

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**



**“Síntesis de isómeros de EDDHA/Fe con uso potencial para la fertilización férrica de especies vegetales”**

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta

QFB Manuel Osvaldo Moreno Leyva

Tijuana, B.C.

Diciembre, 2024

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.371  
Tijuana, B.C., a 22 de noviembre, 2024

C. Manuel Osvaldo Moreno Leyva  
Pasante de: Maestría en Ciencias  
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la  
Opción TESIS


Es propuesto, por los C. Dr. Iván Córdova Guerrero y  
Dra. Laura Janeth Díaz Rubio


Quienes serán los responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido  
al tema "Síntesis de isómeros de EDDHA/Fe con uso potencial para la  
fertilización férrica de especies vegetales"

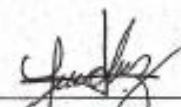
El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. HIPÓTESIS
- III. OBJETIVOS
- IV. ANTECEDENTES
- V. METODOLOGÍAS
- VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS
- VII. CONCLUSIONES
- VIII. BIBLIOGRAFÍA
- IX. APÉNDICES

  
M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez  
Director

  
Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez  
Subdirectora

  
Dr. Iván Córdova Guerrero  
Director De Tesis

  
Dra. Laura Janeth Díaz Rubio  
Co-Directora De Tesis



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQel) por ser mi casa de estudios durante la licenciatura y ahora permitirme realizar mis estudios de maestría.

También quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Iván Córdova por el aprendizaje y guía a lo largo de mi estancia durante la licenciatura y maestría, quien ha servido como un ejemplo a seguir en el cumplimiento de sus metas y siempre aspirando a más.

A mi comité de tesis, a la Dra. Laura Díaz por su guía y apoyo en todo lo posible durante estos años, al Dr. Arturo Estolano por sus valioso apoyo y perspectivas durante mi formación, y al Dr. Daniel Chávez por sus aportaciones y guía que me han desarrollado en un mejor profesionalista.

Al Laboratorio de Agroquímica y Productos Naturales donde adquirí conocimiento a lo largo de los años y a mis compañeros de laboratorio siempre dispuestos a ayudar.

A mi familia por apoyarme durante mis estudios, que me han facilitado mi desarrollo profesional y académico.

## RESUMEN

Este proyecto busca encontrar la relación de las condiciones y metodología en la síntesis de EDDHA/Fe, buscando optimizar su rendimiento, además del diseño de análogos de este compuesto con potencial tratamiento en la corrección de la clorosis férrica.

En la **Introducción** se expone el impacto que la clorosis férrica tiene sobre ciertas regiones, y su efecto en la producción de cultivos agrícolas. Además, se comenta el avance y mejoras en la aplicación de tratamientos para combatir dicho padecimiento en las plantas.

En **Antecedentes** se relata la información relevante y características de la clorosis férrica y sus consecuencias, además, de los principales tratamientos, con énfasis dirigido en el quelato férrico EDDHA/Fe. También se detallan las metodologías sintéticas desarrolladas para su síntesis, y estudios relevantes a partir de los cuales se pueden diseñar nuevas metodologías, o potenciales nuevos quelatos férricos.

En la **Metodología** se explica el procedimiento de la síntesis del quelato férrico EDDHA/Fe, y la del compuesto análogo EDDHNA/Fe, además la mono-protección selectiva de la etilendiamina con Boc, para su uso potencial en la ruta sintética para la obtención del DCHA.

En **Resultados y discusión de resultados** se presenta la síntesis del EDDHA/Fe bajo distintas metodologías sintéticas, además del EDDHNA/Fe, la mono-protección con Boc de etilendiamina para comenzar la ruta sintética del DCHA, así como la caracterización de estos compuestos.

En **Conclusiones** se recapitulan los resultados obtenidos en este proyecto, y se muestra una propuesta para la continuación futura de esta investigación.

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de figuras</b> .....	I
<b>Índice de tablas</b> .....	II
<b>Índice de esquemas</b> .....	III
<b>Anexos</b> .....	IV
<b>Abreviaturas y anexos</b> .....	V
<b>Introducción</b> .....	1-5
<b>Hipótesis</b> .....	6
<b>Objetivo general y específicos</b> .....	7
<b>Antecedentes</b> .....	8-24
Clorosis férrica .....	8-9
Tratamiento de clorosis férrica .....	10-12
EDDHA/Fe .....	12-13
Metodologías sintéticas del EDDHA/Fe .....	13-18
Análogos del EDDHA/Fe .....	18-23
Caracterización con HPLC .....	23-24
<b>Metodología</b> .....	25-30
<b>Resultados y discusión de resultados</b> .....	31-40
<b>Conclusiones</b> .....	41
<b>Bibliografía</b> .....	42-44
<b>Apéndices</b> .....	45-55
Técnicas experimentales .....	45-46
Anexos .....	47-55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Hojas con sintomatología de clorosis férrica .....	<b>1</b>
<b>Figura 2.</b>	Isómeros estructurales del EDDHA .....	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b>	Complejo de EDDHA con metal .....	<b>4</b>
<b>Figura 4.</b>	Hojas de azalea con clorosis férrica .....	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b>	Región con suelo calcáreo .....	<b>9</b>
<b>Figura 6.</b>	Diasterómeros del ( <i>o,o</i> )-EDDHA/Fe: ( $\pm$ )-( <i>o,o</i> )-EDDHA/Fe en la izquierda y el <i>meso</i> -( <i>o,o</i> )-EDDHA/Fe en la derecha .....	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b>	Estructura del ( <i>o,o</i> )-EDDHA, ( <i>o,p</i> )-EDDHA y DCHA .....	<b>19</b>
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma de mezcla de isómeros del EDDHA/Fe, reportado por Klem-Marciniak E. ....	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b>	CCF de fenol y síntesis de EDDHA (visualizado con luz UV de lado izquierdo y revelado químico con vainillina de lado derecho) .....	<b>32</b>
<b>Figura 10.</b>	EDDHA/Fe sintetizado .....	<b>33</b>
<b>Figura 11.</b>	Estructura de EDDHA/Fe .....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b>	EDA mono-Boc sintetizado .....	<b>35</b>
<b>Figura 13.</b>	Estructura de EDA mono-Boc .....	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b>	CCF de 4-nitrofenol y síntesis de EDDHNA (visualizado con luz UV de lado izquierdo y revelado químico con vainillina de lado derecho) .....	<b>37</b>
<b>Figura 15.</b>	EDDHNA sintetizado .....	<b>38</b>
<b>Figura 16.</b>	EDDHNA/Fe sintetizado .....	<b>38</b>
<b>Figura 17.</b>	Estructura de EDDHNA/Fe .....	<b>39</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Agentes quelantes aprobados por el Reglamento (EC) No 2003/2003 .....	<b>11</b>
<b>Tabla 2.</b>	Planteamiento sintético de la síntesis de EDDHA .....	<b>26</b>
<b>Tabla 3.</b>	Planteamiento sintético de la síntesis del EDA mono-Boc .....	<b>28</b>
<b>Tabla 4.</b>	Planteamiento sintético de la síntesis de EDDHNA .....	<b>29</b>
<b>Tabla 5.</b>	Planteamientos sintéticos y rendimientos globales de las 16 reacciones de EDDHA/Fe .....	<b>31</b>

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b>	Síntesis de EDDHA de Kroll (1957) .....	<b>14</b>
<b>Esquema 2.</b>	Síntesis de EDDHA de Dexter (1958) .....	<b>15</b>
<b>Esquema 3.</b>	Síntesis de EDDHA de Petree (1978) .....	<b>16</b>
<b>Esquema 4.</b>	Secuencia sintética del DCHA de López-Rayó (2010) .....	<b>20</b>
<b>Esquema 5.</b>	Metodología para la mono protección con Box del ciclohexano- 1,2-diamina de Servín (2017) .....	<b>22</b>
<b>Esquema 6.</b>	Reacción general de la síntesis de derivados del EDDHA .....	<b>23</b>
<b>Esquema 7.</b>	Reacción general de la síntesis de EDDHA .....	<b>25</b>
<b>Esquema 8.</b>	Quelación del EDDHA para la obtención del EDDHA/Fe .....	<b>27</b>
<b>Esquema 9.</b>	Reacción general de la mono protección con Boc de etilendiamina .....	<b>28</b>
<b>Esquema 10.</b>	Reacción general de la síntesis de EDDHNA .....	<b>29</b>

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Cromatograma de HPLC de EDDHA/Fe .....	<b>47</b>
<b>Anexo 2.</b>	Espectro de infrarrojo de EDDHA/Fe .....	<b>48</b>
<b>Anexo 3.</b>	Cromatograma y espectro de masas de EDA mono-Boc .....	<b>49</b>
<b>Anexo 4.</b>	Espectro de infrarrojo de EDA mono-Boc .....	<b>50</b>
<b>Anexo 5.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EDA mono-Boc .....	<b>51</b>
<b>Anexo 6.</b>	Cromatograma de HPLC de EDDHNA/Fe .....	<b>52</b>
<b>Anexo 7.</b>	Espectro de infrarrojo de EDDHNA .....	<b>53</b>
<b>Anexo 8.</b>	Espectro de infrarrojo de EDDHNA/Fe .....	<b>53</b>
<b>Anexo 9.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de EDDHNA .....	<b>54</b>
<b>Anexo 10.</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de EDDHNA .....	<b>55</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura	Definición	Abreviatura	Definición
<b>AcOEt</b>	acetato de etilo	<b>Boc</b>	dicarbonato de di-ter-butilo
<b>°C</b>	grados Celsius	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ion calcio con estado de oxidación (II)
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	carbonato de calcio	<b>Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	bicarbonato de calcio
<b>CCF</b>	cromatografía en capa fina	<b>CDCl<sub>3</sub></b>	cloroformo deuterado
<b>CEN</b>	Comité Europeo de Normalización	<b>CG/EM</b>	cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	acetonitrilo	<b>cm</b>	centímetros
<b>cm<sup>-1</sup></b>	centímetros recíprocos	<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DCHA</b>	ácido (2-(2-((2-hidroxibenzil) amino) etilamino)-2-(2-hidroxifenil) acético	<b>DCHA/Fe</b>	ácido (2-(2-((2-hidroxibenzil) amino) etilamino)-2-(2-hidroxifenil) acético complejoado con hierro con estado de oxidación (III)
<b>DCM</b>	diclorometano	<b>DMF</b>	dimetilformamida
<b>DMSO</b>	sulfóxido de dimetilo	<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	sulfóxido de dimetilo deuterado
<b>EDA</b>	etilendiamina	<b>EDA mono-Boc</b>	etilendiamina mono-protégida con Boc
<b>EDDHA</b>	ácido etilendiamino N,N'-	<b>EDDHA/Fe</b>	ácido etilendiamino N,N'-di(hidroxifenil)

	di(hidroxifenil) acético		acético complejado con hierro con estado de oxidación (III)
<b>(o-o)-EDDHA</b>	ácido etilendiamino N,N'-di(o-hidroxifenil) acético	<b>(o-o)-EDDHA/Fe</b>	ácido etilendiamino N,N'-di(o-hidroxifenil) acético complejado con hierro con estado de oxidación (III)
<b>(o-p)-EDDHA</b>	ácido etilendiamino N-(o-hidroxifenil)-N'-(p-hidroxifenil) acético	<b>(o-p)-EDDHA/Fe</b>	ácido etilendiamino N-(o-hidroxifenil)-N'-(p-hidroxifenil) acético complejado con hierro con estado de oxidación (III)
<b>(p-p)-EDDHA</b>	ácido etilendiamino N,N'-di(p-hidroxifenil) acético	<b>EDDHNA</b>	ácido etilendiamino N,N'-di[(o-hidroxí-5-nitrofenil) acético
<b>EDDHNA/Fe</b>	ácido etilendiamino N,N'-di[(o-hidroxí-5-nitrofenil) acético complejado con hierro con estado de oxidación (III)	<b>EDDHSA</b>	ácido etilendiamino N,N'-di[(o-hidroxí-5-sulfofenil) acético
<b>EDDHSA/Fe</b>	ácido etilendiamino N,N'-di[(o-hidroxí-5-sulfofenil) acético complejado con hierro con estado de oxidación (III)	<b>Eq</b>	equivalentes molares
<b>Fe</b>	hierro	<b>Fe<sup>2+</sup></b>	hierro con estado de oxidación (II)

<b>Fe<sup>3+</sup></b>	hierro con estado de oxidación (III)	<b>FeCl<sub>3</sub></b>	cloruro férrico
<b>Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> · 9·H<sub>2</sub>O</b>	nitrato férrico nonahidratado	<b>g</b>	gramos
<b>HCl</b>	ácido clorhídrico	<b>HCN</b>	ácido cianhídrico
<b>HCO<sub>3</sub></b>	ion bicarbonato	<b>H<sub>2</sub>O</b>	agua
<b>HPLC</b>	cromatografía de líquidos de alta resolución	<b>Hz</b>	hercios
<b>IR</b>	infrarrojo	<b>K</b>	constante de equilibrio
<b>L</b>	litro	<b>m</b>	posición meta
<b>M</b>	molaridad	<b>M<sup>+</sup></b>	ion molecular
<b>mg</b>	miligramos	<b>MHz</b>	megahercios
<b>mL</b>	mililitros	<b>mm</b>	milímetros
<b>mmol</b>	milimol	<b>mol</b>	mol
<b>m/e</b>	masa sobre carga	<b>N</b>	normalidad
<b>NaOH</b>	hidróxido de sodio	<b>nm</b>	nanómetros
<b>o</b>	posición orto	<b>μL</b>	microlitros
<b>μm</b>	micrómetros	<b>p</b>	posición para
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno	<b>p/p</b>	concentración peso sobre peso
<b>psi</b>	libras (fuerza) por pulgada cuadrada	<b>R<sub>f</sub></b>	factor de retención
<b>RMN</b>	resonancia magnética nuclear	<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	resonancia magnética nuclear de protón
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	resonancia magnética nuclear del isótopo carbono 13	<b>SOCl<sub>2</sub></b>	cloruro de tionilo
<b>TBA<sup>+</sup>OH<sup>-</sup></b>	hidróxido de tetrabutilamonio	<b>TMS</b>	tetrametilsilano
<b>TMSCN</b>	cianuro de trimetilsililo	<b>UV-VIS</b>	ultravioleta-visible

## INTRODUCCIÓN

La presencia de afecciones y patologías en cultivos de especies vegetales es un fenómeno conocido desde el inicio de la agricultura como práctica de los seres humanos. Estas condiciones son consecuencia del desequilibrio homeostático de la especie vegetal, encontrándose entre sus principales causas la infestación por plagas, infecciones por microorganismos patógenos, cambios en las condiciones climatológicas, y entornos químicos desfavorables que puede desencadenar en estrés vegetal, los cuales generalmente tienen un impacto perjudicial en el desarrollo de las plantas si no son tratadas. [1]

Durante el ciclo de vida de las plantas, existe una serie de factores bióticos y abióticos que influyen sobre el estado de salud y desarrollo de las especies vegetales, dentro de las cuales existe una serie de macro y micronutrientes esenciales para su adecuado desarrollo y mantenimiento del estado homeostático. Uno de los factores esenciales que influyen significativamente en el sostenimiento de una condición sana en las plantas, es el consumo del elemento químico hierro (Fe) ya que actúa como catalizador para una serie de procesos metabólicos intrínsecos, además de fungir como un actor primordial en la síntesis de la clorofila, compuesto con importante rol en la fotosíntesis de las plantas. Por tanto, una disrupción en la cantidad necesaria de hierro en la especie vegetal desencadena en una serie de problemas significativos en su desarrollo, derivando en la disminución del rendimiento y calidad de los cultivos, y si no es corregida esta condición, puede llegar hasta su muerte. Esta patología es apreciable visualmente por la pérdida de la pigmentación verde en las hojas más jóvenes de la planta, continuando en las zonas más longevas, adoptando una coloración amarillenta, principal síntoma característico de esta fenomenología, debido a la escasez de clorofila. Este padecimiento posee el nombre de clorosis férrica. [2]



**Figura 1. Hojas con sintomatología de clorosis férrica**

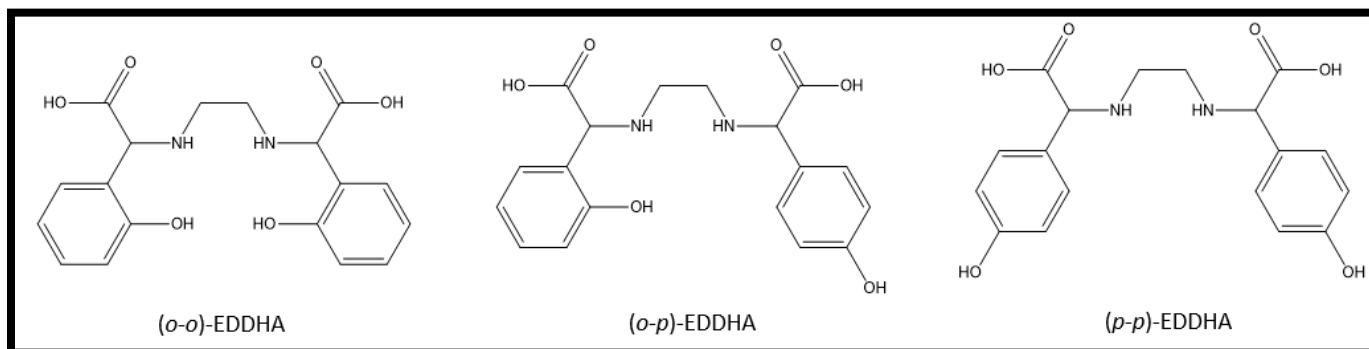
La asimilación del hierro (presente en el sustrato) a través de las raíces de las plantas, está dictada por el estado de oxidación del elemento, en la que solo el  $\text{Fe}^{3+}$  puede ser absorbido después de haber sido reducido en  $\text{Fe}^{2+}$ . Por tanto, a pesar de que el hierro se encuentra ampliamente distribuido en la corteza del planeta y es el cuarto elemento más abundante en esta, las plantas presentan una incapacidad de asimilación si este no se encuentra de forma correcta o se transforma en una sal insoluble, lo cual acontece en suelos alcalinos, especialmente en los calcáreos, como los que se encuentran en zonas con climas áridos y semiáridos. De esta manera, la absorción del hierro por parte de la planta está relacionada con el pH del suelo, ya que, al encontrarse en medio básico, está desfavorecida su asimilación debido a la baja solubilidad del elemento en el sustrato. En conclusión, la clorosis férrica es prevalente en suelos con pH alcalinos. [3]

Esta problemática puede tener un impacto importante en cuanto a la cosecha de los cultivos en la agricultura, perdiendo grandes cantidades de alimento a nivel mundial y contribuyendo de esta manera a la hambruna. Se estima que el aumento de la población va en ascenso, con estimaciones de alcanzar los 8.6 billones de habitantes en 2030, 9.8 billones para 2050, y aproximadamente 11.2 billones para el año 2100 [4], aumentando de esta manera la demanda de producción alimentaria y fomentando de manera paralela el crecimiento de producción agrícola, por lo que el control de la agricultura toma un papel más trascendental.

A causa de este problema, se han utilizado diversos tratamientos para la corrección de la clorosis férrica, que han consistido en la aplicación de sales de hierro tanto en el sustrato como en la parte aérea de las plantas. Sin embargo, si como ya se mencionó anteriormente, la naturaleza del problema no depende de la ausencia de hierro en suelo, sino de su estado no asimilable, este tratamiento resulta inefectivo, sobre todo en los suelos alcalinos. Debido a esto, el tratamiento de primera elección en la actualidad para la clorosis férrica es la aplicación de agentes quelantes de origen sintético capaces de captar los iones de hierro del suelo al formar un complejo químico estabilizado por los distintos enlaces que se forman entre el agente quelante y el metal, aumentando la disponibilidad de hierro por su capacidad de transportar estos iones a las raíces de la planta. Al liberar al hierro en la interfase con las raíces, la planta se encarga de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , forma en la que es asimilado tras su liberación del complejo. Cuando el ion quelado es liberado, los agentes quelantes presentan la capacidad de quelar otros iones presentes en el sustrato, repitiendo este ciclo de quelación, transporte, reducción y absorción, contribuyendo continuamente en la corrección de la clorosis férrica. La capacidad de corregir la clorosis férrica de un agente quelante depende del grado de estabilidad del complejo formado, la cual radica principalmente de la estructura química del agente quelante y del pH del medio. [5]

Entre los agentes quelantes utilizados en el tratamiento de la clorosis férrica, existe una lista de compuestos químicos aprobados por la regulación del parlamento europeo y del consejo (EC) No 2003/2003. En dicha lista se presentan actualmente 12 agentes quelantes, entre los cuales el ácido etilendiamino-N,N'-bis-(*o*-hidroxifenil) acético (EDDHA) es el principal representante por su efectividad, eficiencia, relevancia en la investigación e industria, así como presencia en el mercado. El EDDHA es un compuesto fenólico de origen sintético, con una estructura química con esqueleto de ácido poliamino carboxílico, capaz de formar un complejo estable con el hierro en estado de oxidación (III). [6]

El EDDHA es obtenido a partir de síntesis química, y debido a su efectividad, existe una gama de metodologías y variaciones sintéticas desarrolladas a lo largo de los años en las que generalmente se obtiene una mezcla de isómeros del EDDHA: el *o-o*-EDDHA, *o-p*-EDDHA y el *p-p*-EDDHA, los cuales presentan distintas propiedades en la formación de complejos.



