



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS / DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA FÍSICA

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA
NITROSACIÓN DE TAURINA Y
HOMOTAURINA Y DEL
POTENCIAL ALQUILANTE DE LOS
PRODUCTOS DE REACCIÓN**

JORGE ARENAS VALGAÑÓN

Salamanca 2015



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

Plaza de los Caídos, 1-5 37008 - Salamanca

Tel . (34) 923 29 44 87 Fax . (34) 923 29 45 74 www.usal.es

Memoria presentada por el Licenciado
en Química Jorge Arenas Valgañón
para optar al Grado de Doctor.

Fdo.: Jorge Arenas Valgañón

Salamanca, a de 27 de Julio de 2015



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA**

Plaza de los Caídos, 1-5 37008 - Salamanca

Tel . (34) 923 29 44 87 Fax . (34) 923 29 45 74 www.usal.es

**JULIO CASADO LINAREJOS, CATEDRÁTICO EMÉRITO DE QUÍMICA FÍSICA Y
EMILIO CALLE MARTÍN, PROFESOR TITULAR DE QUÍMICA FÍSICA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

CERTIFICAN que la investigación de doctorado *“Estudio cinético de la nitrosación de taurina y homotaurina y del potencial alquilante de los productos de reacción”* ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Física por el Licenciado en Química don Jorge Arenas Valgañón para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan la presentación de la misma en los términos establecidos por la normativa reguladora de los Estudios de Tercer Ciclo y Doctorado de la Universidad de Salamanca.

Salamanca a 27 de julio de 2015.

Fdo. Julio Casado

Fdo. Emilio Calle Martín

El trabajo descrito en esta memoria se ha desarrollado en el marco de los proyectos CTQ2007-63263 y CTQ2010-18999 del Plan Nacional de I+D+i y SA040/A08 de la Junta de Castilla y León. Se agradece la ayuda de estos organismos.

Agradezco a la Junta de Castilla y León y Fondos FEDER la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (2009-2013).

Agradezco a mis directores de tesis, Dres. Julio Casado Linarejos y Emilio Calle Martín la ayuda prestada, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

A mi familia, en especial a mis padres y hermanos, su apoyo incondicional.

A mis amigos, por estar ahí.

A mis compañeros de laboratorio, por los buenos consejos, apoyo y amistad brindados, que han sido claves en todo momento.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes bibliográficos	9
2.1. Ácidos aminoalcano sulfónicos	11
2.1.1. Taurina.....	11
2.1.1.1. Producción y síntesis	12
2.1.1.2. Biosíntesis.....	13
2.1.1.3. Funciones biológicas	13
2.1.2. Homotaurina	16
2.1.3. Reactividad de los ácidos aminoalcano sulfónicos.....	18
2.1.3.1. Reactividad de los ácidos sulfónicos	18
2.1.3.2. Reactividad de las aminas.....	19
2.2. Sultonas	20
2.2.1. Reactividad de las sultonas.....	21
2.3. Nitrosocompuestos	22
2.3.1. Carcinogenia.....	25
2.4. Reacciones de formación de nitrosocompuestos	26
2.4.1. Agentes nitrosantes (Y-NO).....	26
2.4.1.1. Nitrosación por trióxido de dinitrógeno.	27
2.4.1.2. Nitrosación catalizada en medios ácidos: ion nitrosonio/ ion nitrosacido	28
2.4.1.3. Nitrosación catalizada por nucleófilos: Haluros de nitrosilo.....	30
2.4.1.4. Nitrosación por otros agentes	30
2.4.2. Sustratos nitrosables	31
2.4.2.1. Sustratos <i>N</i> -nitrosables	31
2.4.2.1.1. Nitrosación de aminoácidos	33
2.4.2.2. Sustratos <i>C</i> -nitrosables	35
2.4.2.3. Sustratos <i>O</i> -nitrosables	35
2.4.2.4. Sustratos <i>S</i> -nitrosables.....	36
2.4.3. Mecanismos de nitrosación	36
2.4.3.1. Mecanismos controlados por difusión	36
2.4.3.2. Mecanismos por control orbitalico	38
2.4.3.3. Mecanismos controlados por transferencia protónica	44
2.4.3.4. Mecanismos de reordenamiento interno.....	46
2.5. Agentes alquilantes.....	48
2.5.1. Reactividad de los agentes alquilantes	49
2.5.1.1. Interacción con macromoléculas	51
2.5.1.2. Efectos biológicos de agentes alquilantes	53
2.5.1.2.1. Efectos biológicos de agentes alquilantes bifuncionales	53
2.5.1.2.2. Efectos biológicos de agentes alquilantes bifuncionales	55
2.5.2. Ensayos químicos para estudiar la reactividad de agentes alquilantes.....	56
2.5.2.1. Test de NBP.....	57
2.5.2.1.1. Desarrollo histórico.....	57
2.5.2.1.2. NBP como modelo del ADN	59
2.5.2.1.3. Aplicaciones del test de NBP.....	63

2.5.2.1.4. Factores que condicionan la correlación reactividad química-actividad biológica.....	72
3. Método experimental.....	75
3.1. Objetivos.....	77
3.2. Estudio cinético de la nitrosación de taurina y homotaurina.....	77
3.2.1. Estudio espectrofotométrico	77
3.2.1.1. Coeficiente de absorción molar del sistema ácido nitroso/ nitrito.....	79
3.2.2. Método cinético	80
3.2.3. Método de trabajo.....	81
3.2.3.1. Influencia del pH	82
3.2.4. Constante de acidez del grupo sulfónico	85
3.3. Estudio de la capacidad alquilante de los productos de nitrosación: 1,2-etanosultona y 1,3-propanosultona	86
3.3.1. Test de NPB.....	87
3.3.2. Estudio espectrofotométrico	87
3.3.3. Método de trabajo.....	88
3.3.3.1. Inestabilidad de la 1,2-etanosultona	89
3.4. Reactivos	90
3.5. Equipo de trabajo y software	90
4. Resultados.....	93
4.1. Estudio cinético de la nitrosación de taurina y homotaurina.....	96
4.1.1. Coeficiente de absorción molar del nitrito en medio básico	96
4.1.2. Coeficiente de absorción molar del nitrito en medio ácido	97
4.1.3. Coeficiente de absorción molar aparente del nitrito	97
4.1.4. Orden de reacción respecto a la concentración de nitrito	98
4.1.5. Orden de reacción respecto a la concentración de sustrato	101
4.1.6. Mecanismo de reacción	103
4.1.7. Influencia del pH	106
4.1.7.1. Comparación y discusión de los valores obtenidos para k_{Nit} y k_{exp} ...	111
4.1.8. Influencia de la fuerza iónica.....	112
4.1.9. Influencia de la temperatura: parámetros de activación	112
4.1.10. Caracterización de los productos de nitrosación.....	116
4.2. Estudio de la capacidad alquilante de la 1,2-etanosultona y 1,3-propanosultona.	119
4.2.1. Mecanismo de alquilación	119
4.2.2. Orden de reacción respecto a la concentración de NBP	122
4.2.3. Orden de reacción respecto a la concentración de sultona	123
4.2.4. Coeficiente de absorción molar	125
4.2.5. Estudio de las reacciones implicadas en el proceso de alquilación: Influencia de la temperatura	127
4.2.5.1. Estudio de la reacción de alquilación	129
4.2.5.1. Estudio de la reacciones de hidrólisis de la sultonas	131
4.2.5.1. Estudio de la reacciones de hidrólisis de los aductos Sult-NBP.....	133
4.2.5.1. Discusión	135
5. Conclusiones.....	141

1. Introducción

El hallazgo de Magee y Barnes¹ de que la adición de nitrosodimetilamina a los alimentos suministrados a ratas induce la aparición de cáncer hepático en estos animales y el descubrimiento posterior de la capacidad alquilante de numerosos nitrosocompuestos abrió un amplio horizonte a la investigación sobre los mecanismos de formación de estas especies y sus efectos biológicos. En tal sentido Lijinsky escribe: “*While we do not understand the mechanism by which any carcinogen causes cancer, N-nitroso compounds are providing clues more readily than do other carcinogens.*”²

Desde esas fechas los biólogos han centrado su atención en la capacidad cancerígena de los nitrosocompuestos,³ mientras que los químicos han investigado principalmente sus mecanismos de formación⁴ y las vías de bloqueo/inhibición de esas reacciones⁵.

¹ Magee, P.N.; Barnes, J.M. *Br. J. Cancer*, **1956**, *10*, 114.

² Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds*; Cambridge University Press: Cambridge, 1992.

³ Mirvish, S. S. *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 17.

⁴ a) Zollinger, H. *Diazo Chemistry I*; VCH: Weinheim, 1994.

b) *Diazo Chemistry II*; VCH: Weinheim, 1995.

c) Williams, D.L.H., *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide*, Elsevier: Amsterdam, 2004.

d) Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; Mosquera, M.; Peña, M. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1985**, 1859.

e) Casado, J. Invited Lecture. En *Fast Reactions in Solution*, Discussion Group, The Royal Society of Chemistry, Annual Meeting 1994.

f) Casado, J. Invited Lecture. “*Chemistry of nitrosation reactions in solution*”. En *Kolloquien der Ortsverbände, Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie*, 1997.

g) Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; García Mateos, F. J.; Tostado, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1992**, 987.

h) Casado, J.; González Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *28*, 307.

i) Iglesias, E.; Casado, J. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *21*, 37.

j) Iglesias, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13057.

k) Iglesias, E. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 1025.

l) Iglesias, E.; García Río, L.; Leis, J. R.; Casado, J. *Recent Res. Devel. in Phys. Chem.* **1997**, *1*, 403.

⁵ a) Archer, M. C. In *N-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*, O'Neill, I. K.; von Borstel, R. C.; Miller, C. T.; Long, J.; Bartsch, H., Eds., IARC Sci. Pub.No. 57: Lyon, France, 1984.

b) Loeppky, R. N.; Bao, Y. T.; Bae, J.; Yu, L.; Shevlin, G. En *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds. Chemistry and Biochemistry*, Loeppky, R. N.; Michejda, C. J., Eds., American Chemical Society: Washington DC, 1994.

c) García Prieto, J. C.; Mateos, R.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3517.

d) González Mancebo, S.; Calle, E.; García Santos, M. P.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 334.

e) González Mancebo, S.; García Santos, M. P.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2235.

f) González Mancebo, S.; Lacadena, J.; García Alonso, Y.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 157.

Magee⁶ *et al.* demostraron que la nitrosodimetilamina se convierte enzimáticamente en un poderoso agente metilante, lo que despertó gran interés hacia los mecanismos de carcinogénesis por alquilación de proteínas y ácidos nucleicos.

Actualmente se sabe que algunos nitrosocompuestos se descomponen o son metabolizados *in vivo* para formar electrófilos capaces de dañar el ADN. Se admite que este mecanismo es responsable de los efectos mutágenos y citotóxicos de esas especies químicas.

En ese contexto, el trabajo de nuestro grupo se viene centrando desde hace años en tres objetivos:

1. Estudio de mecanismos de nitrosación de sustratos lineales y cíclicos y búsqueda de correlaciones estructura/actividad en nitrosocompuestos. Inicialmente se abordó la nitrosación de aminoácidos con grupo amino secundario; se pudo demostrar que, junto a la nitrosación por NO^+ y N_2O_3 , interviene un mecanismo que implica la formación inicial de un aminocarboxilato de nitrosilo, seguida de una migración intramolecular del grupo NO.

2. Estudio de mecanismos conducentes a la degradación de nitrosocompuestos o a inhibir su formación.

3. Estudio de mecanismos de alquilación. Se ha trabajado con sustratos precursores de *N*-nitrosocompuestos que pueden dar lugar a mecanismos de alquilación.

La nitrosación de aminoácidos con grupo $-\text{NH}_2$ es particularmente interesante. Se sabía que conduce a la formación de especies mutágenas, pero se desconocía su naturaleza. Ejemplo significativo es la nitrosación del dipéptido aspartamo, éster metílico de la L-aspartil-L-fenilalanina, edulcorante bajo en calorías de amplio uso. La nitrosación de aspartamo conduce a un agente alquilante no identificado. Por eso la inclusión en la dieta de especies capaces de inducir mecanismos de alquilación es vista con prevención creciente. Estudios cinéticos con aspartamo y el dipéptido glicina-triptófano sugieren que los agentes mutágenos proceden de la nitrosación del grupo amino primario.

⁶ a) Magee, P. N.; Hultin, T. *Biochem. J.* **1962**, *83*, 106.

b) Magee, P. N.; Farber, E. *Biochem. J.* **1962**, *83*, 114

Debido a la gran inestabilidad de los productos de la nitrosación de aminoácidos con grupo -NH_2 , la reacción ha sido poco estudiada hasta fechas recientes. En 2001 en nuestro grupo se encontró que los agentes alquilantes resultantes de la nitrosación son las correspondientes lactonas.

Los resultados obtenidos al investigar la nitrosación de aminoácidos con el grupo -NH_2 han aconsejado emprender el estudio de las reacciones de nitrosación de ácidos aminoalcano sulfónicos en general, y de la taurina y la homotaurina (ver Figura 1.1), en particular. Las razones son varias:

a) Estructurales. Como ya se ha señalado, el estudio de la nitrosación de aminoácidos con grupo -NH_2 condujo a la identificación de las lactonas (algunas de ellas muy efectivos agentes alquilantes) como productos resultantes de esa nitrosación. El hecho de poseer en su molécula el grupo -NH_2 convierte a la taurina y a la homotaurina en potenciales sustratos nitrosables, lo que podría implicarlos en mecanismos de mutagénesis/carcinogénesis análogos a los de algunos nitrosocompuestos.⁷

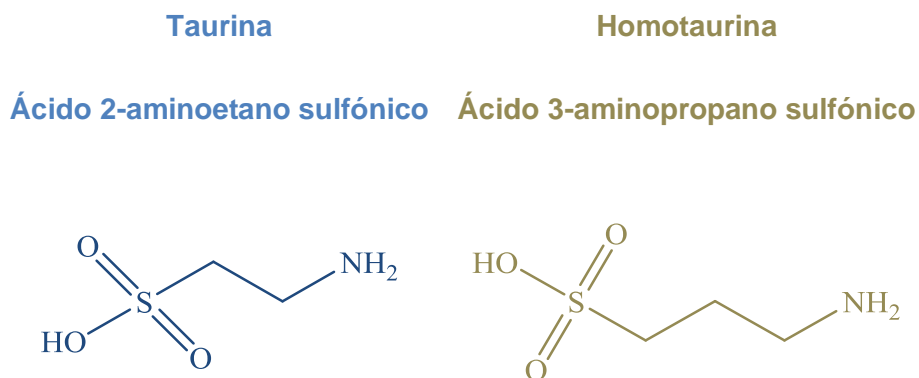


Figura 1.1. Estructuras de la taurina y la homotaurina

b) Bioquímicas. La taurina se ve involucrada en numerosos mecanismos bioquímicos y fisiológicos como el de neurotransmisión, regulación del tejido adiposo, y como agente antioxidante quimioprotector. Se ha comprobado la efectividad de la taurina para eliminar depósitos hepáticos grasos en el hombre, prevenir algunas patologías hepáticas y reducir la cirrosis en ratas. Muestra del interés del tema ha sido el “15th Taurine Meeting”, 12–15 Jun. 2005, Tampere, Finlandia. Los trabajos allí presentados se han publicado en 2006 en *Advances in Experimental Medicine and*

⁷ Williams, D.L.H., *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide*, Elsevier: Amsterdam, 2004.

Biology bajo seis epígrafes: *Taurine metabolism and taurine transporter, Metabolic effects of taurine, Effects of taurine supplementation, Taurine in heart and muscles, Taurine in brain and retina, Taurine derivatives.*

c) Aplicabilidad tecnológica. La taurina se utiliza en tecnología de alimentos y bebidas. Su empleo es creciente como suplemento alimentario, en *bebidas energéticas* como la popular *Red Bull®*, etc. En la Tabla 1.1 se recogen algunos ejemplos de bebidas con distintas concentraciones de taurina.

Tabla 1.1. Algunas bebidas que contienen taurina

Bebida	[Taurina], mg/100 mL
AMP	63
Full Throttle	252
Jolt Cola	403
Monster	423
Red Bull	408
Relentless	423
Rip It	423
Rockstar	423
Starbucks Doubleshot	406
Vitamin Energy	423
Vitamin Water Power C	4,2

La homotaurina se utiliza como intermedio de síntesis de numerosos compuestos, así como en la estructura de algunos tampones, y es un nutraceutico que se comercializa en algunos países como protector de la memoria.

d) Hasta el momento de redactar esta Memoria, en la abundante bibliografía sobre ambos ácidos aminoalcano sulfónicos no se ha encontrado ningún trabajo sobre mecanismos de nitrosación de estas moléculas.

Por otra parte, en la bibliografía bioquímica/biológica se han encontrado conclusiones aparentemente contrapuestas. Mientras que, para algunos autores *“Evidence suggests that some bile acids and their isomeric metabolites may be involved in the pathogenesis of colon cancer. However, the mechanism responsible for their cancer-promoting effect is not clear. We and others propose that one mechanism for the mitogenic effects of bile acids may be N-nitrosation of their glycine and taurine amides; human gastric aspirates do contain small quantities of N-nitroso compounds of other substrates. Many foods contain nitrites and nitrates, which can react with bile acid*

amides to form N-nitroso derivatives”,⁸ otros investigadores sugieren que la taurina puede actuar como quimioprotector antimutágeno mediante inhibición de potenciales agentes mutágenos, lo que ha llevado, incluso, a proponer la inhalación de taurina a los fumadores.⁹

En consecuencia, se ha considerado oportuno abordar el estudio cinético de las reacciones de nitrosación de taurina y homotaurina, y del potencial alquilante de sus productos de nitrosación.

⁸ Dayal, B.; Ertel, N.H. *Lipids*, **1997**, 32, 1331.

⁹ Laidlaw, S.A.; Dietrich, M.F.; Lamtenzan, M.P.; Vargas, H.I.; Block, J.B.; Kopple, J.D. *Cancer Res.* **1989**, 49, 6600.

2. Antecedentes bibliográficos

2.1. Ácidos aminoalcano sulfónicos

La Figura 2.1 muestra la estructura general de los ácidos aminoalcano sulfónicos.

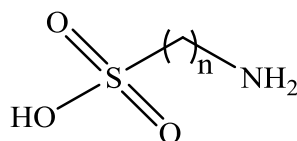


Figura 2.1. Estructura general de los ácidos aminoalcano sulfónicos

Comúnmente se hace referencia a algunos ácidos aminoalcano sulfónicos como aminoácidos. Sin embargo, puesto que el grupo ácido que poseen es sulfónico su designación correcta es aminoácidos sulfónicos,¹⁰ o simplemente sulfoaminoácidos.

Entre los ácidos aminoalcano sulfónicos (AAS) existen numerosos compuestos, la mayoría sintéticos, que han despertado interés por sus aplicaciones: propiedades antivirales,¹¹ limitación del crecimiento de microorganismos,¹² reguladores de pH o surfactantes (especialmente los AAS *N*-sustituidos),¹³ entre otras.

Los dos AAS más conocidos son los que están presentes en la naturaleza: la taurina y la homotaurina.

2.1.1. Taurina

La taurina, ácido 2-aminoetano sulfónico, fue aislada por primera vez en 1827 por Friedrich Tiedemann y Leopold Gmelin¹⁴ en bilis de buey (toro); de ahí su nombre.

La taurina es muy utilizada en la industria alimentaria como componente de

¹⁰ a) Bouckenogue, T.; Remacle, C.; Reusens, B. *Curr Opin. Clin Nutr.* **2006**, 9, 728.

b) Brosnan, J.; Brosnan, M. *J Nurt.* **2006**, 136, 1636S.

¹¹ a) Aekerman, W. W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1952**, 80, 362.

b) Thompson, R. L. *J. Immunol.* **1947**, 55, 345.

c) Fujii, A.; Cook, E. S. *J. Med. Chem.* **1975**, 18, 502.

¹² a) McIlwain, H. *J. Chem. Soc.* **1941**, 75.

b) Greenberg, D. M.; Schulman, M. P. *Science* **1947**, 106, 271.

¹³ a) Good, N. E.; Winget, G. D.; Winter, W.; Connolly, T. N.; Izawa, S.; Singh, R. M. M. *Biochemistry* **1966**, 5, 467.

b) Ferguson, W. J.; Braunschweiger, K. I.; Braunschweiger, W. R.; Smith, J. R.; McCormick, J. J.; Wasmann, C. C.; Jarvis, N. P.; Bell, D. H.; Good, N. E. *Anal. Biochem.* **1980**, 104, 300.

c) Vasconcelos, M. T. S. D.; Almeida, C. M. R. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 369, 115.

¹⁴ Tiedemann, F.; Gmelin, L. *Annalen der Physik* **1827**, 85, 326.

bebidas energéticas tipo Red Bull®. También se utiliza como suplemento en fórmulas infantiles, debido a que los sucedáneos de la leche materna tienen menor cantidad de taurina que ésta, siendo necesario un aporte extra de esta sustancia para el correcto desarrollo del bebé.¹⁵

Este compuesto se encuentra de forma natural en carnes y pescados y en productos de origen vegetal, como las alubias (Tabla 2.1). Además está presente en pequeñas cantidades en tejidos animales y humanos. A diferencia de otros aminoácidos, no forma parte de proteínas, sino que suele encontrarse libre en numerosas partes de los organismos. Aunque se ha identificado en pequeños polipéptidos, aún no se ha encontrado una aminoacil tARN sintetasa que reconozca específicamente este compuesto y pueda incorporarlo al tARN.¹⁶

Tabla 2.1. Contenido en taurina de algunos alimentos.

Alimento	mg/250 g
Garbanzos ¹⁷	1,1
Carne de ternera ¹⁸	192
Atún blanco ¹⁹	440
Almejas ²⁰	1295
Pulpo ²²	976
Gambas ²²	388

2.1.1.1. Producción y síntesis

Dada la gran importancia que ha adquirido la taurina en la industria farmacéutica y alimentaria, es necesaria su producción en grandes cantidades y por ello existen diversas rutas de síntesis. Una de ellas parte de ácido isetiónico (sintetizado a partir de óxido de etileno y bisulfito sódico); otra vía parte de cisteína, metionina y vitamina C, y también las hay que parten de aziridinas.²¹

Una alternativa a la síntesis es su extracción de los intestinos del ganado, forma de obtención que cuenta con la oposición de algunos colectivos.

¹⁵ a) Gaull, G. E. *Acta Paediatr. Scand.* **1982**, 296, 38.

b) Gaull, G. E. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1982**, 139, 89.

¹⁶ Lahdesmaki, P. *Int. J. Neuroscience* **1987**, 37, 79.

¹⁷ Pasantes-Morales, H.; Flores, R. J. *Food Compos. Anal.* **1991**, 4, 322.

¹⁸ Purchas, R. W.; Rutherford, S. M.; Pearce, P. D.; Vather, R.; Wilkinson, B. H. P. *Meat Sci.* **2004**, 66, 629.

¹⁹ Gormley, T. R.; Neumann, T.; Fagan, J. D.; Brunton, N. P. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, 225, 837.

²⁰ Pasantes-Morales, H.; Quesada, O.; Alcocer, L.; Olea, R. S. *Nutr. Rep. Int.* **1989**, 40, 793.

²¹ Hu, L.; Zhu, H.; Du, D. M.; Xu, J. J. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4543.

2.1.1.2. Biosíntesis

La vía de síntesis en mamíferos comprende los siguientes pasos (Figura 2.3):

1. Oxidación del grupo –SH de la cisteína, mediada por la cisteína dioxigenasa, con formación del ácido cisteinsulfínico.
2. Descarboxilación del ácido cisteinsulfínico a hipotaurina, por la enzima sulfinolalanina descarboxilasa.
3. Oxidación de la hipotaurina a taurina, aunque no se ha elucidado el mecanismo por el que transcurre.

Existe otra vía de síntesis de taurina en mamíferos; desechada hace tiempo, que está volviendo a considerarse. Sugiere un paso a través de la coenzima A²² (Figura 2.2):

1. Síntesis de coenzima A a partir de cisteína, con posterior descarboxilación del residuo de cisteína del coenzima que se convierte en un residuo de cisteamina.
2. Síntesis de panteteína a partir del coenzima A descarboxilado y posterior hidrólisis de éste por la panteteinasa, produciendo cisteamina y ácido pantoténico.
3. Oxidación de la cisteamina a hipotaurina por el enzima cisteamino-desoxigenasa.
4. Oxidación de la hipotaurina a taurina. Transcurre a través de un mecanismo aún desconocido.

2.1.1.3. Funciones biológicas

La taurina ejerce numerosas e importantes funciones biológicas en mamíferos. De hecho se ha demostrado que su concentración es elevada en tejidos con actividad oxidativa (riñones, nervios, retina, corazón y tejido muscular en general)²³ mientras que, en tejidos cuya principal actividad es la glucolítica, su concentración es mucho menor.

²² Coloso, R. M.; Hirschberger, L. L.; Dominy, J. E.; Lee, J. I.; Stipanuk, M. H. *Taurine 6, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 583, Springer Science: New York, 2006.

²³ Jacobsen, J. G.; Smith, L. H. *Physiol. Rev.* **1968**, 48, 424.

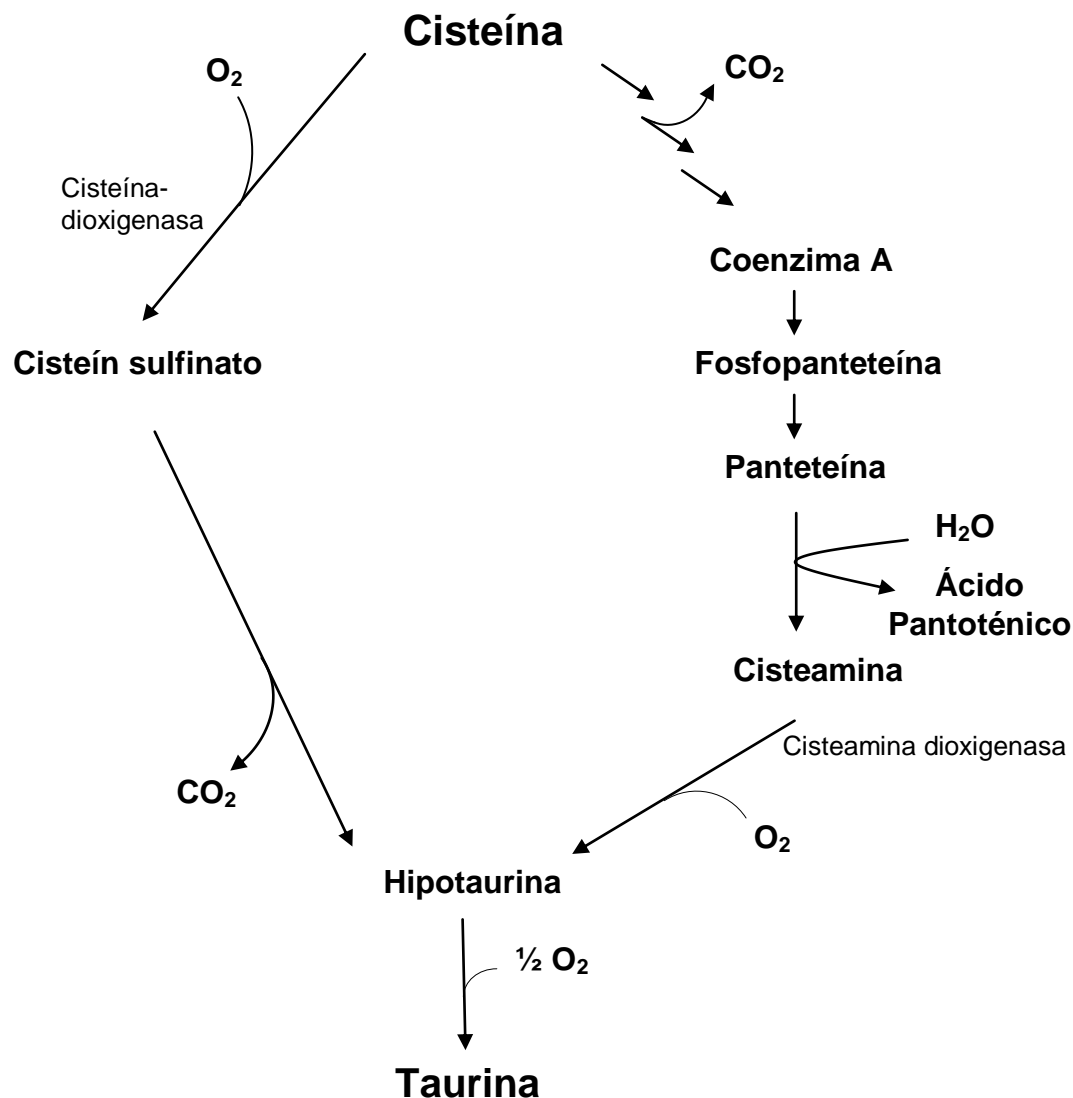


Figura 2.2. Esquema de las principales vías de síntesis de taurina en los seres vivos.

Se ha comprobado en ratas que la taurina ayuda a la pérdida de peso y a la disminución de azúcar en sangre, lo que supone un efecto de prevención de cierto tipo de diabetes.²⁴ Esta posible actividad hipoglucémica se explica por su capacidad para aumentar la excreción del colesterol y, de forma alternativa, por su actividad inhibitoria sobre el transportador de glucosa SGLT-1.

Algunos estudios han demostrado que la taurina modifica la expresión de ciertos genes en células hepáticas HepG2, aumentándola o disminuyéndola. Así ocurre, por ejemplo, con el gen de la isoenzima piruvato deshidrogenasa kinasa. La

²⁴ Nakaya, Y.; Minami, A.; Harada, N.; Sakamoto, S.; Niwa, Y.; Ohnaka., M. *Am. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 54.

disminución en su expresión aumenta la actividad de la piruvato deshidrogenasa, lo cual se traduce en un aumento de la producción de acetilcoenzima A.²⁵

La taurina está implicada de forma indirecta en la oxidación mitocondrial, pues dado el pK_a de su grupo amino (9,0 a 25,0 °C y 8,6 a 37,0 °C), ayuda a mantener el pH de este medio en torno a un valor ($\approx 7,9-8,1$)²⁶ que impide la unión de las especies reactivas que se forman en esta matriz.

La taurina forma parte de algunas sales biliares, como el tauroquenodeoxicolato sódico y el taurocolato sódico, en los que se encuentra formando una amida entre su único grupo amino y el grupo ácido de los ácidos quenodeoxicólico y cólico. Además, como el pK_a del grupo ácido de la taurina es bajo, estos derivados se encuentran siempre cargados negativamente en todo el intervalo de pH del organismo, lo que le confiere propiedades tensioactivas.

Estudios con animales han demostrado que la taurina actúa como agente ansiolítico sobre el sistema nervioso central.²⁷ Está probado que en humanos afectados de hipertensión un aporte extra de taurina en la dieta ayuda a disminuir la presión sanguínea.²⁸

Cabe resaltar también que, tanto la taurina como alguno de sus análogos, tienen una acción antiinflamatoria lo que se ha atribuido principalmente a tres hechos:

1. Su efecto modulador en la liberación del NMDA (ácido *N*-metil-D-aspartico) provocada por el glutamato.
2. Su reacción con el ácido hipocloroso para formar un mediador antiinflamatorio menos tóxico, la cloroaminotaurina (TauCl).
3. El papel que desempeña en la homeostasis del calcio, pues se piensa que produce una mejora de la absorción de este elemento en la mitocondria.

Gracias al efecto antiinflamatorio, la taurina desempeña funciones neuroprotectoras, aunque en este campo se ve superada por uno de sus análogos, la

²⁵ Park, S. H.; Lee, H.; Park, K. K.; Kim, H. W.; Lee, D.H.; Park, T. *Taurine 6, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 583, Springer Science: New York, 2006.

²⁶ Hansen, S. H.; Andersen, M. L.; Birkedal, H.; Cornett, C.; Wibrand, F. *Taurine 6, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 583, Springer Science: New York, 2006.

²⁷ Zhang, C. G.; Kim, S. J. *Annals of Nutrition & Metabolism* **2007**, 51, 379.

²⁸ Militante, J. D.; Lombardini, J. B. *Amino Acids* **2002**, 23, 381.

homotaurina.²⁹ La taurina también está implicada en otros procesos de protección, como, por ejemplo, el que tiene lugar en las células cardíacas.³⁰

Estudios con ratones con deficiencia genética de taurina dieron como resultado una reducción del 80 % de su movilidad, lo que parece indicar que este β -sulfoaminoácido es esencial para la formación del músculo esquelético.³¹ Se piensa que el papel que desempeña en la homeostasis del calcio, así como su intervención en los movimientos iónicos, son las causas por las que la taurina actúa en el acoplamiento de excitación-contracción en el músculo esquelético.³²

2.1.2. Homotaurina

La homotaurina (ácido 1,3-aminopropano sulfónico) es un sulfoaminoácido natural presente en las algas rojas,³³ de donde inicialmente se extraía. Empezó a sintetizarse y se introdujo para uso clínico con el nombre de tramiprosato.³⁴ También se empezó a usar en biología experimental como tampón, CAPS (3-*N*-(ciclohexil)amino-1-propanosulfonato)(sigma Aldrich C2632).

La homotaurina tiene una estructura muy similar a la taurina, de la que recibe su nombre, y al GABA (ácido γ -aminobutírico), por lo que puede desarrollar funciones muy parecidas a las de estos compuestos en el cuerpo humano.

Como sulfoaminoácido, al igual que la taurina, puede actuar como protector contra el daño celular, particularmente del daño producido por la oxidación del ADN que provocan ciertos radicales libres generados en reacciones biológicas.³⁵

Como era de esperar, por su similitud con el GABA, la homotaurina presenta actividad agonista del GABA, por lo que actúa como anti-nocioceptivo y analgésico.³⁶

²⁹ Ward, R.; Cirkovic-Velichovia, T.; Ledequé, F.; Tirizitis, G.; Dubars, G.; Datla, K.; Dexter, D.; Heushling, P.; Crichton, R. *Taurine 6, Advances in Experimental Medicine and Biology*, 583, Springer Science: New York, 2006.

³⁰ Garg, S.; Narula, J.; Chandrashekhar, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, 38, 3.

³¹ Warskulat, U. ; Flogel, U. ; Jacoby, C.; Hartwig, H.G.; Thewissen, M.; Merx, M. W.; Molojavyi, A.; Heller-Stilb, B.; Schrader, J.; Haussinger, D. *FASEB J.* **2004**, 18, 577.

³² De Luca, A.; Pierno, S.; Conte-Camerino, D. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 296, 215.

³³ a) Ito, K.; Miyazawa, K.; Matsumoto, F. *Hiroshima Daigaku Suichikusangakubu Kiyo* **1977**, 16, 77.

b) Miyasawa, K.; Ito, K.; Matsumoto, F. *Nippon Suisan Gakkaishi* **1970**, 36, 109.

³⁴ Wright, T. M. *Drugs Today (Barc)* **2006**, 42, 291.

³⁵ a) Biasseti, M.; Dawson, R. Jr. *Amino Acids* **2002**, 22, 351.

b) Messina, S. A.; Dawson, R. Jr. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 483, 355.