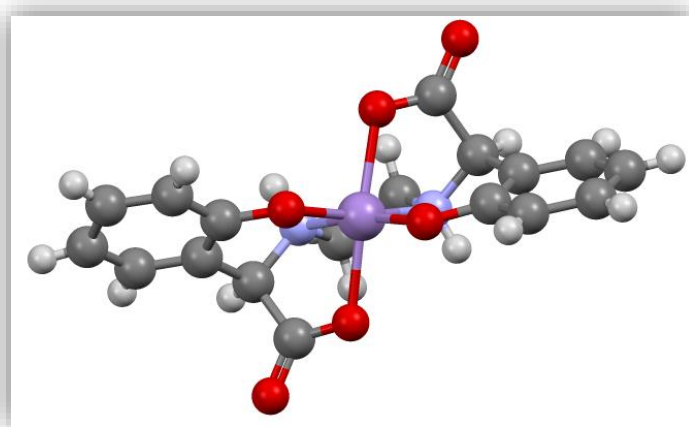
**Figura 2. Isómeros estructurales del EDDHA**

El *o-o*-EDDHA tiene la capacidad de formar seis enlaces con el hierro, debido a la disposición espacial de sus distintos sustituyentes, lo cual le confiere el mayor grado de estabilización entre los tres isómeros, resultando efectivo para tratamiento de síntomas graves de clorosis férrica y su uso a largo plazo. El *o-p*-EDDHA presenta la capacidad de formar cinco enlaces con el hierro, lo que deriva en la obtención de un complejo menos estable que el que forma el isómero *o-o*-EDDHA, por lo que se teoriza que debido a su menor estabilización y naturaleza menos impedida, este logra exponer al  $\text{Fe}^{3+}$  para ser sometido a una reducción de manera más rápida, por lo que el hierro es asimilado con mayor rapidez, resultando adecuado para un tratamiento de índole más urgente, como en casos donde es necesario revertir los estragos de clorosis férrica antes de que estos sean irreversibles. El isómero *p-p*-EDDHA solo puede enlazarse con cuatro enlaces al

hierro, lo que resulta insuficiente para formar un complejo estable, por lo que este isómero resulta carente de propiedades en el tratamiento de clorosis férrica.

En la actualidad, a nivel industrial la metodología patentada por Petree en 1978 [7], para la síntesis del EDDHA ha prevalecido como la ruta sintética más utilizada, la cual consiste en una reacción multicomponente con los reactivos de fenol, etilendiamina, ácido glioxílico en una disolución acuosa al 50% (p/p) e hidróxido de sodio en una disolución acuosa al 50% (p/p), con los respectivos equivalentes molares de 13-0.5-1-1. Esto implica que el fenol funge tanto como reactivo y como disolvente, siendo necesario este exceso (13 equivalentes molares) en la obtención de un mayor rendimiento del producto. La adición de los reactivos sucede a una temperatura aproximada de 45 °C, seguido de un calentamiento bajo sistema de reflujo a 75 °C por 3 horas, obteniendo los tres isómeros estructurales del EDDHA, mediante una reacción modificada de Mannich. Posteriormente es adicionada agua y cloruro de metileno o tetracloruro de carbono para eliminar el exceso de fenol por medio de lavados. Después, se quela el EDDHA, por la adición de 0.7 equivalentes molares de una sal de hierro a temperatura ambiente, buscando ajustar rápidamente el medio de reacción a un pH de 7 con disoluciones acuosas de ácido clorhídrico (HCl) al 37% e hidróxido de sodio (NaOH) al 10%, bajo agitación por 2 horas. Finalmente, el producto obtenido se seca a 80 °C en una estufa para obtener el complejo EDDHA/Fe.

A partir de esta y otras rutas sintéticas, se han patentado distintas metodologías para la formación de EDDHA/Fe, con resultados mixtos en cuanto a rendimientos y en la proporción de isómeros obtenidos, los cuales son una consecuencia del uso de diferentes reactivos, disolventes [8], catalizadores [9], concentraciones [10], orden de adición, procesos de purificación, entre otros, pero que no han logrado superar la rentabilidad de la síntesis de Petree a nivel industrial.



**Figura 3. Complejo de EDDHA con metal**

Debido a que la reacción patentada por Petree y las distintas variaciones que se han diseñado pueden conllevar un exceso considerablemente grande de fenol, el manejo de disolventes halogenados, la obtención de proporciones desfavorables de los isómeros

del EDDHA/Fe de interés y rendimientos bajos globales de reacción, se busca estudiar el efecto e influencia de distintas variables en la reacción química de Petree, buscando obtener una mejora con respecto a las metodologías actuales, optimizando la síntesis del quelato EDDHA/Fe a través de una ruta más redituable en los aspectos de rendimiento, tiempo y economía.

Además, se busca diseñar nuevos agentes quelantes con la capacidad de formar complejos con hierro [11], con potencial para actuar como tratamientos en la corrección de la clorosis férrica en cultivos agrícolas. También se busca iniciar la generación de otras metodologías sintéticas en la obtención de agentes quelantes que impliquen una metodología global más eficiente en la obtención de quelatos férricos.

## HIPÓTESIS

- Las metodologías sintéticas de reacción multicomponente facilitarán el desarrollo de estructuras análogas al fertilizante EDDHA/Fe.

## OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

### Objetivo general:

- Sintetizar compuestos de tipo EDDHA/Fe que puedan ser utilizados como fertilizantes en plantas con déficit de hierro.

### Objetivos específicos:

- Sintetizar los isómeros *orto-orto*, *orto-para*, y *para-para* del EDDHA/Fe mediante una reacción multicomponente para optimizar los rendimientos de reacción.
- Sintetizar análogos del fertilizante EDDHA/Fe mediante una reacción multicomponente.
- Caracterizar por técnicas espectroscópicas y espectrofotométricas los productos obtenidos.

## ANTECEDENTES

### COLORIS FÉRRICA

El adecuado desarrollo y funcionamiento de las especies vegetales es dependiente de las condiciones climatológicas y de cantidades variables de macro y micronutrientes, como el hierro (Fe), el cual es considerado un microelemento esencial. Debido al importante rol que tiene el hierro como catalizador en reacciones metabólicas dentro de las plantas, y especialmente por ser un elemento necesario en la síntesis de la clorofila, pigmento necesario en las plantas para poder llevar a cabo el proceso fotosintético, la asimilación de este elemento es fundamental. El hierro solo puede ser absorbido a través de las raíces de las plantas, después de llevar a cabo la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  mediante una reacción enzimática. Si la absorción del hierro no puede llevarse a cabo por su ausencia o porque no se encuentra en estado asimilable, la especie vegetal experimentará una gama de afecciones sintomatológicas y fisiológicas, conocida como clorosis férrica. [12]

Este estado clorótico patológico en especies vegetales, debido a la falta de hierro, ocasiona una serie de estragos morfológicos y fisiológicos, resultando en una calidad y rendimientos inferiores que, si no es corregido, eventualmente conduce a la muerte de la especie vegetal, impactando significativamente en los cultivos en la práctica agrícola. La clorosis férrica ilustra su indicio con la aparición de una pigmentación amarillenta en las hojas jóvenes de la planta, seguido de las zonas intervenales hasta las regiones más maduras de las hojas. Esta afección nutricional se encuentra ampliamente distribuida en regiones con condiciones de suelos alcalinos, como en los suelos calcáreos, es decir, suelos con elevadas cantidades de carbonato de calcio. [13]



**Figura 4. Hojas de azalea con clorosis férrica**

Esta disponibilidad del hierro en el sustrato está condicionada por una serie de factores y condiciones, en la que el pH del suelo es el factor más significativo. En suelos con pH ácidos, el hierro se encuentra ampliamente disponible para ser absorbido, mientras que, en suelos con pH alcalinos, este se encuentra limitado en una forma no asimilable, generalmente insoluble para las plantas. En suelos calcáreos, característicos por la elevada presencia de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), los cuales generalmente presentan un pH a partir de 7.8, la disponibilidad del hierro desciende notablemente debido a que los carbonatos presentes impiden la reducción del hierro (III) a hierro (II). Además, el carbonato de calcio contribuye al aumento de la alcalinidad en el sustrato, como consecuencia de una serie de reacciones químicas en la que este reacciona con agua y dióxido de carbono, generando bicarbonato de calcio [ $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ].

El bicarbonato de calcio se disocia en medio acuoso generando iones  $\text{Ca}^{2+}$  y dos moles de ion bicarbonato,  $\text{HCO}_3^-$ , el cual reacciona con los protones presentes en el suelo generando dióxido de carbono y agua. Esto dirige la reacción global hacia la producción de agua, la cual se disocia liberando protones que reaccionan con el ion bicarbonato, en la que a su vez genera iones hidróxido, suscitando un aumento en la alcalinidad del suelo. [14]



**Figura 5. Región con suelo calcáreo**

Otra de las causas principales de clorosis férrica, es la competencia de índole antagonista con otros micronutrientes presentes en el suelo, como ocurre principalmente con los elementos de zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu) y cobalto (Co). [13]

El tipo de suelo y sus características mecánicas y fisicoquímicas que restringen el crecimiento de las raíces, y las consecuencias que derivan de no abarcar una mayor área para la absorción de nutrientes, el anegamiento que limita el consumo de oxígeno por parte de las plantas, necesario para su desarrollo, son otros escenarios en los que la clorosis férrica puede desarrollarse.

## TRATAMIENTOS PARA LA CLOROSIS FÉRRICA

Los primeros tratamientos de la clorosis férrica consistieron en la aplicación de distintas sales de hierro por vía foliar o aplicación en el sustrato, sin embargo, este tratamiento resulta inefectivo en suelos alcalinos debido a que el hierro se encuentra de forma insoluble, lo que imposibilita su absorción por las raíces independientemente de la cantidad de hierro presente, lo cual puede resultar en repetidas aplicaciones de tratamiento sin corrección del padecimiento. [13]

Como consecuencia de la falta de un tratamiento efectivo, se desarrollaron soluciones en base a la aplicación de agentes quelantes, que poseen la capacidad de formar complejos con metales pequeños como el hierro y con otros micronutrientes. Estos agentes quelantes actúan formando un complejo a través de varios enlaces químicos con el metal, el cual actúa como un ácido de Lewis. La naturaleza química estructural del agente quelante y las condiciones de pH del medio resultan en complejos con distintos grados de estabilidad. En el tratamiento de clorosis por deficiencia de hierro, el agente quelante transporta el hierro en forma de complejo, aumentando su solubilidad y liberándolo a las raíces de las plantas, en las que se expone al hierro con estado de oxidación (III) y se somete a una reducción, generando el hierro con estado de oxidación (II), el cual es absorbido a través de una proteína transportadora presente en las raíces. Este efecto suele repetirse una vez que el hierro es absorbido por la planta, en la que el agente quelante es capaz de formar un complejo con otro átomo de hierro, o con otro metal presente en el sustrato, repitiendo el ciclo de forma continua. [14]

Hoy en día, el uso de agentes quelantes como fertilizantes es el tratamiento de primera elección para la corrección de clorosis férrica en suelos alcalinos y calcáreos, y su legislación y regulación queda relegada a las autoridades legislativas correspondientes de cada región. Entre las distintas autoridades encargadas de esta regulación en la agricultura, la Comisión Europea presenta el Reglamento (EC) No. 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, en donde establece que el producto debe contener al menos un 80% de hierro en forma de quelato soluble en agua y que, de ese contenido, un mínimo del 50% debe estar quelado específicamente con un agente quelante aprobado y disuelto en agua. Esto asegura la disponibilidad y eficacia del hierro para su absorción por las plantas.

Actualmente, son 12 agentes quelantes los aprobados por el Reglamento (EC) No. 2003/2003, que regula y aprueba los quelatos férricos para su uso como fertilizante dentro de la práctica agrícola.

Número	Designación	Designación alternativa	Fórmula química	Número CAS
1	Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	$C_{10}H_{16}O_8N_2$	60-00-4
2	Ácido 2-hidroxi-etilendiaminotriacético	HEEDTA	$C_{10}H_{18}O_7N_2$	150-39-0
3	Ácido dietilentriaminopentaacético	DTPA	$C_{14}H_{23}O_{10}N_3$	67-43-6
4	Ácido etilendiamino-N,N'-di[(orto-hidroxifenil)acético]	(o,o)-EDDHA	$C_{18}H_{20}O_6N_2$	1170-02-1
5	Ácido etilendiamino-N-[(orto-hidroxifenil)acético]-N'-[(para-hidroxifenil)acético]	(o,p)-EDDHA	$C_{18}H_{20}O_6N_2$	475475-49-1
6	Ácido etilendiamino-N,N'-di[(orto-hidroximetilfenil)acético]	(o,o)-EDDHMA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$	641632-90-8
7	Ácido etilendiamino-N-[(orto-hidroximetilfenil)acético]-N'-[(para-hidroximetilfenil)acético]	(o,p)-EDDHMA	$C_{20}H_{24}O_6N_2$	641633-41-2
8	Ácido etilendiamino-N,N'-di[(5-carboxi-2-hidroxifenil)acético]	EDDCHA	$C_{20}H_{20}O_{10}N_2$	85120-53-2
9	Ácido etilendiamino-N,N'-di[2-hidroxi-5-sulfofenil)acético] y sus productos de condensación	EDDHSA	$C_{18}H_{20}O_{12}N_2S_2 + n*(C_{12}H_{14}O_8N_2S)$	57368-07-7 y 642045-40-7
10	Ácido iminodisuccínico	IDHA	$C_{18}H_{11}O_8N$	131669-35-7
11	Ácido etilendiamino-N,N'-di(2-hidroxibenzil) N,N'-diacético	HBED	$C_{20}H_{24}N_2O_6$	35998-29-9
12	Ácido [S,S]-etilendiaminodisuccínico	(S,S)-EDDS	$C_{10}H_{16}O_8N_2$	20846-91-7

**Tabla 1. Agentes quelantes aprobados por el Reglamento (EC) No 2003/2003**

Estos agentes quelantes son: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 2-hidroxi-etilendiaminotriacético (HEEDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendiamino-N,N'-di[(orto-hidroxifenil)acético] ((o,o)-EDDHA), ácido etilendiamino-N-[(orto-hidroxifenil)acético]-N'-[(para-hidroxifenil)acético] ((o,p)-EDDHA), ácido etilendiamino-N,N'-di[(orto-hidroximetilfenil)acético] ((o,o)-EDDHMA), ácido etilendiamino-N-[(orto-hidroximetilfenil)acético]-N'-[(para-hidroximetilfenil)acético] ((o,p)-EDDHMA), ácido etilendiamino-N,N'-di[(5-carboxi-2-hidroxifenil)acético] (EDDCHA), ácido etilendiamino-N,N'-

di[2-hidroxi-5-sulfofenil)acético] y sus productos de condensación (EDDHSA), ácido iminodisuccínico (IDHA), ácido etilendiamino-N,N'-di(2-hidroxibenzil) N,N'-diacético (HBED) y el ácido [S,S]-etilendiaminodisuccínico ((S,S)-EDDS). Todos estos compuestos químicos (a excepción del IDHA) presentan un esqueleto estructural de ácido poliamino carboxílico, sin embargo, el principal representante entre estas moléculas es el (*o,o*)-EDDHA, debido a su efectividad, eficiencia y especialmente por su capacidad de formar complejos con hierro muy estables que logran corregir la clorosis hasta en pH de 11.5. Este agente quelante forma un complejo con el  $\text{Fe}^{3+}$ , dando lugar al quelato férrico conocido como (*o,o*)-EDDHA/Fe, el más ampliamente utilizado en la actualidad. [15]

## EDDHA/Fe

El EDDHA es un agente quelante de origen sintético, por lo que su obtención estriba únicamente de su síntesis química, la cual, dependiendo de la metodología realizada, generalmente suelen obtenerse una mezcla de diferentes productos, generando en proporción mayoritaria tres isómeros constitucionales: (*o,o*)-EDDHA, (*o,p*)-EDDHA y (*p,p*)-EDDHA. En menor proporción suelen encontrarse otros subproductos, resultado de reacciones de policondensación, material de partida que no reaccionó, entre otros; actualmente la totalidad de su composición química es desconocida. [16]

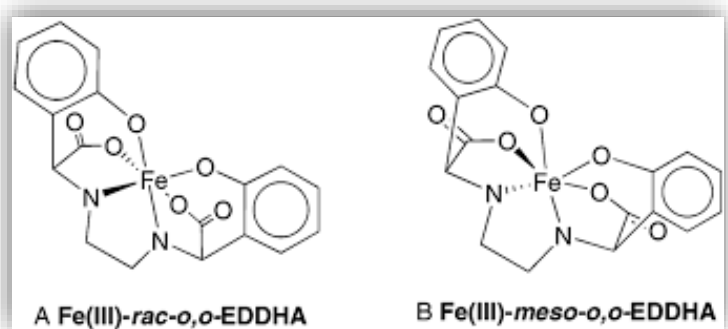
La proporción obtenida respecto estos tres isómeros constitucionales del EDDHA, depende tanto de la metodología sintética realizada, así como de sus condiciones de reacción. Debido a las diferencias estructurales de estos isómeros, cada uno de ellos presentan distintas propiedades físicas, químicas y por tanto en su capacidad de formar complejos con el hierro y otros metales, que a su vez resulta en distintos grados de corrección en el tratamiento de clorosis férrica.

La principal diferencia entre cada isómero del EDDHA, reside en la constante de estabilidad del complejo (K) que forma con determinado metal en un pH determinado. Para cada isómero, el número de enlaces que establecen los distintos grupos funcionales con el metal es el principal factor que contribuye en la estabilidad del complejo formado. El isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe es conocido por su alta estabilidad con el hierro mediante seis enlaces, obteniendo una  $K=10^{35}$ , siendo este el isómero más estable de los tres. Este isómero presenta dos diasterómeros, el *meso*-(*o,o*)-EDDHA/Fe, y el ( $\pm$ )-(*o,o*)-EDDHA/Fe, los cuales a su vez presentan propiedades específicas.

El isómero (*o,p*)-EDDHA/Fe logra estabilizar al hierro a través de cinco enlaces, obteniendo un complejo con una  $K=10^{29}$ , por lo que su estabilidad es significativamente menor en contraste con el (*o,o*)-EDDHA/Fe. El isómero (*p,p*)-EDDHA únicamente es capaz de interactuar con el hierro con cuatro enlaces, los cuales no son suficientes para formar un complejo estable, por lo que este isómero carece de propiedades en el tratamiento de clorosis férrica. [13][17][18]

La estabilidad de cada quelato de los isómeros del EDDHA para la corrección de la clorosis férrica ha impactado directamente en su aplicación, siendo utilizado el (*o,o*)-EDDHA/Fe en cultivos vegetales de mayor gravedad donde es necesaria una aplicación a largo plazo, debido a la liberación gradual que este presenta. Por otro lado, el uso del (*o,p*)-EDDHA/Fe es preferido cuando se necesita una corrección más urgente, debido a que este isómero libera el hierro más rápido que el isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe, al poseer una constante de estabilidad más pequeña, e interactuando con mayor rapidez con la enzima hierro quelato reductasa.

Por estas características, generalmente se busca la presencia mayoritaria tanto del isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe y (*o,p*)-EDDHA/Fe dentro de la mezcla de productos del EDDHA/Fe. [9]

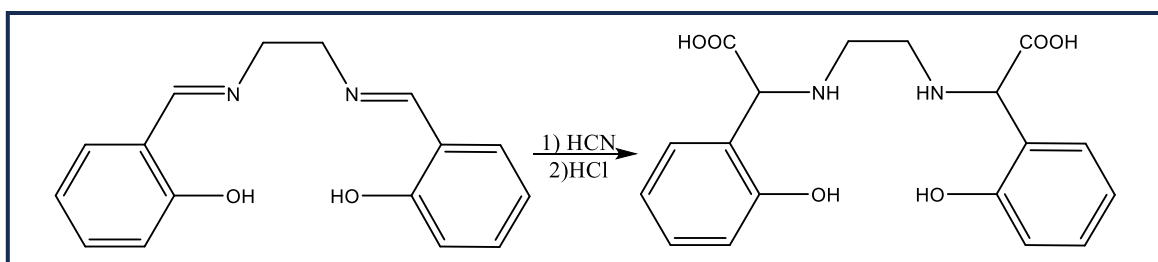


**Figura 6. Diasterómeros del (*o,o*)-EDDHA/Fe: ( $\pm$ )-(*o,o*)-EDDHA/Fe en la izquierda, y el meso-(*o,o*)-EDDHA/Fe en la derecha**

## METODOLOGÍAS SINTÉTICAS DEL EDDHA/Fe

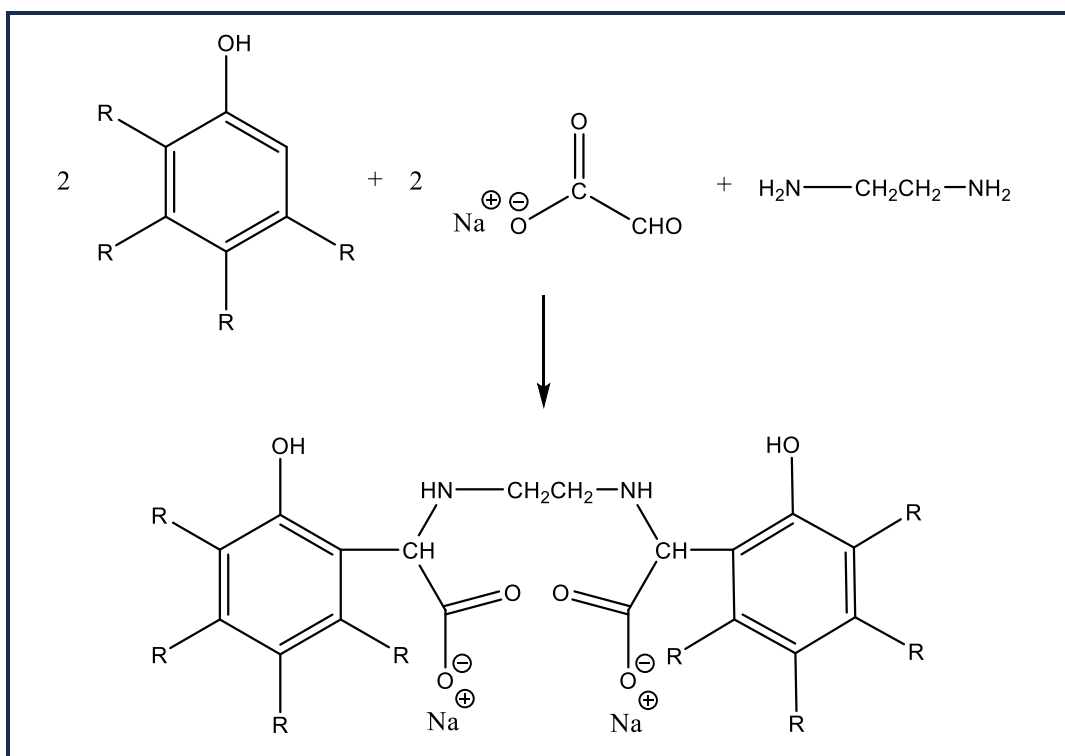
Distintas metodologías sintéticas para la formación del quelato EDDHA/Fe han sido desarrolladas y estudiadas a lo largo de los años, siempre buscando diseñar una metodología superior a las precedentes en la búsqueda de obtener un producto con alto rendimiento, en la que prevalezca la formación de los isómeros (*o,o*)-EDDHA/Fe y (*o,p*)-EDDHA/Fe, pero no la del isómero (*p,p*)-EDDHA ni de subproductos. Además, se ha buscado el reemplazo o disminución de la cantidad de reactivos y disolventes dañinos para los seres vivos y el medio ambiente, buscando alcanzar un proceso industrial rentable en la síntesis de este quelato férrico [10].

La primera metodología para la obtención del EDDHA/Fe fue desarrollada por Kroll en 1957 [19]. Esta ruta sintética consiste en la reacción de un mol de salicilaldehído con dos moles de etilendiamina para la formación de una base de Schiff. Después se adicionan dos moles de ácido cianhídrico (HCN) obteniendo un compuesto dinitrilo, el cual se hidroliza con una solución concentrada de ácido clorhídrico a una temperatura de 40 °C, obteniendo un clorhidrato de la amida. Posteriormente, se neutraliza el medio de reacción hasta un pH aproximado de 4, favoreciendo la precipitación del EDDHA, el cual se disuelve en una solución de amonio diluido y se ajusta nuevamente el pH a 4, volviendo a generar el precipitado del producto en su purificación. La generación del quelato férrico resulta de la combinación del hierro, que se adiciona al EDDHA disuelto en medio acuoso.



**Esquema 1. Síntesis de EDDHA de Kroll (1957)**

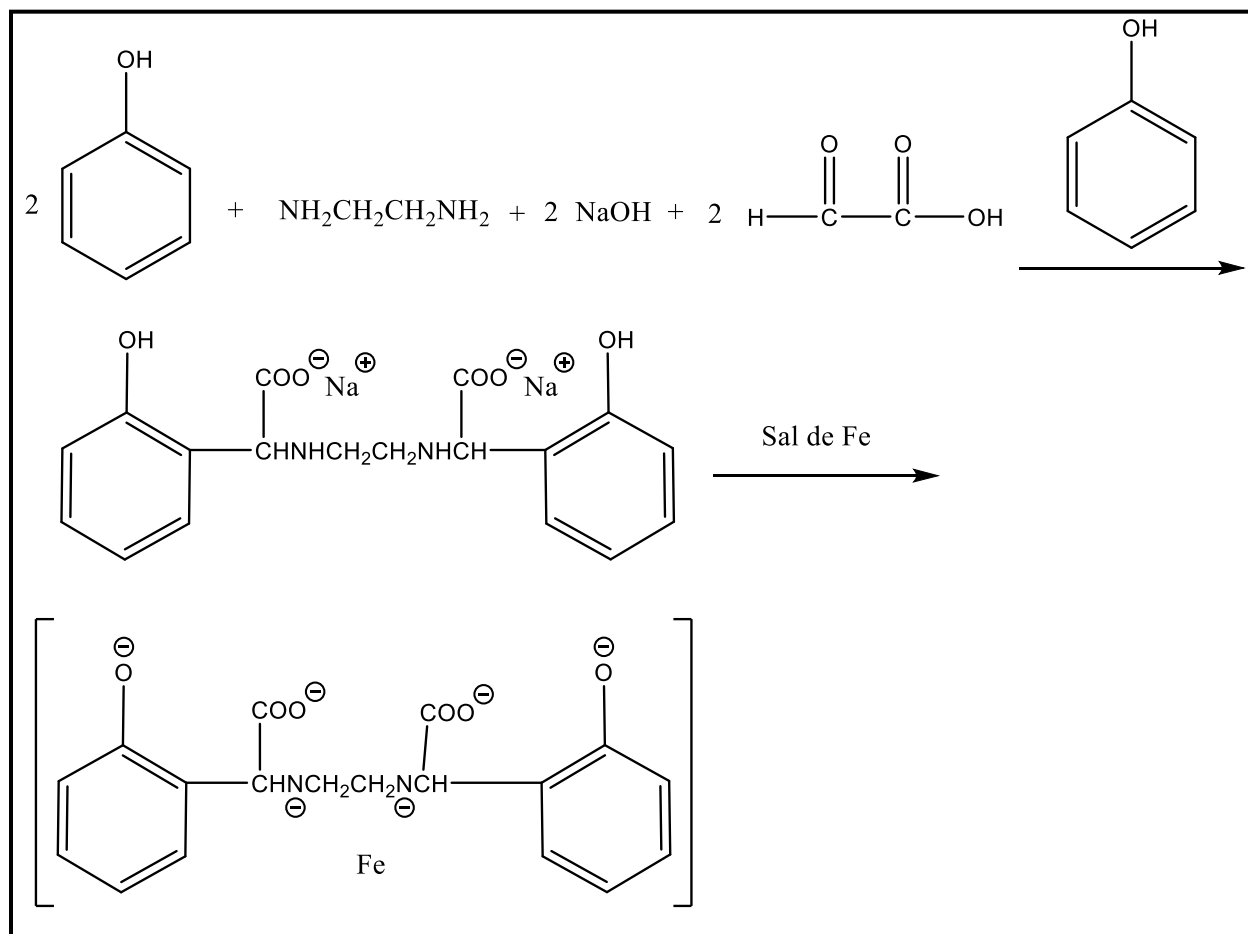
El siguiente año (1958) [20], Dexter diseñó y patentó una metodología distinta, con notables ventajas a la de Kroll, en donde se descartó el uso de ácido cianhídrico, un reactivo altamente tóxico y de manejo especial. Además, esta nueva ruta consiste en una reacción de un solo paso entre etilendiamina, glioxilato de sodio y fenol, o algún derivado de este último que se encuentre sustituido por átomos de halógeno, ácido sulfónico, grupos hidroxilo, carboxilo, o alquilo, en donde el fenol actúa tanto como reactivo y disolvente, pero también puede ser reemplazado de manera parcial como disolvente por metanol, etanol, o alcohol isopropílico. Las condiciones de esta reacción multicomponente mantienen un pH aproximado de 8.5 del medio de reacción, con rango de temperatura entre 70-100 °C y agitación por 7 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el exceso de fenol es removido mediante una destilación. Finalmente, el EDDHA obtenido es quelado mediante una solución acuosa de hierro. A pesar de la innovadora metodología desarrollada, la proporción de los isómeros obtenidos en la mezcla de productos suelen ser variable, reportando el (*p,p*)-EDDHA frecuentemente como el isómero mayoritario (aproximadamente entre 80-90%).



**Esquema 2. Síntesis de EDDHA de Dexter (1958)**

Años más tarde, Petree (1978) [7] optimizó la metodología sintética de Dexter, buscando generar una ruta en la que predomine la obtención del isómero (*o,o*)-EDDHA. Petree teorizó que el disolvente de reacción juega un papel vital en la reactividad de los reactivos, donde la solvatación de las especies iónicas medida por la constante dieléctrica de cada disolvente en particular, puede fomentar la generación de los isómeros del EDDHA de manera selectiva. De esta manera, encontró diversos resultados según el disolvente empleado. Cuando utilizó agua, la obtención del isómero (*p,p*)-EDDHA es predominante, pero cuando utilizó fenol como reactivo y a la vez como disolvente, la generación del isómero (*o,o*)-EDDHA en sus dos formas diastereoméricas fue mayoritaria (aproximadamente 85%), la cual, posteriormente se somete a una quelación con una sal de hierro en un medio con pH básico.

La metodología patentada por Petree también menciona la sustitución del fenol como reactivo en la que se puede seleccionar entre compuestos fenólicos con sustituyentes enlazados directamente en el anillo aromático, los cuales pueden ser átomos de un halógeno, alquilo como metilo y etilo, además de sustituyentes hidroxilo, carboxilo, sulfo, y acetilo.



**Esquema 3. Síntesis de EDDHA/Fe de Petree (1978)**

La reacción química reportada para la síntesis del EDDHA/Fe se lleva a cabo en una reacción multicomponente que consiste en el uso de fenol fundido, etilendiamina, una disolución acuosa diluida de hidróxido con un metal y una disolución acuosa diluida de ácido glioxílico. La reacción se somete a calentamiento con un rango de temperatura entre 45 y 80 °C, bajo agitación constante por 2-16 horas. Se menciona que idealmente, la reacción puede llevarse a cabo entre 70 y 75 °C por un tiempo de 2-4 horas. La estequiometría detallada establece 13 equivalentes molares para el fenol, 0.5 para etilendiamina, 1 para la base y 1 para el ácido glioxílico, el fenol se encuentra en exceso para cumplir con su rol dual de reactivo y disolvente.

Posteriormente, se lleva a cabo un proceso de purificación de la mezcla de productos mediante lavados con un disolvente de naturaleza no polar que elimine el exceso de fenol que no reaccionó, mientras que el EDDHA se encontraría disuelto en una fase acuosa ya que este es altamente soluble en medio acuoso.

La quelación del EDDHA se realiza en medio acuoso, en donde debe prevalecer un pH aproximado de 7 después de la adición de 0.7 equivalentes molares de una sal de hierro. Petree establece el uso de sales férricas de cloruro o sulfato, generando el quelato férrico del EDDHA en solución, la cual es secada hasta la obtención de un polvo de coloración rojo oscuro, característica del EDDHA/Fe.

Petree comenta dentro de su patente un rendimiento global de reacción del 60%, en la que predomina el isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe, el cual se encuentra quelando aproximadamente el 80% del hierro. Esta metodología mejorada permitió la adaptación de esta ruta sintética a nivel industrial para la producción a gran escala del EDDHA/Fe, hasta la actualidad, sin embargo, presenta desventajas en cuanto al uso excesivo de fenol, disolventes y el rendimiento.

En 1989, Jullien [8] buscó optimizar la metodología reportada por Petree, enfocándose en disminuir el exceso estequiométrico de fenol utilizado, el cual conlleva un costo económico en su disposición y tratamiento, por lo que Julien planteó en su patente reemplazar parcialmente el uso de fenol como disolvente por otros de naturaleza aromática no polar en conjunto con el uso de un catalizador durante la síntesis. De esta manera, Julien mantuvo la adición de los reactivos etilendiamina, una base, ácido glioxílico y fenol, además de un disolvente aromático entre los cuales recomendó tolueno, xileno y benceno, con una preferencia por el tolueno debido a su menor toxicidad y economía. Los catalizadores recomendados en la patente son sales de hierro, manganeso, zinc, cobalto, magnesio, níquel y bario, los cuales deben manejarse como óxidos o hidróxidos.

Las condiciones de reacción reportadas por Julien son temperaturas de 85-95 °C por 1 a 10 horas de agitación, con los equivalentes molares estipulados por Petree, a excepción de 2.5 para fenol y 0.001-0.05 moles del catalizador seleccionado por cada mol de ácido glioxílico.

Después de la síntesis del EDDHA, se adiciona agua para generar una separación de la fase orgánica y la acuosa. A partir de la fase acuosa, se lleva a cabo la quelación mediante la adición de una sal férrica en forma de cloruro, nitrato, sulfato o carbonato, manejando un exceso estequiométrico aproximado entre 10% a 20% y buscando estabilizar el pH de la fase entre 6.5-7, obteniendo el quelato férrico con una prevalencia del 80% del isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe y rendimientos aproximados a 60%, según la patente.

Más tarde, en el año 2002 [21], Alcázar se encargó de diseñar una metodología sintética para la obtención del isómero (*o,o*)-EDDHA de elevada pureza, la cual patentó y

representa la síntesis utilizada en la actualidad para la obtención de este isómero puro. Este producto, resultante de esta síntesis se utiliza como estándar para caracterización por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). La síntesis se basó en la metodología de Kroll, con la sustitución de HCN por cianuro de trimetilsililo (TMSCN), por lo que esta metodología tampoco es apta para su empleo a nivel industrial.

Otro avance en el estudio del EDDHA y sus isómeros fue desarrollado por McKenzie, en 2008 [22], el cual patentó un procedimiento que describe la obtención mayoritaria en la mezcla final de los isómeros (*o,o*)-EDDHA y (*o,p*)-EDDHA, y esto puede ser alcanzado utilizando únicamente un exceso de fenol entre 2 a 5 equivalentes molares, además del uso de agua como disolvente a una proporción aproximada entre 15-30% de disolvente total. Los equivalentes molares mencionados consisten en un rango de 4 a 10 para el fenol, 0.5 a 0.55 para el ácido glioxílico, 0.95 a 1.1 para la base, la cual se recomienda sea hidróxido de sodio, y 0.75-1.25 para la etilendiamina. Las condiciones de reacción reportadas consisten en una temperatura entre 45-85 °C.

McKenzie encontró que durante la síntesis de EDDHA, mientras más bajo sea el pH del medio (especialmente en pH ácidos o por lo menos menores a 7) durante el calentamiento, se favorece la obtención del isómero (*o,o*)-EDDHA.

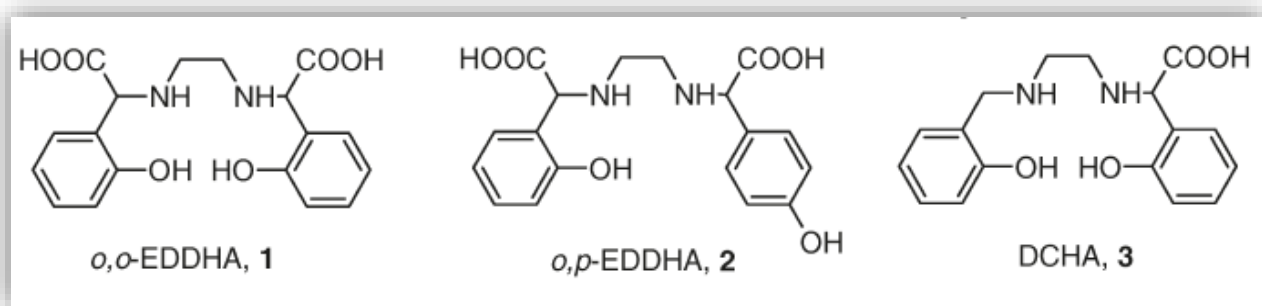
## ANÁLOGOS DEL EDDHA/Fe

La capacidad del quelato EDDHA/Fe y sus isómeros en el tratamiento de la clorosis férrica, ha sentado la base para el diseño de nuevos agentes quelantes, los cuales guardan semblanza con la distribución estructural y espacial de este. De esta forma se ha buscado diseñar, sintetizar y evaluar nuevos agentes quelantes que derivan de cambios estructurales del (*o,o*)-EDDHA/Fe y del (*o,p*)-EDDHA/Fe, esperando obtener quelatos férricos en los que la eficacia, eficiencia y síntesis, involucren procesos y metodologías más rentables en cuanto a rendimiento, economía, tiempo y seguridad.

Uno de estos análogos fue desarrollado, sintetizado y estudiado por López-Rayó, en 2010 [23]. Este compuesto recibe el nombre de ácido (2-(2-((2-hidroxibenzil) amino) etilamino)-2-(2-hidroxifenil) acético (DCHA). El DCHA fue diseñado a partir del conocimiento de la naturaleza altamente estable del (*o,o*)-EDDHA/Fe, consecuencia de la estabilización de este elemento mediante seis enlaces del EDDHA, particularmente por la presencia de los grupos fenolatos, que terminan confiriéndole a este isómero una aplicación más específica para un tratamiento prolongada, y también del conocimiento

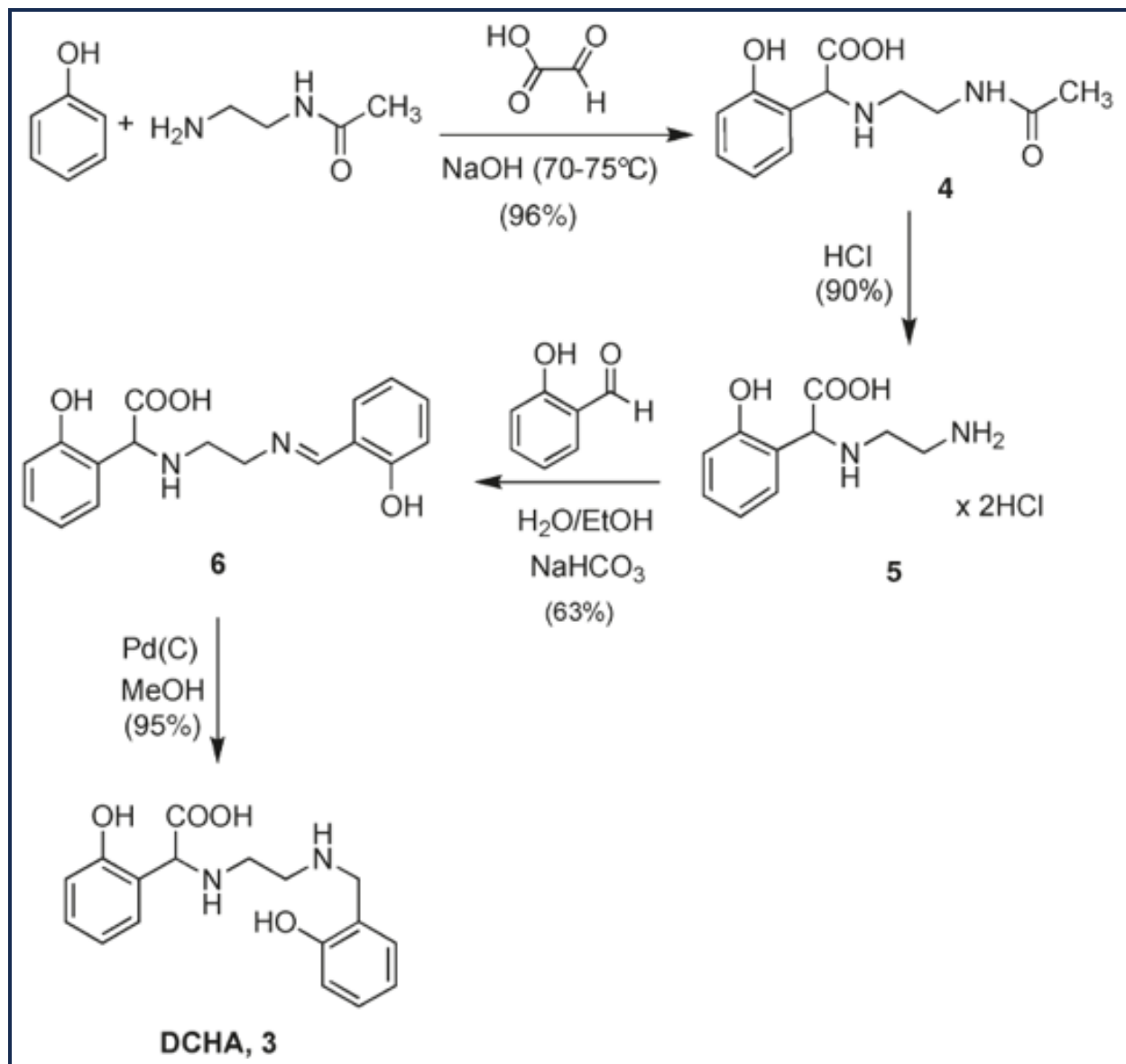
de la menor estabilidad del (*o,p*)-EDDHA/Fe, debido a su estructura penta-coordinada en la que uno de los grupos hidroxilo en el anillo aromático se encuentra inhabilitado para enlazarse con el hierro, lo que le permite al quelato liberar los iones de manera más inmediata a la planta, permitiendo tratar más rápido los síntomas de clorosis férrica.