³⁶ a) Ruiz de Valderas, R. M.; Serrano, M. L.; Serrano, J. S.; Fernández, A. *Gen Pharmacol.* **1991**, 22, 717.

También se han demostrado efectos de neuroprotección,³⁷ antihipertensión y anticólvusión.³⁸

Todos estos efectos de la homotaurina en el cuerpo humano, especialmente su capacidad GABAérgica, han propiciado que uno de sus derivados, el *N*-acetilhomotaurinato de calcio (Figura 2.3), más conocido como acamprosato, se utilice en el tratamiento del alcoholismo.³⁹

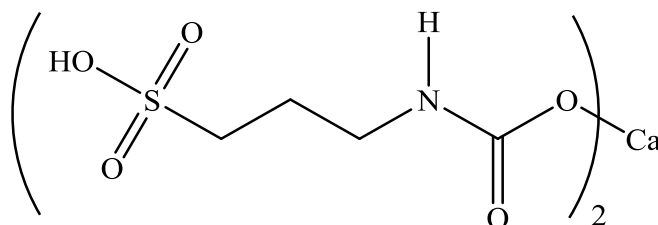


Figura 2.3. Estructura del acamprosato

El acamprosato ayuda a equilibrar el balance de los neurotransmisores GABA y glutamato, inhibidor y excitante del sistema nervioso, respectivamente, lo que ayuda a reducir la recaída en la ingesta alcohólica.⁴⁰ Además, el acamprosato no produce apenas efectos secundarios adversos, no se metaboliza en el hígado y su efecto no se ve alterado por etanol, lo que permite que pueda administrarse a personas con hepatitis o enfermedades del hígado o que sigan consumiendo alcohol.⁴¹

Más allá de los efectos neuroprotectores y neurotrópicos mencionados, que están relacionados con la activación de los receptores tipo A del GABA, se sabe que la homotaurina previene la neurotoxicidad del péptido β -amiloide ($A\beta$), reduciendo su agregación. Esto se debe a que la homotaurina actúa de forma parecida a un glicosaminoglucano, uniéndose al péptido $A\beta$ y bloqueando su agregación.⁴²

Esta capacidad de inhibir la agregación del péptido $A\beta$ propició que se investigase la homotaurina como posible fármaco para el tratamiento del Alzheimer.³⁶

b) Serrano, M. L.; Serrano, J. S.; Asadi, I.; Fernández, A.; Serrano-Martino, M. C. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **2001**, *15*, 167.

³⁷ Bousquet, P.; Feldman, J.; Bloch, R.; Schwartz, J. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *219*, 213.

³⁸ Caltagirone, C.; Ferrannini, L.; Marchionni, N.; Nappi, G.; Scapagnini, G.; Trabucchi, M. *Aging Clin. Exp. Res.* **2012**, *24*, 580.

³⁹ Scott, L. G.; Figgitt, D. P.; Keam, S. J.; Waugh, J. *CNS Drugs* **2005**, *19*, 445.

⁴⁰ Pierrefiche, O.; Daoust, M.; Naassila, M. *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 35.

⁴¹ Witkiewitz, K.; Saville, K.; Hamreus, K. *Ther. Clin. Risk. Manag.* **2012**, *8*: 45.

⁴² Gervais, F.; Chalifour, R.; Garceau, D.; Kong, X.; Laurin, J.; McLaughlin, R.; Morissette, C.; Paquette, J. *Amyloid* **2001**, *8* (suppl 1), 28.

En este estudio la homotaurina superó con éxito las dos primeras fases pero, en la tercera, que se desarrolló con pacientes con un nivel entre moderado y alto de la enfermedad, no se obtuvieron resultados concluyentes y se desechó su utilización para este fin.⁴³

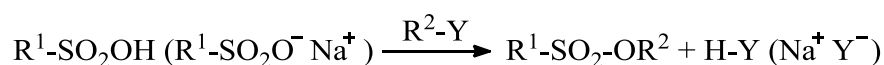
A pesar de este resultado, la homotaurina se empezó a comercializar como nutraceútico para la protección de la memoria bajo el nombre comercial de VIVI mind™ (Ovos Natural Health Inc.).

2.1.3. Reactividad de los ácidos aminoalcano sulfónicos

La reactividad de los aminoácidos carboxílicos es similar a la de los compuestos que tienen grupos amino y carboxilo,⁴⁴ por ello puede esperarse que los aminoácidos sulfónicos reaccionen como las aminas y los ácidos sulfónicos.

2.1.3.1. Reactividad de los ácidos sulfónicos

Los ácidos sulfónicos, al igual que los carboxílicos, forman ésteres con los alcoholes⁴⁵, aunque esta reacción no suele ser el procedimiento habitual para su preparación.⁴⁶ Mucho más comunes son los procedimientos basados en la reacción de ácidos sulfónicos (o sus sales) con electrófilos como ortoformatos,⁴⁷ diazoalcanos,⁴⁸ epóxidos,⁴⁹ aziridinas,⁵⁰ y triazenos.⁵¹



Los ácidos sulfónicos con un grupo hidroxilo también pueden dar lugar a ésteres cíclicos (sultonas). Sin embargo, los métodos clásicos de preparación por acidificación del ácido hidroxisulfónico, en general, no sirven para obtener sultonas, sino que es necesario destilar directamente a vacío el derivado halogenado o hidroxilado del ácido sulfónico.³¹

⁴³ Swanoski, M. T. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* **2009**, *66*, 1950.

⁴⁴ Wade, L. G. *Química Orgánica* Pearson Educación, S. A., Madrid, 2004.

⁴⁵ Elder, D. P.; Teasdale, A.; Lipczynski, A. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 1.

⁴⁶ Roberts, D. W.; Williams, D. L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1027.

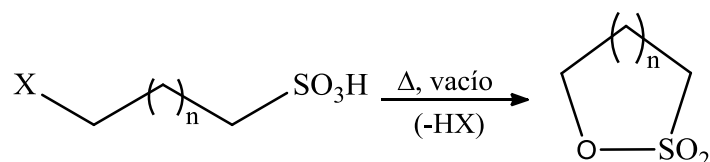
⁴⁷ Trujillo, J. I.; Gopalan, A. S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7355.

⁴⁸ Windaus, A.; Kuhr, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1937**, *532*, 52.

⁴⁹ Nicolaou, K. C.; Prasad, C. V. C.; Somers, P. K.; Hwang, C. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5335.

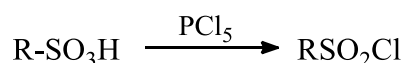
⁵⁰ Voronkov, M. G.; Knutov, V. I.; Shevko, O. N. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1992**, *28*, 586.

⁵¹ Vignola, N.; Dahmen, S.; Endersa, D.; Bräse, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7833.



donde X = Cl, Br ó OH y n = 1, 2 ó 3.

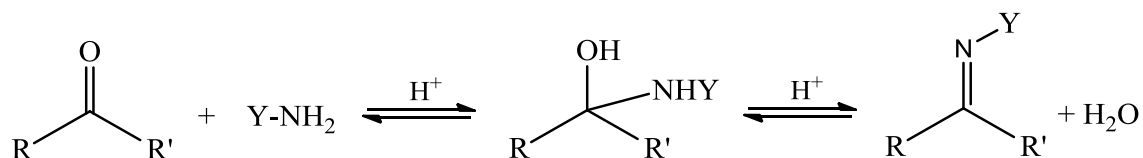
Estos ácidos también reaccionan con pentacloruro de fósforo para formar cloruros de sulfonilo.



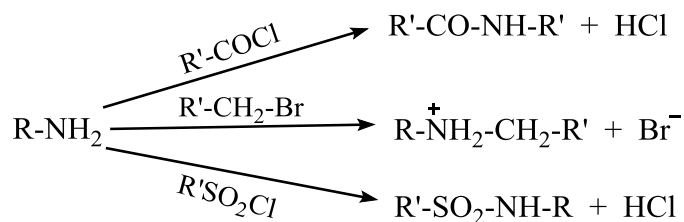
2.1.3.2. Reactividad de las aminas

Las aminas tienen carácter nucleófilo y, por tanto, reaccionan con electrófilos mediante reacciones de sustitución o adición.

Un ejemplo de reacción de adición es la que tiene lugar con los aldehídos y cetonas, para producir una carbinolamina y, si al ataque nucleofílico le sigue una deshidratación, se obtiene una imina (base de Schiff).



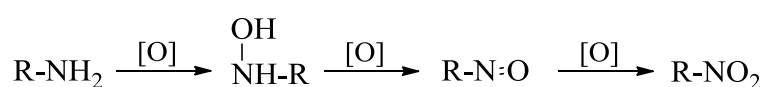
Una de las reacciones de sustitución más comunes en las que intervienen las aminas es la reacción con los haluros de alquilo, que transcurre por medio de un mecanismo S_N2 y da lugar a la formación de alquilaminas. Por un mecanismo análogo transcurre la reacción con los haluros de ácido y de sulfonilo, obteniéndose amidas y sulfonamidas, respectivamente.⁵²



⁵² Morrison, R. T., Boyd, R. N. *Organic Chemistry, fifth Edition* Pearson Education, Boston, 1987.

Las aminas se pueden transformar en alquenos mediante reacciones de eliminación pero, para ello, es necesario convertir el grupo amino en buen grupo saliente lo cual se consigue con una metilación exhaustiva. Este proceso se conoce como eliminación de Hofmann.

Las reacciones de oxidación son habituales en las aminas, de modo que la mayoría se oxidan con oxidantes comunes como H_2O_2 , permanganato y peroxiácidos. Las aminas primarias se oxidan fácilmente, pero a menudo se obtienen mezclas complejas de productos. Se pueden obtener distintos grados de oxidación que van desde la hidroxilamina al grupo nitro.⁵³



2.2. Sultonas

Las sultonas son los ésteres cíclicos de los ácidos hidroxisulfónicos y los análogos sulfurosos de las lactonas. Se conocen muchas sultonas con anillos de 4-6 miembros y unas pocas con anillos de siete. También se han encontrado sultonas cuyo anillo está unido a un sistema aromático.

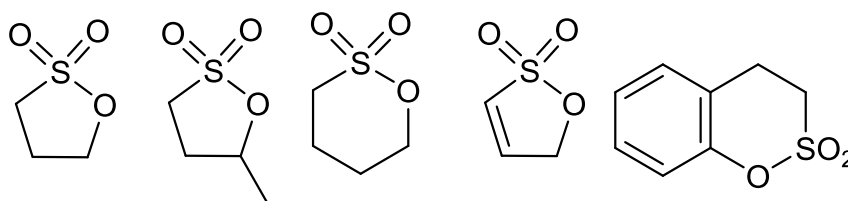


Figura 2.4. Estructura de algunas sultonas

Las sultonas son muy útiles como intermedios en el campo de la síntesis orgánica.⁵⁴ Actualmente la investigación se centra en la síntesis asimétrica de sultonas, puesto que la sultonas quirales ofrecen nuevas posibilidades en las transformaciones estereoselectivas. Esas aplicaciones pueden seguir dos caminos: síntesis orgánica general y síntesis de productos naturales. Un ejemplo de la utilidad de las sultonas en la síntesis orgánica general es la síntesis asimétrica de derivados

⁵³ Wade, L. G. *Química Orgánica* Pearson Educación, S. A., Madrid, 2004.

⁵⁴ a) Bassindale, A. R.; Katampe, I.; Maesano, M. G.; Patel, P.; Taylor, P. G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7417.

b) Jiang, L. S.; Chan, W. H.; Lee, A. W. M. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2245.

de homotaurina.⁵⁵ En cuanto a la síntesis de productos naturales, puede mencionarse la síntesis de β -santalol (uno de los componentes del aceite de sándalo) a partir de canfenosultona.⁵⁶

Las sultonas tienen aplicaciones industriales y suelen clasificarse en dos grupos: 1,3- y 1,4- alcanosultonas de cadena larga (grupo 1) y la 1,3-propanosultona (grupo 2).

Las del grupo 1 se utilizan principalmente como intermediarios en la manufactura de α -(olefin)sulfonatos, que se emplean como surfactantes. En este caso se prepara la sultona para después obtener alqueno sulfonatos e hidroxialcano sulfonatos.⁵⁷ Estas sultonas también se sintetizan para obtener sulfobetainas.⁵⁸

La propanosultona es un agente sulfopropilante muy reactivo y se usa para "alquilar" celulosa, acetato de celulosa y poliacrilamida en la producción de resinas de intercambio catiónico.⁵⁹ Esta sultona también se emplea en la producción de fungicidas,⁶⁰ polímeros resistentes al fuego⁶¹ o agentes emulsionantes.⁶²

Es de destacar que las sultonas son compuestos tóxicos y algunas de ellas, como la 1,3-propanosultona y la 1,4-butanosultona, están catalogadas como posibles carcinógenos.⁶³

2.2.1. Reactividad de las sultonas

Un hecho a destacar en la reactividad de las sultonas es que su estabilidad termodinámica decrece en el orden $\delta > \gamma > \beta$.⁶⁴

Son compuestos que reaccionan bien con los nucleófilos, incluido el agua, por lo que se hidrolizan con facilidad, dando los correspondiente ácidos hidroxisulfónicos por sustitución y alquenosulfonatos por eliminación. La ratio eliminación/sustitución

⁵⁵ Enders, D.; Harnying, W. *Synthesis* **2004**, *17*, 2910.

⁵⁶ Solas, D.; Wolinsky, J. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1988.

⁵⁷ Mori, A.; Nagayama, M. *Tenside* **1973**, *10*, 64.

⁵⁸ Carter, M. N. A.; McGhee, B.; R. Naik, A.; Helliwell, J. F.; Marshall, J. K. *Ger. Offen.* **1970**, *1*, 941.

⁵⁹ Van der Velden, P. M.; Rijpkema, B.; Smolders, C. A.; Bantjes, A. *Eur. Polym. J.* **1977**, *13*, 37.

⁶⁰ Hayama, K.; Ito, I. *Japan Kokai* **76**, 57,826 ; Chem. Abs. **85**, 117990u (1976).

⁶¹ Pusey, M. S. *Ger. Offen.* **2**, 360, 941; Chem. Abs. **81**, 106899n (1974).

⁶² Ohashi, T.; Fujii, S.; Kozuka, K.; *Japan Kokai* **75**, 89, 326; *Chem. Abs.* **85**,520lf (1976).

⁶³ IARC, W. G. o. C. C. S. (1999). Reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Lyon, France: IARC monograph 71.

⁶⁴ Burdge, D. *Dissertation Abstracts* **1960**, *20*, 2550.

depende de si hay sustituyentes y de la posición de éstos.⁶⁵

En las reacciones con nucleófilos las β -sultonas forman ácidos hidroxisulfónicos β -sustituídos o sus sales,⁶⁶ mientras que las δ - y γ -sultonas dan como producto el nucleófilo sulfoalquilado.⁶⁷

Las β -sultonas reaccionan con trióxido de azufre para formar 1,3-dioxa-2,4-ditiaciclohexano-2,2,4,4-tetraóxidos, más conocidos como carbilsulfatos.⁶⁸

Las γ -sultonas se pueden reducir con hidruro de aluminio y litio a sultinas (ésteres cíclicos de los ácidos hidroxisulfónicos), que se reducen a tioles y finalmente, a compuestos sin azufre.⁶⁹

Las δ - y γ -sultonas también reaccionan con compuestos aromáticos en presencia de AlCl_3 , dando como productos 4-aril-1-sulfonatos, en reacciones tipo Friedel-Crafts.⁷⁰

2.3. Nitrosocompuestos

Los nitrosocompuestos, de fórmula general R-N=O , se forman al reaccionar ciertos sustratos nucleófilos con agentes nitrosantes. Muchos de ellos tienen capacidad alquilante, pudiendo dar lugar a mutaciones.

El interés por los nitrosocompuestos comenzó en la segunda mitad del siglo XX, tras observarse que la *N*-nitrosodimetilamina producía alteraciones hepáticas al exponerse a ella de manera prolongada.⁷¹

Numerosos estudios realizados posteriormente han revelado la capacidad cancerígena, mutágena y teratógena de los nitrosocompuestos.⁷²

⁶⁵ Roberts, D. W.; Williams D. L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1027.

⁶⁶ a) Mori, A.; Nagayama, M.; Aoki, M.; Yaguchi, K. *Kogyo Kagaku Zasshi* **1971**, *74*, 706.

b) Thaler, W. A.; du Breul, C. *J. Polym. Sci.* **1984**, *22*, 3905.

⁶⁷ a) Helberger, J. H.; Manecke, G.; Heydon, R. *Annalen der Chemie* **1949**, *565*, 22.

b) Fischer, R. F. *Ind. Eng. Chem.* **1964**, *56*, 41.

⁶⁸ Roberts, D. W.; Williams, D. L. *Tenside* **1985**, *22*, 193.

⁶⁹ Wolinsky, J.; Marhenke, R. L. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1766.

⁷⁰ Truce, W. E.; Hoerger, F. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 5357.

⁷¹ a) Barnes, J. M.; Magee, P. N. *Br. J. Ind. Med.* **1954**, *11*, 167.

b) Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Brit. J. Cancer* **1956**, *10*, 114.

⁷² a) Magee, P. N.; Montesano, R.; Preussmann, R. *ACS Monogr.* **1976**, *173*, 491.

b) Preussmann, R.; Schmähl, D.; Eisenbrand, G. *Z. Krebsforsch.* **1977**, *90*, 161.

c) Lijinsky, W. *Oncology* **1980**, *37*, 223.

La exposición a nitrosocompuestos se puede producir por dos vías:

1. *Exposición exógena*: se produce por ingestión, inhalación o contacto dérmico con estos compuestos. Los nitrosocompuestos se han detectado en aceite de soja almacenado,⁷³ en el humo del tabaco,⁷⁴ en la fabricación de plaguicidas,⁷⁵ en cerveza y whisky,⁷⁶ en cosméticos y fármacos,⁷⁷ etc.
2. *Exposición endógena*: se produce por la formación *in vivo* de los nitrosocompuestos a partir de sus precursores (agentes nitrosantes y sustratos nitrosables). Como los precursores son abundantes, esta vía tiene especial interés, pues en el estómago se dan las condiciones necesarias para que puedan transcurrir mecanismos de nitrosación.⁷⁸

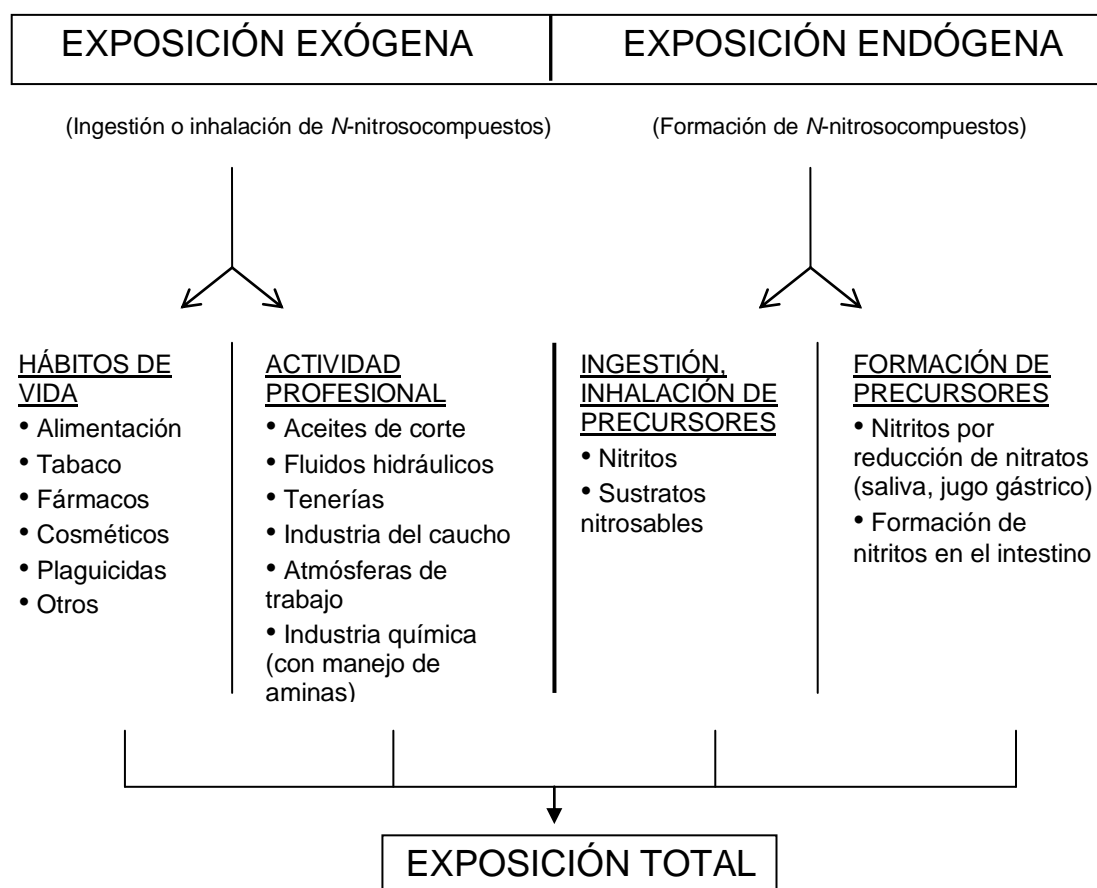


Figura 2.5. Vías de exposición a los *N*-nitrosocompuestos

d) Schmähl, D, Sherf, H. R. *IARC Sci Publ.* **1985**, 57, 677.

⁷³ Hedler, L.; Marquardt, P.; Shurr, C. Environmental *N*-nitrosocompounds, (Eds Walker, E.: Bogosky, P. y Gričiute, L.) *IARC Sci. Pub.* N°14, Lyon, France **1976**, 361.

⁷⁴ Duckrey, H.; Preussmann, R. *Naturwissenschaften* **1962**, 49, 498.

⁷⁵ Lijinsky, W.; Taylor, H. W. *J. Nat. Canc. Inst.* **1976**, 57, 1315.

⁷⁶ Sen, N. P.; Tessier, L.; Seaman, S. N. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, 31, 1033.

⁷⁷ a) Tunick, M.; Harrington, G. W. *Fd. Chem. Toxic.* **1982**, 20, 473.

b) Challis, B. C.; Shuker, D. E. G. *Fd. Cosmet. Toxicol.* **1980**, 18, 283.

⁷⁸ Sander, J.; Seif, J. *Arzneimittel-Forsch* **1969**, 19, 1091.

Entre los agentes nitrosantes se encuentran:

- **Nitratos:** se utilizan como fertilizantes y abonos. Su uso indiscriminado en la agricultura intensiva ha hecho que sus niveles aumenten mucho en las aguas y en vegetales, sobre todo en estos últimos. Estos compuestos son reducidos fácilmente a nitritos por algunas bacterias.⁷⁹
- **Nitritos:** se usan como aditivos cárnicos para prevenir el botulismo causado por el bacilo *Clostridium Botulinum*.⁸⁰ También se emplean para sazonar alimentos, pues aportan un atractivo color rojo⁸¹ y un sabor característico. Estas especies son agentes nitrosantes muy efectivos⁸² y pueden dar lugar a nitrosocompuestos.

Actualmente el empleo de nitratos y nitritos está sujeto a restricciones. El comité mixto FAO/OMS ha limitado la ingesta diaria admisible (IDA) a 0-3,7 mg/kg de masa corporal para el ion nitrato y a 0-0,07 mg/kg de masa corporal para el ion nitrito.⁸³ En España su contenido en el agua potable y en productos cárnicos se encuentra regulado por la Directiva 98/83/CE y Real Decreto 140/2003 y por la Directiva 95/2/CE, respectivamente.

Los sustratos nitrosables son muy variados. En función de su origen y aplicación pueden clasificarse así:

- Alimentos que contienen derivados de aminas: entre ellos se encuentran numerosos pescados.
- Aditivos alimentarios entre los que se encuentran la taurina, la morfina, las sustancias saporantes (preparadas a partir de aminas secundarias y aminoácidos), etc.
- Fármacos: En 1975 Mirvish señaló 41 de estas sustancias que pueden conducir a la formación de nitrosocompuestos.⁸⁴

⁷⁹ a) Doel, J. J.; Benjamin, N.; Hector, M. P.; Rogers, M.; Allaker, R. P. *Eu. J. Oral Sci.* **2005**, *113*, 14.

b) Parham, N. J.; Gibson, G. R. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2000**, *31*, 21.

⁸⁰ Engel, R. E.; *J. Am. Verter med. Ass.* **1977**, *171*, 1157.

⁸¹ Lawrie, R. A. Woodhead Publishing, 6ª edición, Cambridge, 1998.

⁸² Grosse, Y.; Baan, R.; Straif, K.; Secretan, B.; El Ghissassi, F.; Coglianò, V. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 628.

⁸³ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Fifty-ninth meeting, Geneva 4-13 June 2002.

⁸⁴ Mirvish, S. S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1975**, *31*, 325.

2.3.1. Carcinogenia

Se ha demostrado que más de un centenar de nitrosocompuestos provocan cáncer en distintas especies animales: conejos, peces, ratones, perros y también primates.⁸⁵ Se han observado efectos biológicos análogos producidos por derivados nitrosados en estudios metabólicos *in vitro* realizados sobre tejidos hepáticos humanos y de ratas.⁸⁶ Aunque no hay evidencias de que *per se* lo produzcan en el hombre, parece probable que sea así.⁸⁷

Hay estudios que relacionan los nitrosocompuestos con ciertos tipos de cáncer.⁸⁸ Por ejemplo, algunos relacionan el consumo de nitritos y nitrosaminas con el cáncer de estómago y con el riesgo de desarrollar cáncer de esófago. De igual modo, se ha encontrado una asociación positiva y significativa entre el consumo de alimentos tratados con nitrito y cáncer nasofaríngeo.⁸⁹ Al interpretar estos estudios se debe tener en cuenta que, por lo general, las carnes y los pescados tratados con nitrito suelen contener también importantes cantidades de sal. La sal induce procesos inflamatorios que reducen la mucosa protectora del estómago e incrementan el riesgo de cáncer de estómago. La infección con *Helicobacter pylori* puede estar relacionada con el consumo de sal y de nitrosocompuestos, aumentando la carcinogenia tras dañar el epitelio.

El tipo de carcinoma inducido por un nitrosocompuesto y su potencial cancerígeno dependen en gran medida de la estructura del sustrato nitrosable.

Según estudios de Lijinsky *et al.*, los sustituyentes del carbono en α al grupo $-N=O$ determinan la capacidad cancerígena de estos compuestos.⁹⁰ Un nitrosocompuesto poseerá carácter cancerígeno si a dicho carbono se encuentra

⁸⁵ a) Bogowsky, P.; Bogowsky, S. *Int. J. Cancer* **1981**, *27*, 471.

b) Magee, P. N.; Montesano, R.; Preussmann, R. *Chemical Carcinogenesis*, C. E. Searle, ACS Monograph. 173, The American Chemical Society, Washington D. C., 1976.

c) Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Adv. Cancer Res.* **1967**, *10*, 18.

d) Walters, C. L. *Chem. Br.* **1977**, *13*, 140.

e) Weisburger, J. H.; Raineri, R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1975**, *31*, 369.

⁸⁶ a) Swann, P. F.; Magee, P. N. *Biochem. J.* **1968**, *110*, 39.

b) Fussgaenger, R. D.; Ditschunert, H. *Oncology* **1980**, *37*, 273.

c) Montesano, R.; Magee, P. N. *IARC Sci.* **1974**, *10*, 39.

⁸⁷ Hernández-Ramírez, R. U.; Galván-Portillo, M. V.; Ward, M. H.; Agudo, A.; González, C. A.; Oñate-Ocaña, L. F.; Herrera-Goepfert, R.; Palma-Coca, O.; López-Carrillo, L. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 1424

⁸⁸ Zhul, Y.; Wang, P. P.; Zhao, J.; Green, R.; Sun, Z.; Roebbothan, B.; Squires, J.; Buehler, S.; Dicks, E.; Zhao, J.; Cotterchio, M.; Campbell, P. T.; Jain, M.; Parfrey, P. S.; Mclaughlin, J. R. *Brit. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1109.

⁸⁹ Jakszyn, P.; González, C. A. *World J. Gastroentero.* **2006**, *12*, 4296.

⁹⁰ Lijinsky, W.; Andrews, A. W. *Mutat. Res.* **1979**, *68*, 1.

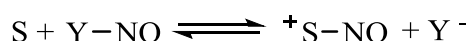
unido, al menos, un átomo de hidrógeno; su potencial cancerígeno se incrementará al hacerlo el número de hidrógenos en esa posición.

La estabilidad de las especies alquilantes modula los mecanismos de carcinogénesis. Las nitrosoareas y nitrosamidas, al ser inestables, se descomponen, produciendo agentes alquilantes en el sitio donde fueron administradas. Las nitrosaminas, en cambio, requieren una activación metabólica para dar lugar a esas especies, lo que es causante de que los tumores aparezcan en órganos específicos.⁹¹

2.4. Reacciones de formación de nitrosocompuestos

Los nitrosocompuestos se forman al reaccionar un agente nitrosante con un sustrato nitrosable. La nitrosación puede tener lugar en átomos de N, C, O ó S y los compuestos se denominan, respectivamente, N-, C-, O-, ó S-nitrosocompuestos. Generalmente, va acompañada de la pérdida de un átomo de hidrógeno.

Si S e Y-NO son, respectivamente, el sustrato nitrosable y el agente nitrosante la reacción de nitrosación se puede representar así:



2.4.1. Agentes nitrosantes (Y-NO)

Los agentes nitrosantes son compuestos capaces de transferir el grupo nitroso. La reactividad de este grupo se debe a su fuerte electrofilia y por ello la reacción se puede describir como una sustitución nucleofílica que tiene lugar entre el sustrato nitrosable y el agente nitrosante.

Existen diferentes vías de nitrosación, que dependen del agente nitrosante efectivo y de las condiciones del medio.⁹²

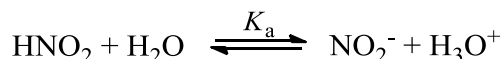
El agente nitrosante más utilizado es el ácido nitroso, HNO₂, que suele generarse a partir de disolución acuosa de nitrito sódico en medio ácido.⁹³ Es un ácido

⁹¹ Hashizume, T.; Santo, H.; Tsujisawa, H.; Kosaka, K.; Ozawa, T.; Yamshita, M.; Kinae, N. *Fd. Chem. Toxicol.* **1991**, 29, 839.

⁹² Casado, J. *Conferencia Plenaria Invitada, XXV Bienal RSEQ*, Vitoria, 1994.

⁹³ Thiemann, M.; Scheibler, E.; Wiegand, K. W. *Nitric acid, nitrous acid and nitrogen oxides* en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, B. Elvers; Wiley-VCH6ª edición, Weinheim, 2002.

débil cuyo pK_a se ha medido en numerosas ocasiones: el valor más aceptado es $pK_a = 3,148$ (25 °C).⁹⁴



El ácido nitroso no se ha aislado como tal, pues se descompone dando lugar a varios óxidos de nitrógeno.⁹⁵

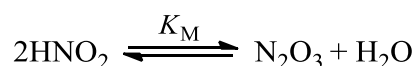


No obstante, esta descomposición no es muy significativa a temperatura ambiente y con concentraciones bajas de ácido nitroso (10^{-3} – 10^{-2} M). Sin embargo, cuando se estudian reacciones de nitrosación lentas, debe ser tenida en cuenta.⁹⁶

En disolución acuosa existen varias especies en equilibrio con el ácido nitroso que son, en realidad, los verdaderos agentes nitrosantes. Por ello los mecanismos de nitrosación asociados a dicha especie pueden ser muy variados.⁹⁷

2.4.1.1. Nitrosación por trióxido de dinitrógeno.

Una de las especies que se encuentra en equilibrio con el ácido nitroso en disolución acuosa es el trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 :



La constante de este equilibrio ha sido medida en numerosas ocasiones con resultados dispares. El valor más aceptado es el propuesto por Markovits *et al.*, $K_M = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$.⁹⁸

El N_2O_3 , de color azul en fase líquida y en disolución acuosa (cuando se encuentra en concentración elevada) es un agente nitrosante muy electrófilo. Puede ser aislado a bajas temperaturas, pero se disocia fácilmente en NO y NO_2 al aumentar

⁹⁴ Tummavuori, J.; Lumme, P. *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2003.

⁹⁵ Abel, E.; Schmid, H. *Z. Phys. Chem.* **1928**, 136, 419.

⁹⁶ Williams, D. L. H. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier Applied Science, Amsterdam, 2004.

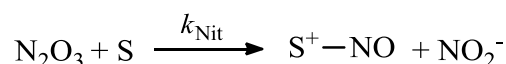
⁹⁷ a) Casado, J. *Nitrosation Reactions*. Invited Lecture. In *Fast Reactions in Solution*, Royal Soc. Chem. Annual Meeting 1994.

b) Casado, J. *Chemistry of Nitrosation Reactions in Solution*; Invited Lecture. In *Kolloquien der Ortsverbände*, Universität Leipzig, 1997.

⁹⁸ Markovits, G. Y.; Swatch, S. E.; Newman, L. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 445.

la temperatura. La velocidad de disociación es pequeña en condiciones de acidez baja y concentraciones relativamente altas de HNO_2 .

El N_2O_3 es un agente nitrosante efectivo cuando se utiliza el ácido nitroso, sobre todo a pH relativamente bajo.



La ecuación de velocidad del proceso global es:

$$v = k[\text{HNO}_2]^2[\text{S}] \quad 2.1$$

Donde k es una constante de velocidad de orden tres que representa el producto $k_{\text{Nit}}K_{\text{M}}$, siendo k_{Nit} la constante de velocidad de orden dos de la reacción del N_2O_3 con el sustrato.

Así pues, en aquellas reacciones de nitrosación en las que intervenga el N_2O_3 como agente nitrosante el orden de reacción será dos respecto a la concentración del ácido nitroso.

Los valores de k_{Nit} para este tipo de reacciones son del orden de 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que sugiere que la velocidad está controlada por difusión.⁵⁷

2.4.1.2. Nitrosación catalizada en medios ácidos: ion nitrosonio/ ion nitrosacido

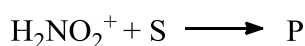
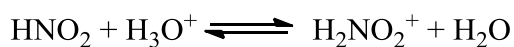
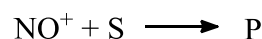
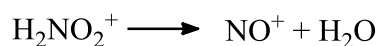
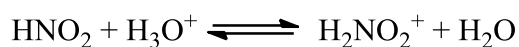
En disoluciones acuosas ácidas diluidas y concentraciones relativamente bajas de ácido nitroso la reacción de nitrosación de algunos sustratos se ajusta a la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k[\text{HNO}_2][\text{H}_3\text{O}^+][\text{S}] \quad 2.2$$

En un principio se pensó que el agente nitrosante efectivo podría ser el propio ácido nitroso que reaccionaría con el sustrato protonado. Esta hipótesis quedó rechazada tras los estudios de Schmidt.⁹⁹

⁹⁹ Schmidt, E.; *Chem. Ztg.* **1962**, 86, 811.