El diseño de la estructura del complejo DCHA/Fe, consiste en dos grupos fenolatos en posición *orto-orto* (como en el (*o,o*)-EDDHA/Fe) que contribuyen en la estabilización del hierro. Además, al presentar solo uno de los grupos carboxilato aparte de dos grupos amino en su estructura, el DCHA/Fe forma cinco enlaces con el hierro, por lo que la naturaleza abierta de este complejo brinda un equilibrio entre la liberación rápida del metal por su disposición no impedida, además de una estabilización significativa por los grupos fenolatos presentes en posición *orto-orto*, por lo que este complejo presenta una estabilización intermedia entre los isómeros (*o,o*)-EDDHA/Fe y (*o,p*)-EDDHA/Fe, pero con mayor rapidez en la corrección de clorosis férrica.



**Figura 7. Estructuras del (*o,o*)-EDDHA, (*o,p*)-EDDHA, y DCHA**

López-Rayó reporta una secuencia sintética que consiste en cuatro reacciones químicas para la obtención del producto DCHA, como se ilustra en el Esquema 4. La primera reacción es multicomponente con la adición de 10.62 mmol de etilendiamina monoacetilada a un matraz bola con 265.6 mmol de fenol fundido y 7.97 mmol de NaOH como una disolución acuosa al 50% (p/p) bajo agitación magnética y una temperatura aproximada de 30 a 35°C. En seguida, se adicionan 10.62 mmol de ácido glioxílico, a partir de una disolución acuosa al 50% (p/p). Posteriormente, la reacción se calienta a un rango de temperatura entre 70 a 75°C por un tiempo de 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se mantiene la agitación por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 60 mL de agua y tres lavados con 20 mL de diclorometano cada uno. Finalmente, el disolvente se elimina reportando un rendimiento del 96% para la síntesis de la amida (**4**).



**Esquema 4. Secuencia sintética del DCHA de López-Rayó (2010)**

En la segunda reacción, la acetoamida (**4**) se hidroliza con 60 mL de una solución de ácido clorhídrico al 15% (v/v), a reflujo y agitación por dos horas, y se elimina el disolvente para la obtención del clorhidrato de la amina con un rendimiento del 90% (**5**).

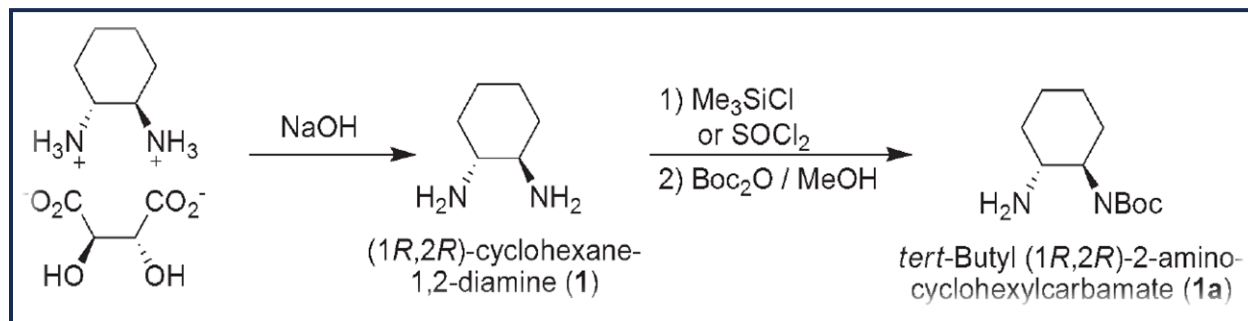
En la tercera reacción, se reporta la adición de 1.06 mmol del clorhidrato de la amina (**5**) obtenida anteriormente, la cual se disuelve en 3 mL de agua y se le adiciona una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% hasta alcanzar un pH de 7.2. Enseguida se lleva a cabo la síntesis de la imina correspondiente, con la adición de 1.06 mmol de salicilaldehído disueltos en 1 mL de etanol absoluto. Esta mezcla de reacción se mantiene en agitación

por 1 hora a temperatura ambiente, ocasionando la precipitación de la imina (**6**) en el medio de reacción, en el que se reporta un 63% de rendimiento. Finalmente, una suspensión de 0.79 mmol de la imina (**6**) se agita en conjunto con un catalizador de paladio (Pd) al 10%, en una disolución con 30 mL de metanol al 5% (p/p), bajo agitación y a 40 psi con hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>) por 6 horas. Después, el catalizador se remueve mediante una filtración y el disolvente se elimina a través de una destilación a presión reducida. El producto DCHA, es obtenido mediante esta aminación reductiva, con un 95% de rendimiento en este último paso.

La secuencia sintética del DCHA comienza con la utilización del reactivo etilendiamina monoacetilada, el cual no suele encontrarse disponible en los laboratorios, sin embargo, la generación de este es necesario para la síntesis reportada del análogo. La obtención de este reactivo puede ser sustituida mediante una mono-protección selectiva con Boc, a la etilendiamina para posteriormente continuar con la reacción multicomponente reportada, utilizando a la etilendiamina mono-protegida con Boc (EDA mono-Boc), seguido de la eliminación del grupo protector mediante una hidrólisis ácida, después una condensación con salicilaldehído, y finalmente una reducción obteniendo el DCHA.

Además, la penúltima reacción sintética antes de la obtención del DCHA, consiste en la generación de una imina. Las iminas pueden formar complejos con propiedades antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, antidiabéticas, antibacterianas, anticancerígenas, y anti-HIV, entre otras [24]. Sin embargo, esta imina no ha sido evaluada en su capacidad de quelación de hierro en el tratamiento de clorosis férrica de especies vegetales.

Existen diferentes metodologías reportadas para llevar a cabo la mono acetilación selectiva de diaminas, pero generalmente se obtienen crudos de reacción con productos mono y di acetilados, además de otros subproductos que conllevan un proceso complicado de purificación y con rendimientos variados [25]. Sin embargo, una metodología reportada por Servín en 2017 [26], demuestra un procedimiento sencillo en la mono protección selectiva de una serie de diaminas simétricas, utilizando Boc, como grupo protector.



**Esquema 5. Metodología para la mono protección con Boc del ciclohexano-1,2-diamina de Servín (2017)**

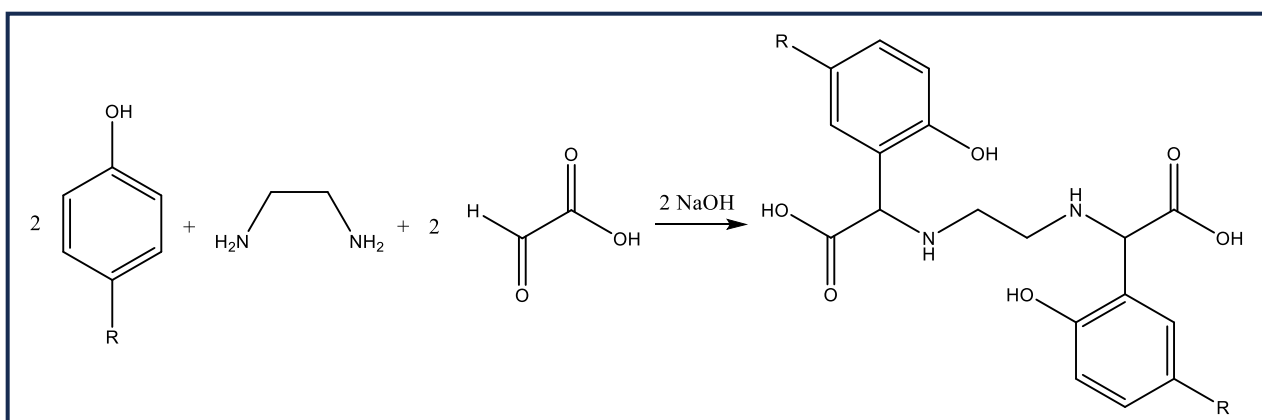
Esta metodología consiste en la reacción de la diamina seleccionada, disuelta en metanol y en presencia de cloruro de tionilo, agua y el grupo protector Boc a 0 °C con agitación y sistema de reflujo por 1 hora. Posteriormente se realizan extracciones líquido-líquido, en la que separan la fase acuosa de una fase orgánica de dietil éter. Seguido de un ajuste de pH superior a 12, con ayuda de una disolución de NaOH 2 N y extracciones con diclorometano, secan la fase orgánica con una sal anhidra y eliminan el disolvente con rotavapor. Los productos reportados son analizados mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , CG-EM e IR, incluyendo la mono acetilación de etilendiamina, en la que reportan una pureza del 96% y un rendimiento del 22%.

De esta manera se plantea la sustitución de la reacción de monoacetilación de la etilendiamina utilizada en la reacción inicial en la secuencia sintética del DCHA y de la imina en su paso anterior, por una mono protección selectiva de la etilendiamina, para obtener el material de partida que puede ser empleado en la secuencia sintética del DCHA.

Dentro de la lista de los agentes quelantes aprobados por la Regulación del Parlamento Europeo y del Consejo (EC) No 2003/2003 [27], se encuentra el agente EDDHSA junto a sus productos de condensación. El EDDHSA/Fe ha demostrado poseer una efectividad similar a sus derivados químicos como el EDDHA/Fe. La diferencia estructural radica en la incorporación de grupos sulfónicos en ambos anillos aromáticos fenólicos, lo cual le confiere una mayor acidez a los fenolatos debido al efecto electroattractor de estos grupos, aumentando la afinidad y estabilidad entre el metal y el agente quelante. Una ventaja del EDDHSA/Fe sobre el EDDHA/Fe, es su mayor solubilidad en medio acuoso, resultando en la aplicación de una cantidad aproximadamente de 1.4 a 1.7 veces menor.

En la síntesis del EDDHSA, al igual que en la del EDDHA, se lleva a cabo mediante una reacción de un solo paso mediante una reacción de Mannich en la que se obtiene un solo isómero constitucional del EDDHSA, sin embargo, también se obtienen productos de condensación que puede actuar como monómero en la generación de otros subproductos. [28]

En base a estos antecedentes, se planteó la síntesis de un derivado del EDDHSA en donde el grupo sulfónico se sustituye por otro grupo electroattractor, el grupo nitro. Esto se considera partiendo de la patente [29] con número de publicación internacional: WO 2021/111317 A1, en la cual detallan la metodología y condiciones para la síntesis de derivados del EDDHA/Fe.

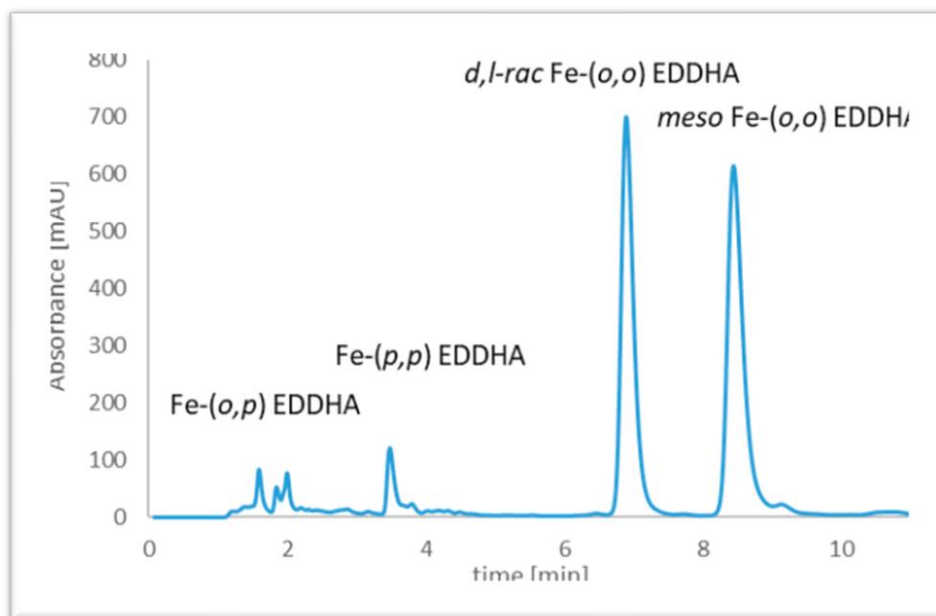


**Esquema 6. Reacción general de la síntesis de derivados del EDDHA**

## CARACTERIZACIÓN CON HPLC

El Comité Europeo de Normalización (CEN) publicó el Estándar Europeo de Normalización Española UNE-EN (13368-2:2018) [30], el cual consiste en la determinación de agentes quelantes en fertilizantes mediante cromatografía, enfocándose en la “determinación de hierro quelado por (*o,o*)-EDDHA, (*o,o*)-EDDHMA, y HBED, o de la cantidad de agentes quelantes, por cromatografía de par iónico”. Esta estandarización es necesaria para la determinación cuantitativa de la cantidad de hierro quelado. Esta norma especifica el método para la determinación cromatográfica del isómero (*o,o*)-EDDHA/Fe, dentro de la cual también determina la presencia de los diastereómeros ( $\pm$ )-racémico y del diastereómero *meso*, permitiendo obtener la cantidad del agente quelante de hierro disuelto en agua.

Esta determinación mediante un equipo HPLC, se fundamenta en una separación por elución isocrática mediante intercambio iónico. Bajo estas condiciones de análisis, el quelato de hierro adicionado a la fase móvil de naturaleza polar, la cual contiene un catión de gran tamaño, resulta en la formación de un par iónico, el cual es retenido en la fase estacionaria sólida de naturaleza no polar. La magnitud de la retención estriba principalmente en el factor de su acidez y del peso molecular. Por tanto, según la naturaleza del quelato, en cuanto a los factores mencionados, cada compuesto presente en la muestra posee un tiempo de retención distinto. Dentro de las especificaciones de análisis en esta norma, se requiere una columna C-18 de fase reversa como fase estacionaria, y una mezcla de hidróxido de tetrabutilamonio y acetonitrilo como fase móvil. La detección por UV-Vis es llevada a cabo a una longitud de onda de 280 nm. Se maneja una bomba isocrática responsable de introducir la fase móvil a un flujo constante de 1.5 mL/minuto, una válvula de inyección de 20  $\mu$ L, con la utilización de una columna con dimensiones de 3.9 mm de diámetro, y una longitud de 150 mm, con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m. La preparación de la fase móvil que fungirá como eluyente, para la obtención de 1 L inicia con 600 mL de agua, a la cual se le adicionan 20 mL de una solución de hidróxido de tetrabutilamonio (40% en agua), seguido de un ajuste a pH 6, con HCl. Posteriormente, se le adicionan 300 mL de acetonitrilo, y finalmente se afora con agua hasta un volumen de 1 L. Esta fase móvil preparada es filtrada a través de una membrana de 0.2  $\mu$ m. A partir de estas condiciones se suele obtener un cromatograma de la mezcla de los isómeros del EDDHA/Fe como el que se muestra en la Figura 8.



**Figura 8. Cromatograma de mezcla de isómeros del EDDHA/Fe, reportado por Klem-Marciniak E.**

## METODOLOGÍA

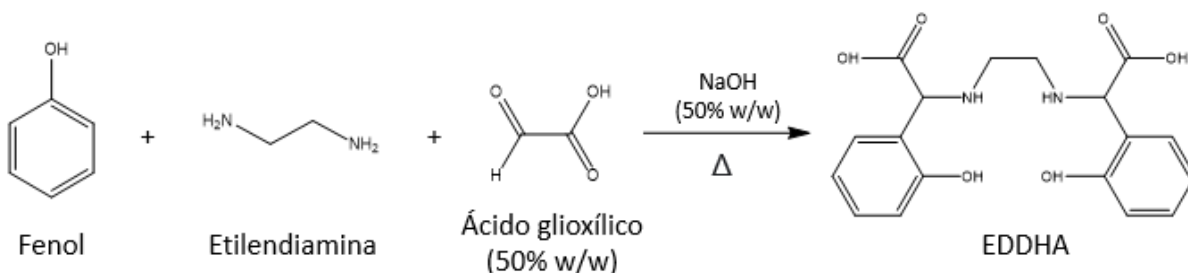
## Síntesis de EDDHA/Fe

- **Síntesis de EDDHA**

En este proyecto se planteó la síntesis del quelato férrico, EDDHA/Fe y sus isómeros basándose en la síntesis de Petree, la cual se divide en dos fases, la síntesis de EDDHA y la quelación de este último con una sal de hierro para obtener el quelato férrico EDDHA/Fe. Se llevaron a cabo un total de 16 reacciones en las que se modificaron cuatro variables de la metodología, realizando todas las permutaciones posibles para identificar la influencia de las condiciones de la reacción sobre el rendimiento global.

Las reacciones se realizaron mediante una reacción multicomponente de Mannich en la que se mantuvieron los equivalentes molares establecidos por Petree: 0.5 Eq de etilendiamina, 1 Eq de ácido glioxílico, 1 Eq de NaOH, y 13 Eq para el sistema reactivo/disolvente de fenol, o 10 Eq de fenol con 3 Eq de tolueno, que consiste en una de las variables empleadas.

Las otras variables consistieron en la adición de NaOH y ácido glioxílico por separado o en conjunto al medio de reacción, la obtención del EDDHA mediante precipitación o sin precipitación, manteniéndola disuelta en la fase acuosa, y finalmente, el empleo del cloruro férrico o nitrato férrico noahidratado, como fuente de hierro en la quelación del EDDHA.



**Esquema 7. Reacción general de la síntesis de EDDHA**

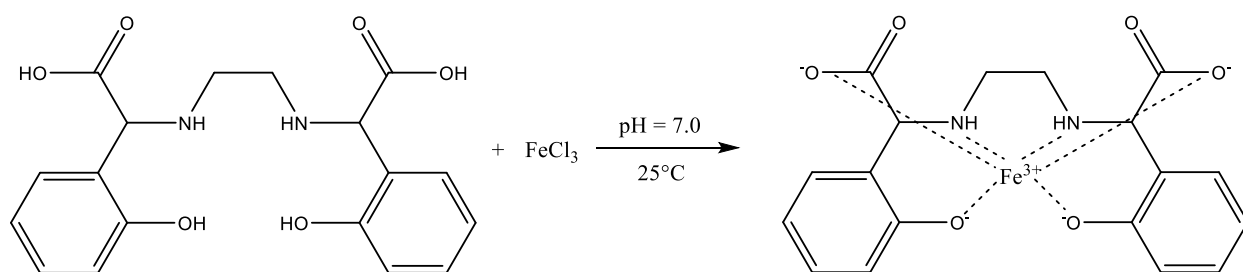
Reactivo/ Producto	PM (mg/mmol)	n (mmol)	Peso (mg)	Volumen ( $\mu$ L)	Densidad (g/mL)
<b>Fenol</b>	94.11	13	3,322.71	/	/
<b>Etilendiamina</b>	60.10	0.5	81.61	89.7	0.91
<b>Ácido glioxílico</b>	92.05	1	250	/	/
<b>NaOH</b>	39.99	1	108.63	/	/

**Tabla 2. Planteamiento sintético de la síntesis de EDDHA**

- 1) Se adicionó la cantidad respectiva de fenol, o una mezcla fenol/tolueno en un matraz bola esmerilado, bajo un baño de aceite a 40°C, y con agitación magnética por 10 minutos.
- 2) Después se agregó por goteo y lentamente la cantidad respectiva de etilendiamina con agitación magnética por 10 minutos.
- 3) Posteriormente, se adicionaron también gota a gota y lentamente una disolución de NaOH acuoso al 50% (p/p), e inmediatamente ácido glioxílico acuoso al 50% (p/p), o una mezcla de ambos reactivos manteniendo la agitación magnética por 10 minutos.
- 4) Después se llevó la reacción a reflujo con agitación constante y temperatura de 80°C durante 3 horas.
- 5) Una vez transcurrido el tiempo, se desmontó el sistema y se llevó el medio de reacción a temperatura ambiente, manteniendo la agitación magnética.
- 6) En seguida se adicionaron los disolventes agua y diclorometano (DCM) al matraz bola, y se mantuvo en agitación por 30 minutos.
- 7) Una vez concluido este tiempo, se decantó el contenido del matraz bola a un embudo de separación, realizando una serie de lavados a la fase acuosa, con las respectivas cantidades de DCM para la eliminación de fenol de la fase acuosa.
- 8) Se monitoreó la eliminación de fenol de la fase acuosa por medio de una cromatografía en capa fina (CCF), con una fase móvil de 70% de *n*-hexano y 30% acetato de etilo, utilizando como revelador químico, cloruro férrico al 2%, para la detección de fenol.

- 9) Una vez eliminado el fenol, se acidificó la fase acuosa con una disolución de HCl, hasta llevarlo a un pH de 2.0, reposando el matraz por 72 horas bajo atmósfera inerte y refrigeración, obteniendo la generación de un precipitado.
- 10) Después de las 72 horas, se filtró a presión reducida (vacío) el precipitado obtenido de la fase acuosa; se secó el producto y se pesó. En los casos que no se precipitó el EDDHA, se utilizó directamente la fase acuosa para llevar a cabo el paso de la quelación.

• **Quelación de EDDHA con sal de hierro para síntesis de EDDHA/Fe:**

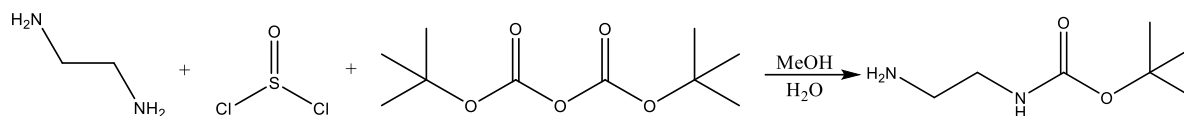


**Esquema 8. Quelación del EDDHA para obtención del EDDHA/Fe**

- 1) El EDDHA precipitado se diluyó en medio acuoso y se adicionó en un matraz bola. En los casos que no se precipitó el EDDHA, se utilizó directamente de la fase acuosa.
- 2) Después, se diluyó la respectiva sal de hierro en un medio acuoso, la cual se introdujo gota a gota y lentamente al matraz bola con el EDDHA, bajo agitación magnética a temperatura ambiente.
- 3) Inmediatamente después de la adición de la sal de hierro, se ajustó el medio de reacción a pH neutro, con ayuda de disoluciones acuosas de NaOH al 50% (p/p) y HCl.
- 4) Se mantuvo la reacción por 2 horas bajo agitación magnética a temperatura ambiente.
- 5) Finalmente, se secó el producto en una estufa a 80 °C, se pesó, y se calculó el rendimiento de la reacción.

## Síntesis de EDA mono-Boc

Se propuso la síntesis del EDA mono-Boc como sustituto de la etilendiamina monoacetilada, utilizada en el primer paso dentro de la secuencia sintética del DCHA mencionada anteriormente en los antecedentes. Se planteó la obtención del EDA mono-Boc debido a su metodología más efectiva y eficiente que la metodología de la monoacetilación de la etilendiamina. Esta reacción química se realizó siguiendo la metodología reportada por Servín, utilizando Boc en la monoprotección selectiva de etilendiamina.



**Esquema 9. Reacción general de la mono protección con Boc de etilendiamina**

Reactivo/ Producto	PM (mg/mmol)	Eq. molar	n (mmol)	Peso (mg)	Volumen ( $\mu$ L)	Densidad (g/mL)
<b>EDA</b>	60.10	1	1.83	110.15	120.99	0.91
<b>SOCl<sub>2</sub></b>	118.97	1	1.83	218.05	132.96	1.64
<b>Boc</b>	218.25	1	1.83	400.0	/	/

**Tabla 3. Planteamiento sintético de la síntesis de EDA mono-Boc**

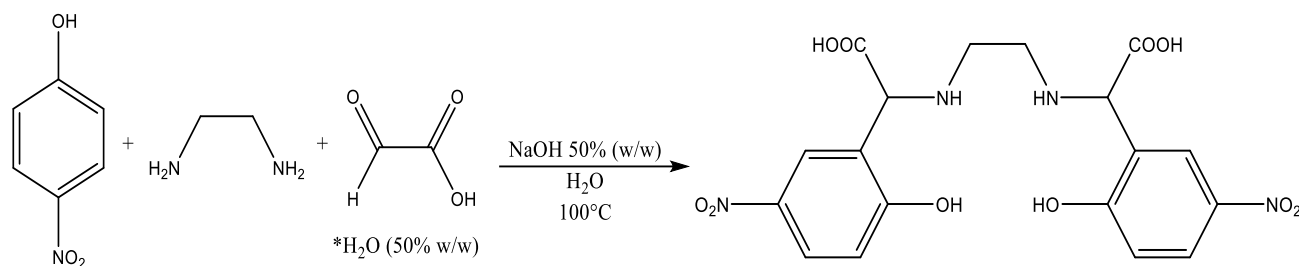
- 1) Se adicionaron 3 mL de metanol anhidro y 125  $\mu$ L de etilendiamina en un matraz bola sobre baño de hielo a 0°C, bajo agitación magnética.
- 2) Después, se introdujeron lentamente 135  $\mu$ L de cloruro de tionilo. Se observó un precipitado blanco dentro del matraz.
- 3) Enseguida se adicionó 1 mL de agua desionizada y 400 mg de Boc disueltos en 3 mL de metanol.
- 4) Se llevó a cabo la reacción en condiciones de reflujo por una hora.
- 5) Se enfrió el sistema a temperatura ambiente y se adicionaron 25 mL de agua desionizada para realizar extracciones con 35 mL de dietil éter.

- 6) Después se basificó la fase acuosa a pH 12 con una disolución de NaOH 50% (p/p) y se realizaron tres extracciones con 35 mL de dietil éter.
- 7) Se combinaron las fases orgánicas y se secaron con sulfato de sodio anhidro; se filtró por gravedad, y se eliminó el disolvente con el rotavapor.

## Síntesis de EDDHNA/Fe

El planteamiento del nuevo agente quelante EDDHNA/Fe, se diseñó a partir de un análogo, el quelato férrico EDDHSA/Fe, uno de los productos sintéticos aprobados por el Reglamento (EC) No. 2003/2003 como agente fertilizante en el tratamiento de clorosis férrica.

La metodología sintética para la obtención de EDDHNA/Fe se realizó adaptándose a la metodología reportada para la obtención del EDDHSA/Fe en la patente con número de publicación internacional: WO 2021/111317 A1 [29], modificando las condiciones necesarias en la síntesis del nuevo quelato férrico, EDDHNA/Fe.



**Esquema 10. Reacción general de la síntesis de EDDHNA**

Reactivo/ Producto	PM (mg/mmol)	n (mmol)	Peso (mg)	Volumen ( $\mu$ L)	Densidad (g/mL)
<b>4-nitrofenol</b>	139.11	4	556.44	/	/
<b>Etilendiamina</b>	60.10	2	120.2	132	0.91
<b>Ácido glioxílico</b>	92.05	4	368.2	/	/
<b>NaOH</b>	39.99	12	479.96	/	/
<b>H<sub>2</sub>O desionizada</b>	18.01	54	972.82	972.82	1

**Tabla 4. Planteamiento sintético de la síntesis de EDA mono-Boc**

- 1) En un matraz bola se adicionaron bajo agitación magnética 556.6 mg de 4-nitrofenol y 975  $\mu$ L de agua desionizada.
- 2) Después se introdujeron lentamente y por goteo 370.8 mg de ácido glioxílico monohidratado a partir de una disolución al 50% (p/p), manteniendo la agitación por 5 minutos y a 55°C.
- 3) Después se adicionaron 480.32 mg de NaOH a partir de una disolución al 50% (p/p), lentamente, gota a gota, manteniendo la agitación por 5 minutos, aun a 55°C.
- 4) Se incorporaron por goteo y lentamente 135  $\mu$ L de etilendiamina con una jeringa, manteniendo la agitación por 5 minutos y temperatura de 55°C.
- 5) Posteriormente se llevó a cabo la reacción con un sistema de reflujo hasta 100°C por 3 horas.
- 6) Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se llevó el sistema a temperatura ambiente y se verificó el pH de 9 con papel indicador.
- 7) Se realizó una CCF utilizando una fase móvil de 70% *n*-hexano y 30% acetato de etilo, luz UV como medio de visualización y vainillina como revelador químico.
- 8) Se eliminó el material de partida sin reaccionar (4-nitrofenol) con tres lavados de la fase acuosa utilizando 40 mL de DCM.
- 9) Después se llevó a cabo la quelación adicionando 809.0 mg (2 mmol) de nitrato férrico noahidratado al 1.08 M a 45°C, ajustando el pH rápidamente a 8 con disoluciones diluidas de NaOH y HCl, dependiendo de lo requerido, y se mantuvo bajo agitación magnética por tres horas.
- 10) En seguida, a la fase acuosa se le adicionaron 60 mL de DMF, generando la precipitación de un sólido, manteniéndolo en reposo por 24 horas.
- 11) Se filtró a presión reducida (vacío) el precipitado obtenido y se eliminó la mezcla de disolventes de la fase acuosa, en el rotavapor, obteniendo una mezcla del producto sólido e impurezas sólidas.
- 12) Se adicionó acetona, disolviendo únicamente las impurezas, seguido de una filtración a presión reducida (vacío) para obtener el producto.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### EDDHA/Fe

Se llevaron a cabo 16 reacciones sintéticas para la obtención del EDDHA/Fe, realizando variaciones de equivalentes de fenol y tolueno, este último, para reemplazar al fenol parcialmente en su función como disolvente. También se ajustó la adición del NaOH y ácido glioxílico de forma unitaria o como mezcla. El EDDHA se obtuvo por precipitación o utilizando directamente la fase acuosa en la que se llevaría a cabo la formación del quelato férrico. En la quelación se utilizaron como sales de hierro el cloruro férrico o nitrato férrico nonahidratado.

Se manejó 1 equivalente molar de NaOH y ácido glioxílico, y 0.5 equivalentes molares para la etilendiamina, para todas las reacciones, las cuales están plasmadas en la Tabla 5 junto a los rendimientos globales de reacción.

NÚMERO DE REACCIÓN	FENOL (Eq)	TOLUENO (Eq)	NaOH/ ÁCIDO GLIOXÍLICO	PRECIPITACIÓN DEL EDDHA	SAL DE HIERRO (0.7 Eq)	RENDIMIENTO GLOBAL (%)
#1	13	0	Separados	Con precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	20%
#2	13	0	Mezcla	Con precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	18%
#3	13	0	Separados	Con precipitación	FeCl <sub>3</sub>	18%
#4	13	0	Mezcla	Con precipitación	FeCl <sub>3</sub>	15%
#5	13	0	Separados	Sin precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	7%
#6	13	0	Mezcla	Sin precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	9%
#7	13	0	Separados	Sin precipitación	FeCl <sub>3</sub>	9%
#8	13	0	Mezcla	Sin precipitación	FeCl <sub>3</sub>	10%
#9	10	3	Separados	Con precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	8%
#10	10	3	Mezcla	Con precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	7%
#11	10	3	Separados	Con precipitación	FeCl <sub>3</sub>	8%
#12	10	3	Mezcla	Con precipitación	FeCl <sub>3</sub>	9%
#13	10	3	Separados	Sin precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	8%
#14	10	3	Mezcla	Sin precipitación	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	7%
#15	10	3	Separados	Sin precipitación	FeCl <sub>3</sub>	8%
#16	10	3	Mezcla	Sin precipitación	FeCl <sub>3</sub>	11%

**Tabla 5. Planteamientos sintéticos y rendimientos globales de las 16 reacciones de EDDHA/Fe**

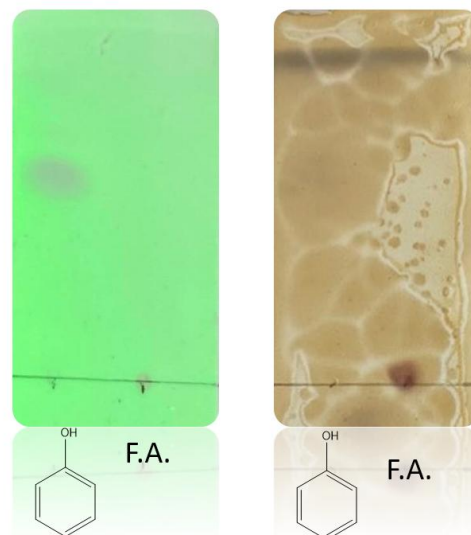
Todas las reacciones fueron monitoreadas utilizando cromatografía de capa fina (CCF), con la que se pudo verificar el avance de las reacciones a los 15, 30 y 60 minutos, y este último fue el tiempo donde se completó la reacción.

La fase móvil en la CCF consistió en 70% *n*-hexano y 30% acetato de etilo, en la que se usó luz UV como fuente de visualización, mostrando la aparición del EDDHA en el carril de los productos con una retención total en cuanto a su desplazamiento, permaneciendo en el punto de sembrado debido a la alta afinidad del producto polar EDDHA con la fase estacionaria de sílica gel.

Posteriormente, también se utilizó una CCF para asegurar la eliminación del exceso de fenol de la fase acuosa, mediante lavados con DCM, además del uso del revelador químico de  $\text{FeCl}_3$  al 2%, en la que al no observar la aparición de una mancha colorida en el carril de la fase acuosa con un mismo  $R_f$  que de la mancha colorida en el carril del fenol, se garantizó la ausencia de este en la fase acuosa, pudiendo proseguir con la metodología.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la adición de NaOH y ácido glioxílico como mezcla o separados, no mostró ninguna tendencia en el aumento o reducción significativa de los rendimientos globales de la reacción para la formación del agente quelante, probablemente debido a que el NaOH abstrae de manera preferencial al protón del ácido glioxílico, independientemente de que este sea adicionado en un paso posterior, por lo que esta variable no presenta un cambio sustancial en la generación del EDDHA.

También se pudo determinar que la obtención por precipitación del EDDHA favorece el rendimiento del producto, probablemente debido a que, en la posterior etapa de quelación, el EDDHA precipitado se disolvió en medio acuoso en una concentración mayor, en contraste con el EDDHA que se utilizó directamente de la fase acuosa obtenida después de los lavados. Esto también puede ser indicativo de que la quelación de EDDHA sin precipitar puede necesitar más tiempo para aumentar el rendimiento que se presenta en las reacciones en las que se precipitó el EDDHA.



**Figura 9. CCF de fenol y síntesis de EDDHA (visualizado con luz UV de lado izquierdo y revelado químico con  $\text{FeCl}_3$  al 2% de lado derecho)**

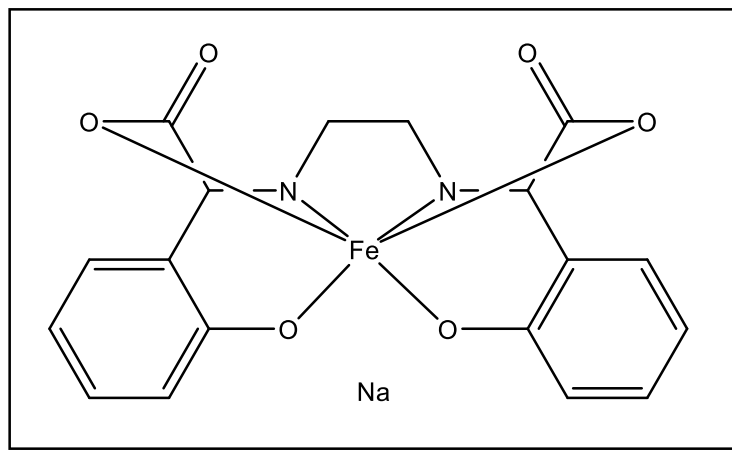
En las reacciones que se empleó fenol como reactivo y disolvente, el rendimiento del producto aumentó en comparación con el uso de fenol y tolueno, como era de esperar según lo que teorizó Petree, por el efecto que el disolvente tiene sobre la reactividad de los distintos reactivos en la que la capacidad de solvatación de los iones del medio de reacción, por cada disolvente en particular influye en la obtención del EDDHA o de otros subproductos, siendo el medio de reacción solo con fenol como disolvente el más apropiado en la obtención de mayor rendimiento.

Por otro lado, aunque los rendimientos de reacción obtenidos estuvieron por debajo de los reportados en la literatura (aproximadamente 27%) [10], se logró obtener exitosamente la quelación utilizando la sal de hierro, cloruro férrico que a pesar de ser más higroscópico que el nitrato férrico noahidratado, el  $\text{FeCl}_3$  es más económico y también es muy soluble en medio acuoso.



**Figura 10. EDDHA/Fe sintetizado**

Por tanto, la reacción química #1 representa la síntesis con mejor metodología y condiciones en la obtención del mejor rendimiento (20%), en la que el fenol se encuentra a 13 equivalentes, la adición del NaOH y ácido glioxílico es por separado, y se realiza la precipitación del EDDHA antes de su quelación con la sal de hierro,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ . Sin embargo, la reacción #3 también representa una alternativa viable a nivel industrial, en la que sus variables se mantienen idénticas a la de la reacción #1, excepto el empleo de la sal de hierro más económicamente viable,  $\text{FeCl}_3$  en la que el rendimiento (18%) no representa una diferencia significativa.



**Figura 11. Estructura de EDDHA/Fe**

La obtención del EDDHA/Fe fue en forma de un polvo con coloración rojiza/café oscura, la cual se caracterizó mediante espectroscopia IR, de la cual se observa una banda ancha a una frecuencia de aproximadamente  $3206\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento de los enlaces O-H de los ácidos carboxílicos y de los fenoles, que pueden encontrarse sobrepuestas sobre las bandas más débiles del estiramiento de las aminas secundarias. También se encuentra una banda característica intensa a  $1592\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los estiramientos asimétricos de los grupos carboxilatos que están coordinados con el hierro. La banda intensa con frecuencia a  $1107\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los enlaces C-N dentro de la estructura del EDDHA/Fe.

La prueba instrumental de caracterización más contundente empleada en la identificación del EDDHA/Fe y sus isómeros corresponde al análisis por HPLC. El análisis analítico del EDDHA/Fe se realizó con una columna C-18 de fase reversa como fase estacionaria, con dimensiones de 4.6 mm de diámetro y una longitud de 250 mm, que difieren de las dimensiones establecidas por el Estándar Europeo de Normalización Española UNE-EN (13368-2:2018) [30] en la que se decretan las dimensiones de la columna de 3.9 mm de diámetro y 150 mm de longitud. No obstante, el resto de las condiciones se mantuvieron sin cambios, manejando una fase móvil isocrática de 300 mL de agua desionizada, 10 mL de tetrabutilamonio acuoso al 40%, 150 mL de acetonitrilo, ajustado a pH 6 con HCl y aforando a 500 mL. El flujo fue de 1.5 mL/min, con una válvula de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , y con una detección del UV-Vis a 280 nm.