Aún existe controversia respecto a este tema, pues hay dos especies implicadas en el mecanismo de nitrosación:

Nitrosación vía ion nitrosacidio**Nitrosación vía ion nitrosonio**

En ácido perclórico al 60% y sulfúrico al 60% la conversión del HNO_2 en NO^+ es completa, (aparición de una banda a 260 nm en espectro UV y una línea a 2300 cm^{-1} en Raman). Por eso puede concluirse que, en medios de acidez elevada, el agente nitrosante efectivo es el NO^+ .¹⁰⁰

En medios de acidez moderada no está claro cuál es la especie nitrosante.

Estudios realizados sobre la nitrosación de peróxido de hidrógeno¹⁰¹ y alcoholes¹⁰² han sugerido la existencia de un orden cero con respecto a la $[\text{S}]$, pero los resultados no son definitivos.

En nitrosaciones llevadas a cabo en acetonitrilo se observa orden cero con respecto a la $[\text{S}]$, lo que apunta a que la velocidad está controlada por la formación del NO^+ .¹⁰³

Existen argumentos a favor de la reacción vía ion nitrosacidio en disoluciones acuosas.¹⁰⁴

También hay estudios¹⁰⁵ que proponen que la protonación del ácido nitroso tiene lugar en el átomo de oxígeno del grupo $-\text{OH}$ (lo cual hace que haya un buen grupo saliente H_2O para la transferencia del NO^+) y que la reacción ocurre por medio de un complejo acuoso del ion nitrosonio, cuya estructura muestra la Figura 2.6.

¹⁰⁰ Williams, D. L. H. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* Elsevier Applied Science, Amsterdam, 2004.

¹⁰¹ Benton, D. J.; Moore, P., *J. Chem. Soc. (A)*, (1970) 3179.

¹⁰² Dix, L. R.; Williams D. L. H. *J. Chem. Res. (S)*, (1982) 190.

¹⁰³ Dix, L. R.; Williams D. L. H. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1988) 571.

¹⁰⁴ a) Bunton, C. A.; Stedman, G. *J. Chem. Soc.* **1959**, 3466.

b) Prakash, G. K. S.; Heiliger, L.; Olah, G. A. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 4965.

¹⁰⁵ a) Nguyen, M. T.; Hegarty, A. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1984**, 2037.

b) Jorgensen, K. A.; Lawesson, S. O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 231.

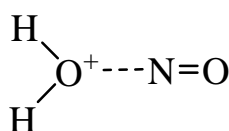
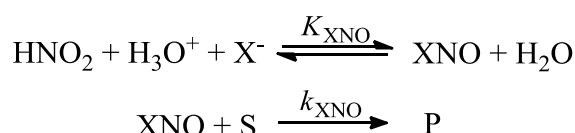


Figura 2.6. Estructura del complejo acuoso del ion nitrosonio propuesto.

2.4.1.3. Nitrosación catalizada por nucleófilos: Haluros de nitrosilo

Hay una gran variedad de nucleófilos no básicos (cloruro, bromuro, tiocianato, etc.) que, añadidos a disoluciones acuosas de ácido nitroso, dan lugar a catálisis.



La especie nitrosante efectiva es el XNO y la ecuación de velocidad para la reacción de nitrosación de un sustrato nitrosable S es:

$$v = k_{\text{XNO}} K_{\text{XNO}} [\text{HNO}_2] [\text{H}_3\text{O}^+] [\text{X}^-] [\text{S}] \quad 2.3$$

La reacción es de orden 1 respecto a cada reactivo, siendo k_{XNO} la constante de velocidad de orden 2 para la reacción de nitrosación y K_{XNO} la constante de equilibrio de formación del XNO.

El efecto catalítico depende del producto $k_{\text{XNO}}K_{\text{XNO}}$ pero, en la práctica, suele ocurrir que este efecto depende casi exclusivamente de K_{XNO} (k_{XNO} no sufre tanto cambio al modificar el nucleófilo) y la velocidad está controlada por difusión.⁵⁷

2.4.1.4. Nitrosación por otros agentes

Los nitritos de alquilo son muy poco reactivos en medio ácido y buenos agentes nitrosantes en medio básico; por eso, la mayoría de los estudios se han hecho en este medio. Calle *et al.* estudiaron la nitrosación de aminas secundarias y alquilaminas por nitrito de propilo y nitrito de butilo en medios fuertemente básicos.¹⁰⁶ Los nitritos se prepararon *in situ* y se encontró la siguiente ecuación de velocidad:

¹⁰⁶ Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; García Mateos, F. J.; Tostado, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1992**, 987.

$$v = k[\text{amina}][\text{nitrito}] \quad 2.4$$

García Santos *et al.* investigaron la nitrosación de piperidina por nitritos de propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, secbutilo y tertbutilo. Encontraron correlación entre $\log k_2$ y σ^* ($\rho^* = 4,5$), lo que demuestra que las reacciones transcurren mediante ataque electrofílico por los nitritos. La comparación de las reactividades relativas de los nitritos de alquilo (primarios > secundarios > terciarios) con parámetros característicos de sus grupos R (potenciales de ionización vertical y calores de formación de R^+) sugieren que las reacciones transcurren por control orbitalico.¹⁰⁷

Algunos complejos metálicos de nitrosilo también son importantes en este ámbito. Casado *et al.* estudiaron la reacción de nitrosación de morfolina por el ion $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$,¹⁰⁸ de interés porque la *N*-nitrosomorfolina es una especie de carcinogenia probada. Encontraron que la primera etapa del mecanismo de nitrosación es una reacción rápida entre la amina y el grupo nitrosilo, para formar un complejo, seguida de una segunda reacción con otra molécula de amina, para formar la nitrosamina.

El tetróxido de dinitrógeno es un agente nitrosante que se utiliza para la síntesis de *N*-nitrosaminas en disolventes orgánicos.

Existen especies orgánicas que, en ocasiones, también se utilizan como agentes nitrosantes: *N*-nitrosaminas, nitrosocompuestos y ésteres del ácido nitroso.

2.4.2. Sustratos nitrosables

Dada la naturaleza electrófila de los agentes nitrosantes, los sustratos nitrosables deben ser especies químicas de apreciable carácter nucleófilo.

Según la naturaleza del átomo al que se une el grupo NO, se pueden distinguir diferentes sustratos nitrosables.

2.4.2.1. Sustratos *N*-nitrosables

El curso de las reacciones de nitrosación de aminas depende de la naturaleza del sustituyente, y de su carácter aromático o alifático. Sin embargo, todas tienen en

¹⁰⁷ García Santos, M. P.; Calle, E.; González Mancebo, S.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **1996**, *127*, 997.

¹⁰⁸ Casado, J.; Castro, A.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, M. F.; Vázquez Tato, J. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 1211.

común que el primer paso consiste en el ataque nucleófilo de la amina sobre el agente nitrosante. Si la reacción se produce con el ácido nitroso, la mayor parte de los estudios coinciden en que la especie implicada es el trióxido de dinitrógeno, N₂O₃. El comportamiento del producto de reacción depende de la naturaleza de la amina.¹⁰⁹

Las aminas primarias reaccionan con los agentes nitrosantes, aunque, debido a la inestabilidad de las nitrosaminas formadas, dan lugar a reacciones de desaminación¹¹⁰ siendo los productos de reacción muy variados: alquenos, alcoholes, sales de diazonio, etc.

Sin embargo, las aminas primarias alifáticas y aromáticas, dan como productos de reacción nitrosaminas estables con cualquiera de los agentes nitrosantes convencionales.⁵⁷

Durante algún tiempo las aminas terciarias fueron consideradas inertes frente a los agentes nitrosantes. Hein¹¹¹ demostró la formación de nitrosaminas a partir de aquellas, si bien son procesos muy poco favorecidos. Se han propuesto algunos mecanismos para explicar su nitrosación, pero el conocimiento que se posee es todavía escaso. Tampoco son bien conocidos los mecanismos de nitrosación de sales de amonio cuaternario y óxidos de amina, que tienen lugar a altas temperaturas.¹¹²

Otros sustratos *N*-nitrosables son las ureas. Los primeros experimentos sobre nitrosación de ureas se remontan a 1971 cuando Mirvish¹¹³ estudió la nitrosación de metilurea en medio ácido, encontrando la ecuación de velocidad:

$$v = k[\text{HNO}_2][\text{H}^+][\text{S}] \quad 2.5$$

Posteriormente, Hallet y Williams verificaron la ausencia de catálisis por haluros de nitrosilo en la nitrosación y desnitrosación de metilurea.¹¹⁴

En 1996, Casado *et al.* investigaron la nitrosación de *N*-alquilureas con la técnica de *stopped-flow*.¹¹⁵ Mediante experimentos en agua deuterada encontraron un

¹⁰⁹ Geissman, T. A. *Principios de química orgánica*, Reverté, 1ª edición, Barcelona, 1973.

¹¹⁰ a) Casado, J.; Vicario, P. M. *An. Real Soc. Esp. Fis. Quim.*, **1966**, 62, 87.

b) Casado, J.; Ramos, T. *An. Real Soc. Esp. Fis. Quim.*, **1968**, 64, 1017.

¹¹¹ Hein, G. E. *J. Chem. Educ.* **1963**, 40, 181.

¹¹² a) Lijinsky, W.; Conrad, E.; Bogart, R. *Nature* **1972**, 239, 1165.

b) Fiddler, W.; Pensabene, J. W.; Doerr, R. C.; Wasserman, A. E. *Nature* **1972**, 236, 307.

c) Oshima, H.; Kawabata, T., *Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds*, I.A.R.C. Spec. Pub. n° 19, I.A.R.C., Lyon, **1978**, pag. 143.

¹¹³ Mirvish, S. S. *J. Nat. Canc. Inst.* **1971**, 46, 1183.

¹¹⁴ Hallet, G.; Williams, D. L. H.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1980**, 1372.

claro efecto cinético isotópico (KIE) coherente con las previsiones de la teoría semiclásica del estado de transición. Se demostró así que la etapa cinética determinante de la velocidad de nitrosación de las *N*-alquileas es una transferencia protónica desde la *N*-alquil-*N*-nitrosourea protonada al disolvente.

Las amidas también dan reacciones de nitrosación. En general, estas reacciones son mucho más lentas que las de nitrosación de aminas, debido al efecto electroceptor que ejerce el grupo carbonilo. Las amidas primarias dan productos de desaminación.

Inicialmente se pensó¹¹⁶ que el mecanismo de nitrosación de amidas era el mismo que de nitrosación de aminas, lo que hizo suponer que las reacciones de nitrosación estarían controladas por ataque de especies XNO. En 1983 Casado *et al.*¹¹⁷ estudiaron la nitrosación de *N*-metilurea (MU) en medios reguladores acetato y mono-, di y tricloroacetato (B), encontrando catálisis general básica y efecto KIE lo que supone que la etapa determinante de estas reacciones es una transferencia protónica desde una especie intermedia al disolvente o a un anión orgánico. La ecuación de velocidad encontrada es compleja:

$$v = \frac{[\text{MU}][\text{nitrito}][\text{H}^+]^2}{K_1 + [\text{H}^+]^2} \left[\gamma + \delta \frac{K_1[\text{nitrito}]}{K_1 + [\text{H}^+]} + \varepsilon \frac{K_2[\text{B}]}{K_2 + [\text{H}^+]} \right] \quad 2.6$$

donde K_1 y K_2 son, respectivamente, las constantes de acidez de los ácidos nitroso y carboxílico.

2.4.2.1.1. Nitrosación de aminoácidos

La nitrosación de aminoácidos ofrece particular interés. En el caso de los aminoácidos con grupo amino secundario, junto a la nitrosación directa por las especies NO^+ y N_2O_3 se ha encontrado un mecanismo de reacción que implica la formación inicial de un carboxilato de nitrosilo, seguida de un lento reagrupamiento intramolecular.¹¹⁸

¹¹⁵ a) Casado, J.; González Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, 28, 301.

b) González Alatorre, G. *Tesis Doctoral*, Universidad de Salamanca, 1994.

¹¹⁶ Kricsfalussy, Z.; Bruylants, A. *Bull. Soc. Chim. Belges* **1967**, 76, 168

¹¹⁷ Casado, J.; Castro, A.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, M. F.; Vázquez Tato, J. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1983**, 87, 1211.

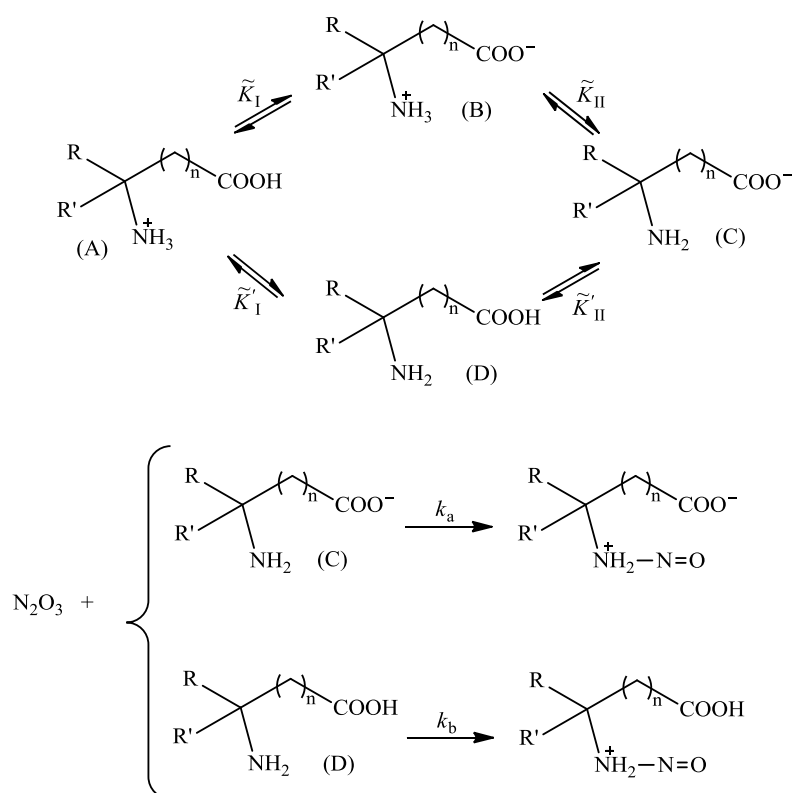
¹¹⁸ a) Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; Mosquera, M.; Peña, M. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1985**, 1859.

b) Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, 26, 1167.

La nitrosación de aminoácidos con grupo $-NH_2$ no ha sido muy conocida hasta hace poco, porque da lugar a productos muy inestables.

En nuestro grupo de trabajo se estudió la nitrosación de diez aminoácidos por $NaNO_2$ en medio ácido: seis α -aminoácidos (glicina, DL-alanina, ácido DL- α -aminobutírico, ácido DL- α -aminoisobutírico, valina y norvalina), dos β -aminoácidos (DL- β -alanina y ácido β -aminobutírico) y un γ -aminoácido (ácido γ -aminobutírico). La selección de estos sustratos nitrosables se realizó atendiendo a dos criterios: 1) Estructurales, con el fin de analizar la influencia de la posición relativa de los grupos amino y carboxilo sobre la velocidad de la reacción de nitrosación; y 2) su presencia en la naturaleza (puesto que los α -aminoácidos son más comunes se eligieron más aminoácidos de este tipo).

Como resultado de ese estudio García-Santos encontró en su tesis que la nitrosación de esos aminoácidos transcurre según el siguiente mecanismo:¹¹⁹



También se encontró que la secuencia de reactividades (en términos de constante de velocidad de nitrosación): α -aminoácidos > β -aminoácidos > γ -aminoácidos, es la misma que la observada para la capacidad alquilante de las

c) Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1997**, 29, 495.

¹¹⁹ García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7506.

lactonas resultantes de la nitrosación.¹²⁰ Eso significa que las reacciones de nitrosación de los aminoácidos naturales más comunes son las más eficientes en la formación de agentes alquilantes.

2.4.2.2. Sustratos C-nitrosables

La mayor parte de los sustratos que conducen a la formación de C-nitrosocompuestos son de tipo aromático. Los C-nitrosocompuestos que tienen hidrógenos en el carbono en α respecto al grupo nitroso se isomerizan en medios ácidos o básicos de forma rápida e irreversible. Ésta es una de las etapas fundamentales en las reacciones de oximación de compuestos con metilenos activos llevadas a cabo con nitritos de alquilo.

La primera reacción conocida de este tipo es la nitrosación del fenol.¹²¹ Más tarde se vio que otros compuestos parecidos, como el naftol o el indol, presentan un comportamiento análogo, así como el azuleno.¹²²

Son también mencionables los estudios de Williams *et al.* sobre la nitrosación del ácido mevalónico y sus derivados, que transcurren a través de especies enólicas.¹²³

2.4.2.3. Sustratos O-nitrosables

Las reacciones que conducen a la formación de O-nitrosocompuestos se usan con fines preparativos. La nitrosación de alcoholes y de compuestos con el grupo hidroxilo tiene lugar en el átomo de oxígeno.¹²⁴ Un ejemplo de este tipo de compuestos es el acetato de nitrosilo, que en ocasiones también puede actuar como agente nitrosante.¹²⁵

Un caso especial de este tipo de nitrosación es la del ácido ascórbico, estudiada por primera vez por Dahn *et al.*¹²⁶

¹²⁰ García Santos, M. P.; González Mancebo, S.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177.

¹²¹ Veibel, S. *Ber.* **1930**, *63*, 1577.

¹²² Challis, B. C.; Lawson, A. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1973**, 918.

¹²³ a) Williams D. L. H.; Graham, A. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7973.

b) Graham, A.; Williams, D. L. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1992**, 747.

¹²⁴ Allen, A. D. *J. Chem. Soc.* **1954**, *196*, 8.

¹²⁵ Casado, J.; Castro, A.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, M. F.; Vázquez, J. *Monatsh. Chem.* **1984**, *115*, 669.

¹²⁶ Dahn, H.; Loewe, L.; Bunton, C. A. *Helv. Chim., Acta* **42**, 320, **1960**.

2.4.2.4. Sustratos S-nitrosables

Se sabe que la tiourea reacciona con el ácido nitroso, dando lugar a N- y S-nitrosaciones, esta última se ve favorecida en medios de acidez alta.¹²⁷

Collin *et al.* observaron un comportamiento similar al estudiar una serie de metilureas sustituidas.¹²⁸

Estudios cinéticos realizados sobre una serie de ácidos mercapto-carboxílicos dieron como resultado que el producto final es el S-nitrosocompuesto.¹²⁹

2.4.3. Mecanismos de nitrosación

Son numerosos los factores que condicionan el curso cinético de las reacciones de nitrosación. Con objeto de facilitar la comprensión y discusión de los resultados que se exponen más adelante, en las líneas siguientes se reseñan brevemente las principales vías cinéticas propuestas a lo largo de los años para interpretar mecanísticamente las reacciones de nitrosación.

2.4.3.1. Mecanismos controlados por difusión

Una reacción controlada por difusión es aquella en la que los reactivos participantes reaccionan tan rápidamente que su velocidad se ve limitada por la velocidad de los procesos físicos de encuentro.¹³⁰

Muchas reacciones de nitrosación presentan mecanismos de reacción controlados por este proceso.

Los estudios de Challis¹³¹, Mirvish¹³² y Moss¹³³ concluyeron que en la nitrosación de aminas de elevado pK_a existe una constancia del coeficiente de velocidad difícil de explicar. En cambio, Schmid¹³⁴ observó en la diazotación de

¹²⁷ Werner, A. E. *J. Chem. Soc.* **1912**, 101, 2180.

¹²⁸ Collings, P.; Al-Mallan, K.; Stedman, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1992**, 747.

¹²⁹ Dix, L. R.; Williams, D. L. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1984**, 109.

¹³⁰ a) Mortimer, R. G. *Physical Chemistry*, Elsevier, 3ª Edición, Londres, 2008.

b) Eigen, M.; Hammes, G. G. *Elementary steps in enzyme reactions (as studied by relaxation spectrometry)* en *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* Ed: F. F. Nord, Wiley, 25, 1-38, 2006.

¹³¹ Challis, B. C.; Butler, A. R. *The Chemistry of the Amino Group*, Cap. 6, Wiley-Interscience, Londres, 1968.

¹³² Mirvish, S. S. *IARC Sci. Publ.* **1972**, 104.

¹³³ Moss, R. A.; Talkowski, C. S. *Tetrahedron Lett.* **1971**, 9, 703.

¹³⁴ Schmid, H.; Essler, C. *Monatsh. Chem.* **1960**, 91, 484.

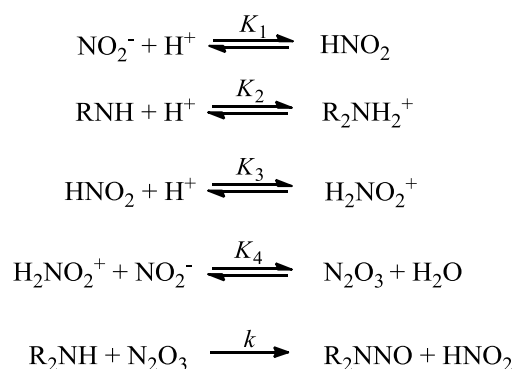
anilinas de $pK_a < 5$, que la constante de velocidad variaba, observándose una correlación con el pK_a del sustrato. Esto último se observó también en una investigación de Casado *et al.* en 1981.¹³⁵

Dada la existencia de estas discrepancias, Casado *et al.* investigaron la nitrosación de una amplia serie aminas secundarias en condiciones experimentales en las que el agente nitrosante efectivo era el trióxido de dinitrógeno. Se manejaron concentraciones bajas de nitrito para evitar la descomposición espontánea del ácido nitroso.¹³⁶

Se encontró la siguiente ecuación de velocidad experimental:

$$v_o = \frac{\alpha [\text{nitrito}]_o^2 [\text{amina}]_o [\text{H}^+]}{(\beta + [\text{H}^+])^2} \quad 2.7$$

Los resultados encontrados condujeron al siguiente mecanismo:



De él se deduce una ecuación de velocidad acorde con la ecuación de velocidad experimental:

$$v_o = \frac{(kK_3K_4/K_1K_2)[\text{nitrito}]_o^2 [\text{amina}]_o [\text{H}^+]}{(1/K_1 + [\text{H}^+])^2} \quad 2.8$$

¹³⁵ Casado, J.; Castro, A.; López Quintela, M. A. *Monatsh. Chem.* **1981**, *12*, 1221.

¹³⁶ a) Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; López Quintela, M. A.; Mosquera, M. *Monatsh. Chem.* **1983**, *114*, 639.

b) Casado, J.; Castro, A.; López Quintela, M. A.; Rodríguez Prieto, M. F. *Z. Phys. Chem.* **1979**, *118*, 43.

c) López Quintela, M. A.; *Tesis Doctoral*, Univ. de Santiago, 1980.

De este estudio se desprende que el trióxido de dinitrógeno es una especie mucho más reactiva de lo que se pensaba hasta entonces.

La constancia de los valores de la velocidad específica de nitrosación de los sustratos estudiados y los valores obtenidos para las entalpías de activación del proceso de ataque del N_2O_3 sobre la amina ($1-20 \text{ kJ mol}^{-1}$)¹³⁷ evidenciaron el control por difusión de esas reacciones de nitrosación.

2.4.3.2. Mecanismos por control orbitálico

Las reacciones con control orbitálico son aquellas en las que su velocidad se ve influenciada por la energía del último nivel ocupado (HOMO) del nucleófilo.

Generalmente, la formación de un enlace entre un electrófilo y un nucleófilo está regida por las diferencias de carga eléctrica entre los reactivos.¹³⁸ El nucleófilo, rico en electrones, se ve atraído por el electrófilo, comenzando la unión sin apenas ceder los electrones. Según la teoría de orbitales moleculares, estas uniones, denominadas reacciones controladas por carga, se deben a la gran diferencia de energía que existe entre el orbital ocupado más alto del nucleófilo y el orbital vacío más bajo del electrófilo.

En ocasiones, la diferencia de energías entre los dos orbitales es muy pequeña y la formación del enlace se ve dirigida por la interacción de los electrones del nucleófilo con el orbital vacío del electrófilo. En este caso, la velocidad de reacción depende del nivel de energía del último orbital ocupado del nucleófilo y se dice que la reacción tiene control orbitálico. En estas reacciones existe una correlación entre el valor de la constante de velocidad y el potencial de ionización vertical del nucleófilo.

Ejemplo de control orbitálico son las reacciones de nitrosación por nitritos de alquilo.

Desde que en 1978 Oae *et al.*¹³⁹ estudiaron la hidrólisis y aminólisis de nitritos de alquilo, surgieron dos limitaciones en el conocimiento de los mecanismos de nitrosación por nitritos de alquilo: a) no se conocía lo suficiente el papel del pH, b) los nitritoésteres se habían preparado *in situ*, con el consiguiente riesgo de la participación simultánea de otros agentes nitrosantes.

¹³⁷ Ridd, J. H. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1978**, *16*, 1.

¹³⁸ Klopman, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 223.

¹³⁹ a) Oae, S.; Asai, N.; Fujimori, K. *J. Chem. Soc. Perkin 2*, **1978**, 1124.

b) Oae, S.; Asai, N.; Fujimori, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1978**, 571.

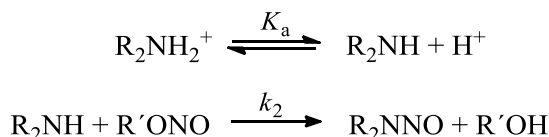
A diferencia de las nitrosaciones *in vivo*, que pueden tener lugar en medio ácido (estómago), los procesos de formación de nitrosocompuestos en medios alcalinos, como saliva, intestino, páncreas, orina, etc., han sido poco estudiados.

Por otro lado, los nitritos de alquilo se usan como saporantes y aromatizantes en tecnología de los alimentos, y como vasodilatadores en medicina. También debido a esta última propiedad se han utilizado ocasionalmente como afrodisíacos y relajantes musculares, habiendo sido relacionados con alguna patogenicidad asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida.¹⁴⁰

Los nitritos de alquilo también pueden formarse *in vivo* a partir de especies presentes en la dieta humana.¹⁴¹

En 1992, se emprendió en nuestro grupo un estudio de las reacciones entre nitritos de propilo y butilo y dieciséis sustratos nitrosables (seis alquilaminas y diez aminas cíclicas) en medio fuertemente alcalino.¹⁴²

El mecanismo encontrado fue:



De él se deduce la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = \frac{k_2 [\text{amina}][\text{nitrito}]}{1 + [\text{H}^+]/K_a} \quad 2.9$$

que en medio alcalino, coincide con la experimental:

$$v = k_2 [\text{amina}][\text{nitrito}] \quad 2.10$$

¹⁴⁰ García Rodríguez, J. SIDA, ¿Precursor de una nueva metodología infecciosa?, *Discurso de apertura del curso académico 1984-85*, **1984**, Univ. Salamanca.

¹⁴¹ Casado, J.; Lorenzo, F. M.; Mosquera, M.; Prieto, M. F. R. *Can. J. Chem.*, **1984**, *62*, 136.

¹⁴² Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; García Mateos, F. J.; Tostado, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* **1992**, 987.

La Tabla 2.2 muestra los valores de k_2 encontrados para las reacciones de nitrosación de los diferentes sustratos por nitrito de propilo (PrONO) y nitrito de butilo (BuONO).

Tabla 2.2. Constantes de velocidad de las reacciones de nitrosación de aminas secundarias por PrONO, k_{2Pr} y BuONO, k_{2Bu} a 25,0 °C. $[OH^-] = 0,1$ M y $I = 0,25$ M; rango de concentraciones iniciales, $[PrONO]_0 = (3,6-8,4) \cdot 10^{-3}$ M, $[BuONO]_0 = (3,6-6,5) \cdot 10^{-3}$ M, $[nucleófilo]_0 = (3,6-42,0) \cdot 10^{-3}$ M.

	Nucleófilo	$10^3 \cdot k_{2Pr},$ $M^{-1} s^{-1}$	$10^3 \cdot k_{2Bu},$ $M^{-1} s^{-1}$	Nucleófilo		$J(^{13}C-H),$ Hz
				pK_a	$E_i(v), eV$	
1	Dimetilamina, DMA	66,4 ± 0,7		10,73		
2	Dietilamina, DEA	12,5 ± 0,3		10,93		
3	Dipropilamina, DnPA	13,6 ± 0,2		11,00		
4	Diisopropilamina, DiPA	1,47 ± 0,02		11,20		
5	Dibutilamina, DnBA	21,9 ± 0,2		11,25		
6	Diisobutilamina, DiBA	15,2 ± 0,3		10,59		
7	2-Metil-aziridina, 2MAZIR	—	—		9,57	161
8	Azetidina, AZET	21,3 ± 0,3	18,2 ± 0,3	11,29	9,04	134
9	Pirrolidina, PYRR	175 ± 3	166 ± 4	11,35	8,77	128
10	Piperidina, PIPER	26,0 ± 0,4	31,9 ± 0,4	11,12	8,64	123, 124
11	2-Metilpiperidina, 2MPIPER	6,40 ± 0,08	5,59 ± 0,09	10,93		
12	Homopiperidina, HOMO	314 ± 7	281 ± 3	10,89	8,41	123
13	Heptametileneimina, HEPT	1080 ± 20	8990 ± 10	10,78		122
14	Piperazina, PIP	2,54 ± 0,03	3,06 ± 0,03	10,20		
15	1-Metil-piperazina, 1MPIP	0,280 ± 0,005	0,171 ± 0,003	9,16		
16	Morfolina, MOR	0,0957± 0,0016	0,0740 ± 0,018	8,45		

La pendiente negativa de la Figura 2.7 indica que se produce un ataque nucleofílico de las aminas a los nitritos.

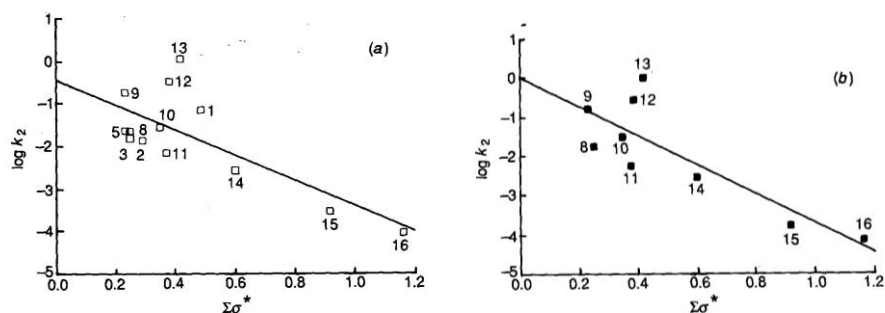


Figura 2.7. Representación de $\log k_2$ frente a $\Sigma\sigma^*$ para la reacción de aminas secundarias con a) PrONO y b) BuONO a 25,0 °C. $[\text{OH}] = 0,1 \text{ M}$ y $I = 0,25 \text{ M}$. Las aminas están numeradas como se muestra en la Tabla 2.1

En la Figura 2.8 está representado $\log k_2$ frente a $\text{p}K_a$ para distintos nucleófilos. La inexistencia de dependencia lineal apoya la idea de control orbital en estas reacciones. Numerosos resultados apoyan esta hipótesis:

1. Se observa linealidad entre los valores de $\log k_2$ y $\text{p}K_a$ en el caso de aminas cíclicas de seis miembros (Figura 2.9).

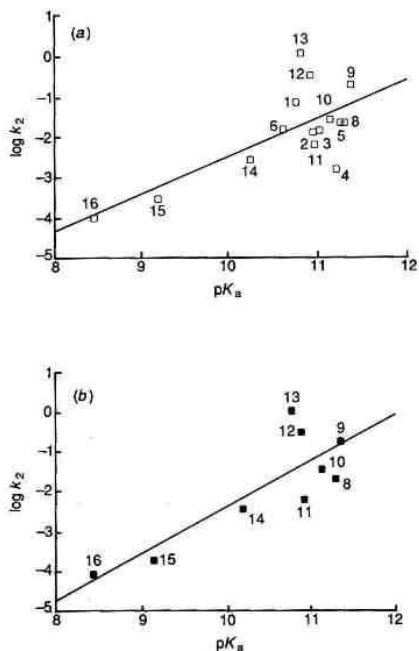


Figura 2.8. Representación de $\log k_2$ frente a $\text{p}K_a$ para la reacción de aminas secundarias con a) PrONO y b) BuONO a 25,0 °C. $[\text{OH}] = 0,1 \text{ M}$ y $I = 0,25 \text{ M}$. Las aminas son numeradas como se muestra en la Tabla 2.1

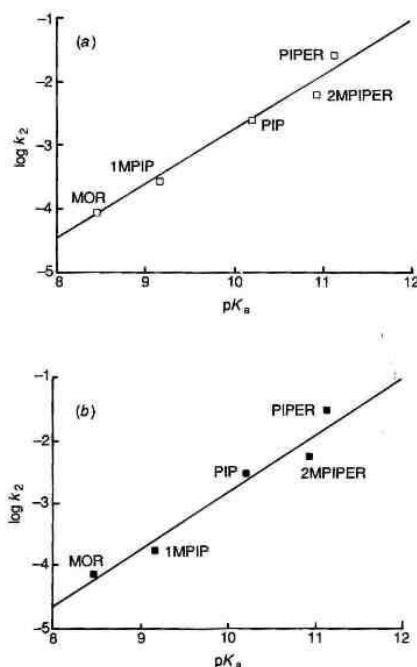


Figura 2.9. Representación de $\log k_2$ frente a $\text{p}K_a$ para la reacción de aminas cíclicas de seis miembros con a) PrONO y b) BuONO

Como se ha apuntado antes, cuando hay control orbitalico debería existir una dependencia lineal entre los valores de $\log k_2$ y el potencial de ionización vertical ($E_i(v)$) de los nucleófilos.

Desafortunadamente, los valores de ese $E_i(v)$, no son conocidos. Sin embargo, como para aminas secundarias los valores de pK_a son directamente proporcionales a los de $E_i(v)$, la linealidad observada entre $\log k_2$ y pK_a confirma la existencia de aquella correlación y, como consecuencia, del control orbitalico.

2. Sí se encontraron en la bibliografía los valores de los potenciales de ionización vertical de cinco de las aminas cíclicas. Como puede verse en la Figura 2.10, la nitrosación de estas aminas por PrONO y BuONO revela una tendencia a aumentar la reactividad (k_2) con la disminución de $E_i(v)$.

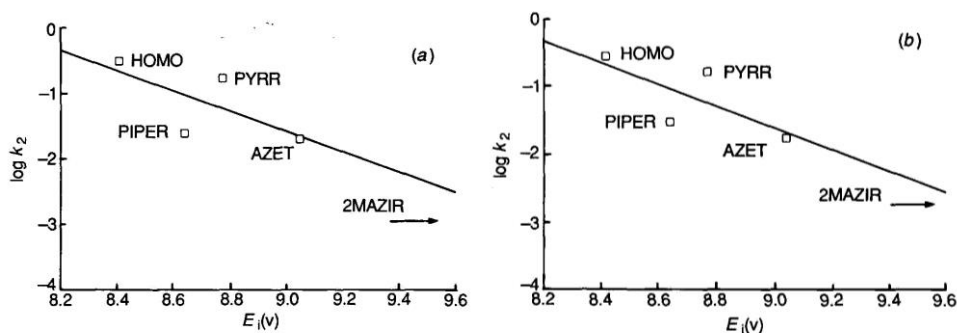


Figura 2.10. Representación de $\log k_2$ frente a $E_i(v)$ en la nitrosación de aminas secundarias con a) PrONO y b) BuONO.

3. En los cicloalcanos el carácter *s* del enlace C-H aumenta al disminuir el tamaño de ciclo. Los valores de la constante de acoplamiento espín-núcleo se muestran en la Tabla 2.2. Especial atención merece la gran similitud entre los valores de la constante *J* del ciclopropano y el benceno ($J = 159$ Hz).

Este hecho se ha interpretado pensando que el nitrógeno heterocíclico en la metalaziridina posee un tanto por ciento de carácter *s* superior al de los anillos de mayor tamaño, lo que supondría una estabilización de su par electrónico y, por consiguiente, una notable merma de reactividad, de acuerdo con lo observado experimentalmente.

Se observa también una disminución de la constante de velocidad con la polaridad del medio (Tabla 2.3), lo que sugiere que los reactivos neutros dan lugar a un estado de transición de naturaleza polar.

Tabla 2.3. Constantes de velocidad de las reacciones de nitrosación de aminas secundarias por PrONO en agua y agua/THF, a 25,0 °C. $[OH^-] = 0,1 \text{ M}$; $I = 0,25 \text{ M}$; $[\text{nucleófilo}]_0 = 1,40 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{PrONO}]_0 = 7,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Nucleófilo	$k_2, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$		
	H ₂ O	0,5 M THF	1,00 M THF
AZET	21,3 ± 0,3	13,1 ± 0,2	12,5 ± 0,1
PYRR	175 ± 3	134 ± 7	124 ± 4
PIPER	26,0 ± 0,4	22,0 ± 0,9	20,4 ± 0,2
HOMO	314 ± 7	230 ± 9	202 ± 5
HEPT	1080 ± 20	470 ± 8	437 ± 3

Los valores de los parámetros de activación en agua y en medio acuorgánico se muestran en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Parámetros de activación par las reacciones de nitrosación aminas secundarias cíclicas por PrONO en agua y en medio agua/THF; rango de temperaturas 8,0-25,0 °C (ΔH^\ddagger en kJ mol^{-1} ; ΔS^\ddagger en $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$).

Nucleófilo	H ₂ O		0,5 M THF		1,00 M THF	
	ΔH^\ddagger	$-\Delta S^\ddagger$	ΔH^\ddagger	$-\Delta S^\ddagger$	ΔH^\ddagger	$-\Delta S^\ddagger$
AZET	31,4 ± 1,4	171 ± 32	33,3 ± 1,4	169 ± 21	34,6 ± 1,8	165 ± 30
PYRR	39,2 ± 1,5	128 ± 10	28,9 ± 1,2	164 ± 21	22,7 ± 1,0	186 ± 30
PIPER	43,2 ± 0,0	130 ± 6	38,9 ± 1,9	146 ± 18	41,1 ± 1,0	139 ± 8
HOMO	37,2 ± 1,7	130 ± 11	27,7 ± 0,9	164 ± 15	29,3 ± 0,8	160 ± 12
HEPT	30,3 ± 1,7	143 ± 16	26,9 ± 0,6	161 ± 18	24,7 ± 0,6	169 ± 11

Los elevados valores negativos encontrados para la entropía de activación revelan que el estado de transición debe poseer una estructura altamente organizada.

La determinación del efecto isotópico en la reacción de nitrosación (Tabla 2.5) apoya la hipótesis de una estructura cíclica para el intermedio altamente ordenado. La

disminución observada en la relación $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ cuando se trabaja en presencia de THF puede ser interpretada como indicio de que el mecanismo estudiado esté controlado por transferencia protónica.

Tabla 2.5. Valores de $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$ en la nitrosación de piperidina por PrONO en agua y en medio agua/THF, a 25,0 °C. $[\text{OH}^-] = 0,1 \text{ M}$; $I = 0,25 \text{ M}$, $[\text{PIPER}]_0 = 1,49 \cdot 10^{-2} \text{ M}$; $[\text{PrONO}]_0 = 7,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Medio de reacción	$k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$
Agua	1,7
Agua/THF (1,00 M)	1,3

Esto significaría que los reactivos fácilmente solvatados (la amina, en particular) favorecerían la transferencia de protones en la formación del enlace nucleófilo/electrófilo.

Si esto fuera así los valores k_2 serían más altos en agua que en medio agua/THF, tal y como se ha observado. En este contexto, la estructura II (Figura 2.11) se daría en medio acuoso, mientras que la estructura I surgiría al crecer la proporción de medio orgánico. Como la estructura I es más rígida que la II, cabe esperar que, al modificar la composición del medio, cambie ΔS^\ddagger .

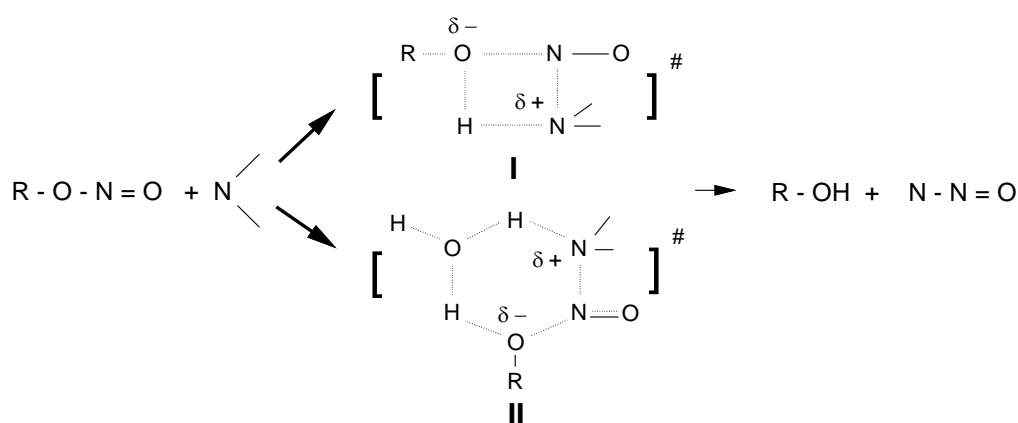


Figura 2.11. Estado de transición en mecanismos de nitrosación por nitritos de alquilo.

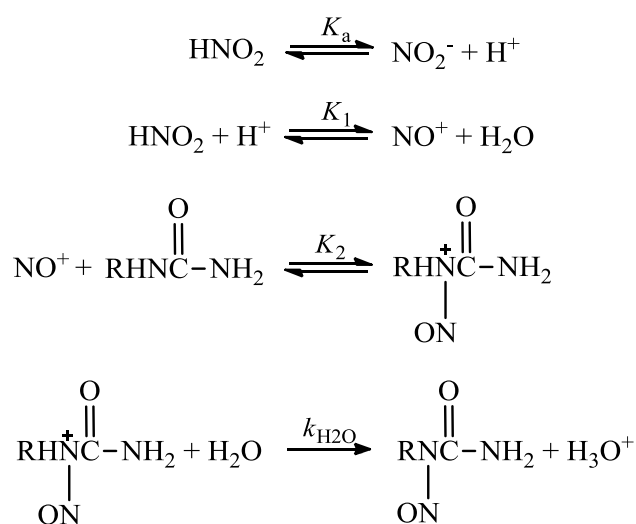
2.4.3.3. Mecanismos controlados por transferencia protónica

En el ámbito de las reacciones de nitrosación son de particular interés las que

dan lugar a la formación de *N*-nitrosoureas. A diferencia de las nitrosaminas, las *N*-nitrosoureas no requieren activación metabólica para actuar como agentes alquilantes,¹⁴³ debido probablemente a su baja estabilidad.¹⁴⁴

En su tesis doctoral González Alatorre hizo un estudio sistemático de las reacciones de nitrosación de *N*- metil, etil, propil, butil y alilurea. Uno de los objetivos del estudio fue verificar si, en el mecanismo de nitrosación de ureas (Esquema 2.1), la etapa determinante era la transferencia protónica.^{115,145}

Con el valor de la frecuencia de vibración del enlace R_3N^+H ($2700-2250\text{ cm}^{-1}$), se calculó un efecto isotópico k_{H_2O}/k_{D_2O} de magnitud comprendida entre 4,1 y 5,5, en muy buena concordancia con el encontrado cinéticamente.



Esquema 2.1. Mecanismo de nitrosación de ureas.

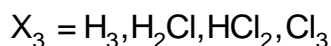
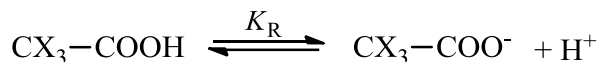
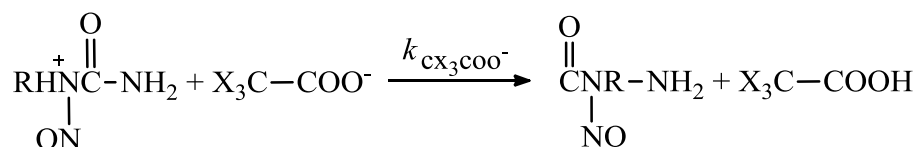
Para conocer mejor este mecanismo se estudiaron las reacciones de nitrosación de los mismos sustratos en disoluciones de ácidos mono-, di- y tricloroacético, lo que implicaría la intervención de esta etapa:

¹⁴³ Heidelberg, C.; *Ann. Rev. Biochem.* **1975**, *44*, 79.

¹⁴⁴ Casado, J., Castro, A.; Lorenzo Barral, F. M.; Meijide. F.; Mosquera, M. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, 597.

¹⁴⁵ a) Casado, J.; González Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *28*, 301.

b) González Alatorre, G. *Tesis Doctoral*, Universidad de Salamanca, 1994.



que conduce a la ecuación de velocidad:

$$v = -\frac{d[\text{nitrito}]}{dt} = \frac{[\text{urea}][\text{nitrito}][\text{H}^+]^2}{K_a + [\text{H}^+]} (a + b[\text{CX}_3\text{COOH}]) \quad 2.11$$

Los resultados experimentales mostraron excelente cumplimiento de la correlación que se muestra en la ecuación 2.12.

$$k_{\text{exp}} = a + b[\text{CX}_3-\text{COOH}] \quad 2.12$$

$$a = k_{\text{H}_2\text{O}_{\text{exp}}} (\text{M}^{-2} \text{s}^{-1})$$

$$b = \frac{k_{\text{CX}_3\text{COO}^-}}{K_R + [\text{H}^+]} K_R (\text{M}^{-3} \text{s}^{-1})$$

2.4.3.4. Mecanismos de reordenamiento interno

La formación del acetato de nitrosilo¹⁴⁶ y la efectividad de esta especie como agente nitrosante¹⁴⁷ hicieron pensar en la posibilidad de estudiar la influencia del grupo -COOH en la nitrosación de aminoácidos.

Resultados obtenidos en un primer trabajo¹⁴⁸ aportaron argumentos que hicieron pensar en la posibilidad de que, junto a las vías de nitrosación por trióxido de dinitrógeno y por iones nitrosonio/nitrosacido, existiese una tercera vía, consistente en

¹⁴⁶ Senent, S.; Casado, J.; De Diego, A. *Anal. Quím.* **1968**, *64*, 219.

¹⁴⁷ a) Casado, J.; Castro, A.; López Quintela, M. A.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, M. F. *Monatsh. Chem.* **1983**, *114*, 647.

b) Casado, J.; Castro, A.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, M. F.; Vázquez Tato, J. *Monatsh. Chem.* **1984**, *115*, 669.

¹⁴⁸ Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; Mosquera, M.; Peña, M. E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1984**, 1963.

la formación de un amino carboxilato de nitrosilo que, a continuación, actuaría como agente nitrosante del grupo amino por migración interna del grupo NO hasta el átomo de N del mismo.

Al estudiar la influencia de la acidez del medio en la velocidad de nitrosación, Gil¹⁴⁹ confirmó esta hipótesis e introdujo un nuevo parámetro, γ , en la ecuación de velocidad, que refleja cuantitativamente el grado de participación del carboxilato de nitrosilo como agente nitrosante. El cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por parte del parámetro γ confirma su significado como constante de velocidad de un proceso real.

Los valores de este parámetro varían para los distintos aminoácidos. Para los α -aminoácidos, es 5-10 veces mayor que el correspondiente a los β -aminoácidos. En los γ -aminoácidos este parámetro no es significativamente distinto de cero.

Estos resultados se han explicado en términos estereoquímicos: el anillo pentagonal formado durante la transferencia del grupo -NO en los α -aminocarboxilatos de nitrosilo se ve favorecido estéricamente (Figura 2.12).

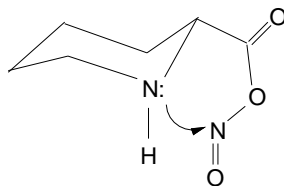


Figura 2.12. Compuesto intermedio en la reacción de nitrosación de α -aminoácidos.

En los β -aminoácidos, ese mecanismo implica la formación de un estado intermedio hexagonal que requiere un reordenamiento previo del enlace $C_{\text{anillo}}-C_{\text{carboxilo}}$ desde una conformación ecuatorial hasta una axial, más energética¹⁵⁰ (Figura 2.13)

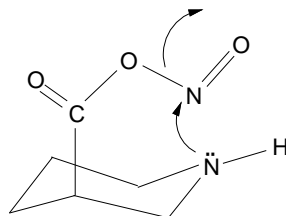


Figura 2.13. Compuesto intermedio en la reacción de nitrosación de β -aminoácidos.

Por último, en el γ -aminoácido (intermedio cíclico heptagonal), se requiere, no sólo un cambio en el enlace $C_{\text{anillo}}-C_{\text{carboxilo}}$ de orientación ecuatorial a axial, sino

¹⁴⁹ a) Gil, R. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, 1996.

b) Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1997**, 29, 495.

¹⁵⁰ Hirsch, J. A.; in Allinger, N. L.; Eliel, E. eds., *Topics in Stereochemistry*, Intersci., Nueva York, 1967, 208.

también la conversión del anillo piperidínico de conformación en silla a conformación en barca, proceso que exige una energía adicional y, en consecuencia, determina que el proceso esté menos favorecido (Figura 2.14).

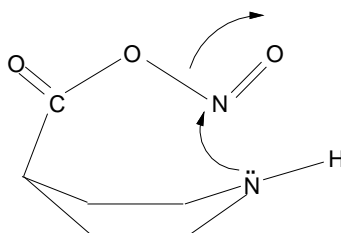


Figura 2.14. Compuesto intermedio en la reacción de nitrosación de γ -aminoácidos

En los aminoácidos con anillo aromático, se ha observado la intervención del mecanismo de migración interna del grupo NO en la nitrosación del ácido indolín-2-carboxílico pero no en la del fenilaminoacético. De nuevo, la causa debe residir en la rigidez relativa de la molécula de ácido indolín-2-carboxílico, que favorece la formación del estado de transición.¹⁵¹

2.5. Agentes alquilantes

Un agente alquilante (AA) es una especie electrófila capaz de reaccionar con un nucleófilo transfiriéndole su grupo alquilo, lo que significa, entre otras cosas, que es potencialmente capaz de unirse a moléculas con centros nucleófilos en el medio biológico. Esos centros nucleófilos pueden ser átomos de N, S y O de ADN y proteínas, y su unión con los AA puede dar lugar a la formación de aductos que pueden provocar efectos patógenos.¹⁵² Por ello, los agentes alquilantes suscitan un gran interés, siendo numerosos los estudios acerca de su carcinogenia.¹⁵³ Precisamente por su habilidad para unirse al ADN también se utilizan ampliamente en tratamientos de quimioterapia.¹⁵⁴

A pesar de que la aplicación médica sea probablemente la más conocida, los agentes alquilantes poseen aplicaciones en numerosas áreas.

¹⁵¹ Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1997**, *29*, 495.

¹⁵² Lawley, P. *Carcinogenesis by Alkylating Agents*, en *Chemical Carcinogens* Ed: Searle, C. E., American Chemical Society, Washington, DC., 83–244, 1976.

¹⁵³ Hemminki, K. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2007.

¹⁵⁴ De Vita, V. T.; Chu, E. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643.

Las primeras aplicaciones de agentes alquilantes fueron en el ámbito militar (gas mostaza) como armas químicas,¹⁵⁵ lo que aceleró su investigación y facilitó el desarrollo de nuevas aplicaciones, especialmente como agentes quimioterapéuticos,¹⁵⁶ antibacterianos y antifúngicos y como esterilizadores¹⁵⁷ de alimentos, fármacos, material quirúrgico, libros, equipos médicos, etc. También es habitual su utilización como intermedios industriales en síntesis orgánica, en la producción de surfactantes, glicoles y polímeros,¹⁵⁸ como disolventes orgánicos y como agentes de entrecruzamiento en procesos de manufactura.

Debido al amplio uso de los agentes alquilantes, el ser humano se encuentra expuesto a este tipo de compuestos por vía exógena y, como se generan *in vivo* a partir de precursores, también por vía endógena -nitrosación (*cf.* capítulos 2.3 y 2.4), oxidación,¹⁵⁹ etc.-

2.5.1. Reactividad de los agentes alquilantes

Los mecanismos de alquilación han sido investigados, entre otros, por Price¹⁶⁰ y Ross.¹⁶¹ En general, son procesos que transcurren a través de reacciones de sustitución nucleófila (S_N) y se clasifican como unimoleculares (S_{N1}) o bimoleculares, (S_{N2}), según su curso cinético. En las reacciones S_{N1} la etapa limitante de velocidad es la formación del intermedio reactivo, un carbocatión, que reacciona posteriormente con el nucleófilo. Así, la velocidad de reacción depende fundamentalmente de la concentración inicial de agente alquilante y es independiente de la de sustrato alquilable. Por otro lado, en las reacciones S_{N2} se produce una reacción concertada con desplazamiento de un grupo saliente, presente en el agente alquilante, por un nucleófilo más fuerte. En este caso, la velocidad de las reacciones S_{N2} depende de la concentración de ambos reactivos, sustrato alquilable y agente alquilante. No

¹⁵⁵ a) Auerbach, C. *Hereditas* **1949**, 35, 128.

b) Hosseini-khalili, A.; Haines, D. D.; Modirian, E.; Soroush, M.; Khateri, S.; Joshi, R.; Zendehtdel, K.; Ghanei, M.; Giardina, C. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2009**, 678, 1.

¹⁵⁶ a) Craig, C. R.; Stitzel, R. E. *Modern Pharmacology with Clinical Applications*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2003.

b) Arcangelo, V. P.; Peterson, A. M. *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2011.

¹⁵⁷ a) Block, S. S. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000.

b) Fraise, A.; Lambert, P. A.; Maillard, J. Y. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008.

¹⁵⁸ Ehrenberg, L.; Hussain, S. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1981**, 86, 1.

¹⁵⁹ Mestankova, H.; Schirmer, K.; Canonica, S.; von Gunten, U. *Water Res.* **2014**, 66, 399.

¹⁶⁰ Price, C. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, 68, 663.

¹⁶¹ Ross, W. C. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, 68, 669.

obstante, las reacciones exclusivamente S_N1 o S_N2 no existen; lo que suele ocurrir es que prevalece un tipo de reacción sobre la otra. El tipo de sustitución nucleofílica depende de factores como concentración de los reactivos, pH y naturaleza del disolvente, pero también de la naturaleza del propio nucleófilo.¹⁶² Dependiendo del tipo de sustitución nucleofílica los agentes alquilantes se clasifican en agentes alquilantes S_N2 (o agentes alquilantes tipo S_N2) y agente alquilantes S_N1 (agentes alquilantes tipo S_N1). Precisamente por eso, y debido a la existencia de agentes alquilantes denominados fronterizos S_N1/S_N2 ,¹⁶³ lo más acertado es hablar de agentes alquilantes con mayor carácter S_N1 o con mayor carácter S_N2 . A pesar de no ser la nomenclatura recomendada por la IUPAC para nombrar los mecanismos de alquilación,¹⁶⁴ es la que habitualmente se encuentra en bibliografía.

Otras formas de clasificar los agentes alquilantes son:

- En función el número de grupos electrófilos capaces de dar reacciones de alquilación:

- Monofuncionales. Ejemplos de este tipo son las lactonas, epóxidos o aziridinas.

- Bifuncionales, como las mostazas y la ifosfamida

- Según su modo de actuación:

- Agentes alquilantes directos: son, *per se*, electrófilos capaces de producir la reacción de alquilación de forma directa. Pertenecen a este grupo epóxidos, nitrosoureas, sulfonatos, sultonas, haloéteres y algunas lactonas y mostazas.¹⁶⁵

- Agentes alquilantes indirectos: requieren metabolización previa para dar lugar a la especie alquilante. Ejemplos son hidrocarburos, pigmentos azo, aminas aromáticas y dialquilnitrosaminas.^{165c}

¹⁶² Miller, E. C.; Miller, J. A. *Pharmacol. Rev.* **1966**, *18*, 805.

¹⁶³ a) Lawley, P. D. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1974**, *23*, 283.

b) Dipple, A. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 437.

¹⁶⁴ Guthrie, R. D.; Jencks, W. P. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 343.

¹⁶⁵ a) Bartsch, H.; Terracini, B.; Malaveille, C.; Tomatis, L.; Wahrendorf, J.; Brun, G.; Dodet, B. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1983**, *110*, 181.

b) Gourdie, T. A.; Valu, K. K.; Gravatt, G. L.; Boritzki, T. J.; Baguley, B. C.; Wakelin, L. P. G.; Wilson, W. R.; Woodgate, P. D.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1177.

c) Beranek, D. T. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1990**, *231*, 11.

2.5.1.1. Interacción con macromoléculas

En el primer artículo publicado sobre interacción covalente de un carcinógeno químico con una macromolécula diana tisular se abordaba el estudio de los aductos de derivados del *N,N*-dimetil-4-aminoazobenceno con proteínas en el hígado de ratas y ratones alimentados con este compuesto.¹⁶² Desde entonces, la interacción de agentes alquilantes con proteínas y ADN ha sido estudiada por numerosos autores.

Se sabe que a pH = 7,5 casi todos los grupos carboxilo e imidazol, y entre un 11% y un 44% de los grupos α -amino, sufren alquilación. El resto de centros nucleófilos también pueden dar lugar a alquilación, aunque en pequeña proporción. Ross estudió la reactividad de algunos de esos centros.^{161,166} También hay estudios en los que se establecen correlaciones cualitativas y cuantitativas entre reactividad de los agentes alquilantes con proteínas (generalmente proteínas nucleares asociadas al ADN) y su capacidad carcinógena.¹⁶⁷

Los agentes alquilantes también reaccionan con los átomos de nitrógeno y oxígeno de las bases de los ácidos nucleicos y con los grupos fosfato de ADN y ARN, para formar gran variedad de aductos covalentes.^{153,168} Las características de los aductos formados dependen de diversos factores:¹⁶⁹

- Reactividad química.

Los agentes alquilantes tienen preferencia por algunas posiciones nucleófilas de los ácidos nucleicos.^{168a,170} Los tipo S_N1 muestran afinidad elevada por los átomos de oxígeno exocíclicos, y son agentes alquilantes mucho más reactivos que los S_N2 , que reaccionan mayoritariamente con los átomos de nitrógeno de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.^{168c,171} De acuerdo con esto, Loechler recomendó denominar a los agentes alquilantes S_N2 compuestos *low oxyphilic* y a los S_N1 *high oxyphilic*.^{170b} Los factores que dirigen la reactividad de los agentes alquilantes con los ácidos

¹⁶⁶ Ross, W. C. J. *Biological alkylating agents: fundamental chemistry and the design of compounds for selective toxicity*, Cancer Monograph, Butterworths, London, 1962.

¹⁶⁷ a) Boffa, L. C.; Bolognesi, C.; Mariani, M. R. *Mutat. Res. Lett.* **1987**, *190*, 119.

b) Dickens, F.; Jones, H. E. *Br. J. Cancer* **1965**, *19*, 392.

¹⁶⁸ a) Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747.

b) van Sittert, N. J.; Boogaard, P. J.; Natarajan, A. T.; Tates, A. D.; Ehrenberg, L. G.; Törnqvist, M. *A. Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2000**, *447*, 27.

c) Drabløs, F.; Feyzi, E.; Aas, P. A.; Vaagbø, C. B.; Kavli, B.; Bratlie, M. S.; Peña-Díaz, J.; Otterlei, M.; Slupphaug, G.; Krokan, H. E. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1389.

¹⁶⁹ Fu, D.; Calvo, J. A.; Samson, L. D. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 104.

¹⁷⁰ a) Hemminki, K. *Arch. Toxicol.* **1983**, *52*, 249.

b) Loechler, E. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 277.

¹⁷¹ Spears, C. P.; Kang, S.-I.; Kundu, N. G.; Shamma, T.; Ohla, G. *Curr. Top. Med. Chem.* **1997**, *2*, 85.

nucleicos son una combinación de factores estéricos y electrónicos. Algunas teorías han tratado de explicar el comportamiento observado:

- En la escala Swain-Scott de nucleofilia/electrofilia, los nucleófilos con valores bajos de constante de sustrato, s , (normalmente asociados a agentes alquilantes S_N1)¹⁷² tienen mayor afinidad por los centros menos nucleófilos del ADN, fosfatos y átomos de oxígeno. A valores más altos de s , mayor preferencia por los centros de mayor nucleofilia (átomos de nitrógeno) y, particularmente, por el $N7$ de la guanina.^{163a,173}

- Según la teoría de ácidos y bases duros y blandos, la reactividad observada se explica en términos de selectividad, de modo que los agentes alquilantes reaccionan con centros que poseen su misma naturaleza. La alquilación de los oxígenos fuertes se produce por agentes alquilantes fuertes y los centros débiles, átomos de nitrógeno, reaccionan con agentes alquilantes débiles.¹⁷⁴ Los agentes alquilantes pequeños y difundibles reaccionan con la posición $N7$.^{165c,168a,170b}

Ninguna de esas teorías explica por completo las afinidades observadas experimentalmente.

- Número de centros reactivos que contenga el agente alquilante, es decir, si es mono o bifuncional.

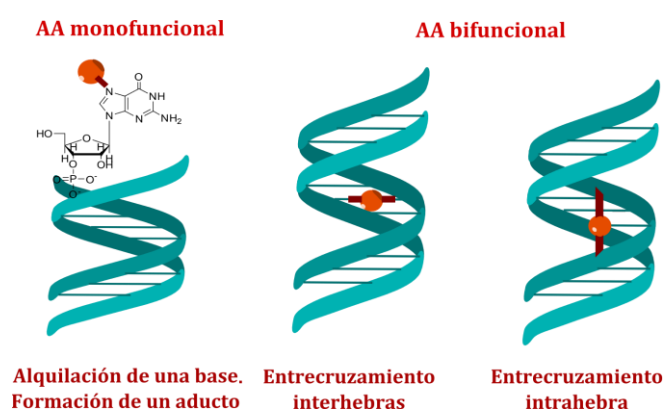


Figura 2.15. Efectos producidos por reacción de agentes alquilantes mono y bifuncionales con los ácidos nucleicos.

¹⁷² Swain, C. G.; Scott, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 141.

¹⁷³ a) Kang, S. I.; Spears, C. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 597.

b) Sedgwick, B. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 148.

c) Barbin, A.; Bartsch, H. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1989**, *215*, 95.

d) Vogel, E. W. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 2093.

¹⁷⁴ Ho, T.-L. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 1

Como los agentes alquilantes monofuncionales tienen sólo un sitio reactivo, reaccionan con los ácidos nucleicos en una única posición, formando un aducto covalente. Los agentes polifuncionales, después de formar aducto con una de las posiciones reactivas, pueden reaccionar con el ácido nucleico a través de otra posición, dando lugar a entrecruzamiento intrahebra o interhebras (Figura 2.15).

- El tipo de grupo alquilo añadido. El tamaño del grupo alquilo, así como la presencia de grupos funcionales en el mismo, modifican los efectos causados por la alquilación.
- El tipo de sustrato: ARN, ADN de hebra sencilla o doble hebra y la conformación de este último.

En el caso del ADN doble hebra la reacción está también condicionada por efectos estéricos. Según sea la conformación en que se encuentre el ADN, las posiciones de ataque de los agentes alquilantes son más o menos accesibles. Cuando el ADN se encuentra en su configuración normal (ADN B), los átomos O^6 y $N7$ de las guaninas son más accesibles que cuando se halla en conformación Z, levógira.¹⁷⁵

Como consecuencia de la interacción de agentes alquilantes con el ADN u otras macromoléculas se pueden producir ciertos efectos biológicos que dependen de si el agente alquilante es mono o bifuncional.

2.5.1.2. Efectos biológicos de agentes alquilantes

2.5.1.2.1. Efectos biológicos de agentes alquilantes bifuncionales

Al interactuar con las bases del ADN, los agentes alquilantes monofuncionales pueden dar lugar a mutaciones puntuales:

- Alterar el marco de lectura. Por inserción/delección: Uno o más pares de nucleótidos se insertan o se eliminan. Este tipo de mutaciones, salvo que se compensen entre sí, pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada y sus consecuencias suelen ser graves.
- No alterar el marco de lectura. Se produce cuando tiene lugar la sustitución de pares de bases. Las sustituciones provocan la alteración de un único triplete y por tanto, salvo que indiquen un triplete de parada, o un aminoácido del centro activo de una enzima, pueden no ser perjudiciales. Las mutaciones se denominan en ese caso:

¹⁷⁵ Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC, 1995.

- Transiciones: las purinas y pirimidinas son reemplazadas por bases del mismo tipo.
- Transversiones: las purinas son reemplazadas por pirimidinas y viceversa.

En la Tabla 2.6 se recogen las principales mutaciones asociadas a la alquilación del ADN. Puesto que las posiciones que sufren alquilación son mayoritariamente O⁶ y N7 de la guanina, cabe destacar sus posibles consecuencias biológicas. No obstante, en el caso de producirse una mutación puntual, pueden transcurrir mecanismos muy complejos (reparación, recombinación, reordenamiento, etc.) antes de que aparezca el efecto biológico, y éste podría cambiar o no llegar a producirse.

Tabla 2.6. Mutaciones asociadas a la alquilación en las principales posiciones en el ADN.^{169,176}

Base nitrogenada del ADN	Posición alquilada de la base	Mutación puntual
Adenina (A)	N1	Transversión A-T
	N3	
Guanina (G)	O ⁶	Transición G-A
	N7	Transición G-A
		Eliminación (depuración)
Citosina (C)	N3	Transición C-T

La estabilidad de los aductos con el ADN parece estar correlacionada con la aparición de tumores.^{153,177} Las lesiones producidas por alquilación en la posición O⁶ tienen mayor capacidad mutágena que las generadas por la formación de aductos N7-alquilguanina.^{168a} Mientras que la alquilación en la posición O⁶ produce aductos estables que alteran los puentes de hidrógeno (lo que puede producir mutagenia y errores en la codificación), los aductos N7-alquilguanina son inestables y no afectan a los puentes de hidrógeno.^{168a,178} La transición G-A producida tanto por alquilación de N7 como de O⁶, si no es reparada, puede acarrear la producción de proteínas defectuosas y, dependiendo del papel de esa proteína, se podrían producir consecuencias biológicas.

¹⁷⁶ Kondo, N.; Takahashi, A.; Ono, K.; Ohnishi, T. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*, 543531.

¹⁷⁷ Swenberg, J. A.; Richardson, F. C.; Boucheron, J. A.; Dyroff, M. C. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *62*, 177.

¹⁷⁸ Boysen, G.; Pachkowski, B. F.; Nakamura, J.; Swenberg, J. A. *Mutat.Res.,Gen. Toxicol. Environm. Mutagen.* **2009**, *678*, 76.

Las mutaciones puntuales tienen un papel importante en diferentes procesos biológicos, como la activación de oncogenes. La mutagenia directa por mal apareamiento de las bases, atribuida a la alquilación de átomos de las bases que alteran la especificidad del apareamiento (ej: O⁶-alquilguanina), puede producir recombinaciones y, con ellas, la muerte celular, aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas.¹⁷⁹ La mutagenia indirecta no causa efectos *per se* sino que depende de otros procesos, como la generación de errores en los procesos enzimáticos de reparación.^{176,180} Por otro lado, la depurinación (escisión del residuo de guanina por alquilación N7), puede provocar ruptura de la cadena del ADN,^{156a} y con ella la muerte celular o el reordenamiento cromosómico, que puede tener consecuencias nefastas.¹⁸¹

Las lesiones del ADN debidas a exposición endógena ascienden a 20.000 por día y célula. Aunque no se sabe cuál es la contribución exacta de los procesos de alquilación, se conoce que existen numerosos mecanismos de reparación específicos para las lesiones producidas por alquilación directa o indirecta. Este hecho hace pensar que el número de lesiones generadas por ese mecanismo debe ser muy elevado.^{168c} Numerosas lesiones en el ADN, capaces de producir mutaciones son reparadas y no producen ningún efecto. Sin embargo, cuando la lesión no consigue ser reparada, ni da lugar a muerte celular o generación de una respuesta inmune, se produce la replicación del ADN alterado, que puede dar lugar a la aparición de tumores.¹⁸²

Entre los efectos biológicos de los agentes alquilantes monofuncionales, destacan, además de su capacidad mutágena, tumorigena y carcinógena, su toxicidad, citotoxicidad, clastogenia y teratogenia, entre otros.¹⁷⁹

2.5.1.2.2. Efectos biológicos de agentes alquilantes bifuncionales

Los agentes moleculares bifuncionales reaccionan con dos centros nucleófilos. En el medio biológico se forma inicialmente un aducto covalente que luego reacciona con otro nucleótido, proteína o macromolécula. Los entrecruzamientos intrahebra del ADN o entre el ADN y una proteína o el glutatión, no tienen efectos tan nocivos como los producidos por el entrecruzamiento entre hebras del ADN opuestas.¹⁸³ En este último caso el entrecruzamiento imposibilita la replicación del ADN al impedir que se

¹⁷⁹ Margison, G. P.; Santibáñez Koref, M. F.; Povey, A. C. *Mutagenesis* **2002**, *17*, 483.

¹⁸⁰ Sugiura, K.; Goto, M. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *35*, 71.

¹⁸¹ Sanderson, B. J. S.; Shield, A. J. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**, *355*, 41.

¹⁸² Miller, E. C.; Miller, J. A. *Cancer* **1981**, *47*, 2327.

¹⁸³ Siddik, Z. H. In *The Cancer Handbook*; John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, New Jersey, 2005.

separen las dos hebras. El efecto es muy citotóxico y causa una elevada muerte celular.¹⁸⁴ De hecho, los aductos bifuncionales formados entre hebras opuestas son hasta cien veces más citotóxicos que los aductos monofuncionales.¹⁸³ Se han tratado de establecer correlaciones estructura-actividad para los agentes alquilantes bifuncionales y se ha comprobado que, aunque no existe correlación entre la constante del sustrato, s, y potencial cancerígeno, sí la hay entre éste y su toxicidad aguda en roedores (expresada como LD₅₀).¹⁸⁵

Los agentes alquilantes bifuncionales poseen capacidad citotóxica más alta que los monofuncionales. Como los compuestos estudiados en esta tesis son alquilantes monofuncionales, nos centraremos exclusivamente en ellos.