Bajo estas condiciones se realizó el análisis a 10 minutos obteniendo un cromatograma en el que se observan cuatro señales intensas. La primera de ellas con el tiempo de retención más bajo corresponde al (*o,p*)-EDDHA/Fe a 2.7 min, seguido del (*p,p*)-

EDDHA/Fe a 3.2 min, los cuales se encuentran en baja proporción. Más adelante se muestran los diasterómeros del (*o,o*)-EDDHA/Fe con intensidades similares, primero aparece el ( $\pm$ )-(*o,o*)-EDDHA/Fe a 4.2 min y el *meso*-(*o,o*)-EDDHA/Fe a los 4.6 min. Estos tiempos de retención se encuentran desfasados, presentando una menor separación entre las señales según lo esperado por la UNE-EN (13368-2:2018), así como se ilustra en la Figura 8, sin embargo, estos tiempos de retención distintos se explican por el uso de una columna con dimensiones distintas a las establecidas por el método estándar de análisis. De cualquier forma, estas diferencias no son impedimento en la identificación de las cuatro señales esperadas, las cuales muestran una proporción mayoritaria del isómero deseado, el (*o,o*)-EDDHA/Fe.

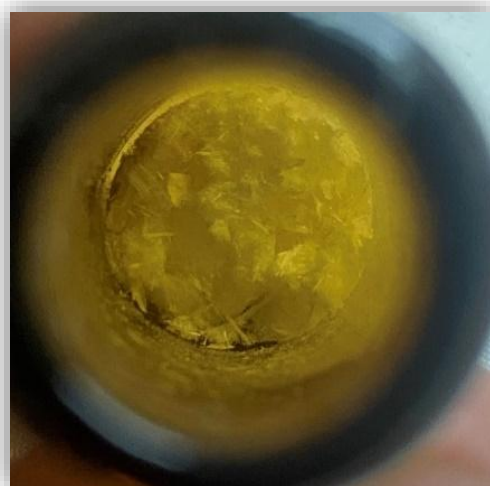
## EDA mono-Boc

La obtención del EDA mono-Boc se estableció partiendo de la idea de sustituir la etilendiamina monoacetilada, como material de partida para iniciar la secuencia sintética del DCHA reportada por López-Rayó [23], debido a la mayor eficiencia y eficacia en la mono-protección de la etilendiamina con Boc, en contraste con su monoacetilación.

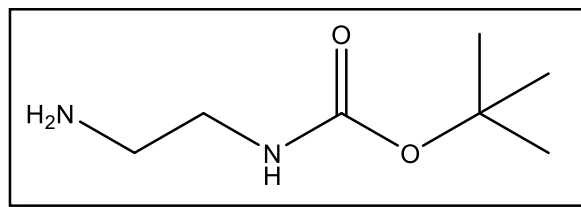
La mono-protección de la etilendiamina con Boc se llevó a cabo siguiendo la metodología reportada por Servín [26]. El producto de la etilendiamina mono-protegida con Boc (EDA mono-Boc) fue obtenido en forma de cristales blancos con un rendimiento del **44%**.

Este compuesto se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM), en donde se identificó una sola señal a 4.83 minutos dentro del cromatograma.

En el espectro de masas se puede identificar el ion molecular de 160 *m/e* correspondiente a la masa del producto con fórmula molecular  $C_7H_{16}N_2O_2$ . En relación con su patrón de fragmentación, el pico base de 57 *m/e* corresponde a un fragmento de tipo terbutilo, el pico a 87 *m/e* se correlaciona con el fragmento de la diamina con el carbonilo, y a 103 *m/e* la diamina con el carbonilo sin el grupo terbutilo. Esta fragmentación sugiere la estructura del producto esperado.



**Figura 12. EDA mono-Boc sintetizado**



**Figura 13. Estructura de EDA mono-Boc**

El análisis por espectroscopia de IR arroja un espectro en el que se observa una banda característica del estiramiento del carbonilo del carbamato identificada a una frecuencia de  $1681\text{ cm}^{-1}$ . También se visualiza una banda pronunciada a  $3367\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento N-H de la amina secundaria, además de otra banda a  $1528\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la flexión N-H de la amina secundaria. A  $2981\text{ cm}^{-1}$  se encuentra una banda del estiramiento C-H. A  $1156\text{ cm}^{-1}$  hay una banda intensa del estiramiento del enlace C-N.

El compuesto también fue analizado por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , obteniendo un espectro con un pico intenso a 1.37 ppm, correspondiente a los nueve protones de los metilos del terbutilo. A un desplazamiento de 2.95 ppm se obtiene una señal correspondiente a los protones del metileno adyacente a la amina primaria, mientras que a más campo bajo se encuentra una señal intensa que corresponde a la presencia de agua, la cual puede estar solapando la señal esperada de los protones del metileno adyacente a la amina secundaria. A 6.71 ppm corresponde la señal de la amina secundaria, la cual se encuentra como la señal más desplazada a campo bajo.

Mediante estas técnicas instrumentales se caracterizó la EDA mono-Boc el cual puede emplearse como material de partida en la secuencia sintética del DCHA, o de su imina correspondiente, los cuales podrían evaluarse como potenciales agentes quelantes en el tratamiento de la clorosis férrica en especies vegetales.

## EDDHNA/Fe

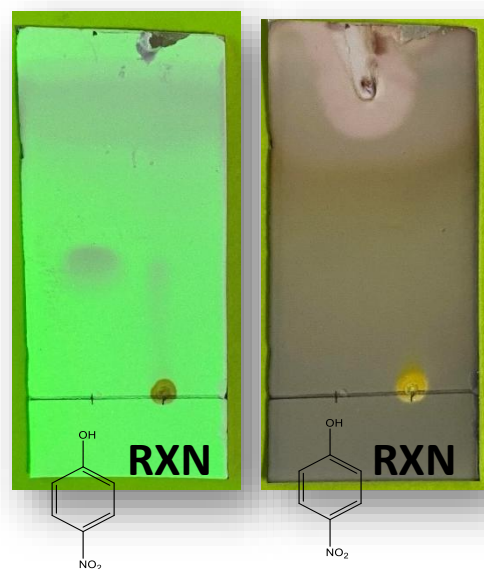
La síntesis del EDDHNA/Fe se basó en el diseño de la estructura química del EDDHSA/Fe, que a su vez guarda semejanza con la estructura del EDDHA/Fe. El EDDHSA/Fe tiene un grupo sulfónico en posición *para* respecto al grupo hidroxilo en ambos anillos aromáticos, que al poseer una naturaleza química electroattractora, contribuye aumentando el carácter ácido del compuesto, generando un complejo muy estable con un metal. La

síntesis del EDDHSA/Fe suele generar subproductos, generalmente, compuestos de condensación en una baja proporción, sin embargo, esta solo genera un isómero *orto-orto* de los grupos hidroxilo respecto a la cadena principal lo cual representa una gran ventaja sobre la síntesis del EDDHA/Fe. Buscando obtener un nuevo agente quelante con potencial en el tratamiento de clorosis férrica, se ideó la síntesis del EDDHNA/Fe, que, en lugar de poseer los grupos sulfónico, posee grupos nitro, también de naturaleza química electroattractora.

Para la síntesis del EDDHNA/Fe, se realizó un proceso sintético en dos etapas, basándose en la patente del EDDHSA/Fe mencionada en la metodología, modificando las condiciones para la síntesis del EDDHNA/Fe. El aumento de la temperatura inicial reportada fue necesario para disolver el 4-nitrofenol en el medio, llegando hasta 55 °C en lugar de los 40 °C reportados en la patente. Finalizada la síntesis del EDDHNA, durante la purificación de la fase acuosa con lavados de diclorometano, se observó la precipitación de un sólido por lo que se mantuvo en reposo por 24 horas. Después, se añadieron diferentes disolventes buscando encontrar cual favorecía más la precipitación del sólido, encontrando que el DMF fue el mejor. Por tanto, se adicionó DMF a la fase acuosa manteniéndola en reposo por 24 horas. Después se procedió a filtrar el sólido el cual consistía en el producto esperado y 4-nitrofenol, este último que no logró eliminarse con los lavados, por lo que se procedió a eliminar la mezcla de disolvente agua/DMF, hasta la obtención del producto con el material de partida, secos. Finalmente se disolvieron las impurezas con acetona mientras que el producto, insoluble en ese disolvente, se obtuvo mediante una filtración a presión reducida (vacío).

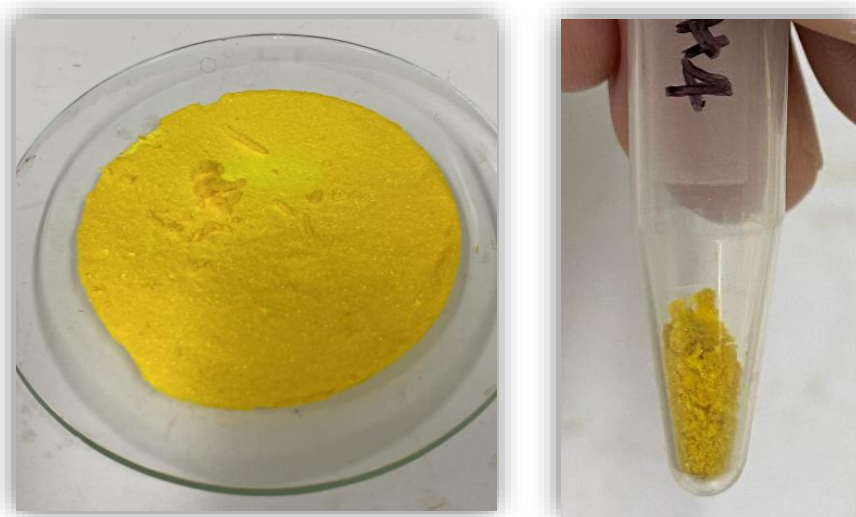
Las reacciones fueron monitoreadas utilizando CCF a los 15, 30, 60, y 90 minutos, con este último siendo el tiempo donde la reacción se completó.

La fase móvil en la CCF fue de 70% *n*-hexano y 30% acetato de etilo, usando luz UV para observar la placa, la cual mostró la síntesis del EDDHNA en el carril de los productos, en la que el compuesto no se desplazó del punto de origen debido a la alta afinidad del producto polar EDDHNA con la sílica gel. Se utilizó vainillina como agente revelador químico como prueba en la obtención del producto.



**Figura 14. CCF de 4-nitrofenol y síntesis de EDDHNA (visualizado con luz UV de lado izquierdo y revelado químico con vainillina de lado derecho)**

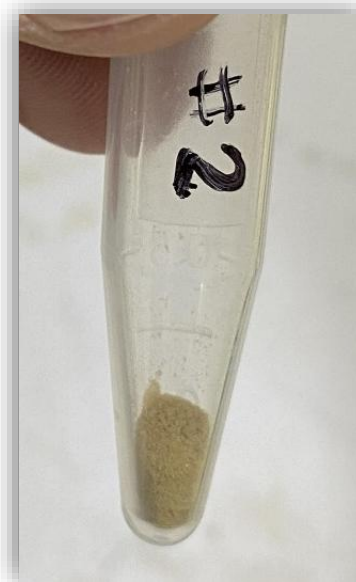
La síntesis química se realizó por triplicado, en donde se obtuvo el agente quelante obteniendo rendimientos del 66%, 59%, y 66%. Estos productos se obtuvieron en forma de polvos con coloración amarilla intensa, característica de los grupos nitro, y presentaron alta solubilidad acuosa, solubilidad parcial en DMSO, DMF, y metanol, e insolubles en disolventes como acetonitrilo, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano, y *n*-hexano.



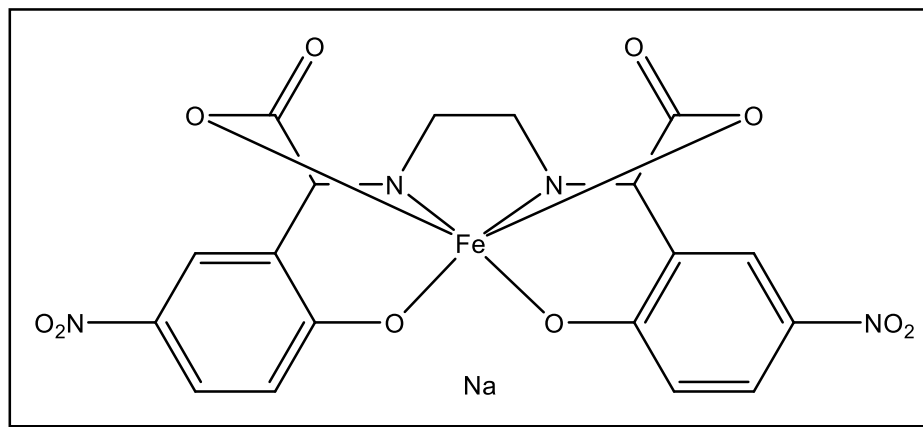
**Figura 15. EDDHNA sintetizado**

La quelación con nitrato férrico nonahidratado resultó en rendimientos globales del EDDHNA/Fe del 46%, 50%, y 52%, respectivamente. Los productos se obtuvieron en forma de sólidos en polvo con una coloración grisácea pálida.

Se realizaron pruebas de solubilidad (5 mg/125  $\mu$ L de disolvente) estableciendo que el producto quelado es totalmente soluble en agua, parcialmente soluble en DMSO, DMF y metanol, e insoluble en acetonitrilo, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano, y *n*-hexano.



**Figura 16. EDDHNA/Fe sintetizado**



**Figura 17. Estructura de EDDHNA/Fe**

La elucidación estructural del compuesto se realizó mediante espectroscopia de IR, tanto del agente quelante no quelado (EDDHNA), como del quelato férrico (EDDHNA/Fe). En el espectro del EDDHNA se observa una banda ancha a  $3217\text{ cm}^{-1}$  característica de los estiramientos de los enlaces O-H, en contraste con una banda débil a  $3363\text{ cm}^{-1}$  debido a que los oxígenos de los fenóxidos del compuesto quelado se encuentran actuando como base de Lewis, formando enlaces de coordinación con el hierro. Además, en el espectro del EDDHNA/Fe se observa la banda característica de los estiramientos de los grupos carboxilatos a una frecuencia de  $1604\text{ cm}^{-1}$ .

El análisis por HPLC se realizó bajo las mismas condiciones en la detección del EDDHA/Fe debido a que el EDDHNA/Fe trata de un compuesto nuevo, y se carece de las condiciones apropiadas para su identificación por medio de una metodología estándar, sin embargo, logró apreciarse la absorción intensa de algún componente a aproximadamente 9-12 min de tiempo de retención, en el análisis realizado por 10 minutos.

La caracterización por RMN de  $^1\text{H}$  presenta un espectro con una señal a 1.24 ppm correspondiente a los protones de los metilenos, seguido de una señal de los protones de las aminas, detectada a 2.09 ppm, también hay una señal de los protones de los metinos a 2.51 ppm, otra señal de los protones aromáticos en posición *para* con el grupo hidroxilo, a 5.97 ppm, una señal del resto de los protones aromáticos a 7.73 ppm, seguido de una señal de los protones de los fenoles a 8.30 ppm, y finalmente, una señal correspondiente de los protones de los grupos carboxilo a 8.48 ppm en campo bajo, además de una señal intensa correspondiente a la hidratación del disolvente deuterado utilizado.

El análisis estructural por RMN de  $^{13}\text{C}$  mostró una señal correspondiente a los carbonos metilenos a 31.1 ppm, seguido de una señal de los carbonos metinos a 62.1 ppm, una señal de los carbonos en posición *orto* respecto al grupo hidroxilo en el anillo aromático, a 119.7 ppm, otra señal de los carbonos en posición *meta* respecto al grupo hidroxilo en el anillo aromático que casi se solapan, a 127.8 ppm y 128.9 ppm, además de una señal de los carbonos unidos directamente al grupo hidroxilo, a 167.5 ppm, y finalmente, a campo más bajo se encuentra una señal correspondiente de los carbonos del grupo carboxilo, a 180.7 ppm.

En base a la síntesis y caracterización del agente quelante EDDHNA, y en su forma como quelato férrico, EDDHNA/Fe, en un trabajo futuro se puede cuantificar el grado de estabilidad de los complejos que puede formar con hierro y con otros metales, además de la evaluación de este compuesto en la corrección de la clorosis férrica en especies vegetales agrícolas.

## CONCLUSIONES

Después de llevar a cabo las reacciones para la síntesis del quelato EDDHA/Fe, se pudo establecer que no existen cambios significativos en los rendimientos globales del producto obtenido por la adición en conjunto o por separado del ácido glioxílico e hidróxido de sodio.

También se establece que no se tiene una diferencia significativa entre la quelación con la sal de cloruro férrico y el nitrato férrico noahidratado, por lo que es posible utilizar la sal más viable económicamente, en este caso, el cloruro férrico.

Se observó que la sustitución de fenol como disolvente tiene a disminuir el rendimiento de reacción obtenido.

### Trabajo futuro

Se plantea llevar a cabo la secuencia sintética para la obtención de DCHA/Fe, a partir de la mono-protección con Boc de la etilendiamina, y evaluar el producto que se obtenga en su capacidad para tratar la clorosis férrica, investigación que no ha sido reportada dentro de la literatura.

Asimismo, es necesario un estudio más profundo de la síntesis del EDDHA/Fe cambiando otras variables de reacción que conduzcan a la síntesis de los isómeros *orto-orto* y *orto-para* en mayor concentración, pero especialmente en el aumento del rendimiento obtenido.

También es importante sintetizar otros análogos del quelato EDDHNA/Fe, que puedan ser más efectivos en la corrección de especies vegetales con clorosis férrica.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Jeger *et al.*, "Global challenges facing plant pathology: multidisciplinary approaches to meet the food security and environmental challenges in the mid-twenty-first century," *CABI Agric. Biosci.*, pp. 1–18, 2021.
- [2] L. Gao and Y. Shi, "Genetic Differences in Resistance to Iron Deficiency Chlorosis in Peanut," *J. Plant Nutr.*, no. Diciembre, 2014, pp. 37–41.
- [3] S. K. Pattanashetti, G. K. Naidu, P. K. K. V, O. K. Singh, and B. D. Biradar, "Identification of iron deficiency chlorosis tolerant sources from mini-core collection of groundnut (*Arachis hypogaea* L.)," *Plant Genet. Resour.*, vol. 2621, 2018.
- [4] D. Booklet, "World Population Prospects," *United Nations*, 2017.
- [5] A. W. D. C. Schenkeveld, R. Dijcker, A. M. Reichwein, and E. J. M. Temminghoff, "The effectiveness of soil-applied FeEDDHA treatments in preventing iron chlorosis in soybean as a function of the o,o-FeEDDHA content," *Plant Soil*, vol. 303, no. 1, pp. 161–176, 2021.
- [6] P. E. R. Ami, Ä. Rez, and C. A. P. In, "Synthesis of o ,p-EDDHA and Its Detection as the Main Impurity in o,o-EDDHA Commercial Iron Chelates," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 6395–6399, 2002.
- [7] H. Petree, "Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids," *United States Pat. 4,130,582*, 1978.
- [8] J. A. L. and A. A. Jullien, "Process for the preparation of ethylene diamine N,N'-bis (ortho-hydroxyphenylacetic) acid and derivatives thereof," *EP Pat. 0,331,556*, 1989.
- [9] P. Apicella *et al.*, "Production Processes and Reaction Evolution Analysis Iron Chelates : Production Processes and Reaction Evolution Analysis," *Che*, no. November, 2015.
- [10] S. Cascone, P. Apicella, D. Caccavo, G. Lamberti, and A. Barba, "Optimization of Chelates Production Process for Agricultural Administration of Inorganic Micronutrients," vol. 44, 2015.
- [11] S. A. Lucas, "Development of new formulations of EDDHA/Fe<sup>3+</sup> chelates and methodologies for their analysis based on NMR," 2015.
- [12] Y. Chen and P. Barak, "Iron nutrition of plants in calcareous soils," *Adv. Agron.*, vol. 35, pp. 217–240, 1982.
- [13] F. Yunta, S. Garcı, J. J. Lucena, R. Alca, and M. A. Sierra, "Chelating Agents Related to Ethylenediamine Bis(2-hydroxyphenyl)acetic Acid (EDDHA): Synthesis, Characterization, and Equilibrium Studies of the Free Ligands and Their Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Fe<sup>3+</sup> Chelates," *Inorg. Chem.*, vol. 42, no. 17, pp. 5412–5421, 2003.
- [14] P. Nutrition, J. Liebig, D.- Giessen, and K. Mengel, "Iron availability in plant tissues - iron

- chlorosis on calcareous soils," *Plant Soil*, pp. 389–397, 1995.
- [15] Ä. A. Arco and J. L. Ucena, "Theoretical Speciation of Ethylenediamine-N-(o-hydroxyphenylacetic)-N'-(p-hydroxyphenylacetic) Acid (o,p-EDDHA) in Agronomic Conditions," *J. Agric. Food Chem.*, 2003.
- [16] R. M. Welch, L. Shuman, and R. M. Welch, "Critical Reviews in Plant Sciences Micronutrient Nutrition of Plants Micronutrient Nutrition of Plants," *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.*, no. Enero, 2013, pp. 37–41, 2011.
- [17] Ä. A. Arco, P. A. N. Adal, J. U. A. N. J. L. Ucena, and Ä. O. Rez, "Structure and Fertilizer Properties of Byproducts Formed in the Synthesis of EDDHA," *J. Agric. Food Chem.*, 2006.
- [18] S. Garcí, N. Martí, F. Yunta, L. Herna, and J. J. Lucena, "Effectiveness of ethylenediamine-N-(o-hydroxyphenylacetic)-N-(p-hydroxy-phenylacetic) acid (o,p-EDDHA) to supply iron to plants," *Plant Soil*, vol. 279, pp. 31–40, 2006.
- [19] H. Kroll, "A phenolic analog of ethylenediamine-tetraacetic acid," *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 2024–2025, 1957.
- [20] M. Dexter, "Preparation of phenolic ethylenediaminepolycarboxylic acids," *United States Pat. 2,824,128*, pp. 5–7, 1958.
- [21] M. . Alcazar, "Nuevo procedimiento para la preparacion de acidos bis (2-hidroxiaril) aminoaceticos utilizando agentes de transferencia de cianuro," 2002.
- [22] D. and L. J. Mckenzie, "Plan nutrient based on o,p-ethylene (bis)hydroxyphenyl glycines," 2005.
- [23] F. Chem, "Synthesis and Chemical Characterization of the Novel Agronomically Relevant Pentadentate Chelate," *J. Agric. Food Chem.*, pp. 7908–7914, 2010.
- [24] I. Ibrahim and M. Bsharat, "Tailored functionalization of heterocyclic derivatives of carboxylic acids and imines: synthesis, characterization, and biological implications," *Nat. Sci.*, 2023.
- [25] W. Tang and S. Fang, "Mono-acylation of symmetric diamines in the presence of water," *Tetrahedron Lett.*, vol. 49, no. 41, pp. 6003–6006, 2008.
- [26] F. A. Servín, J. A. Romero, G. Aguirre, D. Grotjahn, R. Somanathan, and D. Chávez, "General Method for Selective Mono-Boc Protection of Diamines and Thereof," *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 61, no. 1, pp. 23–27, 2017.
- [27] P. E. y del Concejo, "Reglamento (CE) No 2003/2003," 2017.
- [28] K. Marecka, K. Hoffmann, E. Klem-marciniak, and M. Huculak-m, "Chemical Stability of the Fertilizer Chelates Fe-EDDHA and Fe-EDDHA over Time," *Molecules*, vol. 26, no. 7, 2021.
- [29] A. Biasone, "Process for the preparation of polyaminocarboxylic acids and chelate

compounds thereof,” in *WO2021111317A1*, WIPO PCT WO2021111317A1, 2020.