2.5.2. Ensayos químicos para estudiar la reactividad de agentes alquilantes

Se han desarrollado numerosos test y métodos para detectar y estudiar la reactividad de los agentes alquilantes. Los reactivos más empleados se muestran en la Figura 2.16.¹⁸⁶

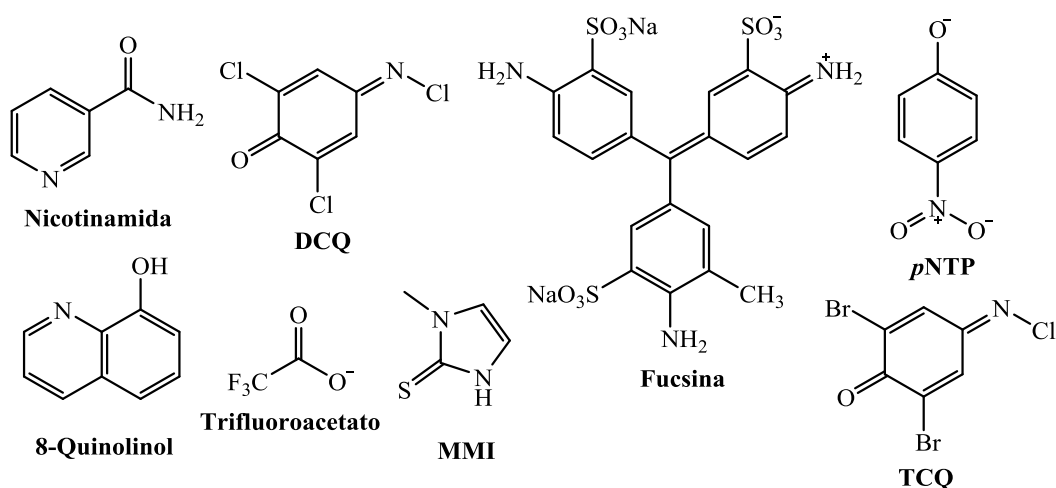


Figura 2.16. Moléculas utilizadas en la detección de agentes alquilantes.

¹⁸⁴ Garcia, S. T.; McQuillan, A.; Panasci, L. *Biochem. Pharm.* **1988**, *37*, 3189.

¹⁸⁵ Vogel, E. W.; Nivard, M. J. M.; Ballering, L. A. B.; Bartsch, H.; Barbin, A.; Nair, J.; Comendador, M. A.; Sierra, L. M.; Aguirrezabalaga, I.; Tosal, L.; Ehrenberg, L.; Fuchs, R. P. P.; Janel-Bintz, R.; Maenhaut-Michel, G.; Montesano, R.; Hall, J.; Kang, H.; Miele, M.; Thomale, J.; Bender, K.; Engelbergs, J.; Rajewsky, M. F. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**, *353*, 177.

¹⁸⁶ a) Mason, W. A.; Meloan, C. E. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 299.

b) Trams, E. G. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 256.

c) Tee, K. L.; Schwaneberg, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5380.

d) Doderer, K.; Lutz-Wahl, S.; Hauer, B.; Schmid, R. D. *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 131.

e) Zoicher, F.; Enzelberger, M. M.; Bornscheuer, U. T.; Hauer, B.; Schmid, R. D. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 345.

Algunos métodos se han utilizado como ensayos de referencia para estudiar la reactividad de especies bioactivas con macromoléculas y poder establecer correlaciones con los efectos biológicos. Entre los sustratos modelo destaca la NBP (4-(*p*-nitrobencil)piridina), en el que nos detendremos más adelante.¹⁸⁷

El ensayo colorimétrico o fluorimétrico con nicotinamida permite trabajar en condiciones más próximas a las biológicas que con el test de NBP y da lugar a la formación de aductos más estables.¹⁸⁸ Sin embargo, su empleo no se ha generalizado tanto. El ensayo con *N*-mercaptoimidazol (MMI) se utiliza en la modelización de la reactividad con los átomos de nitrógeno de las bases del ADN, para estudiar la capacidad alquilante S_N2. Este ensayo tiene dos inconvenientes: la monitorización de la reacción es compleja, porque se hace con espectroscopia H-RMN, y presenta dos sitios reactivos, un átomo de azufre y otro de nitrógeno.¹⁸⁹ Para modelar la alquilación de los oxígenos o de la capacidad alquilante S_N1 se han utilizado de forma habitual las reacciones con el H₂O o con trifluoroacetato.^{189,190}

Aunque, para simplificar los estudios y reducir costes, algunos de los métodos apuntados se han utilizado para modelar la reactividad con macromoléculas biológicas, en ningún caso sustituyen al estudio directo.

2.5.2.1. Test de NBP

2.5.2.1.1. Desarrollo histórico

La molécula 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP) se utilizó por primera vez para detectar agentes alquilantes en 1925, comprobándose que actuaba como los análogos bencílicos manejados anteriormente.¹⁹¹ Los métodos de detección de agentes alquilantes alcanzaron un gran desarrollo en ese momento a partir del descubrimiento de su papel como vesicantes, mutágenos, carcinógenos y cocarcinógenos y de su uso como armas químicas. Brown fue el primero en descubrir que la reacción con NBP podía utilizarse para detectar gas mostaza en 1941.¹⁹² Gehauf y Braun utilizaron la reacción general para detectar algunos compuestos orgánicos alquilantes. El

¹⁸⁷ Fishbein, L.; Cavanaugh, M. A. *J. Chromatogr. A* **1965**, 20, 283.

¹⁸⁸ a) Nelis, H. J. C. F.; Airy, S. C.; Sinsheimer, J. E. *Anal. Chem.* **1982**, 54, 213.

b) Hooberman, B. H.; Chakraborty, P. K.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1993**, 299, 85.

¹⁸⁹ Eder, E.; Kutt, W.; Deininger, C. *Chem.-Biol. Interact.* **2006**, 164, 76.

¹⁹⁰ a) Eder, E.; Kutt, W. *Chem.-Biol. Interact.* **1989**, 69, 45.

b) Eder, E.; Espinosa-Gonzalez, J.; Mayer, A.; Reichenberger, K.; Boerth, D. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 952.

¹⁹¹ Koenigs, E.; Friedrich, H.; Jurany, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, 58, 2571.

¹⁹² Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* **1955**, 27, 1435.

procedimiento consistía en adsorber los vapores de los haluros de alquilo en silica gel impregnada de NBP y añadir una base, lo que inducía la aparición de colores que variaban del azul al violeta y al marrón. El mecanismo de reacción fue propuesto en el año 1944 tras aislar los intermedios de reacción.¹⁹²

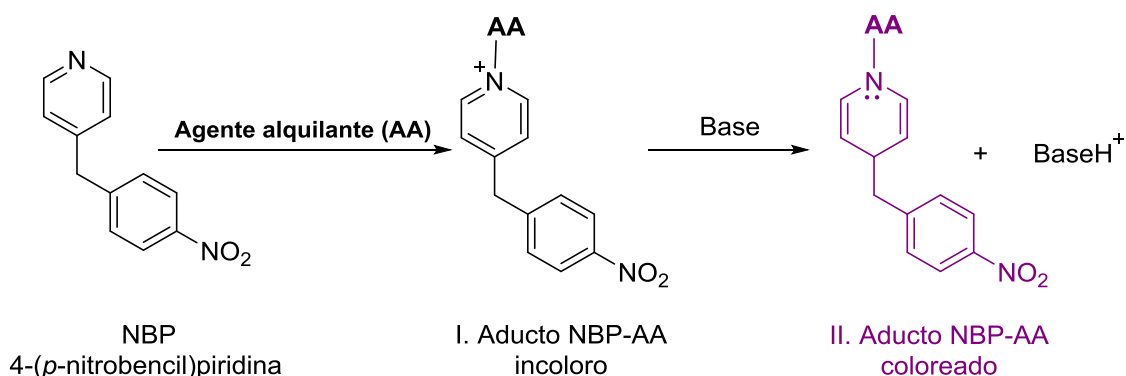


Figura 2.17. Test de NBP

En 1955, el grupo de Epstein fue pionero en la aplicación del método con objetivos cuantitativos e incluso cinéticos.¹⁹² El procedimiento se basaba en la medida de la absorbancia del aducto formado entre la NBP y el AA tras la adición de una base. Se observó el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por parte del aducto NBP-AA formado. Estos autores fueron los primeros en encontrar las condiciones óptimas para el test de NBP y advirtieron de la importancia de hacer las medidas inmediatamente después de la adición de la base debido a la inestabilidad del aducto coloreado en medio básico.

Desarrollaron dos métodos diferentes, uno para compuestos solubles en agua y otro para los solubles en disolventes orgánicos. Ambos procedimientos se han utilizado en numerosas investigaciones con pequeñas modificaciones.¹⁹³

¹⁹³ a) Van Duuren, B. L.; Melchionne, S.; Seidman, I.; Pereira, M. A. *Environ. Health Perspect.* **1986**, 69, 109.

b) Perlman, M. E.; Bardos, T. J. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1761.

c) Wilman, D. E. V.; Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2256.

d) Phillips, D. H.; Grover, P. L.; Sims, P. *Chem.-Biol. Interact.* **1978**, 20, 63.

e) Banerjee, R.; Rachid, Z.; McNamee, J.; Jean-Claude, B. J. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5546.

f) Hemminki, K.; Heinonen, T.; Vainio, H. *Arch. Toxicol.* **1981**, 49, 35.

g) Sobol, Z.; Engel, M. E.; Rubitski, E.; Ku, W. W.; Aubrecht, J.; Schiestl, R. H. *Mutat. Res.* **2007**, 633, 80.

h) Hemminki, A.; Vayrynen, T.; Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, 93, 51.

Debido a estas modificaciones a partir de entonces muchos autores se refieren al test de NBP como test de Epstein. Preussman también realizó una modificación posterior y en ocasiones se ha denominado al test con su nombre.¹⁹⁴

En 1960 la atención de los científicos se centró en la búsqueda de correlaciones entre carcinogenia, toxicidad o actividad inhibidora del desarrollo de tumores de los compuestos investigados y algunas de sus propiedades químicas como la solubilidad en agua, constante de reparto y reactividad química frente a nucleófilos. El objetivo principal fue alertar y prevenir de los peligros de exposición a estos compuestos y también, en el caso de los utilizados en medicina, la mejora de los medicamentos y sus dosis.¹⁹⁵

Por esas razones, el test de NBP experimentó gran desarrollo en el ámbito biológico. Se incluyeron modificaciones en el método para poder hacer frente a los problemas añadidos por el tratamiento de muestras biológicas. Aunque se han utilizado muchas modificaciones, la más conocida y más aplicada ha sido la de Friedman y Boger,¹⁹⁶ que utilizaban NaOH para desprotonar el aducto formado y una etapa de extracción del producto coloreado con acetato de etilo.¹⁹⁷

2.5.2.1.2. NBP como modelo del ADN

Los ácidos nucleicos son moléculas complejas con numerosos centros nucleófilos susceptibles de mecanismos de alquilación. Como investigar la reactividad de los agentes alquilantes con estas moléculas supone una inversión elevada de tiempo y dinero, a menudo se trabaja con los distintos nucleótidos o nucleósidos por separado, lo que disminuye el número de centros reactivos. Sin embargo, como la solubilidad de las bases nitrogenadas en agua es baja y el seguimiento cinético de las reacciones sigue resultando complejo, en numerosas ocasiones se trabaja con moléculas modelo mucho más sencillas y con las que es más fácil trabajar (piridina, anilina, nicotinamida, NBP...).

¹⁹⁴ a) Braun, R.; Dittmar, W.; Hefter, B.; Weber, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *35*, 229.

b) Nawrot-Modranka, J.; Nawrot, E.; Graczyk, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1301.

c) Imamura, T.; Talcott, R. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1985**, *155*, 1.

d) Kalinowska-Lis, U.; Szmigiero, L.; Studzian, K.; Ochocki, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 660.

e) Preussmann, V.; R.; Schneider, H.; Epple, F. *Arzneimittel-Forsch.* **1969**, *19*, 1059.

¹⁹⁵ a) Van Duuren, B. L.; Goldschmidt, B. M. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 77.

b) Mellett, L. B.; Woods, L. A. *Cancer Res.* **1960**, *20*, 524.

c) Van Duuren, B. L.; Nelson, N.; Orris, L.; Palmes, E. D. *J. Natl. Cancer Inst.* **1963**, *31*, 41.

¹⁹⁶ Friedman, O. M.; Boger, E. *Anal. Chem.* **1961**, *33*, 906.

¹⁹⁷ a) Acosta, D.; Mitchell, D. B. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1981**, *30*, 3225.

b) Archer, M. C.; Eng, V. W. S. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *33*, 207.

c) Samanta, S.; Pain, A.; Ghosh, M.; Dutta, S.; Sanyal, U. *Exp. Oncol.* **2005**, *27*, 279.

La NBP se emplea con frecuencia porque permite modelar la reactividad del ADN y en particular la del N7 de la guanina (con nucleofilia muy similar a la de la NBP) y, además, presenta múltiples ventajas para estudiar la reactividad de agentes alquilantes:¹⁹⁸

- El seguimiento de la reacción es sencillo (espectroscopia UV-vis).
- Es un ensayo rápido¹⁹⁹ y barato.^{197b,200}
- Muestra alta reproducibilidad.²⁰¹
- Es versátil (aplicable a infinidad de agentes alquilantes).^{198b,202}
- Posee una elevada sensibilidad, que permite realizar estudios con concentraciones muy bajas de agente alquilante.^{201,202a,203}
- Permite estudiar la reactividad utilizando sistemas de activación y estudiar agentes alquilantes indirectos.^{199,204}

Por todo ello, el test de NBP se utiliza mucho en el estudio mecanístico y cinético de la reactividad de agentes alquilantes, y en el establecimiento de correlaciones reactividad/efectos biológicos, a pesar de que su empleo presenta ciertos inconvenientes:

- Los medios de trabajo difieren del biológico: La insolubilidad de la NBP en agua limita el medio de reacción a mezclas acuoorgánicas y las concentraciones salinas pueden ser diferentes a las biológicas.
- No es un método específico.

¹⁹⁸ a) Chmielewicz Z. F.; Fiel, R. J.; Bardos, T. J.; Ambrus, J. L. *Cancer Res.* **1967**, *27*, 1248.

b) Kim, J. H.; Thomas, J. J. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 879.

c) Van Duuren, B. L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, *163*, 633.

¹⁹⁹ Fisher, G. R.; Donis, J.; Gutierrez, P. L. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1992**, *44*, 1625.

²⁰⁰ Nakano, N.; Yamamoto, A.; Kobayashi, Y.; Nagashima, K. *Talanta* **1995**, *42*, 641.

²⁰¹ Dierickx, K. M. E.; Journé, F.; Gerbaux, P.; Morandini, R.; Kauffmann, J.-M.; Ghanem, G. E. *Talanta* **2009**, *77*, 1370.

²⁰² a) Sawicki, E.; Bender, D. F.; Houser, T. R.; Wilson, R. M.; Meeker, J. E. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1479.

b) Gómez-Bombarelli, R.; Palma, B. B.; Martins, C.; Kranendonk, M.; Rodrigues, A. S.; Calle, E.; Rueff, J.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1275.

c) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 386.

²⁰³ a) Hammock, L. G.; Hammock, B. D.; Casida, J. E. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* **1974**, *12*, 759.

b) Agree, A. M.; Meeker, R. L. *Talanta* **1966**, *13*, 1151.

²⁰⁴ Thomas, J. J.; Kim, J. H.; Mauro, D. M. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *22*, 219.

- Los aductos NBP-AA se hidrolizan en medio básico por lo que las medidas deben hacerse inmediatamente después de la adición de la base.²⁰¹
- Si se trabaja en medio ácido, es necesario considerar su pK_a .
- La aplicación habitual del test, en ausencia de un sistema de activación, no permite la detección o el seguimiento de agentes alquilantes indirectos.
- El impedimento estérico puede ser muy diferente al de los centros reactivos de los ácidos nucleicos.

Aunque habitualmente se admite *ab initio* que la NBP es una molécula válida para modelar la reactividad con el ADN, algunas consideraciones sobre ella pueden ser útiles:

1. Debido a los inconvenientes mencionados, la NBP no sería el mejor modelo de la molécula de ADN, pero puede ser muy útil para modelar la reactividad de la posición más nucleófila del ADN, el *N7* de la guanina.

2. La escala de nucleofilia/electrofilia más generalizada en los estudios con ADN es la de Swain-Scott.¹⁷² De acuerdo con la ecuación 2.13, la nucleofilia se obtiene a partir de las constantes de velocidad de la reacción de diversos electrófilos en agua (k_0) y en presencia de un nucleófilo N, k_N . La nucleofilia, n_N , es una constante característica de cada centro nucleófilo en disolución acuosa. Es un valor relativo al del agua que se toma como referencia, $n_0 = 0$. El valor de referencia de s ($s = 1$) es el del bromuro de metilo a 25,0 °C.¹⁷²

$$\log\left(\frac{k_N}{k_0}\right) = s(n_N - n_0) \quad 2.13$$

Como puede observarse en la Tabla 2.7, la nucleofilia de la NBP es similar a la de la posición *N7* de la guanina, aunque dista apreciablemente de la del ADN y de las de los restantes centros nucleófilos de los ácidos nucleicos (grupo fosfato y posición *O6* de la guanina). Se observa también que otras moléculas utilizadas ocasionalmente como modelos del ADN, piridina y anilina, tienen nucleofilias similares entre ellas pero distintas de las del ADN y de las de sus principales centros nucleófilos.

Tabla 2.7. Nucleofilia de Swain-Scott de algunos nucleófilos comunes.

Nucleófilo	n_N	Ref.
ADN ^a	2,5-2,6	205
ADN monohebra ^a	5,4	163a,206
Guanina N7	3,5-3,6	205
Guanina O ⁶	0,5-1,5	205
Cisteína - RS y -RSH*	5	205
Fosfato ADN ^a	1	207
Fosfato inorgánico	2,5	172
Acetato	2,72	172
Tiosulfato	6,36	172
Azida	4,00	172
Hidróxido	4,20	172
Yoduro	5,04	172
Anilina	4,43-4,49	172
Piridina	4,27	208
NBP	3,5	206

* Valor medio; ^a Estos valores son una aproximación.

3. Aparte de la nucleofilia, la NBP y la posición N7 de la guanina, comparten otras semejanzas, como las configuraciones electrónicas de sus centros nucleófilos²⁰⁹ y el impedimento estérico, considerando la guanina monómera. Las diferencias residen en la reactividad, puesto que, mientras la NBP no es selectiva y reacciona tanto con nucleófilos S_N1 como S_N2,²¹⁰ la posición N7 de la guanina lo hace fundamentalmente con los S_N2. Además, el impedimento estérico de la guanina en la molécula de ADN, es mucho mayor que el de la NBP. Este hecho afecta a los agentes alquilantes de mayor tamaño que sí presentan reactividades diferentes frente a ambos nucleófilos, lo que puede dar lugar a la aparición de falsos positivos en el ensayo de NBP.

²⁰⁵ Vogel, E. W.; Nivard, M. J. M. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1994**, 305, 13

²⁰⁶ Spears, C. P. *Mol. Pharmacol.* **1981**, 19, 496.

²⁰⁷ a) Osterman-Golkar, S.; Ehrenberg, L.; Wachtmeister, C. A. *Radiat. Bot.* **1970**, 10, 303.

b) Ehrenberg, L.; Granath, F.; Tornqvist, M. *Environ. Health Perspect.* **1996**, 104 Suppl 3, 423.

²⁰⁸ Walles, S. A. S. *Toxicol. Lett.* **1980**, 5, 161.

²⁰⁹ Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Mutat. Res.* **1990**, 238, 193.

²¹⁰ Boerth, D. W.; Eder, E.; Rasul, G.; Morais, J. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, 4, 368.

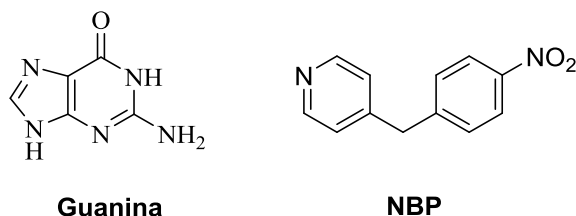


Figura 2.18. Estructuras de la guanina y NBP.

Como consecuencia de estos factores, la molécula NBP puede considerarse un buen modelo de la posición *N7* de la guanina sólo para reactivos pequeños y con gran afinidad por esta posición. Para los agentes alquilantes S_N2 de pequeño tamaño, se puede considerar también que la NBP es un buen modelo del ADN para establecer correlaciones entre reactividad y efectos biológicos. Puesto que la mayoría de los aductos entre estos agentes alquilantes y el ADN se forman en la posición *N7* de la guanina, su formación se considera evidencia del potencial genotóxico.^{168a}

Sin embargo, para agentes alquilantes S_N1 que reaccionan preferentemente con los oxígenos de las bases nitrogenadas, la NBP no es un buen modelo de reactividad. En estos caso sólo tiene sentido estudiar la reactividad con la NBP cuando paralelamente se produce la reacción de hidrólisis, dado que el valor de *s* estimado a partir de las constantes de velocidad obtenidas en las dos reacciones se puede correlacionar con la proporción de aductos O^6 -/*N7*-alquilguanina y, a su vez, con la mutagenia y carcinogenia, como se verá más adelante (2.6.1.2.2.1).

2.5.2.1.3. Aplicaciones del test de NBP

Las aplicaciones del test de NBP para la detección de agentes alquilantes han sido muy variadas y se pueden clasificarse en:

2.5.2.1.3.1 Aplicaciones no cinéticas

A parte de la detección cualitativa o cuantitativa de agentes alquilantes, las principales aplicaciones no cinéticas del test de NBP, son las dedicadas a la búsqueda de correlaciones entre la actividad química y la actividad biológica (mutagenia, carcinogenia, toxicidad...). En ese último caso los principales objetivos son:

- Determinar la influencia de la estructura y de los grupos funcionales en la eficacia biológica y como agente alquilante.
- Predecir mediante un ensayo simple las posibles consecuencias biológicas

asociadas a un determinado compuesto.

Para el establecimiento de correlaciones se consideran siempre aquellos efectos biológicos en los que el proceso químico involucrado en su aparición es, o puede ser, la reacción de alquilación. Como la NBP es un buen modelo de la reactividad del N7 de la guanina, hay que considerar las posibles consecuencias biológicas de la alquilación en esta posición.

- **Correlaciones reactividad química-actividad biológica**

Para estudiar este tipo de correlaciones se utiliza la medida de absorbancia del aducto a un tiempo fijo como respuesta cuantitativa de reactividad. Ese tiempo se encuentra, generalmente, dentro del intervalo en el que la variación absorbancia/tiempo se mantiene lineal.

- **Mutagenia-reactividad química (Ames-NBP)**

Para establecer correlaciones entre reactividad química y potencial mutágeno habitualmente se combinan las respuestas obtenidas con el test NBP y con el de Ames.^{188b,211} Debido al elevado grado de correlación entre las respuestas a ambos ensayos (para 126 compuestos se ha encontrado un 92 % de concordancia en los resultados para ambos test), se ha considerado a la molécula de NBP como modelo en la búsqueda de correlaciones cuantitativas y semicuantitativas.

Cabe destacar que la discordancia entre las respuestas a ambos ensayos se observa con frecuencia en casos en los que el agente mutágeno es un metabolito y no la especie inicial (y no se ha trabajado en presencia de un sistema de activación

²¹¹ a) Eder, E.; Neudecker, T.; Lutz, D.; Henschler, D. *Chem.-Biol. Interact.* **1982**, *38*, 303.

b) Turchi, G.; Bonatti, S.; Citti, L.; Gervasi, P. G.; Abbondandolo, A.; Presciuttini, S. *Mutat. Res.* **1981**, *83*, 419.

c) Sinsheimer, J. E.; Chakraborty, P. K.; Messerly, E. A.; Gaddamidi, V. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1989**, *224*, 171.

d) Hemminki, K.; Falck, K. *Toxicol. Lett.* **1979**, *4*, 103.

e) Rosman, L. B.; Beylin, V. G.; Gaddamidi, V.; Hooberman, B. H.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1986**, *171*, 63.

f) Eder, E.; Neudecker, T.; Lutz, D.; Henschler, D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1980**, *29*, 993.

e) Neudecker, T.; Lutz, D.; Eder, E.; Henschler, D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1980**, *29*, 2611.

g) Yano, K.; Isobe, M. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 5147.

h) Yano, K.; Katayama, H.; Takemoto, K. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 1027.

i) Rosman, L. B.; Gaddamidi, V.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1987**, *189*, 189.

j) Rosman, L. B.; Chakraborty, P. K.; Messerly, E. A.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1988**, *206*, 115.

metabólica), o con agentes alquilantes muy poco reactivos.^{193h,211bce,198b,204,212}

Se han podido establecer algunas correlaciones mutagenia-reactividad semicuantitativas y cuantitativas para series de agentes alquilantes, formadas generalmente por compuestos estructural o funcionalmente relacionados.^{188b,211abdfg,}

^{212c,213} No obstante, en algunas ocasiones, entre series de compuestos similares no se han observado correlaciones.^{165a,211dkij,194c,214} Este hecho se ha atribuido a admitir un mismo coeficiente de absorción molar para todos los compuestos. Entre mutagenia y reactividad de compuestos de diferente naturaleza no se obtienen correlaciones satisfactorias.

- **Carcinogenia/genotoxicidad-reactividad química**

La respuesta en el test de NBP suele utilizarse como parámetro indicador de la capacidad carcinógena de un compuesto. Se han encontrado buenas correlaciones cualitativas, particularmente cuando se utiliza un sistema de activación metabólica.²⁰⁴ También se ha comprobado que compuestos reactivos en ese ensayo muestran capacidad genotóxica, dando lugar a: aberraciones cromosómicas,²¹⁵ ruptura de las hebras del ADN,^{215a,216} síntesis incontrolada de ADN (ensayo UDS)²¹⁷ e intercambio de cromátidas hermanas (SCE).^{215bc,218} Incluso se han observado correlaciones cuantitativas entre algunos de estos parámetros y la reactividad con la NBP.^{216,217}

- **Reactividad química-capacidad antitumoral**

Algunos agentes alquilantes se utilizan en el tratamiento del cáncer por su capacidad antitumoral, que discurre a través de mecanismos análogos a los inductores

²¹² a) Grover, P. L.; Sims, P. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1970**, *19*, 2251.

b) Ashby, J.; Hilton, J.; Dearman, R. J.; Callander, R. D.; Kimber, I. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *101*, 62.

c) Zoetemelk, C. E. M.; Mohn, G. R.; Vandergen, A.; Breimer, D. D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1987**, *36*, 1829.

d) Schrader, T. J.; Langlois, I.; Soper, K.; Cherry, W. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, *22*, 425.

e) Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *34*, 323.

²¹³ a) Turchi, G.; Bauer, C.; Bronzetti, G.; Citti, L.; Corsi, C.; Fassina, G. F.; Gervasi, P. G.; Lippi, A.; Neri, R.; Abbondandolo, A.; Berti, G.; Mastrorilli, E. *Mutat. Res.* **1983**, *117*, 213.

b) Eya, S. K.; Talcott, R. E. *Environ. Mutagen.* **1980**, *2*, 395.

²¹⁴ Hemminki, K.; Paasivirta, J.; Kurkirinne, T.; Virkki, L. *Chem.-Biol. Interact.* **1980**, *30*, 259.

²¹⁵ a) Ehrenberg, L.; Osterman-Golkar, S.; Singh, D.; Lundqvist, U. *Radiat. Bot.* **1974**, *14*, 185.

b) Agurell, E.; Cederberg, H.; Ehrenberg, L.; Lindahlkiessling, K.; Rannug, U.; Tornqvist, M. *Mutat. Res.* **1991**, *250*, 229.

c) Norppa, H.; Vainio, H. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1983**, *116*, 379.

d) Das, L.; Das, S. K.; Chu, E. H. Y.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1993**, *299*, 19.

²¹⁶ Giri, A. K.; Messerly, E. A.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1989**, *224*, 253.

²¹⁷ Schiffmann, D.; Eder, E.; Neudecker, T.; Henschler, D. *Cancer Lett.* **1983**, *20*, 263.

²¹⁸ Nishi, Y.; Hasegawa, M. M.; Taketomi, M.; Ohkawa, Y.; Inui, N. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 3270.

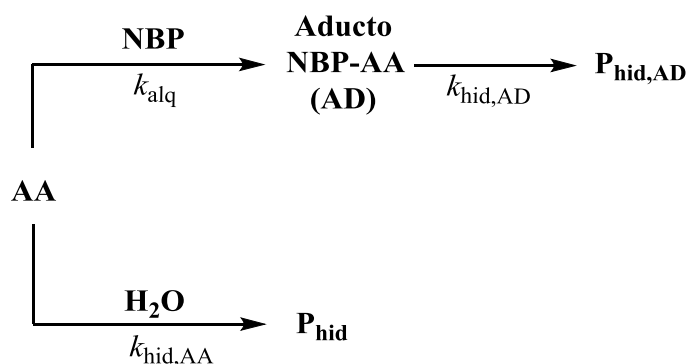
de mutaciones malignas. Por eso, al igual que la capacidad alquilante se ha considerado parámetro para predecir la capacidad mutágena, puede serlo también para predecir la antitumoral.²¹⁹

2.5.2.1.3.2 Aplicaciones cinéticas

Las aplicaciones cinéticas del test de NBP tienen como principales objetivos:

- Elucidación de los mecanismos por los que los agentes alquilantes ejercen su actividad biológica.
- Establecimiento de correlaciones cuantitativas entre reactividad química y efectos biológicos.

El mecanismo general de alquilación de NBP por un agente alquilante en medio acuoso o acuoorgánico se esquematiza en el Esquema 2.1: la reacción de hidrólisis del agente alquilante compite con la reacción de alquilación de NBP que da lugar a la formación de un aducto inestable (AD) que, a su vez, se descompone. Aunque pueden intervenir otras reacciones, este esquema resume las reacciones que tienen lugar más frecuentemente.



El seguimiento cinético de la reacción se hace espectrofotométricamente; por ello se puede manejar la expresión integrada de velocidad en términos de la absorbancia A_{AD} del aducto formado al cabo de un tiempo t , (ecuación 2.14). En esta ecuación ϵ_{AD} es el coeficiente de absorción molar del aducto coloreado, l el paso óptico

²¹⁹ a) Miyahara, M.; Miyahara, M.; Kamiya, S.; Maekawa, A. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, 29, 2366.

b) Schmid, F. A.; Otter, G. M.; Mehta, B. M. *Cancer Res.* **1985**, 45, 40.

c) Shyam, K.; Cosby, L. A.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1323.

d) Shyam, K.; Penketh, P. G.; Divo, A. A.; Loomis, R. H.; Rose, W. C.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 3496.

e) Jesson, M. I.; Johnston, J. B.; Robotham, E.; Begleiter, A. *Cancer Res.* **1989**, 49, 7031.

de la cubeta, y $[NBP]_0$ y $[AA]_0$ las concentraciones iniciales de los reactivos. Las constantes k_{alq} y $k_{hid,AA}$ son las constantes de velocidad de orden dos de las reacciones de alquilación de la NBP y de hidrólisis del agente alquilante, respectivamente, y $k_{hid,AD}$ la pseudoconstante de velocidad de la reacción de descomposición del aducto.

$$A_{AD} = \frac{\epsilon_{AD} / [AA]_0 k_{alq} [NBP]_0}{k_{hid,AD} - (k_{alq} [NBP]_0 + k_{hid,AA} [H_2O]_0)} \left(e^{-(k_{alq} [NBP]_0 + k_{hid,AA} [H_2O]_0)t} - e^{-k_{hid,AD}t} \right) \quad 2.14$$

En función de los valores de la velocidad de los tres procesos implicados, el proceso global se puede ver desde tres perspectivas que implican algunas aproximaciones: i) admitir que sólo tiene lugar la reacción de alquilación ($k_{hid,AA} \approx k_{hid,AD} \approx 0$); ii) admitir que el aducto formado es estable y que, por tanto, sólo tienen lugar las reacciones de alquilación de NBP e hidrólisis del agente alquilante ($k_{hid,AD} \approx 0$); iii) considerar que transcurren las tres reacciones. Naturalmente, es esencial investigar cuál es la aproximación adecuada en cada caso. Para ello es necesario realizar un estudio cinético exhaustivo de la reacción.

En la bibliografía se encuentran muchos casos en los que se ha prescindido de reacciones que debieran haberse tenido en cuenta. Frecuentemente ocurre con la reacción paralela de hidrólisis y, de forma generalizada, con la reacción de descomposición del aducto.

Con frecuencia, para reducir el tiempo de experimentación, se investiga exclusivamente la reacción de alquilación por el método de velocidades iniciales (IRM).²²⁰ Así, se sigue menos del 4 % de reacción y la variación de la absorbancia viene dada por la siguiente expresión:

$$v_0 = -\frac{1}{\epsilon_{ap}} \left[\frac{dA_{AD}}{dt} \right] = k_{alq} [AA]_0 [NBP]_0 \quad 2.15$$

Mediante los órdenes de reacción se puede comprobar si el mecanismo por el que transcurre la reacción de alquilación es S_N2 . Como el método de IRM permite estudiar exclusivamente la reacción de alquilación, sólo es aplicable en busca de correlaciones cuando sea ésta la única reacción que tiene lugar. En caso de existir otras reacciones, es necesario completar el estudio con la investigación de las mismas.

²²⁰ Casado, J.; Lopez-Quintela, M. A.; Lorenzo-Barral, F. M. *J. Chem. Educ.* **1986**, 63, 450.

Independientemente del uso de unas u otras aproximaciones, para poder obtener las constantes de velocidad se requiere conocer el coeficiente de absorción molar de los aductos AA-NBP. A ese respecto, con frecuencia se maneja una nueva aproximación: admitir que todos los aductos formados tienen la misma absorptividad. Ello no introduce errores significativos cuando los agentes alquilantes poseen grupos funcionales y estructuras muy similares, pero es fuente de error apreciable cuando no es así.

En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos publicados en los que el test de NBP se ha aplicado con éxito para elucidar mecanismos de reacción de agentes alquilantes muy dispares.^{202bc,209,221}

2.5.2.1.3.2.1 Parámetros cinéticos para caracterizar la reactividad

A continuación se resumen los parámetros cinéticos utilizados para caracterizar la reactividad con el fin de establecer correlaciones con la actividad biológica, dependiendo de la aproximación adecuada en cada caso:

♦ **Alquilación exclusivamente:**

El parámetro cinético más utilizado cuando sólo existen reacciones de alquilación es la *constante de velocidad de alquilación*, k_{alq} . Su valor se obtiene bien con el seguimiento de la reacción por velocidades iniciales (ecuación 2.15) o bien siguiendo un grado elevado de avance de la reacción, mediante ajuste de los datos de absorbancia/tiempo a la ecuación 2.16:

$$A_{AD} = \epsilon_{AD} I [AA]_0 \left(1 - e^{-k_{alq} [NBP]_0 t} \right) \quad 2.16$$

- *Correlación reactividad química-actividad biológica*

En este caso, el potencial alquilante de la especie bioactiva se puede

²²¹ a) Parodi, S.; Picca, M.; Bolognesi, C.; Cavanna, M.; Carlo, P.; Finollo, R.; Brambilla, G. *Pharmacol. Res. Commun.* **1977**, *9*, 621.

b) Peterson, L. A.; Harris, T. M.; Guengerich, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3284.

c) García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177.

d) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964.

e) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Caballero, M. C.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11824.

f) Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1320.

correlacionar directamente con la constante de velocidad de alquilación: a mayor valor de esta, menor será el tiempo del que dispone el organismo para excretar o desactivar el agente alquilante y mayores los efectos biológicos. Así, se han obtenido buenas correlaciones con muchos compuestos (que no sufren hidrólisis y forman aductos estables) entre parámetros cinéticos (constante de velocidad de alquilación) y efectos biológicos (capacidad para producir mutaciones puntuales,²²² recombinación,^{213a} toxicidad (LC₅₀),²²³ carcinogénesis,²²⁴ mutagénesis^{211abd,217,225} y síntesis incontrolada de ADN²¹⁷).^{165b,188b,194c,211a,226} En algunos casos se ha observado que otros parámetros, como el carácter hidrófobo de los compuestos bioactivos condicionan los efectos biológicos inducidos.²²³

Cuando se utiliza el método de velocidades iniciales para estudiar la reacción de alquilación, a veces se comete el error de admitir, sin comprobarlo, que el coeficiente de absorción molar es el mismo que el de otros aductos. Esta asunción puede conducir a resultados erróneos, aunque en algunos casos se han obtenido buenas correlaciones (probablemente cuando los aductos de los compuestos bioactivos con la NBP tengan coeficientes de absorción molar muy semejantes).^{211bd}

◆ **Alquilación e hidrólisis competitiva:**

Cuando alquilación de NBP e hidrólisis del agente alquilante compiten, es necesario obtener las constantes de velocidad para ambas reacciones. Para ello se ajustan los datos absorbancia/tiempo a la ecuación 2.17.

$$A_{AD} = \frac{\varepsilon_{AD} I [AA]_0 k_{alq} [NBP]_0}{k_{alq} [NBP]_0 + k_{hid,AA} [H_2O]_0} \left(1 - e^{-(k_{alq} [NBP]_0 + k_{hid,AA} [H_2O]_0) t} \right) \quad 2.17$$

Los parámetros utilizados para el establecimiento de correlaciones son:

²²² a) Planche, G.; Croisy, A.; Malaveille, C.; Tomatis, L.; Bartsch, H. *Chem.-Biol. Interact.* **1979**, *25*, 157.

b) Ashby, J.; Callander, R. D.; Gilman, D. *Mutat. Res. Lett.* **1984**, *140*, 71.

c) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Solution Chem.* **2008**, *37*, 459.

d) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244.

²²³ Deneer, J. W.; Sinnige, T. L.; Seinen, W.; Hermens, J. L. M. *Aquat. Toxicol.* **1988**, *13*, 195.

²²⁴ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *22*, 386.

²²⁵ Schmiedel, G.; Filser, J. G.; Bolt, H. M. *Toxicol. Lett.* **1983**, *19*, 293.

²²⁶ a) Karchesy, J. J.; Arbogast, B.; Deinzer, M. L. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3867.

b) Giraud, I.; Rapp, M.; Maurizis, J.-C.; Madelmont, J.-C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2116.

• La constante de sustrato de Swain-Scott, s , definida anteriormente, (pág. 61) suministra información sobre la selectividad de un mismo agente alquilante con diferentes nucleófilos (ecuación 2.13).¹⁷² Valores de $s < 0,7$ son propios de mecanismos S_N1 y $s > 0,7$ de mecanismos S_N2 . Se han obtenido buenas correlaciones lineales entre los valores de s de agentes alquilantes, tanto S_N1 como S_N2 , y sus capacidades carcinógenas y clastogénicas.^{185,227}

Además, el parámetro s ha sido relacionado linealmente con la proporción de aductos $N7$ -/ O^6 -alquilguanina formados por agentes alquilantes monofuncionales en la reacción con ADN, mediante la siguiente expresión:^{165a,173c}

$$\log \left[\frac{[N7\text{-alquilG}]}{[O^6\text{-alquilG}]} \right] = 3,513s - 0,6109 \quad 2.18$$

Valores de s elevados indican la preferencia del agente alquilante por la alquilación del $N7$ de la guanina.^{165a,205,206}

• La selectividad hacia la NBP, S_{NBP} , relación entre las constantes de orden dos de velocidad de alquilación e hidrólisis (ecuación 2.21), ilustra sobre el mecanismo por el que transcurre la alquilación. S_{NBP} también puede definirse como cociente entre las pseudoconstantes de velocidad de primer orden de alquilación e hidrólisis, $k'_{alq} = k_{alq} \cdot [NBP]$ y $k'_{hid,AA} = k_{hid,AA} \cdot [H_2O]$, respectivamente, (ecuación 2.19). Valores altos de S_{NBP} se asocian a mecanismos S_N2 , valores intermedios indican competencia de la reacción de hidrólisis con la de alquilación en un elevado grado, y valores muy bajos de S_{NBP} sugieren un mecanismo S_N1 .²²⁸

$$S_{NBP} = \frac{k_{alq}}{k_{hid,AA}} = \frac{k'_{alq} [H_2O]}{k'_{hid,AA} [NBP]} \quad 2.19$$

• La capacidad alquilante, f , se define como fracción del agente alquilante inicial que forma aducto (ecuación 2.22), de modo que sus valores se encuentran entre 0 (no hay alquilación) y 1 (todo el agente alquilante forma aducto).

²²⁷ Vogel, E. W.; Barbin, A.; Nivard, M. J. M.; Bartsch, H. *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 2211.

²²⁸ a) Kawazoe, Y.; Tamura, N.; Yoshimura, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 2077.

b) Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32*, 1326.

$$f = \frac{[AD]}{[AA]_0} = \frac{k'_{alq}}{k'_{alq} + k'_{hid,AA}} \quad 2.22$$

- *Correlaciones reactividad química-actividad biológica*

Numerosos agentes alquilantes dan lugar simultáneamente a alquilación de NBP e hidrólisis del propio agente alquilante, con velocidades de reacción del mismo orden de magnitud.

S_{NBP} , utilizada para predecir los efectos biológicos de mostazas de selenio en la búsqueda de medicamentos,²²⁹ presenta una buena correlación con la carcinogenia y mutagenia de lactonas^{212e,230} y con la capacidad tumoral de *N*-nitrosoureas en animales de ensayo.²³¹ En cuanto a la constante de sustrato, a menor s , mayor afinidad del agente alquilante por los átomos de oxígeno de las bases, mayor proporción $O^6/N7$ de aductos alquilguanina y mayor capacidad tumoral. La constante de sustrato, s , se ha correlacionado, con buenos resultados, con la capacidad carcinógena ($1/TD_{50}$), para agentes alquilantes monofuncionales^{205,231} y bifuncionales.¹⁸⁵

◆ **Alquilación, hidrólisis y descomposición del aducto:**

Cuando el aducto formado es inestable, la selectividad o la capacidad alquilante no reflejan plenamente todas las posibilidades, siendo conveniente utilizar un nuevo parámetro, la vida del aducto, AL, definida como área bajo la curva del perfil de reacción por unidad de agente alquilante. Aporta información sobre el efecto acumulativo del agente alquilante (ecuaciones 2.23 y 2.24).

$$AL = \frac{\int_0^{\infty} [AD] dt}{[AA]_0} = \int_0^{\infty} \frac{k'_{alq}}{k_{hid,AD} - (k'_{alq} + k'_{hid,AA})} \left(e^{-(k'_{alq} + k'_{hid,AA})t} - e^{-k_{hid,AD}t} \right) dt \quad 2.23$$

$$AL = \frac{k'_{alq}}{(k'_{alq} + k'_{hid,AA}) k_{hid,AD}} = \frac{f}{k_{hid,AD}} \quad 2.24$$

²²⁹ Kagn, S. I.; Spears, C. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 597.

²³⁰ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. D.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.

²³¹ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.

Cuanto mayor sea AL, mayor la estabilidad del aducto y/o su concentración y, por tanto, mayor probabilidad de que el agente alquilante dé lugar a un efecto biológico.

- Correlaciones reactividad química-actividad biológica

Se ha conseguido establecer una buena correlación semicuantitativa entre la mutagenia y la capacidad alquilante, f , y la vida del aducto, AL, del ácido nítrico,^{221ef} que presenta una baja capacidad mutágena acorde con los pequeños valores de f y AL. La corta vida del aducto formado por la α -angelicalactona, explica que no se produzcan daños permanentes en el ADN, a pesar de su capacidad alquilante.²³² La ausencia de efectos biológicos mostrados por la dicetena, a pesar del elevado valor de f ($f = 1$), es acorde con el bajo valor de AL. Es decir, es un agente alquilante potente con una efectividad tan baja que no produce efecto.^{221d}

2.5.2.1.4. Factores que condicionan la correlación reactividad química-actividad biológica

A veces no se observa correlación entre reactividad química y efectos biológicos de los agentes alquilantes; ello puede deberse a distintos factores:

◆ ***Los estudios de reactividad pueden ser inadecuados:***

En algunos estudios sólo se considera la reacción de alquilación y no todas las reacciones que pueden tener lugar en el medio de reacción.^{207a} Esto hace que se sobreestime la capacidad alquilante del compuesto.

Otros estudios no tienen en cuenta la posible variación entre los coeficientes de absorción molar de distintos aductos y consideran que son iguales para todos ellos.

En ciertas ocasiones, se intenta modelar la reactividad con el ADN de agentes tanto S_N2 como S_N1 utilizando la reactividad con la NBP. Para los agentes alquilantes S_N1 no sería el modelo adecuado de estudio, en términos de constante de velocidad y, por tanto, los resultados de reactividad no explican la mutagenia observada.

²³² Fernández-Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39*, 591.

♦ **Los estudios biológicos pueden ser inadecuados:**

A veces, para establecer correlaciones en compuestos volátiles, se emplean resultados de mutagenia de estudios en placa, en los que habría sido más adecuado trabajar con las muestras en disolución.

♦ **El factor fundamental para producir efectos biológicos del compuesto no es la capacidad alquilante:**

Si existen otros procesos o propiedades del compuesto que determinan en mayor grado la capacidad mutágena (aromaticidad, lipofilia, carga, volumen molecular, impedimento estérico...), los resultados del test de NBP no se correlacionarán con los efectos biológicos.^{207a,205,223}

3. Método experimental

3.1. Objetivos

En el presente trabajo se han investigado cinéticamente las reacciones de nitrosación de los sulfoaminoácidos taurina y homotaurina y la capacidad alquilante de sus productos de reacción.

3.2. Estudio cinético de la nitrosación de taurina y homotaurina

3.2.1. Estudio espectrofotométrico

Para realizar el estudio cinético de las reacciones de nitrosación se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis de las especies participantes en el proceso.

Los espectros de la taurina (Tau) (Figura 3.1) y homotaurina (HT) (Figura 3.2) en el intervalo $\lambda = 200-700$ nm no mostraron ninguna banda de absorción que facilitase su seguimiento a lo largo de la reacción de nitrosación.

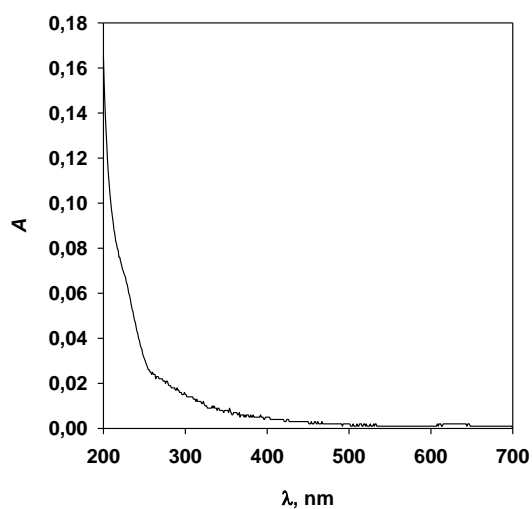


Figura 3.1. Espectro de absorción de la taurina.
[Tau] = 0,30 M.

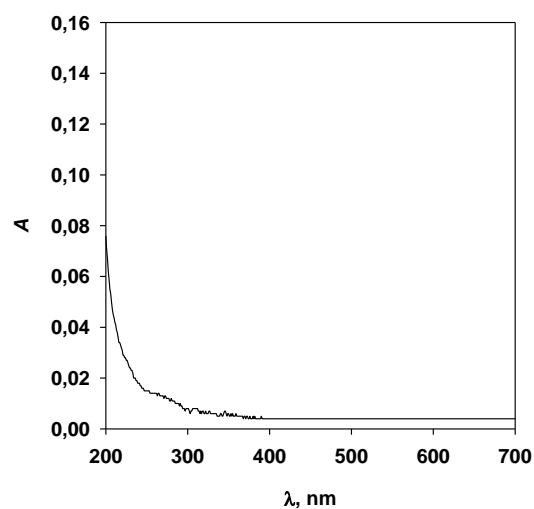


Figura 3.2. Espectro de absorción de la homotaurina. [HT] = 0,30 M.

El análisis espectrofotométrico de una disolución acuosa de nitrito sódico en medio básico ($\text{pH} > 7$) muestra dos bandas (Figura 3.3), una muy intensa en torno a 220 nm, que se atribuye a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y otra en torno a 354 nm atribuida a una transición $n \rightarrow \pi^*$.²³³ A medida que disminuye el pH desaparece esta última banda y comienza a aparecer la banda característica del HNO_2 , con máximos centrados en 347, 358, 371 y 386 nm. Este resultado sugiere que a valores de pH intermedios y

²³³ Vogel, A.I. *Textbook of Practical Organic Chemistry*, Longman, London, 1948, 426.

bajos, las disoluciones acuosas de nitrito son una mezcla de las especies NO_2^- y HNO_2 en equilibrio.

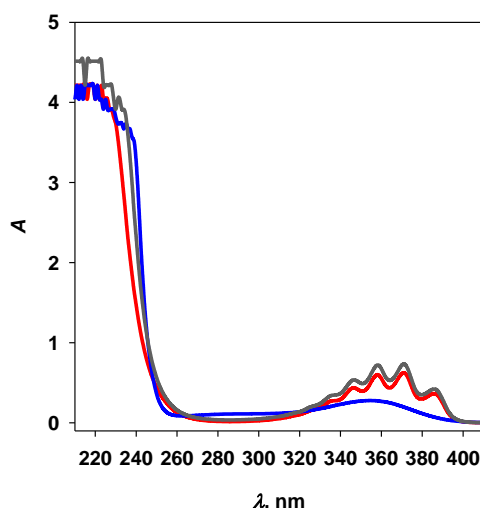


Figura 3.3. Espectro de absorción del sistema $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$, $[\text{NaNO}_2]_0 = 0,012 \text{ M}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$: **pH ≤ 1 ;** **pH = 2,50;** **pH > 7 .**

La Figura 3.4 muestra la evolución del espectro durante la reacción de nitrosación de taurina y la Figura 3.5 durante la nitrosación de homotaurina. A lo largo del tiempo de reacción no se observó aparición de nuevos picos, potencialmente atribuibles a algún producto de reacción.

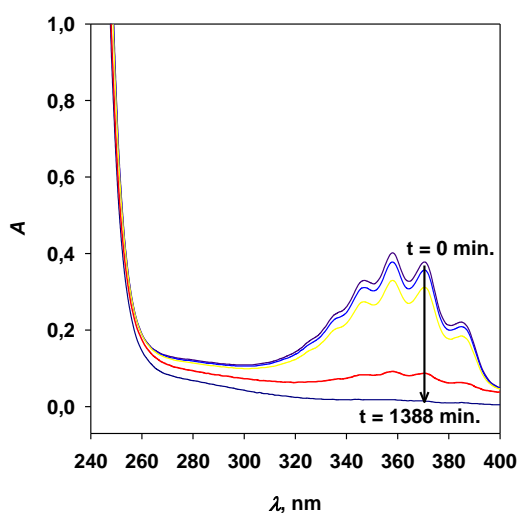


Figura 3.4. Espectrogramas que muestran la evolución del sistema nitroso/nitrito a lo largo de la nitrosación de taurina. $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 3,00$.

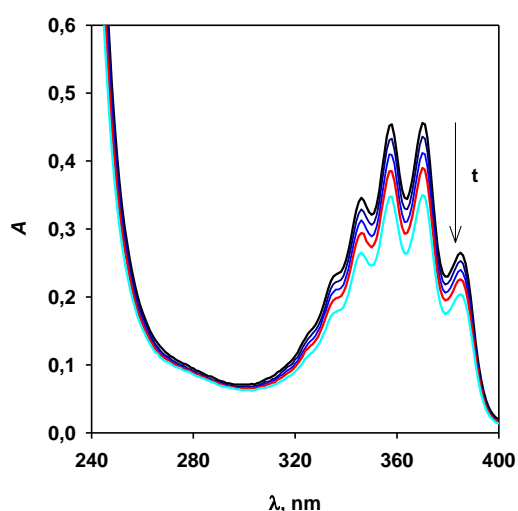


Figura 3.5. Espectrogramas que muestran la evolución del sistema nitroso/nitrito a lo largo de la nitrosación de homotaurina. $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $[\text{HT}]_0 = 0,30 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 3,20$.

La longitud de onda elegida para el seguimiento cinético fue 371 nm , correspondiente a uno de los máximos de absorción de este sistema.

3.2.1.1. Coeficiente de absorción molar del sistema ácido nitroso/nitrito

Para relacionar en cada caso las medidas de absorbancia con la concentración, se determinó el valor del coeficiente de absorción molar del sistema ácido nitroso/nitrito. Como estas especies no tienen el mismo coeficiente de absorción molar, ha sido necesario manejar un nuevo parámetro, el coeficiente de absorción molar aparente, ϵ_{ap} , que relaciona la absorbancia de las disoluciones con su concentración total y con los coeficientes de absorción del ácido nitroso y del nitrito.

Como la concentración total de nitrito añadida inicialmente es suma de las concentraciones de la especie básica y del ácido nitroso (ecuación 3.1), la absorbancia total del sistema puede expresarse como suma de las absorbancias de cada especie.

$$[\text{nitrito}]_o = [\text{NO}_2^-] + [\text{HNO}_2] \quad 3.1$$

$$A_{\text{Nit}} = A_{\text{NO}_2^-} + A_{\text{HNO}_2} = l\epsilon_{\text{NO}_2^-} [\text{NO}_2^-] + l\epsilon_{\text{HNO}_2} [\text{HNO}_2] \quad 3.2$$

Siendo: A_{Nit} la absorbancia total del sistema ácido nitroso/ nitrito, $A_{\text{NO}_2^-}$ la absorbancia de la especie básica (nitrito), A_{HNO_2} la absorbancia del ácido nitroso, l la longitud de paso óptico (1 cm), $\epsilon_{\text{NO}_2^-}$ el coeficiente de absorción molar de la especie básica y ϵ_{HNO_2} el coeficiente de absorción molar del ácido nitroso.

Al tener en cuenta la expresión de la constante de equilibrio ácido/base del nitrito:

$$K_a = \frac{[\text{NO}_2^-][\text{H}^+]}{[\text{HNO}_2]} \quad 3.3$$

se llega fácilmente a la siguiente expresión:

$$A_{\text{Nit}} = l \frac{\epsilon_{\text{NO}_2^-} K_a + \epsilon_{\text{HNO}_2} [\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} [\text{nitrito}]_o = \epsilon_{ap} [\text{nitrito}]_o \quad 3.4$$

$$\epsilon_{ap} = \frac{\epsilon_{NO_2} K_a + \epsilon_{HNO_2} [H^+]}{[H^+] + K_a} \quad 3.5$$

Conocidos los valores de los coeficientes de absorción molar del ácido nitroso y del nitrito, esta expresión permite calcular fácilmente el ϵ_{ap} de la mezcla obtenida al disolver nitrito en agua a distintos valores de pH.

3.2.2. Método cinético

Para el seguimiento cinético de las reacciones de nitrosación de taurina y homotaurina se ha utilizado el método de velocidades iniciales. Al seguir porcentajes de reacción cortos, las condiciones iniciales se mantienen constantes ($[T]_0$, $[HT]_0$, $[nitrito]_0$ y $[H^+]_0$), de modo que el pH no varía, no siendo necesario utilizar disolución reguladora que podría dar lugar a reacciones concurrentes.

La ecuación experimental de la velocidad inicial de las reacciones de nitrosación a pH constante es:

$$v_o = -\frac{d}{dt}([nitrito]_0) = k_{exp} [S]_0^a [nitrito]_0^b \quad 3.6$$

donde $[S]_0$ es la concentración inicial de sustrato (taurina u homotaurina); a y b son los órdenes de reacción con respecto a las concentraciones iniciales de sustrato y nitrito, respectivamente.

Como la especie a seguir espectrofotométricamente es el sistema ácido nitroso/nitrito, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer puede escribirse:

$$A_o = \epsilon_{ap} [nitrito]_0 \quad 3.7$$

donde A_o es la absorbancia inicial total.

Habida cuenta de las ecuaciones 3.6 y 3.7 se llega fácilmente a la siguiente expresión:

$$v_o = -\frac{1}{\epsilon_{ap}} \left[\frac{dA_o}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} \quad 3.8$$

En estas condiciones, las velocidades iniciales de nitrosación se pueden calcular con las tangentes a las curvas absorbancia/tiempo, a tiempo cero. Si se siguen porcentajes de reacción inferiores al 4%,²³⁴ puede manejarse la propia curva para calcular la velocidad inicial.

3.2.3. Método de trabajo

El método de trabajo utilizado para el seguimiento cinético de la reacción de nitrosación de taurina consistió en la adición de 0,1 ml de la disolución de nitrito sódico sobre 3 ml de disolución de sustrato contenidos en una cubeta termostataada a la temperatura deseada.

A la disolución de sustrato se le añadía perclorato sódico para ajustar la fuerza iónica a 0,50 M y ácido perclórico para ajustar el pH. Para preparar todas las disoluciones se utilizaron disoluciones madre (termostatadas a la temperatura de trabajo) de taurina, homotaurina, perclorato sódico y ácido perclórico en agua.

La disolución de nitrito sódico también contenía ácido perclórico para ajustar el pH, el mismo que el de la disolución de taurina.

Debido a la descomposición del ácido nitroso, las disoluciones se preparaban inmediatamente antes de usarlas, a partir de una disolución de nitrito sódico en agua y otra de ácido perclórico.

Tras la adición del nitrito se agitaba la cubeta y se procedía a medir la absorbancia de la mezcla de reacción a lo largo del tiempo. Las medidas se hicieron por triplicado, de modo que los resultados finales son el valor medio de los tres valores medidos. En todos los casos se hacían medidas de absorbancia hasta que la disminución de ésta era aproximadamente del 2 %.

Al representar los valores de la absorbancia del sistema ácido nitroso/nitrito frente a t para cada disolución, se obtuvieron rectas como la que muestra la Figura 3.6, cuya pendiente es dA_o/dt .

$$m = \frac{dA_o}{dt} = -v_o \epsilon_{ap} \quad 3.9$$

²³⁴ Casado, J.; López Quintela, M. A.; Lorenzo Barral, F. M. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 450.

Como el nitrito se descompone en pequeña proporción desde su adición en medio ácido hasta que se hace la primera medida, para calcular la concentración inicial de nitrito se tuvo en cuenta la ordenada en el origen.

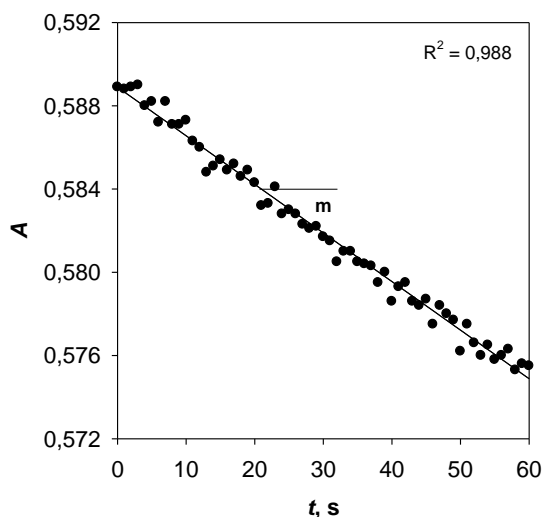


Figura 3.6. Variación de la absorbancia del sistema ácido nitroso/nitrito a lo largo del tiempo en la reacción de nitrosación de taurina; $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 2,97$, $[\text{Tau}]_0 = 0,30\text{ M}$, $I = 0,50\text{ M}$.

3.2.3.1. Influencia del pH

A $\text{pH} \leq 3$, al investigar la influencia del pH sobre la constante de nitrosación de taurina y homotaurina, la descomposición del ácido nitroso durante el tiempo de reacción no es despreciable (Figura 3.7).

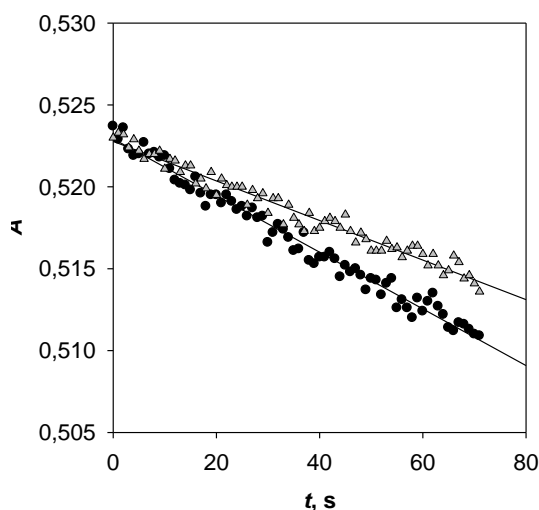


Figura 3.7. Comparación de la variación de absorbancia del sistema $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ con el tiempo entre las reacciones de: (●) nitrosación de taurina ($[\text{Tau}]_0 = 0,30\text{ M}$, $[\text{nitrito}]_0 = 0,010\text{ M}$) y (▲) descomposición del HNO_2 a lo largo del tiempo. $[\text{nitrito}]_0 = 0,010\text{ M}$. Ambas a $\text{pH} = 1,90$, $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $I = 0,50\text{ M}$.

Se tiene así que, para valores de pH bajos, la velocidad inicial de desaparición del nitrito ($v_{0,T}$) es suma de la velocidad inicial de nitrosación ($v_{0,N}$) y de la velocidad inicial de descomposición del nitrito ($v_{0,D}$).

$$V_{o,T} = V_{o,N} + V_{o,D} \quad 3.10$$

Para conocer estas dos velocidades y evaluar la influencia del pH en la reacción de nitrosación de los sustratos investigados se han puesto a punto dos métodos diferentes, uno para cada sustrato.

Eliminación de la interferencia de la descomposición del ácido nitroso I

En este caso se ha tenido en cuenta que, de las dos reacciones causantes de la desaparición del ácido nitroso, sólo una de ellas se ve influida por la presencia de sustrato nitrosable. Así pues, si sustituimos la ecuación 3.6 en la 3.10, se obtiene:

$$V_{o,T} = k_{\text{exp}} [\text{nitrito}]_0^b [S]_0^a + V_{o,D} \quad 3.11$$

Por otro lado, como las reacciones se siguieron hasta un máximo del 2%, la concentración de nitrito total, se puede considerar constante durante el tiempo de seguimiento. Si la concentración inicial de nitrito es siempre la misma, el producto $k_{\text{exp}}[\text{nitrito}]_0^b$ (k'_{exp}) puede considerarse constante.

$$V_{o,T} = k'_{\text{exp}} [S]_0^a + V_{o,D} \quad 3.12$$

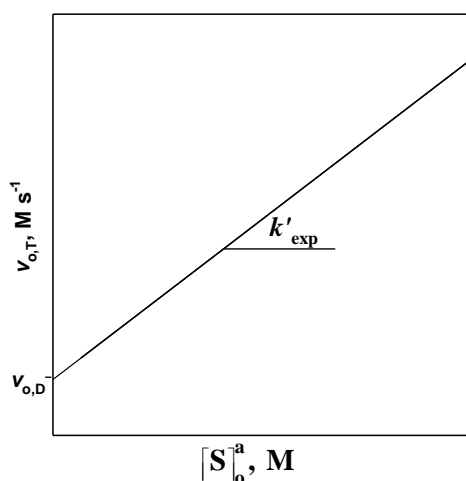


Figura 3.8. Variación de la velocidad de reacción con la concentración inicial de taurina.

Si se llevan a cabo experimentos en los que se varía la concentración inicial de sustrato para cada pH, al representar la velocidad inicial ($V_{o,T}$) obtenida frente a la

concentración de sustrato (Figura 3.8), se obtienen rectas cuya pendiente es la constante de velocidad experimental de nitrosación (k'_{exp}).

La ordenada en el origen engloba otros factores que modifican la concentración de nitrito, asociados a procesos en los que no interviene el sustrato, en este caso la velocidad inicial descomposición del ácido nitroso.

Conocidos $v_{o,T}$ y $v_{o,D}$ la diferencia nos da el valor de $v_{o,N}$.

Eliminación de la interferencia de la descomposición del ácido nitroso II

Otra alternativa consiste en realizar únicamente dos experimentos para cada valor de pH.

El primero se lleva a cabo en ausencia del sustrato nitrosable y, por tanto, la velocidad de desaparición del ácido nitroso coincide con su descomposición. La ecuación 3.9 permite escribir:

$$m_D = \frac{dA_D}{dt} = -v_{o,D} \epsilon_{ap} \quad 3.13$$

Así, la pendiente de la recta obtenida, m_D , permite conocer la velocidad inicial de descomposición del ácido nitroso, $v_{o,D}$ (Figura 3.9).

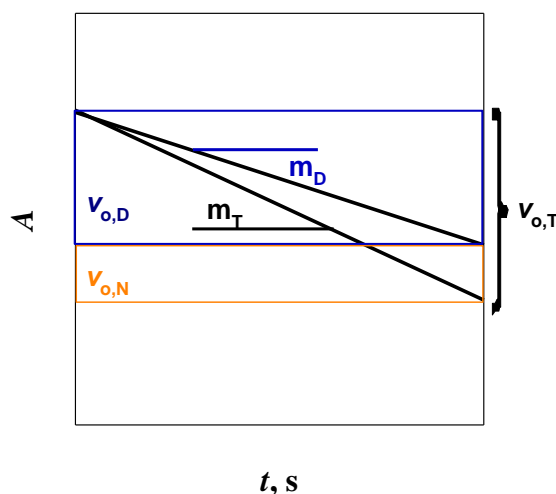


Figura 3.9. Variación de la absorbancia del nitrito a lo largo del tiempo: con sustrato nitrosable ($v_{o,T}$) y sin él ($v_{o,D}$).

El segundo experimento se efectúa como el primero, pero añadiendo una cantidad conocida de sustrato. En este caso la velocidad obtenida es la suma de las velocidades de nitrosación y descomposición, es decir, $v_{o,T}$ (Figura 3.9). La ecuación que se obtiene para este segundo experimento es:

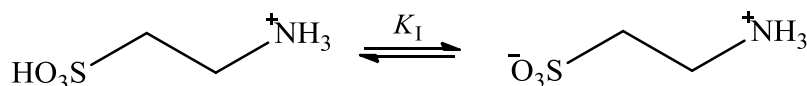
$$m_T = \frac{dA_T}{dt} = -v_{o,T} l \epsilon_{ap} \quad 3.14$$

La diferencia $v_{o,T} - v_{o,D}$ es la velocidad inicial de nitrosación del sustrato:

$$v_{o,N} = v_{o,T} - v_{o,D} = -\left(\frac{m_T}{l \epsilon_{ap}} - \frac{m_D}{l \epsilon_{ap}}\right) = -\left(\frac{m_T - m_D}{l \epsilon_{ap}}\right) \quad 3.15$$

3.2.4. Constante de acidez del grupo sulfónico

Existe cierta contradicción entre los valores bibliográficos de la constante de acidez del grupo sulfónico de la taurina.



Numerosas trabajos manejan el valor $pK_1 = 1,5$,²³⁵ aunque hay estudios que obtienen valores inferiores, como 0,03,²³⁶ 0,008,²³⁷ -0,33²³⁸ y -1,05.²³⁹ Un estudio computacional propone el valor -1,8.²⁴⁰

Valores de pK_a de compuestos que guardan relación estructural con la taurina (Figura 3.10) conducen a pensar que el grupo sulfónico de la taurina es un ácido fuerte.

El ciclo representado en la Figura 3.10 y las estructuras del ácido acético y la taurina permiten estimar el valor del pK_1 de ésta: -3,2 (4,8 - 6,8 - 1,2 = -3,2).

²³⁵ a) CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90th ed.; CRC Press: Boca Raton, 2010.

b) Albert, A. *Biochem J.* **1960**, *76*, 621.

²³⁶ Andrews, S.; Schmidt, C. L. A. *J. Biol. Chem.* **1927**, *73*, 631

²³⁷ Carr, W.; Shutt, W. J. *Trans. Faraday Soc.* **1939**, *36*, 579.

²³⁸ King, E. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 2204.

²³⁹ Irving, C. S.; Hammer, B. E.; Danyhk, S. S.; Klein, P. D. *J. Inorg. Biochem.* **1980**, *13*, 137.

²⁴⁰ Madura, J. D.; Lombardini, J. B.; Briggs, J. M.; Minor, D. L.; Wierzbicki, A. *Amino Acids* **1997**, *13*, 131.

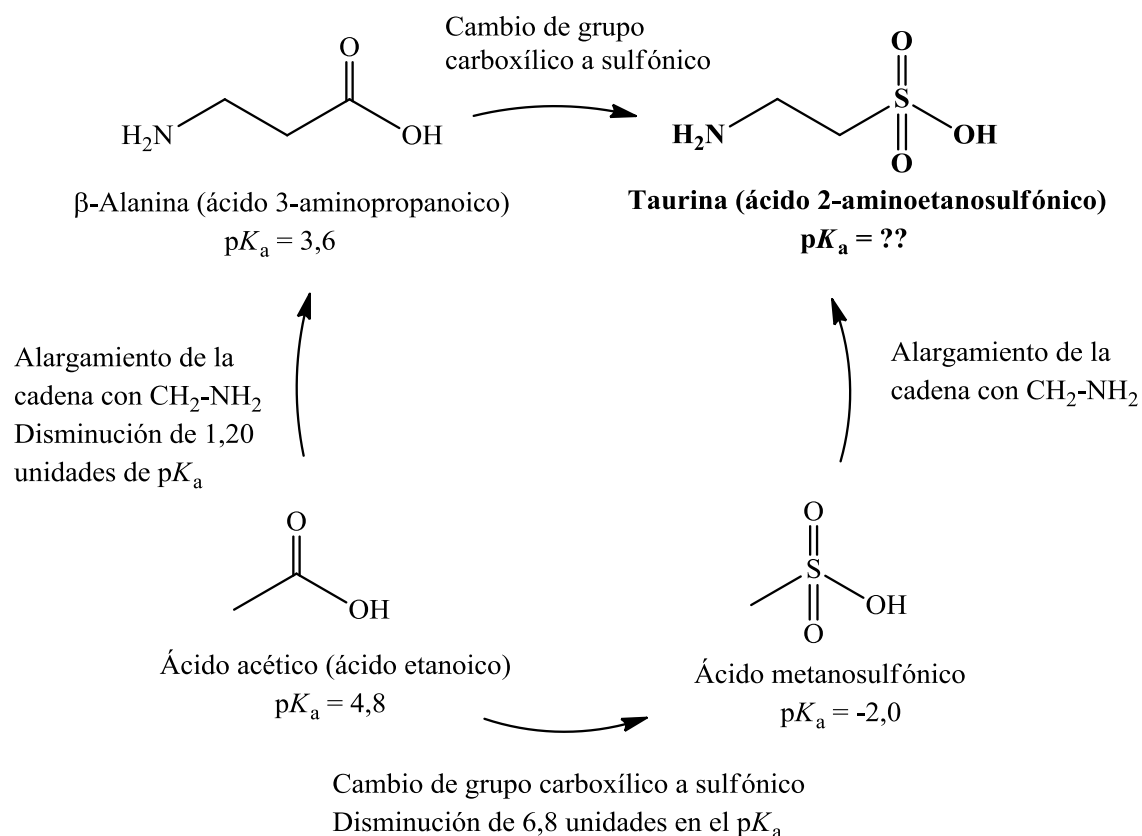


Figura 3.10. Comparación de valores pK_a de compuestos con estructura molecular relacionada con la de taurina.