- [30] “Norma Española Fertilizantes Determinación de agentes quelantes en fertilizantes mediante cromatografía Parte 2: Determinación de hierro quelado por [o,o] EDDHA, [o,o] EDDHMA y HBED, o de la cantidad de agentes quelantes, por cromatografía de par iónico,” *UNE*, 2018.

## APÉNDICE

## TÉCNICAS EXPERIMENTALES

- **Cromatografía en Capa Fina (CCF)**

Los análisis realizados con cromatografía en capa fina (CCF), se llevaron a cabo con placas modelo Fluka Analytical, las cuales consisten en un espesor de 0.2 mm de fase estacionaria de sílica gel depositadas en un soporte de lámina de aluminio, con indicador fluorescente de 254 nm.

- **Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG/EM)**

Los análisis instrumentales realizados con el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de gases se realizaron con el equipo y modelo Thermo Scientific TRACE 1310 cuadrupolo Scientific ESQ LT. Los análisis se realizaron mediante una ionización por impacto electrónico.

- **Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con espectrofotómetro UV-VIS**

Los análisis instrumentales llevados a cabo mediante HPLC UV-Vis, se realizaron en un equipo y modelo U HPLC Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000, utilizando una columna C-18 de fase reversa, de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro, a 280 nm de longitud de onda en el espectro UV-Vis.

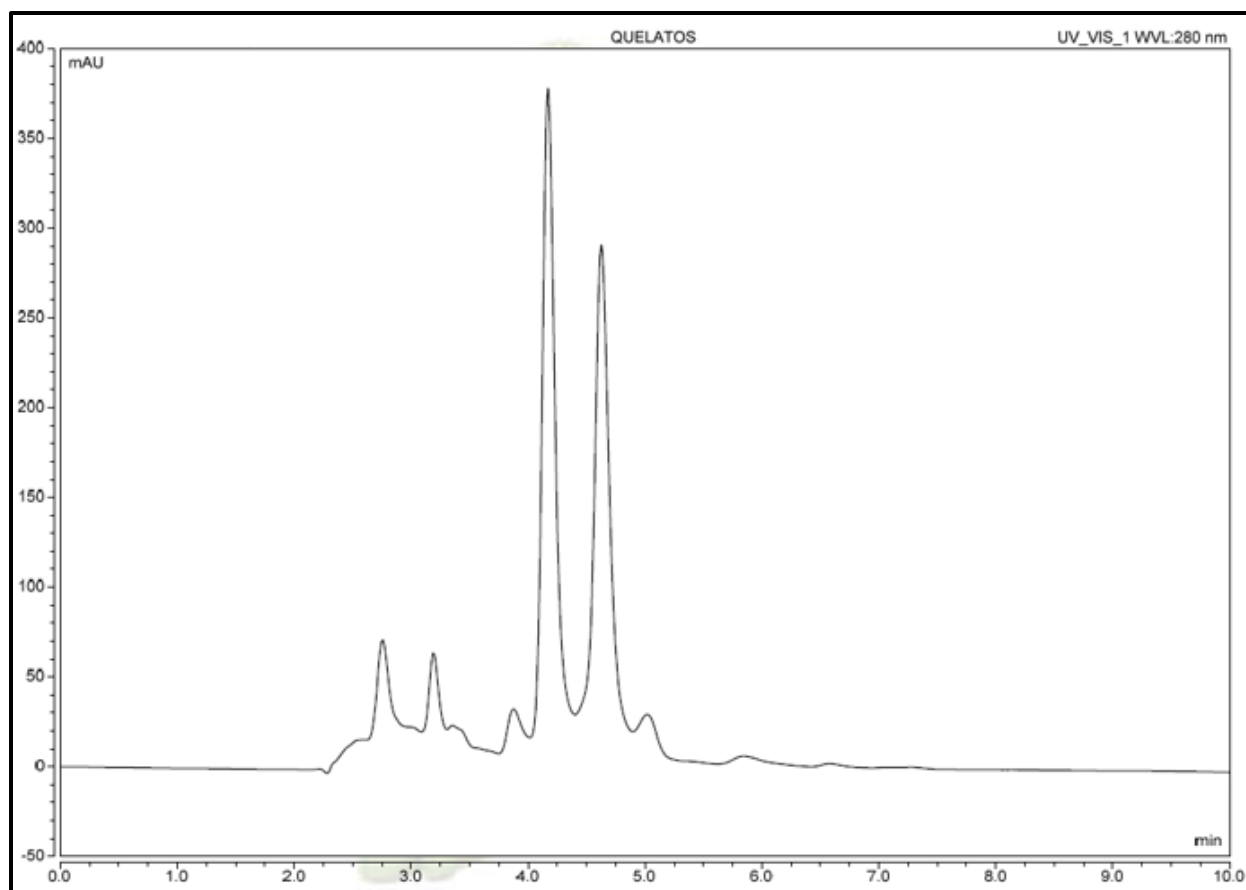
- **Espectroscopia de Infrarrojo (IR)**

Los análisis instrumentales mediante el espectrofotómetro infrarrojo se realizaron con el equipo y modelo Thermo Scientific Nicolet is5.

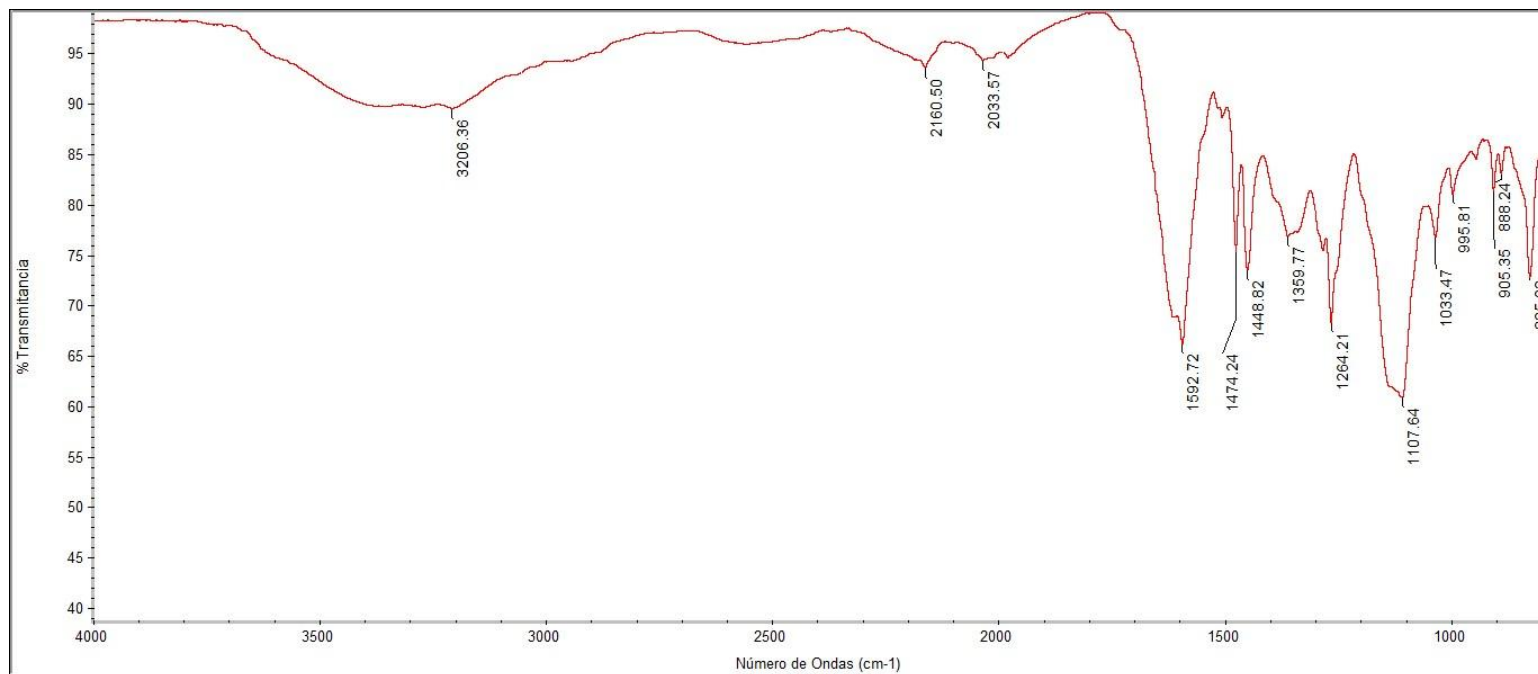
- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los análisis por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se realizaron en un equipo con modelo Bruker Avance III de 400 MHz, en la que se empleó TMS como referencia interna del equipo. Los disolventes deuterados utilizados para disolver las muestras fueron  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{DMSO-d}_6$ .

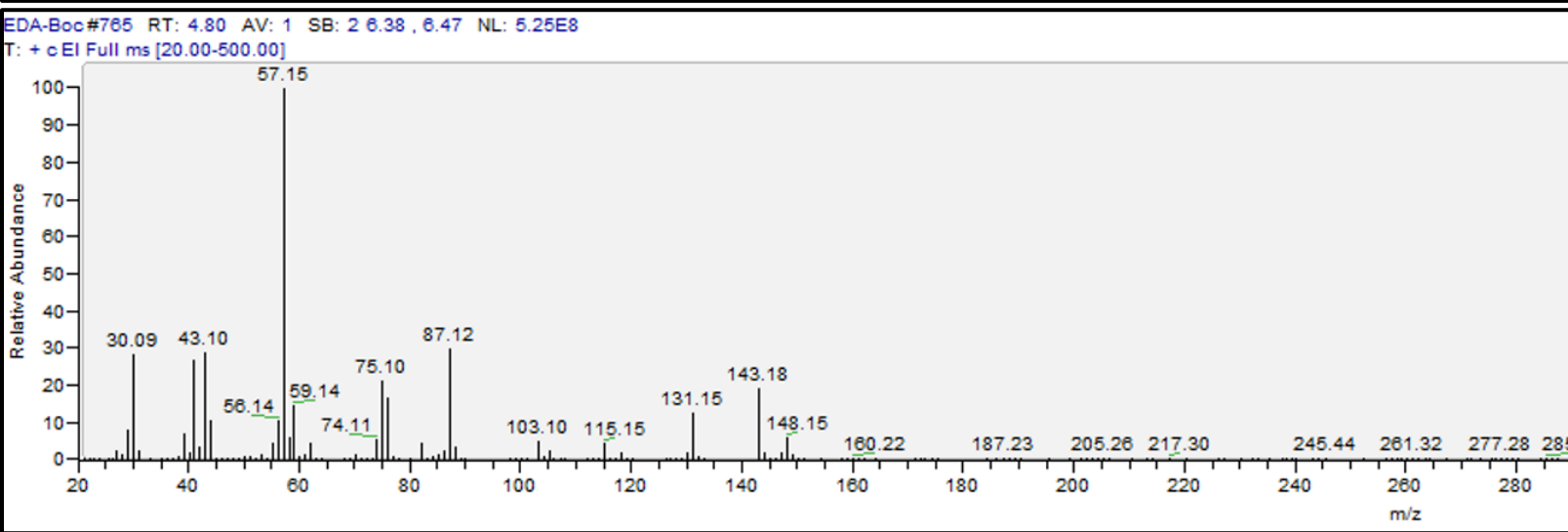
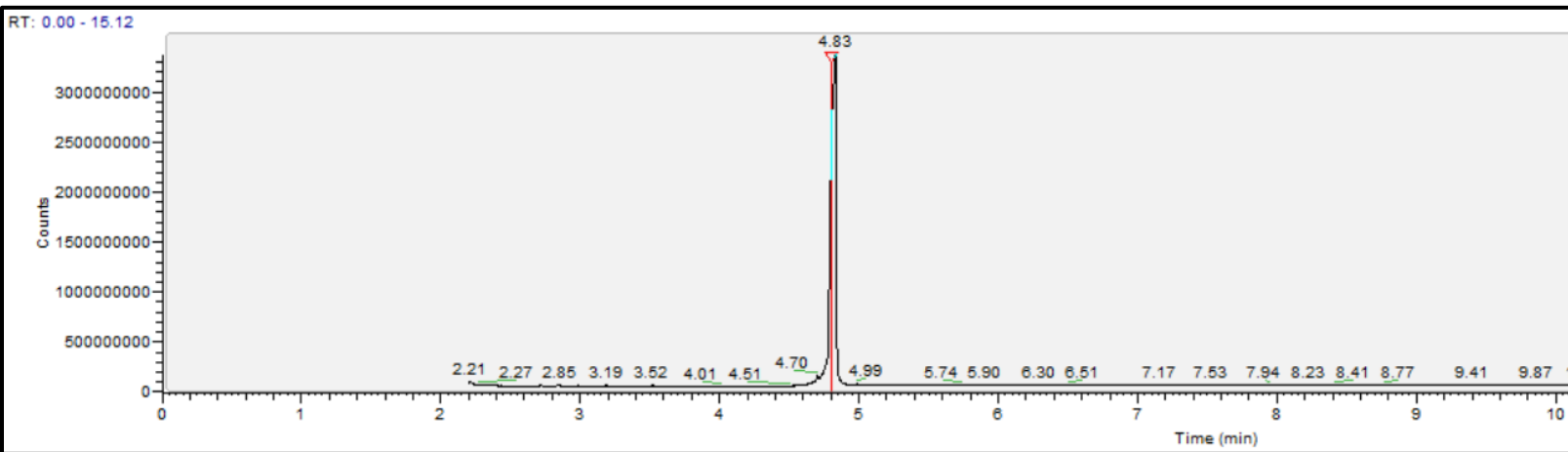
## ANEXOS



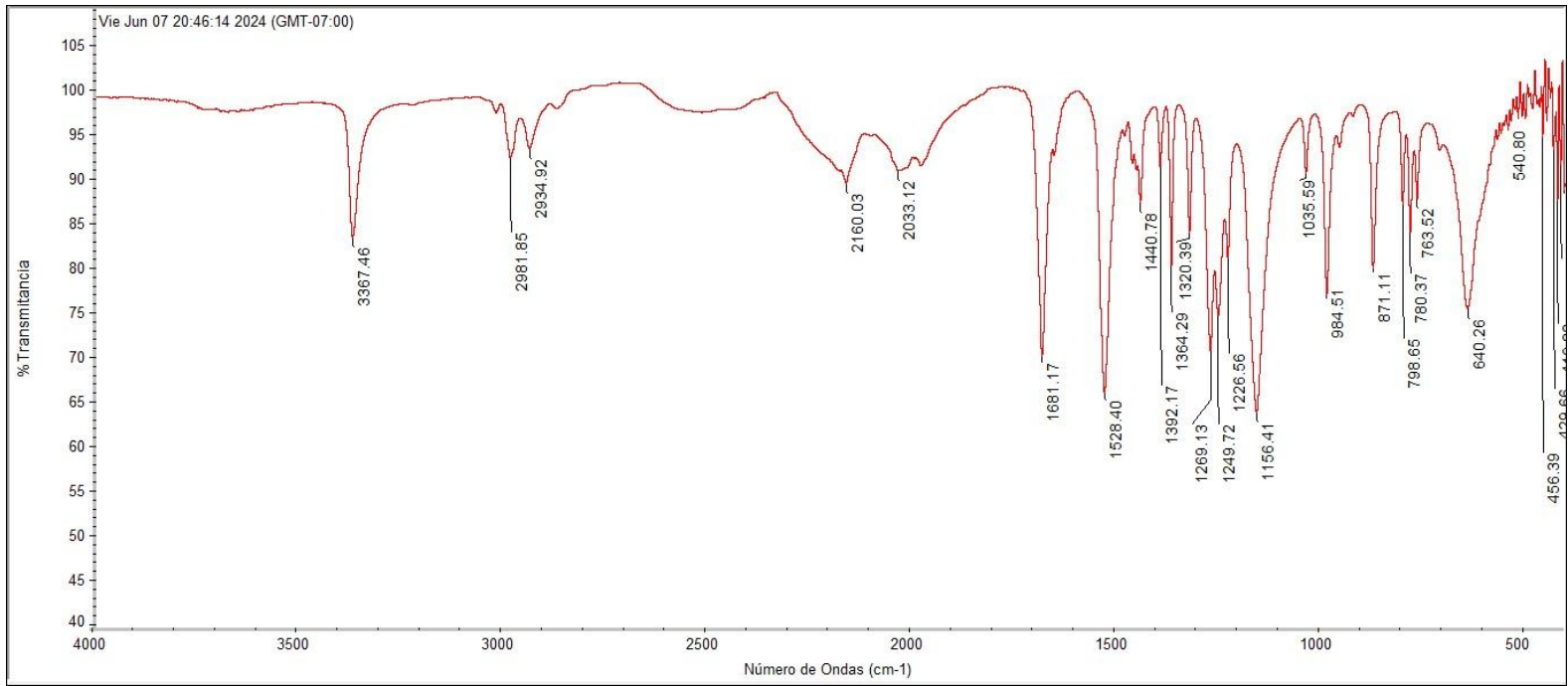
**Anexo 1. Cromatograma de HPLC de EDDHA/Fe**