Como la mayoría de los ácidos sulfónicos son ácidos fuertes, parece lógico pensar que el grupo sulfónico de la taurina también lo sea. A este hecho se suma que el pK_a de los grupos ácidos disminuye cuando existe un grupo amino cercano. Un ejemplo es el ácido propanoico con $pK_a = 4,8$, mientras que el del ácido 3-aminopropanoico es 3,6.

Sobre el valor de pK_a de la homotaurina existen muy pocos datos y, además, poco fiables. No obstante, por su proximidad estructural con la taurina y por los hechos apuntados, es de suponer que el ácido sulfónico de este compuesto también sea un ácido fuerte.

3.3. Estudio de la capacidad alquilante de los productos de nitrosación: 1,2-etanosultona y 1,3-propanosultona

Para estudiar la capacidad alquilante de las sultonas (Sult) que se forman en la nitrosaciones de taurina (1,2-etanosultona, ES) y homotaurina (1,3-propanosultona, PS) se ha utilizado el test de NBP (4-*p*-nitrobencilpiridina). Como se apuntó en el

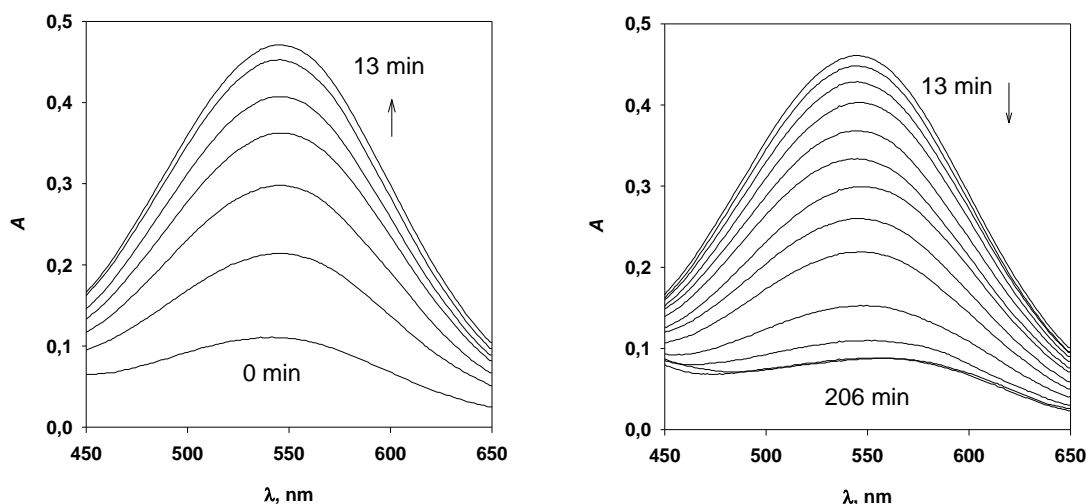


Figura 3.12. A la izquierda espectros del aducto ES-NBP hasta $t_{\text{alq}}=13$ min; a la derecha, a partir de $t_{\text{alq}}=13$ min. $[\text{NBP}]_0 = 0,014$ M; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $\text{pH} = 5,4$; $T = 20,0$ °C.

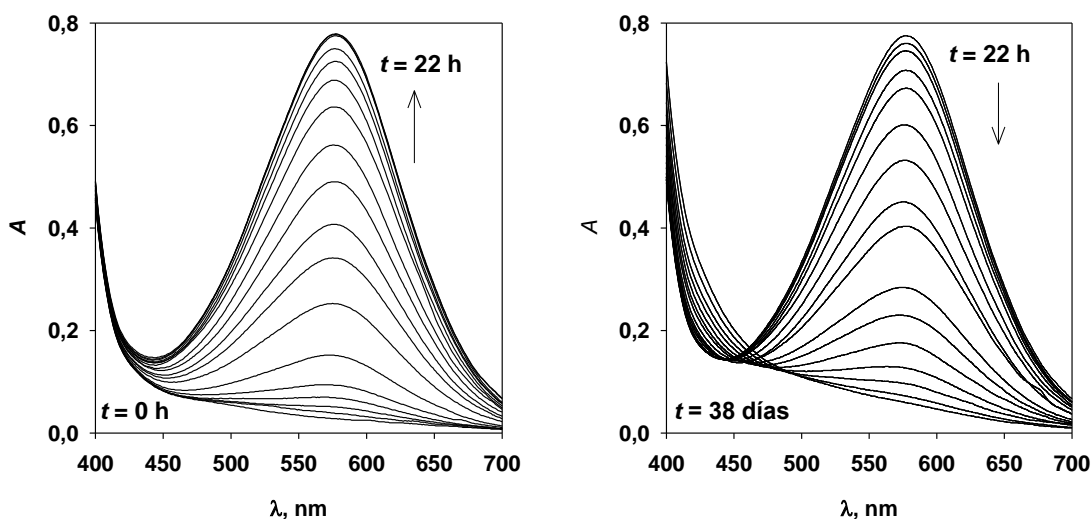


Figura 3.13. A la izquierda espectros del aducto PS-NBP hasta $t_{\text{alq}} = 22$ h; a la derecha, a partir de $t_{\text{alq}} = 22$ h. $[\text{NBP}]_0 = 0,020$ M; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4}$ M; $\text{pH} = 7,1$; $T = 37,5$ °C.

3.3.3. Método de trabajo

Los experimentos se hicieron añadiendo 2,4 ml de disolución de aducto NBP-Sult sobre 0,6 ml de trietilamina (Et_3N) contenidos en una cubeta termostatada a 15 °C en el portacubetas del espectrofotómetro. A continuación se agitaba la cubeta con cuidado, para que no se formasen burbujas, y se medía la absorbancia. Es importante que, desde el momento en que tiene lugar la mezcla de la disolución de aducto con la

Et₃N, las medidas se hagan lo más rápidamente posible, porque en medio tan básico el aducto se descompone.

Las disoluciones de aducto se preparaban añadiendo diferentes volúmenes de disolución madre de sultona en dioxano (medio en el que no se ha observado hidrólisis) a una disolución de NBP en medio 7:3 (agua/dioxano) (v/v) tamponada a pH = 7,1 con NaH₂PO₄/NaOH, en el caso de la PS, y a pH = 5,4 con AcOH/NaOH, con la ES. La razón de trabajar en medio agua/dioxano es la insolubilidad de la NBP en agua. Con la ES se trabajó a pH = 5,4 porque a pH = 7 el aducto se descompone tan rápidamente que no se puede trabajar con él.

La disolución de NBP procedía de una disolución madre preparada disolviendo primero la NBP en dioxano, después se le añadía el agua y el tampón y se ajustaba el pH.

Se trabajó siempre con exceso de NBP.

3.3.3.1. Inestabilidad de la 1,2-etanosultona

La 1,2-etanosultona es un compuesto fácilmente hidrolizable no disponible comercialmente; además, es lo suficientemente polar como para no poder ser extraído a un medio orgánico, lo que impide su aislamiento y purificación. Por eso, para investigar su capacidad alquilante, es necesario prepararla *in situ* antes de comenzar los experimentos y añadirla inmediatamente a la disolución de NBP. Dicha preparación consistió en realizar una nitrosación de taurina previa a los experimentos de alquilación.

De lo dicho hasta ahora se desprende la imposibilidad de conocer la concentración de ES que se añade a la mezcla de alquilación. Sin embargo, si las condiciones de trabajo en la nitrosación previa son siempre las mismas: [Tau]_o = 0,10 M, [nitrito]_o = 0,10 M, pH = 3,20 (para mantenerlo constante durante la reacción se usó una autobureta que añadía NaOH a medida que la disolución se acidificaba) y T = 25,0 °C, a un determinado tiempo de nitrosación, t_{nit} , la concentración de ES será siempre la misma. Se trabajó con $t_{nit} = 15$ min (Figura 3.14), cuando la concentración de sultona es máxima. De este modo, a los 15 min de nitrosación se tomaba una alícuota de 20 ml y se añadía a un matraz que contenía 30 ml de disolución de NBP.

Se puede utilizar la absorbancia del aducto formado entre la NBP y la ES para, de forma indirecta, conocer la variación de la concentración de sultona a lo largo de la

reacción de nitrosación. De este modo, se tomaban alícuotas de la mezcla de nitrosación a diferentes tiempos y se añadían a una disolución con $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$, $\text{pH} = 5,4$, medio 7:3 (agua dioxano) y se dejaba 7 min reaccionando, tiempo en el que la concentración de aducto ES-NBP es máxima (Figura 3.15). Pasado ese tiempo se medía la absorbancia.

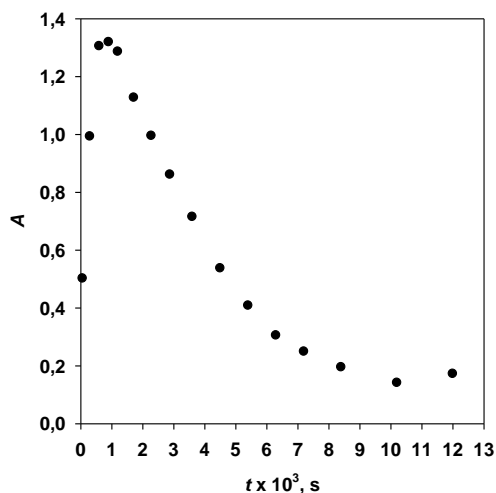


Figura 3.14. Perfil cinético de la ES a lo largo de la reacción de nitrosación. $t_{\text{alq}} = 7 \text{ min}$.

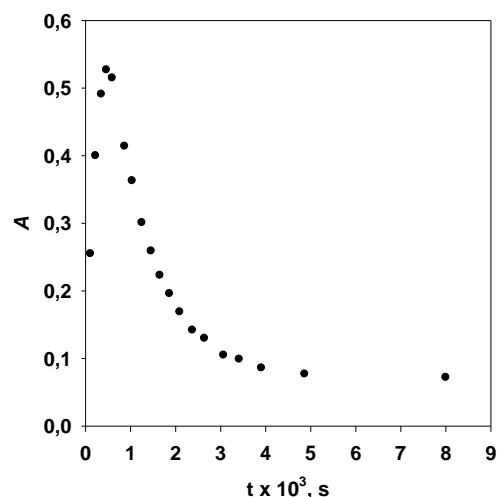


Figura 3.15. Perfil cinético del aducto ES-NBP durante la reacción de alquilación. $t_{\text{Nit}} = 15 \text{ min}$.

3.4. Reactivos

- *Generales:* HClO_4 (60%), NaOH , Na_2HPO_4 , dioxano y AcOH (Panreac, Barcelona, España), NaClO_4 y NaNO_2 (Merck, Darmstadt, Alemania) y Et_3N (99%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se utilizó agua desionizada con un equipo Wasserlab Ultramatic-ecomatic.
- *Específicos:* Taurina (>99%), homotaurina (97%), NBP, ácido isetiónico (98%), ácido 3-hidroxiopropano sulfónico y 1,3-propanosultona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania).

3.5. Equipo de trabajo y software

Las medidas de la absorbancia se hicieron con un espectrofotómetro Shimadzu UV 2401 PC con portacubetas CPS 240A y unidad Peltier ($\pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$). Cubetas de cuarzo Hellma 110 QS, de 1 cm de paso óptico.

La temperatura de las reacciones se mantuvo constante ($\pm 0,05$ °C) mediante termostatos *Lauda Ecoline Re 120*.

El pH de las mezclas de reacción se medía con un pH-metro *Metrohm*, pH lab 827 y 211 microprocessor pH meter *Hanna Instruments*.

Los espectros de masas de iniciación por electrospray, tanto en modo positivo como negativo, se obtuvieron mediante inyección directa en un espectrómetro Waters ZQ400.

El pH de la nitrosación previa para a la alquilación con ES se mantuvo contante con una autobureta 718 Stat Titrino *Metrohm*

Los ajustes se hicieron mediante algoritmos de optimización por mínimos cuadrados (programa *SigmaPlot 10.0*).

4. Resultados

4.1. Estudio cinético de la nitrosación de taurina y homotaurina

4.1.1. Coeficiente de absorción molar del nitrito en medio básico

El cálculo del coeficiente de absorción molar, $\epsilon_{\text{NO}_2^-}$, de esta especie se hizo midiendo la absorbancia de disoluciones con distintas concentraciones de nitrito. Las disoluciones se preparaban a partir de una disolución madre de nitrito sódico a la que se le habían añadido unas gotas de hidróxido sódico concentrado para evitar la formación de ácido nitroso.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1 (véase también Figura 4.1).

Tabla 4.1. Variación de la absorbancia del nitrito en función de la concentración en medio básico; pH > 7,0, T = 25,0 °C, $\lambda = 371$ nm.

A	$10^3 \cdot [\text{NO}_2^-], \text{M}$
0,020	1,15 ± 0,01
0,041	2,40 ± 0,02
0,078	4,81 ± 0,02
0,120	7,21 ± 0,03
0,157	9,61 ± 0,03
0,197	12,01 ± 0,05
0,390	24,03 ± 0,08
0,583	36,0 ± 0,1
0,775	48,1 ± 0,1
0,972	60,07 ± 0,06

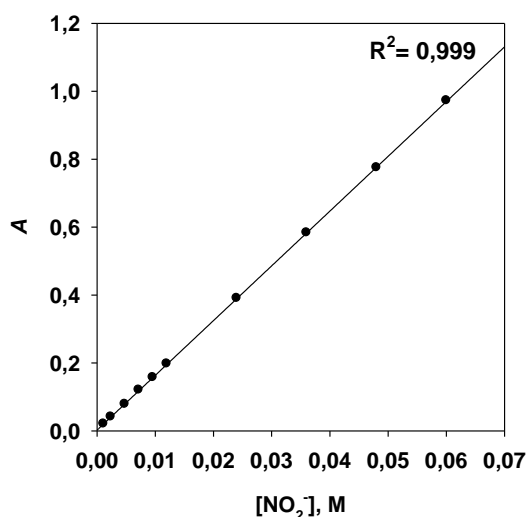


Figura 4.1. Variación de la absorbancia en función de la concentración de nitrito en medio básico; pH > 7,0, T = 25,0 °C, $\lambda = 371$ nm.

El valor obtenido para el coeficiente de absorción molar del nitrito en medio básico ($\lambda = 371$ nm) fue $\epsilon_{\text{NO}_2^-} = 16,12 \pm 0,02 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.1.2. Coeficiente de absorción molar del nitrito en medio ácido

Para calcular este coeficiente de absorción molar (ϵ_{HNO_2}) se midió la absorbancia de disoluciones con distintas concentraciones de nitrito en medio ácido. Las disoluciones se preparaban a partir de una disolución madre de nitrito sódico en agua y se acidificaban con HClO_4 . Las medidas se tomaban inmediatamente para evitar la descomposición del HNO_2 .

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.2 y Figura 4.2.

Tabla 4.2. Variación de la absorbancia del nitrito en función de la concentración en medio ácido; $\text{pH} \leq 1$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 371 \text{ nm}$.

A	$10^3 \cdot [\text{HNO}_2], \text{ M}$
0,056	$1,002 \pm 0,006$
0,113	$2,004 \pm 0,007$
0,169	$3,01 \pm 0,01$
0,223	$4,01 \pm 0,01$
0,272	$5,01 \pm 0,01$
0,325	$6,01 \pm 0,02$
0,549	$10,02 \pm 0,02$
0,802	$15,03 \pm 0,04$
1,059	$20,04 \pm 0,03$

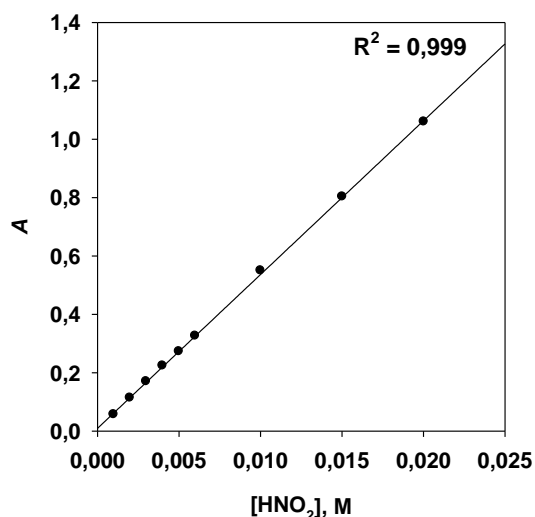


Figura 4.2. Variación de la absorbancia del nitrito en función de la concentración en medio ácido; $\text{pH} \leq 1$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 371 \text{ nm}$.

El valor obtenido para el coeficiente de absorción molar del nitrito en medio ácido ($\lambda = 371 \text{ nm}$) fue $\epsilon_{\text{HNO}_2} = 52,7 \pm 0,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.1.3. Coeficiente de absorción molar aparente del nitrito

Como el coeficiente de absorción molar aparente del nitrito depende del pH , se ha manejado la ecuación 3.5 que permite conocerlo en función de este parámetro y de la constante de acidez del ácido nitroso ($K_a = 10^{-3,148} \text{ M}$).²⁴¹ En esa expresión también aparecen los valores de ϵ_{HNO_2} y $\epsilon_{\text{NO}_2^-}$, determinados previamente ($\epsilon_{\text{HNO}_2} = 52,7 \pm 0,3$

²⁴¹ Tummuvauroi, J.; Lumme, P. *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2003.

$M^{-1}cm^{-1}$ y $\epsilon_{NO_2} = 16,12 \pm 0,02 M^{-1}cm^{-1}$) a $\lambda = 371$ nm. Al introducir esos valores en la ecuación 3.5, se llega a la ecuación 4.1 en la que el único valor desconocido es el del pH.

$$\epsilon_{ap} = \frac{\epsilon_{NO_2} K_a + \epsilon_{HNO_2} [H^+]}{[H^+] + K_a} \quad 3.5$$

$$\epsilon_{ap} = \frac{1,15 \cdot 10^{-2} cm^{-1} + 52,7 M^{-1}cm^{-1} [H^+]}{[H^+] + 7,1 \cdot 10^{-4} M} \quad 4.1$$

La Figura 4.3 muestra la dependencia de ϵ_{ap} con el pH del medio.

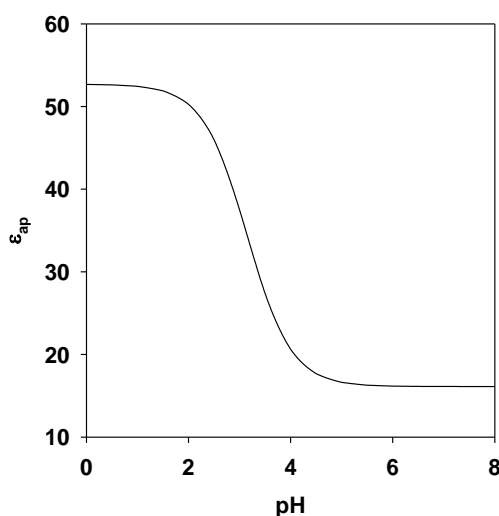


Figura 4.3. Variación del ϵ_{ap} del sistema nitroso/nitrito con el pH.

Puede observarse que, para valores extremos de pH, el coeficiente de absorción molar es el de la única especie que se encuentra en disolución: nitrito a $pH \geq 5,2$ y ácido nitroso a $pH \leq 1,2$.

4.1.4. Orden de reacción respecto a la concentración de nitrito

La variación de la velocidad de reacción con la concentración de nitrito se estudió con el método de velocidades iniciales. Si se tienen en cuenta las ecuaciones 3.6 y 3.9, se obtiene la ecuación 4.2, cuya forma logarítmica es la ecuación 4.3.

$$v_o = -\frac{d}{dt}([\text{nitrito}]_o) = k_{\text{exp}} [S]_o^a [\text{nitrito}]_o^b \quad 3.6$$

$$m = \frac{dA_o}{dt} = -v_o \epsilon_{\text{ap}} \quad 3.9$$

$$v_o = -\frac{m}{\epsilon_{\text{ap}}} = k_{\text{exp}} \epsilon_{\text{ap}} [S]_o^a [\text{nitrito}]_o^b \quad 4.2$$

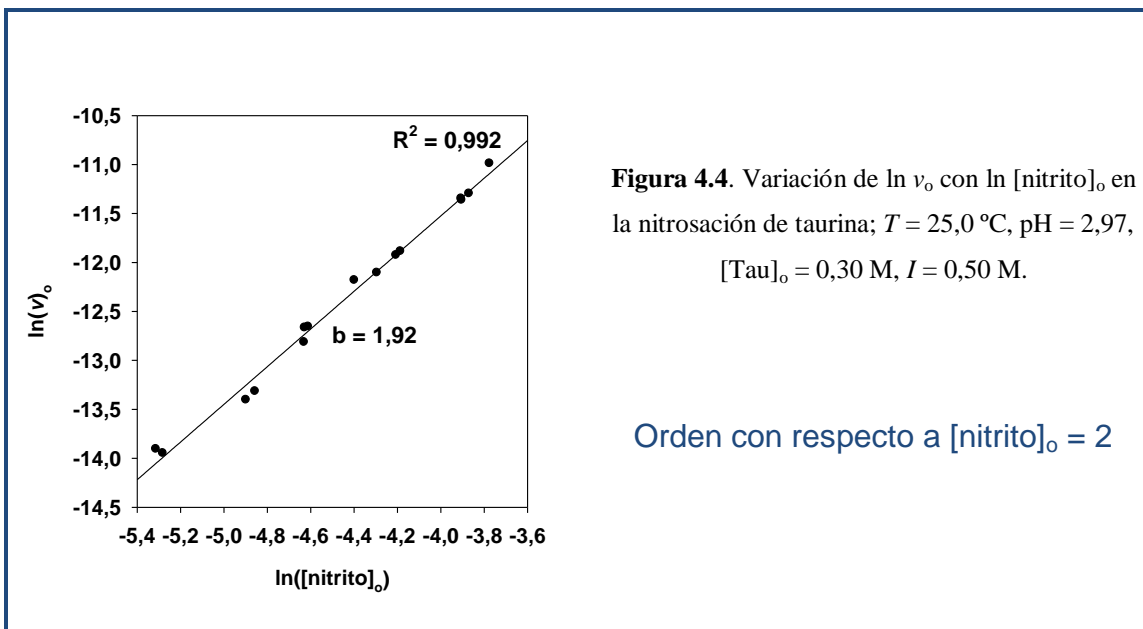
$$\ln(v_o) = \ln(k_{\text{exp}} [S]_o^a) + b \ln([\text{nitrito}]_o) \quad 4.3$$

Por ello se realizaron experimentos en los que se varió únicamente la concentración inicial de nitrito y se obtuvieron los correspondientes valores de v_o (véanse Tabla 4.3 para la nitrosación de taurina y Tabla 4.4 para la nitrosación de homotaurina). Utilizando la ecuación 4.3 se obtuvieron los órdenes de reacción con respecto a la concentración de nitrito para las reacciones de nitrosación de taurina (Figura 4.4) y homotaurina (Figura 4.5).

TAURINA

Tabla 4.3. Variación de v_o con $[\text{nitrito}]_o$ en la nitrosación taurina; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 2,97$, $[\text{Tau}]_o = 0,30 \text{ M}$, $I = 0,50 \text{ M}$.

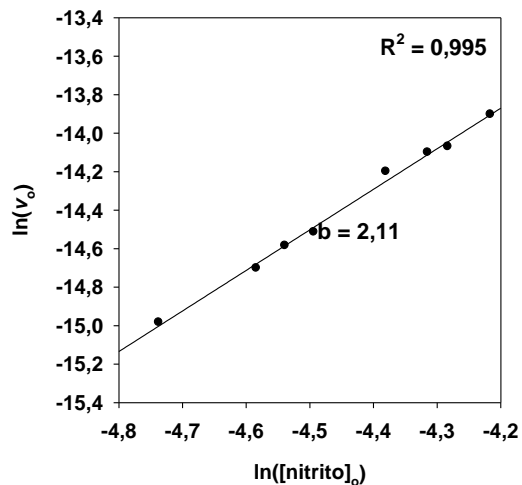
$10^6 \cdot v_o, \text{ M s}^{-1}$	$[\text{nitrito}]_o, \text{ M}$	$10^6 \cdot v_o, \text{ M s}^{-1}$	$[\text{nitrito}]_o, \text{ M}$
0,91	0,0049	5,51	0,0137
0,87	0,0051	6,60	0,0149
1,51	0,0075	6,87	0,0152
1,64	0,0078	11,77	0,0201
3,15	0,0098	11,58	0,0202
2,72	0,0098	12,38	0,0209
3,18	0,0100	16,83	0,0230
5,11	0,0123		



HOMOTAURINA

Tabla 4.4. Variación de v_o con $[\text{nitrito}]_o$ en la nitrosación de homotaurina; $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 3,50$, $[\text{HT}]_o = 0,40\text{ M}$, $I = 0,50\text{ M}$.

$10^7 \cdot v_o, \text{ M s}^{-1}$	$[\text{nitrito}]_o, \text{ M}$
3,11	0,0088
4,12	0,0102
4,63	0,0107
4,97	0,0112
6,81	0,0125
7,52	0,0134
7,75	0,0138
9,16	0,0148



El orden de reacción encontrado respecto a la concentración de nitrito fue 2 para ambas reacciones de nitrosación, lo que indica que el agente nitrosante efectivo es el N_2O_3 .²⁴²

4.1.5. Orden de reacción respecto a la concentración de sustrato

Para calcular el orden de la reacción de nitrosación respecto a la concentración de sustrato se medía la absorbancia de disoluciones con fuerza iónica, pH y temperatura constantes. La concentración de nitrito también fue la misma para todas las disoluciones; el único parámetro que se variaba fue la concentración inicial de sustrato.

Los pares de datos $\ln([S]_0)/\ln(v_0)$ (Tabla 4.5 para la taurina y Tabla 4.6 para la homotaurina) se ajustaron a la ecuación 4.5; véanse Figura 4.6 (taurina) y Figura 4.7 (homotaurina).

$$v_0 = -\frac{m}{\epsilon_{ap}} = k_{exp} \epsilon_{ap} [\text{nitrito}]_0^b [S]_0^a \quad 4.4$$

$$\ln(v_0) = \ln(k_{exp}[\text{nitrito}]_0) + a \ln([S]_0) \quad 4.5$$

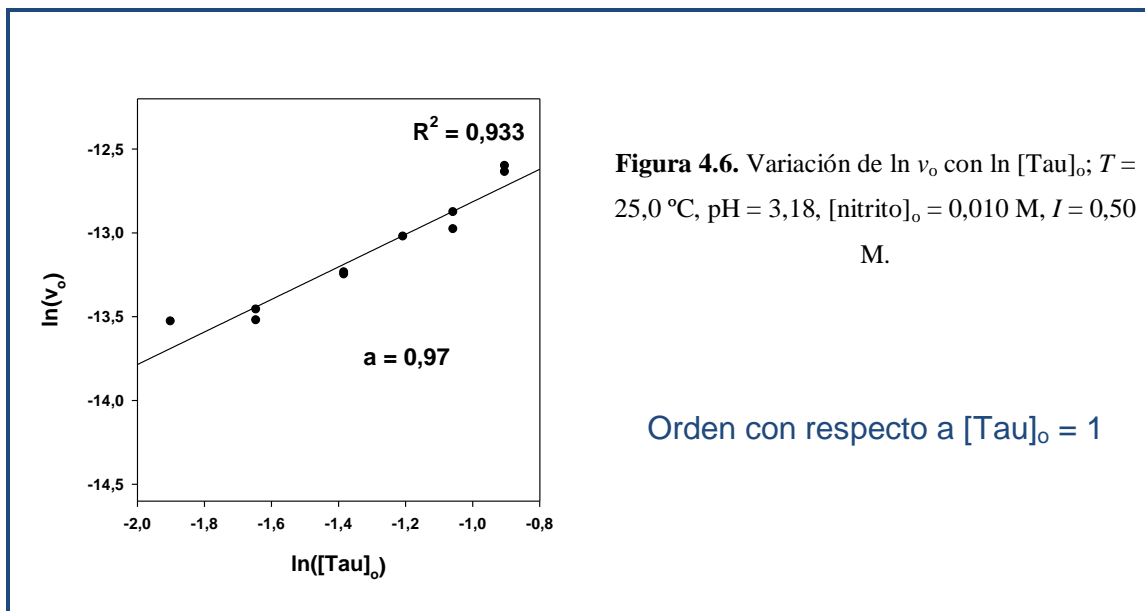
TAURINA

Tabla 4.5. Variación de v_0 con $[\text{Tau}]_0$; $T = 25,0$ °C, $\text{pH} = 3,18$, $[\text{nitrito}]_0 = 0,010$ M, $I = 0,50$ M.

$10^6 \cdot v_0, \text{ M s}^{-1}$	$[\text{Tau}]_0, \text{ M}$	$10^6 \cdot v_0, \text{ M s}^{-1}$	$[\text{Tau}]_0, \text{ M}$
1,33	0,15	2,20	0,30
1,43	0,19	2,55	0,35
1,34	0,19	2,30	0,35
1,78	0,25	3,36	0,40
1,76	0,25	3,24	0,40

²⁴² a) Casado, J. *Nitrosation Reactions*. Invited Lecture. In *Fast Reactions in Solution*, Royal Soc. Chem. Annual Meeting 1994.

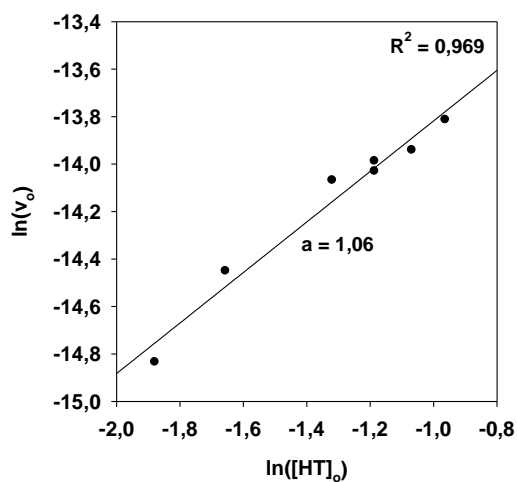
b) Casado, J. *Chemistry of Nitrosation Reactions in Solution*; Invited Lecture. In *Kolloquien der Ortsverbände*, Universität Leipzig, 1997.



HOMOTAURINA

Tabla 4.6. Variación de v_0 con $[\text{HT}]_0$; $T = 25,0$ °C, $\text{pH} = 4,03$, $[\text{nitrito}]_0 = 0,020$ M, $I = 0,50$ M.

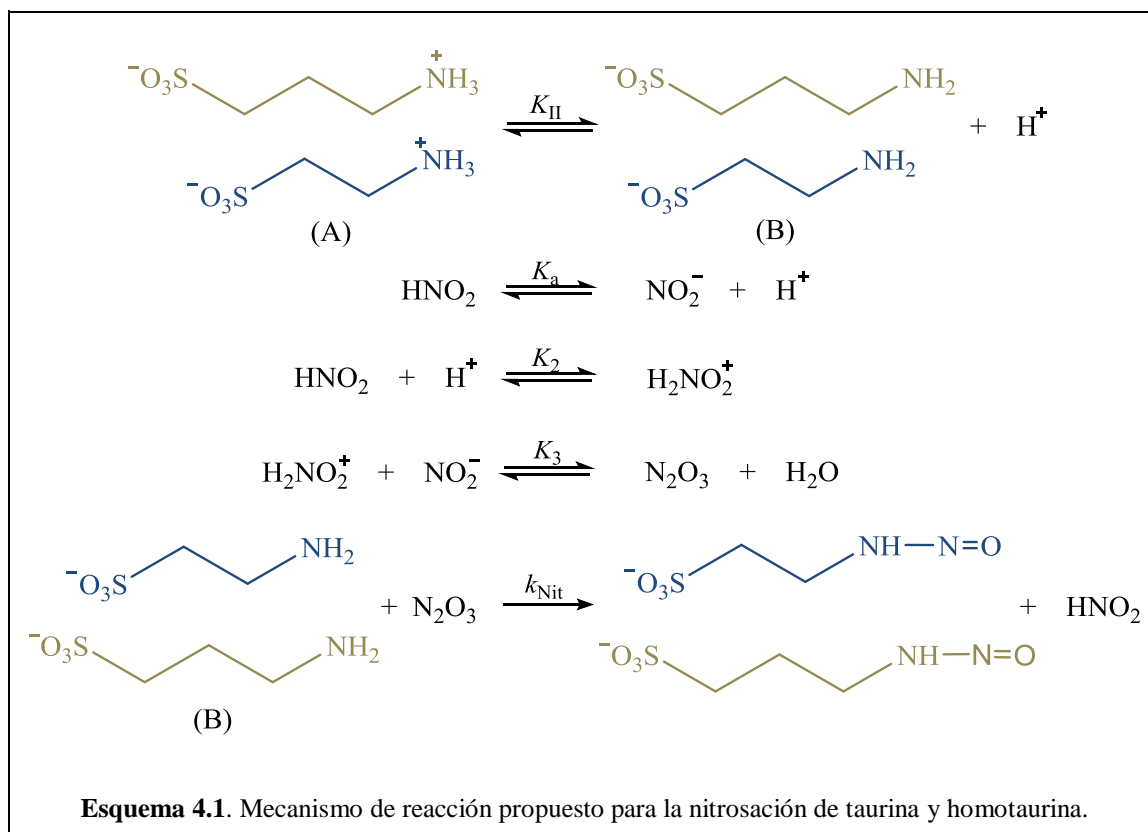
$10^7 \cdot v_0, \text{M s}^{-1}$	$[\text{HT}]_0, \text{M}$
3,60	0,15
5,30	0,19
7,77	0,27
8,42	0,30
8,07	0,30
8,82	0,34
10,02	0,38



El orden de reacción encontrado respecto a la concentración de sustrato fue uno en las dos reacciones de nitrosación.