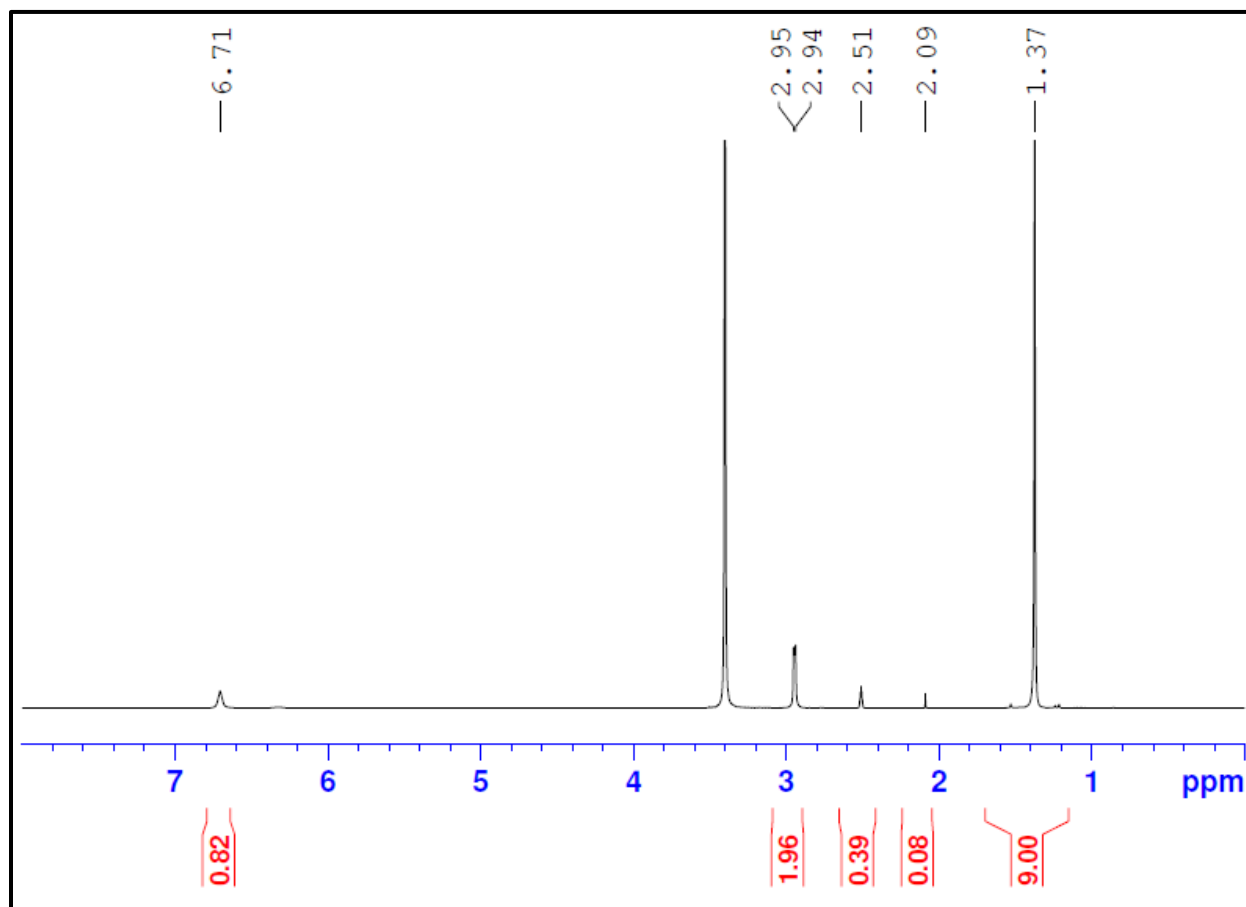
**Anexo 2. Espectro infrarrojo de EDDHA/Fe**



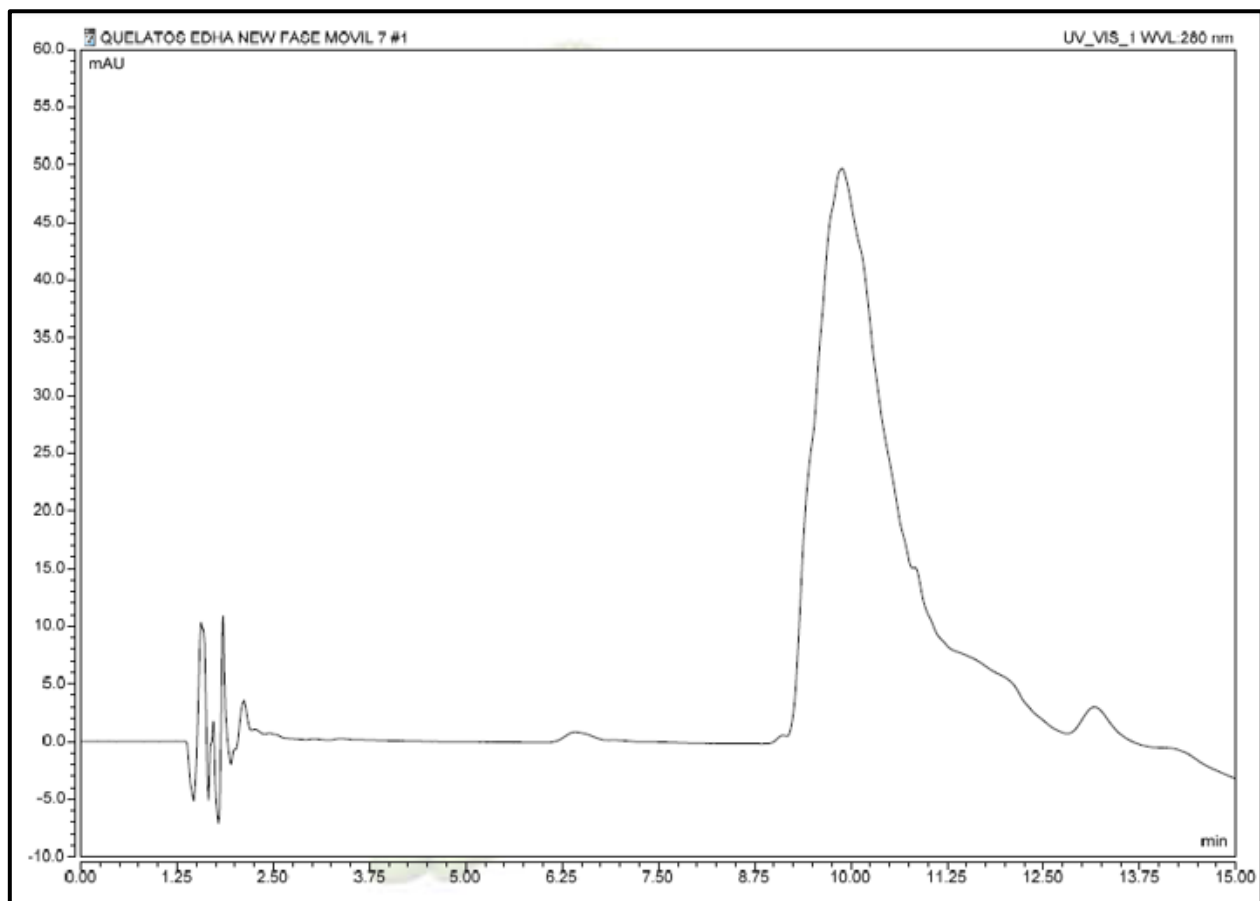
**Anexo 3. Cromatograma y espectro de masas de EDA mono-Boc**



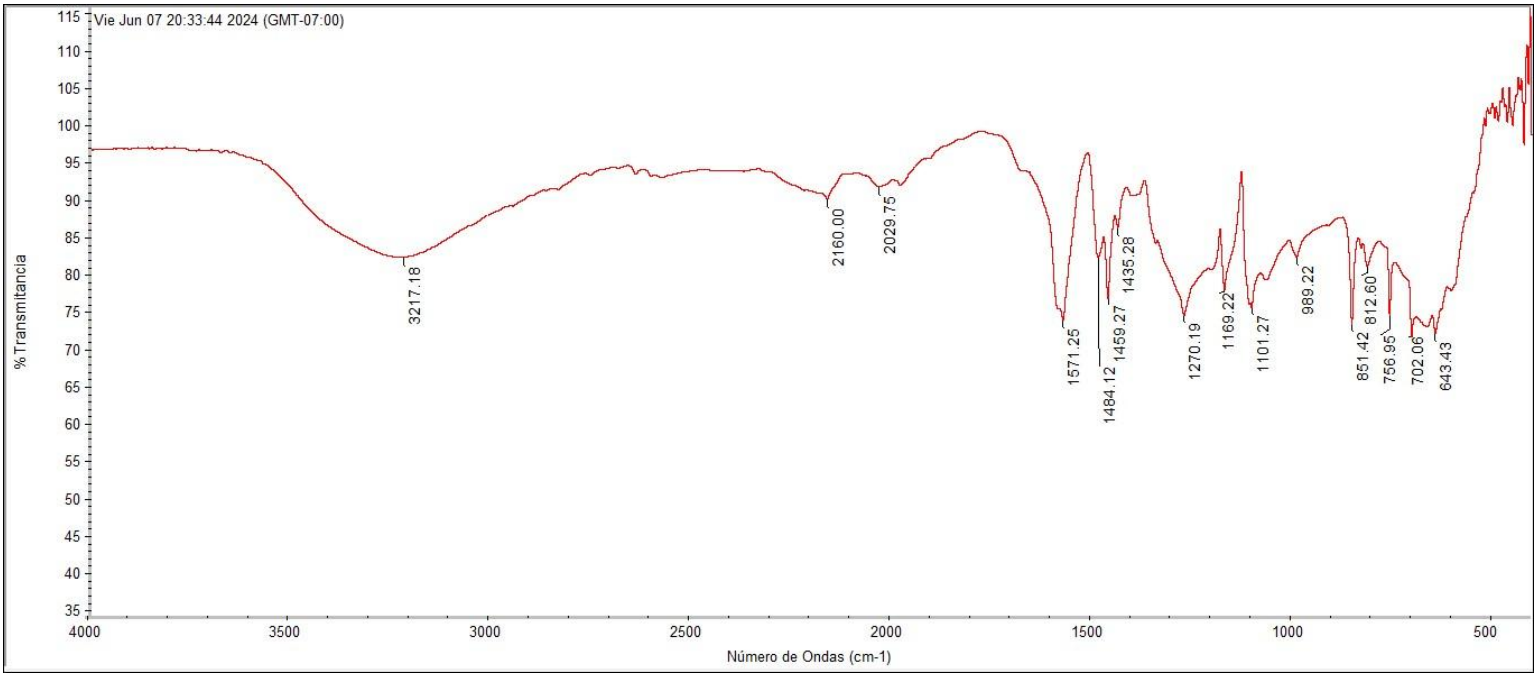
**Anexo 4. Espectro infrarrojo de EDA mono-Boc**



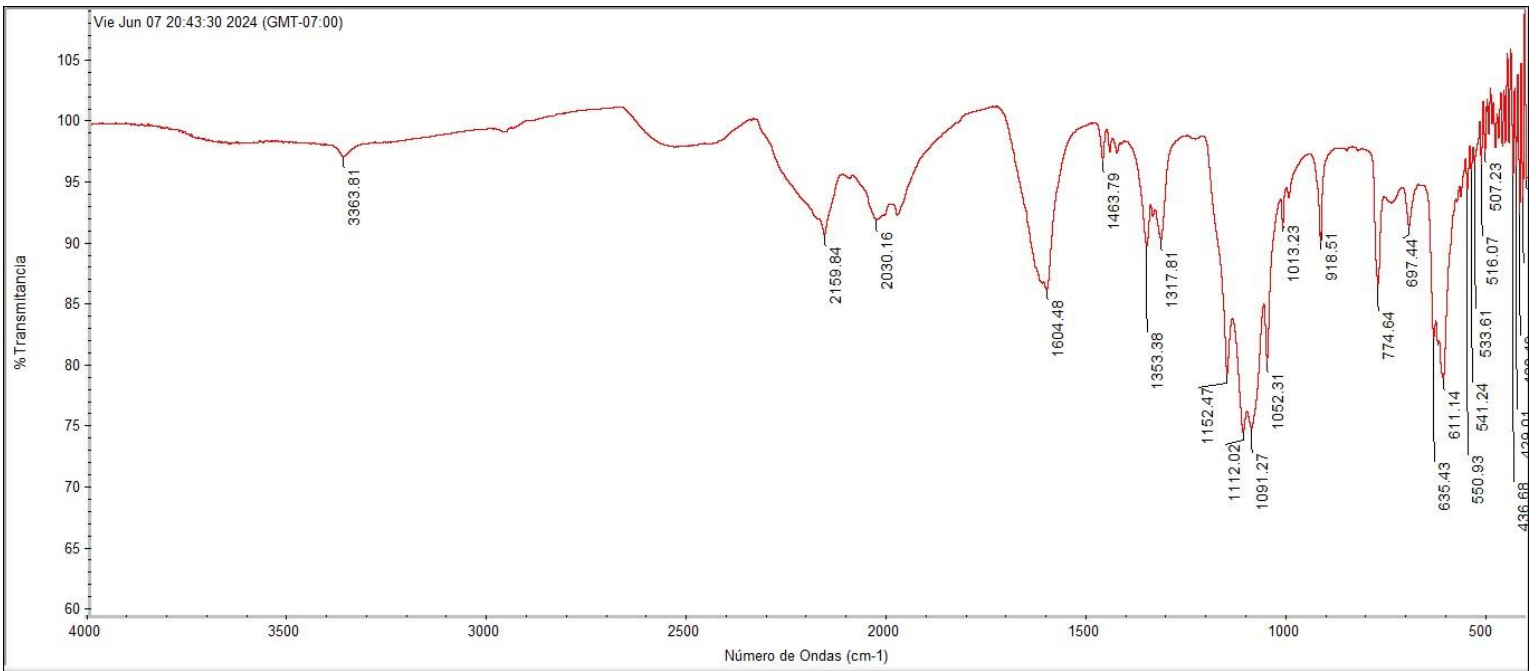
Anexo 5. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de EDA mono-Boc



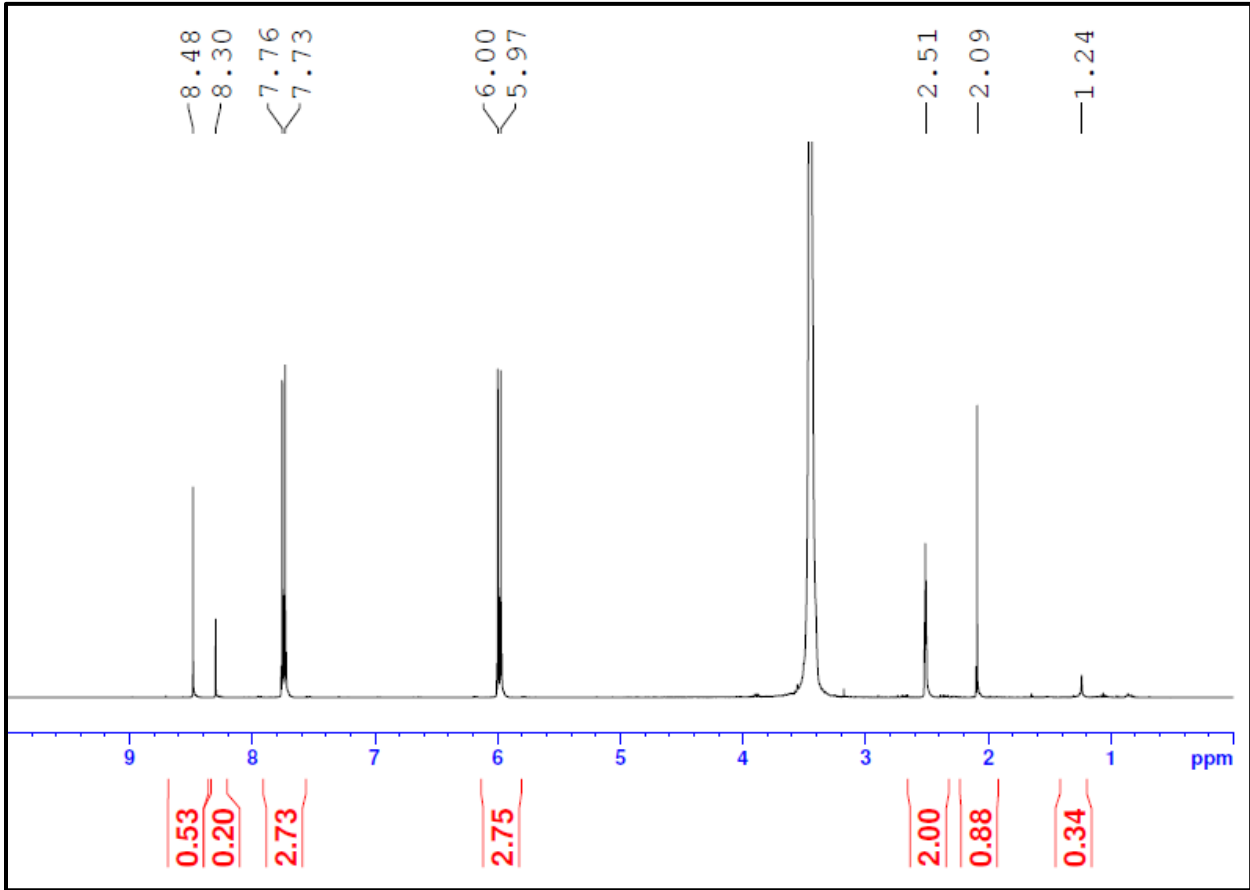
**Anexo 6. Cromatograma de HPLC de EDDHNA/Fe**



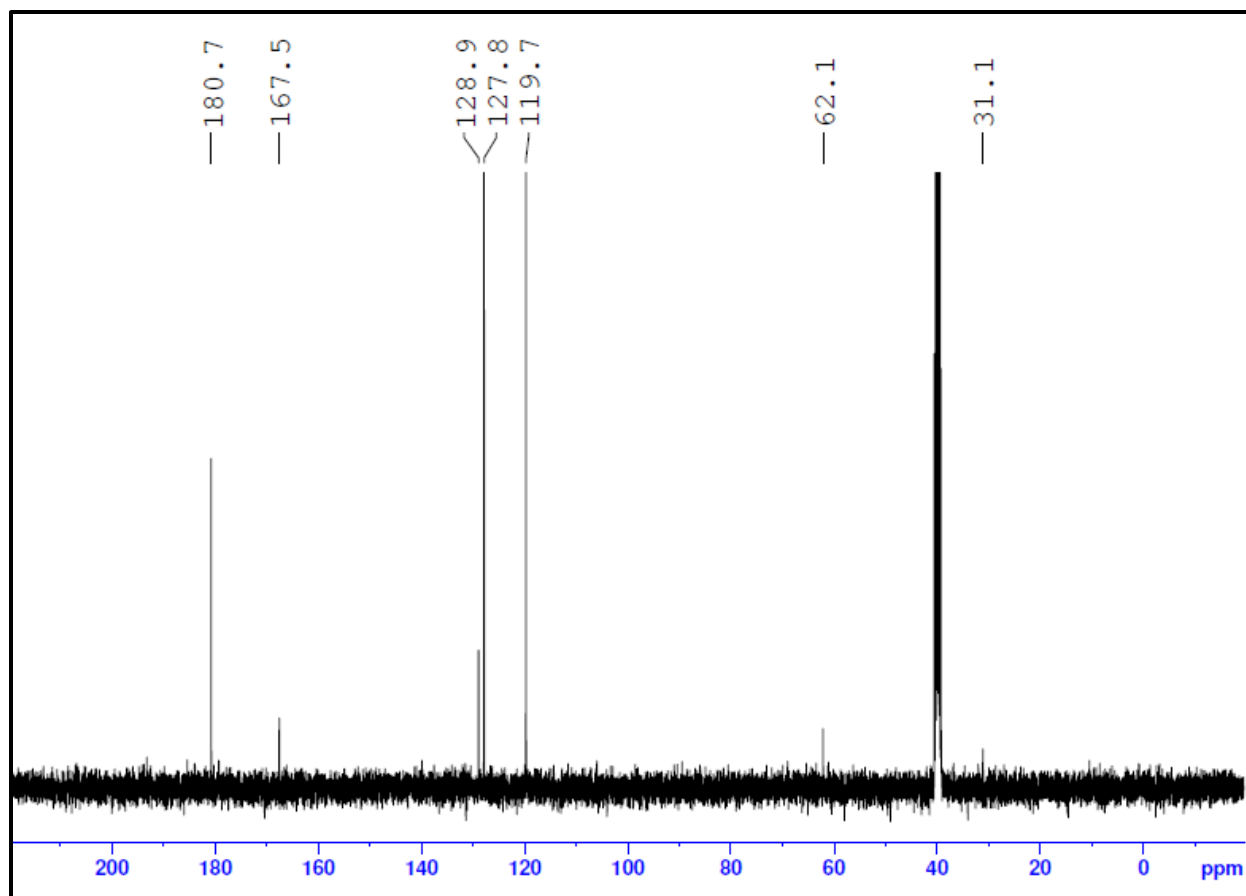
**Anexo 7. Espectro infrarrojo de EDDHNA**



**Anexo 8. Espectro infrarrojo de EDDHNA/Fe**



Anexo 9. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de EDDHNA



*Anexo 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de EDDHNA*