4.1.6. Mecanismo de reacción

Los resultados antes reseñados y, en particular, el hecho de que el agente nitrosante efectivo en las dos reacciones investigadas sea el trióxido de dinitrógeno, condujo al mecanismo reflejado en el Esquema 4.1.



Como puede verse, K_{II} , K_a , K_2 y K_3 son las constantes de equilibrio para las especies (A) y (B), HNO_2 y NO_2^- , HNO_2 y H_2NO_2^+ y la de formación del N_2O_3 , respectivamente. k_{Nit} es la constante de velocidad de la reacción de nitrosación de la especie (B) por el trióxido de dinitrógeno.

$$K_{II} = \frac{[\text{B}][\text{H}^+]}{[\text{A}]} \quad 4.6$$

$$K_a = \frac{[\text{NO}_2^-][\text{H}^+]}{[\text{HNO}_2]} \quad 4.7$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}_2\text{NO}_2^+]}{[\text{HNO}_2][\text{H}^+]} \quad 4.8$$

$$K_3 = \frac{[\text{N}_2\text{O}_3]}{[\text{H}_2\text{NO}_2^+][\text{NO}_2^-]} \quad 4.9$$

La velocidad de la reacción de nitrosación de la especie (B) por el trióxido de dinitrógeno es:

$$v = k_{\text{Nit}} [\text{B}][\text{N}_2\text{O}_3] \quad 4.10$$

Como el grupo sulfónico de los dos sustratos está totalmente desprotonado en disolución acuosa, sólo se tendrá en cuenta el equilibrio ácido-base de su grupo amino. Así, la concentración inicial de sustrato es suma de las especies (A) y (B) (Esquema 4.1), es decir, las que tienen el grupo amino protonado y desprotonado, respectivamente (ecuación 4.11).

$$[\text{S}]_0 = [\text{A}] + [\text{B}] \quad 4.11$$

Las expresiones de las constantes de equilibrio y de las concentraciones iniciales del nitrito y sustrato conducen a las ecuaciones 4.12 y 4.13:

$$[\text{B}] = \frac{K_{\text{II}} [\text{S}]_0}{[\text{H}^+] + K_{\text{II}}} \quad 4.12$$

$$[\text{N}_2\text{O}_3] = K_2 K_3 [\text{H}^+] [\text{HNO}_2] [\text{NO}_2^-] \quad 4.13$$

Al sustituir en la ecuación 4.10 se obtiene que:

$$v = k_{\text{Nit}} \frac{K_{\text{II}} [\text{S}]_0}{[\text{H}^+] + K_{\text{II}}} K_2 K_3 [\text{H}^+] [\text{HNO}_2] [\text{NO}_2^-] \quad 4.14$$

Mediante sencillas operaciones se llega a expresiones que relacionan $[\text{NO}_2^-]$ y $[\text{HNO}_2]$ con la concentración inicial de nitrito:

$$[\text{HNO}_2] = \frac{[\text{nitrito}]_0 [\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} \quad 4.15$$

$$[\text{NO}_2^-] = \frac{K_a [\text{nitrito}]_0}{K_a + [\text{H}^+]} \quad 4.16$$

Al sustituir las ecuaciones 4.15 y 4.16 en la 4.14 se llega a la expresión final de la ecuación de velocidad de nitrosación de taurina:

$$v = k_{\text{Nit}} K_2 K_3 K_a K_{\text{II}} \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_{\text{II}})(K_a + [\text{H}^+])^2} [\text{S}]_0 [\text{nitrito}]_0^2 \quad 4.17$$

Si se define una constante α que aglutine todas las constantes que no dependen de la concentración de ninguna especie, se obtiene la ecuación 4.18.

$$v = \alpha \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_{\text{II}})(K_a + [\text{H}^+])^2} [\text{S}]_0 [\text{nitrito}]_0^2 \quad 4.18$$

donde:

$$\alpha = k_{\text{Nit}} K_2 K_3 K_a K_{\text{II}} \quad 4.19$$

Cuando el pH se mantiene constante puede escribirse:

$$k_{\text{exp}} = \alpha \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_{\text{II}})(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad 4.20$$

De modo que la ecuación de velocidad experimental es:

$$v = k_{\text{exp}} [S]_0 [\text{nitrito}]_0^2 \quad 4.21$$

4.1.7. Influencia del pH

Conocidos los órdenes y el mecanismo de reacción, se procedió a estudiar la influencia del pH sobre la constante de velocidad k_{exp} en las dos reacciones de nitrosación.

Como se indicó en el apartado 3.2.3.1, la descomposición del ácido nitroso a valores de pH bajos compite con la reacción de nitrosación. Por eso hubo de perfeccionarse el tratamiento cinético, para evitar considerar como velocidad de nitrosación lo que, en ocasiones, es la suma de ésta y la de velocidad de descomposición del ácido nitroso.

Para discriminar las dos velocidades se han seguido dos métodos, uno aplicado en la nitrosación de taurina, y el otro en la de homotaurina.

Eliminación de la interferencia de la descomposición del ácido nitroso I.

Influencia del pH en la nitrosación de taurina

Se hicieron experimentos en los que, para cada valor de pH, se trabajó con distintas concentraciones de taurina. Así se obtuvieron los valores de la pseudoconstante experimental de velocidad, k'_{exp} , y de la velocidad de descomposición del HNO_2 (cf. 3.2.3.1.1). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.7.

La Figura 4.8 da cuenta de los resultados obtenidos para k_{exp} frente a pH y su ajuste a la ecuación 4.20. Este ajuste condujo a los siguientes valores: $\alpha = 3,21 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $K_a = 10^{-3,02} \text{ M}$, coherente con el habitualmente aceptado ($10^{-3,145}$).²⁴³

Con el valor de α y la ecuación 4.19 se puede conocer el valor de la constante k_{Nit} de ataque del N_2O_3 sobre el grupo amino libre de la taurina. Se ha manejado el valor $K_M = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ (Markovits *et al.*²⁴⁴) con $K_M = K_2 K_3 K_a$ y $K_{II} = 10^{-9,06} \text{ M}$.²⁴⁵

²⁴³ Tumnavuori, J.; Lumme, P. *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2003.

²⁴⁴ Markovits, G. Y.; Swatch, S. E.; Newman, L. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 445.

$$\alpha = k_{\text{Nit}} K_2 K_3 K_a K_{\text{II}} = k_{\text{Nit}} K_{\text{M}} K_{\text{II}} \quad 4.19$$

Así se llegó al valor $k_{\text{Nit}} = 1,23 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tabla 4.7. Valores de $10^6 \cdot v_{0,T}$, M s^{-1} para la reacción de nitrosación de taurina a diferentes valores de pH y $[\text{Tau}]_0$. $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,50 \text{ M}$.

pH	[Tau] ₀ , M						10 ⁶ · k' _{exp} s ⁻¹	10 ² · k _{exp} M ⁻² s ⁻¹	10 ⁶ · v _{0,D} M s ⁻¹
	0,15	0,19	0,25	0,30	0,35	0,41			
2,09	3,01	3,49	3,62	3,66	4,17	4,18	4,27	3,63	2,53
2,40	2,77	2,94	3,17	3,67	3,78	4,25	5,52	5,09	1,90
2,57	2,63	2,98	3,05	3,26	3,91	4,50	6,90	6,81	1,49
2,77	2,17	2,33	2,77	3,32	3,79	4,23	8,49	7,59	0,77
2,98	1,78	2,15	2,46	2,94	3,85	3,82	8,77	8,13	0,42
3,20	1,28	1,39	1,77	2,07	2,43	3,31	7,60	7,86	0,05
3,53	—	—	—	1,98	—	—	6,61	6,26	—
4,02	—	—	—	0,94	—	—	3,43	3,35	—
4,99	—	—	—	0,08	—	—	0,29	0,27	—

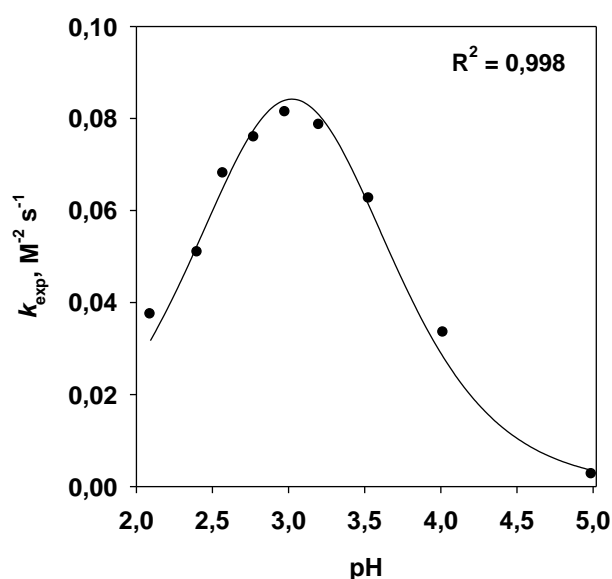


Figura 4.8. Diagrama $k_{\text{exp}} / \text{pH}$; (●) valores experimentales y (—) teóricos. $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$, $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $I = 0,50 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

²⁴⁵ Hamborg, E. S.; Niederer, J. P. M.; Versteeg, G. V. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, 52, 2491.

Uno de los primeros objetivos al estudiar mecanismos de nitrosación es acotar las condiciones de trabajo (pH particularmente) en las que la reacción de nitrosación propiamente dicha no se ve enmascarada (o perturbada sustancialmente) por la competitiva de descomposición del HNO_2 . La Figura 4.9 muestra las velocidades iniciales de los dos procesos por separado. Se observa que a $\text{pH} \leq 2,5$ la reacción de descomposición comienza a ser más rápida que la de nitrosación, de modo que, si se sigue bajando el pH, la descomposición es el proceso más rápido. A $\text{pH} \geq 3,2$ el único proceso que tiene lugar es la nitrosación, con una velocidad que es máxima a $\text{pH} \cong 3$. A partir de ese valor la constante de velocidad comienza a disminuir hasta hacerse casi nula a $\text{pH} > 5$.

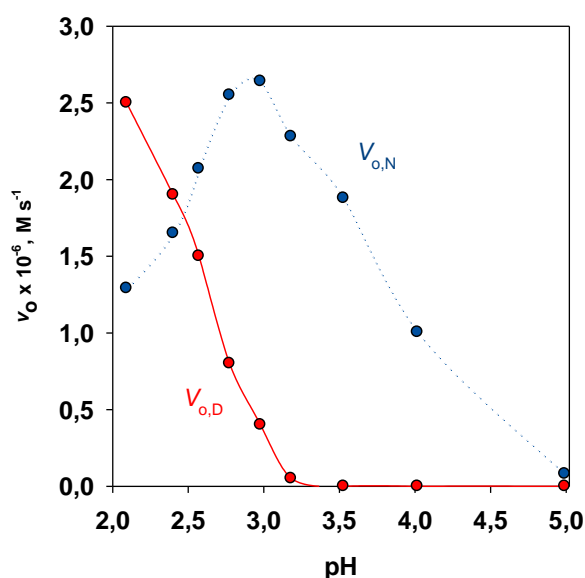


Figura 4.9. Representación de (●) Velocidad inicial de descomposición del nitrito en medio ácido y (▲) Velocidad inicial de nitrosación de taurina; en función del pH. $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$, $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$, $I = 0,50 \text{ M}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Eliminación de la interferencia de la descomposición del ácido nitroso II.

Influencia del pH en la nitrosación de homotaurina

Como se indica en el apartado 3.2.3.1.2, a cada pH se hicieron dos experimentos en los que la única diferencia era la presencia o no de homotaurina. Así se obtuvieron los valores de velocidad inicial de descomposición ($v_{o,D}$) y velocidad inicial total de desaparición de nitrito ($v_{o,T}$). Con esos datos se calculó la velocidad inicial de

nitrosación y la k_{exp} de nitrosación (Tabla 4.8). La Figura 4.10 ilustra el ajuste de los resultados a la ecuación 4.20.

Tabla 4.8. Variación de v_{OD} , v_{OT} , v_{ON} y k_{exp} con el pH. $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{HT}]_0 = 0,50 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,60 \text{ M}$.

pH	$10^6 \cdot v_{\text{OT}}, \text{ M s}^{-1}$	$10^6 \cdot v_{\text{OD}}, \text{ M s}^{-1}$	$10^6 v_{\text{ON}}, \text{ M s}^{-1}$	$10^2 \cdot k_{\text{exp}}, \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$
2,83	2,63	1,48	1,16	0,85
2,98	3,07	1,34	1,72	0,96
3,21	2,70	0,84	1,86	1,03
3,35	—	0,73	—	1,06
3,50	2,30	0,43	1,87	0,96
3,70	1,96	0,26	1,71	0,86
3,90	1,47	0,13	1,35	0,67
4,11	0,99	0,06	0,92	0,45
4,55	0,55	0,03	0,52	0,23
5,02	0,18	0,01	0,17	0,08

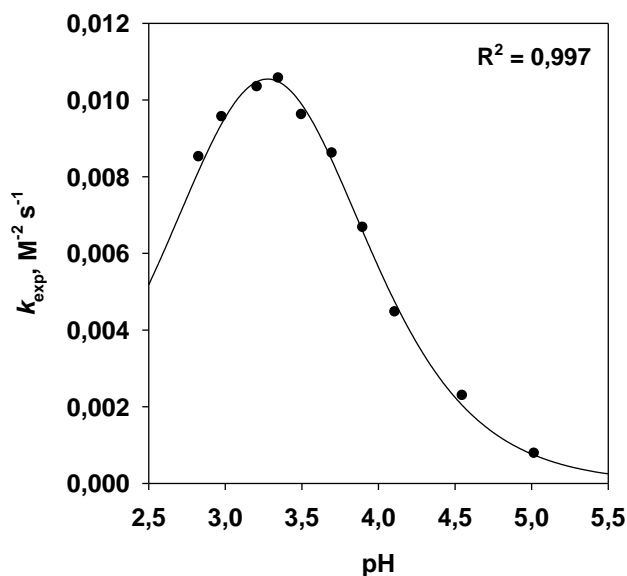


Figura 4.10. Variación de k_{exp} con el pH. $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{HT}]_0 = 0,50 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,60 \text{ M}$.

Mediante este ajuste se obtuvieron los valores $\alpha = 2,29 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $K_a = 10^{-3,3}$,

este último ligeramente superior al bibliográfico ($K_a = 10^{-3,145} \text{ M}$).²⁴⁶

Con el valor de α y la ecuación 4.19 se calculó el valor de la constante k_{Nit} de ataque del N_2O_3 sobre el grupo amino libre de la homotaurina ($K_M = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ ²⁴⁷ y $K_{II} = 10^{-10,2} \text{ M}$).²⁴⁸ Se obtuvo así $k_{\text{Nit}} = 1,21 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

La variación de las velocidades iniciales de nitrosación con el pH (Figura 4.11) muestra que, a $\text{pH} > 4,10$, la velocidad inicial de nitrosación es prácticamente la velocidad inicial total, lo que significa que la velocidad de descomposición del ácido nitroso es despreciable. A partir de ese valor y hasta $\text{pH} = 3,0$, aproximadamente, la velocidad de nitrosación sigue siendo mayor que la de descomposición pero esta última ya no puede despreciarse. De hecho, a medida que disminuye el pH, la velocidad de descomposición aumenta, compitiendo cada vez más con la velocidad de nitrosación y, en torno a $\text{pH} = 2,9$, las dos velocidades se igualan. A valores inferiores de pH la velocidad inicial de descomposición del ácido nitroso es superior a la de nitrosación y, a juzgar por la tendencia de ambas velocidades, podría suponerse que, hacia valores de $\text{pH} < 2,5$, la descomposición del ácido nitroso sería ya el único proceso a tener en cuenta.

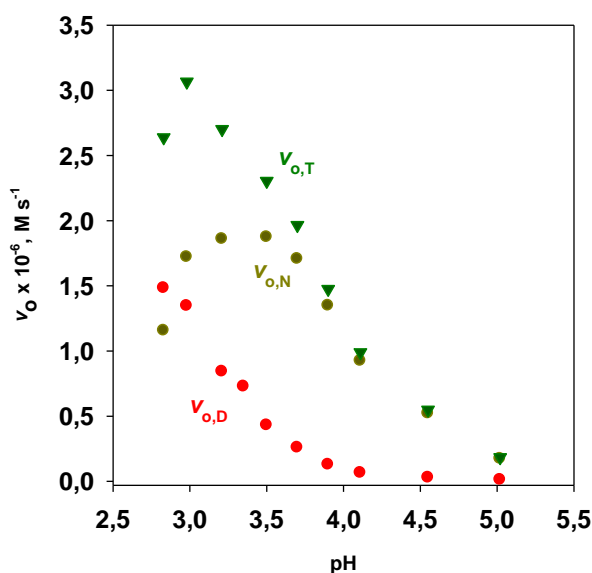


Figura 4.11. Comparación de $v_{o,D}$, $v_{o,T}$ y $v_{o,N}$ en función del pH.
 $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{HT}]_0 = 0,50 \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $I = 0,60 \text{ M}$.

²⁴⁶ Tumnavuori, J.; Lumme, P. *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 2003.

²⁴⁷ Markovits, G. Y.; Swatch, S. E.; Newman, L. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 445.

²⁴⁸ Goldberg, R. N.; Klahore, N.; Lennen, R. M. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2002**, 31, 231.

4.1.7.1. Comparación y discusión de los valores obtenidos para k_{Nit} y k_{exp}

Como puede observarse, los valores de la constante de nitrosación, k_{Nit} , para la taurina y homotaurina son prácticamente iguales. Ello no es de extrañar si se tiene en cuenta que la etapa cinética lenta del mecanismo de nitrosación (ataque por el trióxido de dinitrógeno) está controlada por difusión.

Es de notar que, en aparente contraste con la igualdad de k_{Nit} para la taurina y homotaurina, los valores de k_{exp} en la reacción de nitrosación de taurina son 7-8 veces mayores que sus homólogos en la nitrosación de homotaurina, en las mismas condiciones de pH y temperatura. Sin embargo, estos resultados son coherentes con el mecanismo de reacción propuesto (Esquema 4.1): el valor de K_{II} para el grupo amino de la taurina es más alto que el de la homotaurina (lo que hace más ácida a la amina de la primera). Como se ha visto en páginas anteriores (capítulo 4.1.6), el N_2O_3 reacciona con la forma desprotonada de la amina, y en la homotaurina este grupo está más protonado en el pH de trabajo. La ecuación 4.22 refleja cómo influye el valor de K_{II} en el de k_{exp} .

$$k_{\text{exp}} = k_{\text{Nit}} K_2 K_3 K_a K_{\text{II}} \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_{\text{II}})(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad 4.22$$

Es también este valor más alto de K_{II} en la nitrosación de taurina (y, en consecuencia, de k_{exp}) el responsable de que esta reacción sea más rápida que la nitrosación de homotaurina en las mismas condiciones. Ello explica también por qué la descomposición del ácido nitroso empieza a ser despreciable a pH más ácido (pH > 3,2) en la nitrosación de taurina que en la nitrosación de homotaurina (pH > 4,1).

Por otro lado, el buen ajuste de los valores de k_{exp} a la ecuación 4.20 confirma el mecanismo de reacción propuesto para las reacciones de nitrosación de taurina y homotaurina.

$$k_{\text{exp}} = \alpha \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_{\text{II}})(K_a + [\text{H}^+])^2} \quad 4.20$$

4.1.8. Influencia de la fuerza iónica

Un factor significativo cuando se trabaja en medios de permitividad eléctrica elevada es la fuerza iónica, I .²⁴⁹ Para analizar su influencia sobre la constante de velocidad de nitrosación de taurina se ha investigado la variación de la absorbancia a lo largo del tiempo en medios con distinta fuerza iónica. El intervalo de trabajo ha sido $I = 0,4-0,8$ M en la nitrosación de taurina y $0,6-0,9$ M en la nitrosación de homotaurina.

En los dos casos se obtuvieron valores de k_{exp} muy parecidos con distintos valores de I , y sin ninguna relación que sugiera una dependencia de esta constante con la fuerza iónica.

La no influencia de la fuerza iónica sobre la constante de velocidad de reacción constituye un nuevo apoyo al mecanismo de control por difusión propuesto para la nitrosación de los dos sustratos.

4.1.9. Influencia de la temperatura: parámetros de activación

El conocimiento de los parámetros de activación es con frecuencia muy útil para esclarecer mecanismos de reacción.²⁵⁰ Por eso, uno de los objetivos del trabajo descrito en estas páginas ha sido la determinación de los parámetros termodinámicos de las reacciones de nitrosación de taurina y homotaurina. Para ello se ha hecho una serie de experiencias en las que, mantenidas constantes la concentración de sustrato, concentración de nitrito y pH, se ha hecho variar la temperatura.

Del ajuste de los valores de k_{exp} a las ecuaciones de Arrhenius (ecuación 4.23) y Eyring-Wynne-Jones (ecuación 4.24) se obtuvieron los valores de los parámetros experimentales de activación.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad 4.23$$

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad 4.24$$

La Tabla 4.10 y la Tabla 4.11 muestran los resultados obtenidos para las nitrosaciones de taurina y homotaurina. La representación de las ecuaciones

²⁴⁹ Seymour, M. D.; Fernando, Q. *J. Chem. Educ.* **1977**, *54*, 225.

²⁵⁰ Carpenter, B. K. *determination of Organic Reaction Mechanism*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1984.

linealizadas de Arrhenius está en la Figura 4.12 y en la Figura 4.14 y la de Eyring-Wynne-Jones en Figura 4.13 y Figura 4.15.

TAURINA

Tabla 4.9. Influencia de la temperatura en la k_{exp} : $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,18$; $I = 0,50 \text{ M}$.

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^2 \cdot k_{\text{exp}}, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{exp}}$	$-\ln(k_{\text{exp}}/T)$
17,5	3,44	3,96	3,2301	8,9022
20,0	3,41	5,06	2,9834	8,6641
22,5	3,38	6,90	2,6731	8,3623
25,0	3,35	8,27	2,4931	8,1907
27,5	3,33	10,13	2,2894	7,9954
30,0	3,30	10,93	2,2135	7,9277
32,5	3,27	13,65	1,9917	7,7142
35,0	3,25	16,66	1,7919	7,5225
37,5	3,22	18,25	1,7009	7,4396
40,0	3,19	24,13	1,4218	7,1685

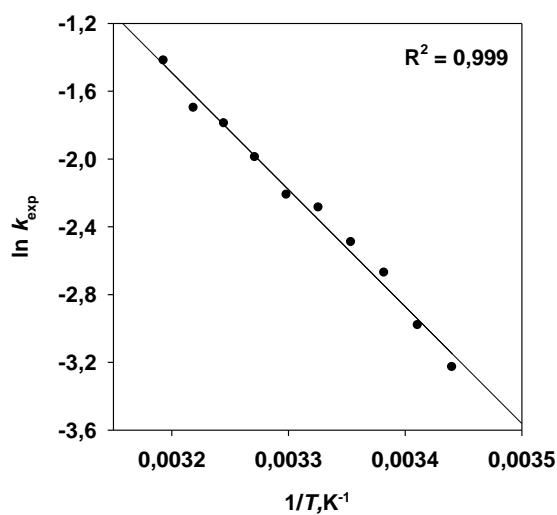


Figura 4.12. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental k_{exp} ; $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,18$; $I = 0,50 \text{ M}$.

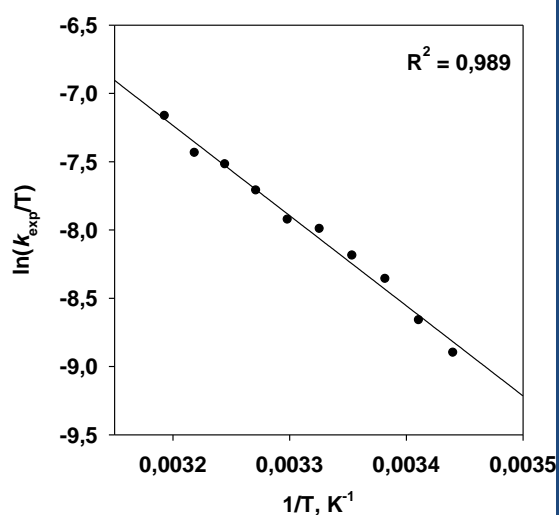


Figura 4.13. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental k_{exp} ; $[\text{Tau}]_0 = 0,30 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,010 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,18$; $I = 0,50 \text{ M}$.

$$E_a = 57 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger = 55 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

HOMOTAURINA

Tabla 4.10. Influencia de la temperatura en la k_{exp} ; $[\text{HT}]_0 = 0,40 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,50$; $I = 0,50 \text{ M}$.

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^2 \cdot k_{\text{exp}}, \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{exp}}$	$-\ln (k_{\text{exp}}/T)$
20,0	3,41	0,83	4,7928	10,4734
22,5	3,38	0,94	4,6642	10,3533
25,0	3,35	1,18	4,4418	10,1394
27,5	3,33	1,35	4,3022	10,0082
30,0	3,30	1,48	4,2125	9,9268
32,5	3,27	1,91	3,9586	9,6844
35,0	3,25	2,10	3,8606	9,5928
37,5	3,22	2,47	3,7017	9,4404

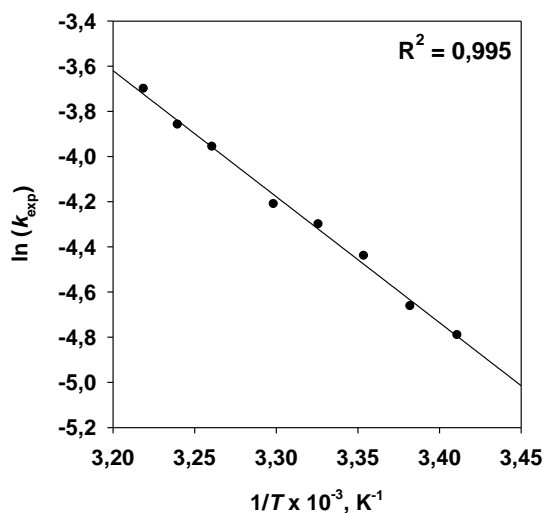


Figura 4.14. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental k_{exp} ; $[\text{HT}]_0 = 0,40 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,50$; $I = 0,50 \text{ M}$.

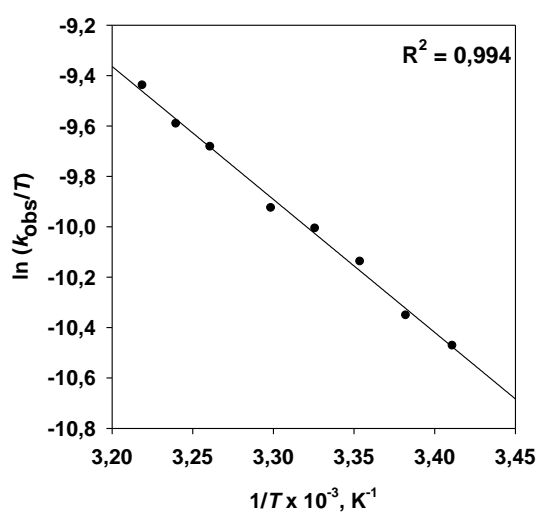
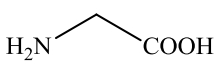
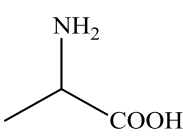
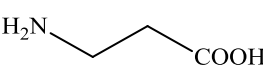
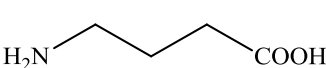
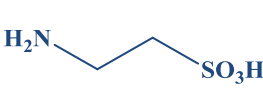
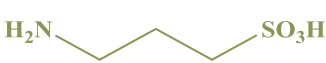


Figura 4.15. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental k_{exp} ; $[\text{HT}]_0 = 0,40 \text{ M}$; $[\text{nitrito}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $\text{pH} = 3,50$; $I = 0,50 \text{ M}$.

$$E_a = 46 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger = 44 \pm 1 \text{ kJ mol}^{-1}.$$

La Tabla 4.11 muestra que los valores de ΔH^\ddagger aquí obtenidos en la nitrosación de la taurina y homotaurina son comparables con los encontrados para una serie de aminoácidos.

Tabla 4.11. Estudio comparativo de los parámetros termodinámicos obtenidos para la taurina y otros aminoácidos.²⁵¹

Aminoácido	Estructura	ΔH^\ddagger , kJ mol ⁻¹
Glicina		56,9 ± 0,4
Alanina		59,3 ± 0,9
β-Alanina		61,7 ± 0,6
Ácido γ-aminobutírico		57 ± 1
Taurina		55 ± 2
Homotaurina		44 ± 1

Como el valor de ΔH^\ddagger experimental está asociado a la constante α que aparece en la ecuación 4.19, ese valor de ΔH^\ddagger es suma de las entalpías asociadas a las constantes que engloba α (ecuación 4.25).

$$\alpha = k_{\text{Nit}} K_M K_{\text{II}} \quad \text{donde } K_M = K_2 K_3 K_a \quad 4.19$$

$$\Delta H_{\text{e.l.}}^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta H_m - \Delta H_a \quad 4.25$$

donde:

$\Delta H_{\text{e.l.}}^\ddagger$ es la entalpía asociada a la etapa limitante.

ΔH^\ddagger es la entalpía obtenida experimentalmente.

ΔH_M es la entalpía asociada al proceso de Markovits.

ΔH_a es la entalpía asociada al proceso de protonación de la amina.

²⁵¹ García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Polyhedron* **2003**, 22, 1059.

Como para la reacción de nitrosación de taurina $\Delta H^\ddagger = 55 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H_M = 5,9 \pm 0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ²⁵² y $\Delta H_a = 41,5 \text{ kJ mol}^{-1}$,²⁵³ para la entalpía de activación asociada a la etapa limitante se obtuvo $\Delta H_{e.l}^\ddagger = 8 \text{ kJ mol}^{-1}$, que se encuentra dentro del margen de valores asociados a procesos controlados por difusión ($0\text{-}20 \text{ kJ mol}^{-1}$).²⁵⁴

4.1.10. Caracterización de los productos de nitrosación

Para concluir el estudio de la nitrosación de taurina y homotaurina se procedió a identificar los productos de reacción de ambas nitrosaciones. Se realizaron espectros de masas de diferentes muestras de cada nitrosación.

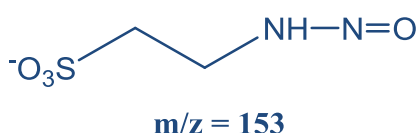


Figura 4.16. N-Nitrosotaurina

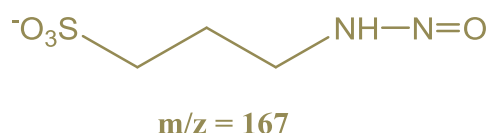


Figura 4.17. N-Nitrosohomotaurina

Como muestra la Figura 4.23 y la Figura 4.24, en la nitrosación de taurina y homotaurina, en lugar de detectarse los previsible productos de nitrosación primarios (Figura 4.16 y Figura 4.17), se observaron señales cuya m/z coincide con la masa de la 1,2-etanosultona (ES) y la 1,3-propanosultona (PS), respectivamente (Figura 4.18 y Figura 4.19, respectivamente). Estos resultados son coherentes con los encontrados previamente en nuestro grupo al investigar la nitrosación de aminoácidos carboxílicos con grupo -NH₂.²⁵⁵

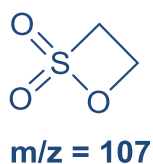


Figura 4.18. Estructura de 1,2-etanosultona

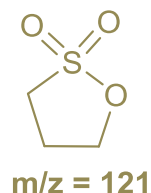


Figura 4.19 estructura de 1,3-propanosultona

²⁵² Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; López-Quintela, A.; Mosquera, M. *Monatsh. Chem.* **1983**, *114*, 639.

²⁵³ Hamborg, E. S.; Niederer, J. P. M.; Versteeg, G. V. *J. Chem. Eng. Data* **2007**, *52*, 2491.

²⁵⁴ Williams, D. L. H. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* Elsevier Applied Science, Amsterdam, 2004.

²⁵⁵ a) García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177.

b) García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7506.

A su vez estas sultonas se hidrolizan fácilmente en medio acuoso²⁵⁶ al correspondiente hidroxíacido, ácido 2-hidroxietano sulfónico o ácido isetiónico (AIT) en el caso de la ES y ácido 3-hidroxiopropano sulfónico (AHPS) en el de la PS.

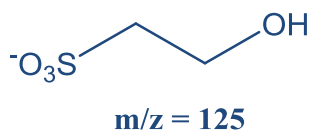


Figura 4.20. Estructura del ácido isetiónico.

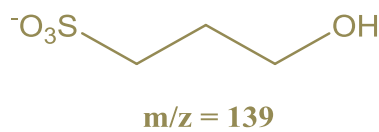


Figura 4.21. Estructura del ácido 3-hidroxiopropano sulfónico.

El pico de estos compuestos también se encontró en los espectrogramas de masas (ver Figura 4.22 y Figura 4.23).

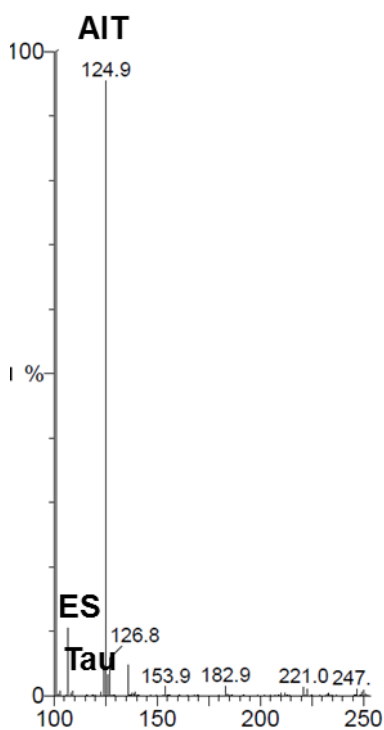


Figura 4.22. Espectrograma de masas en modo negativo de una mezcla de nitrosación de taurina en medio ácido.

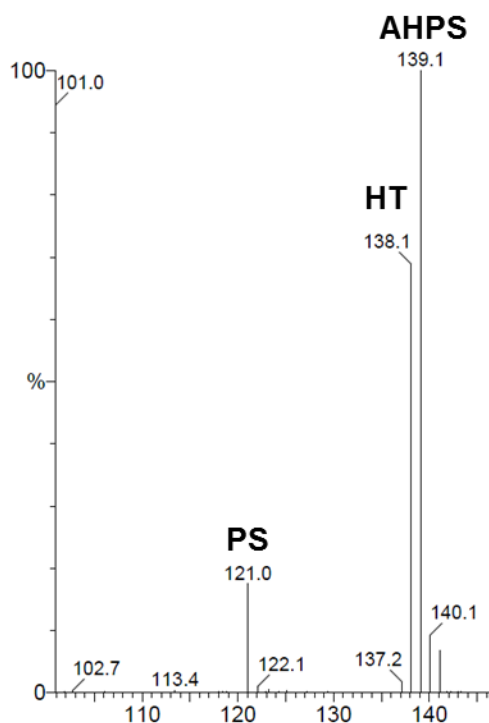
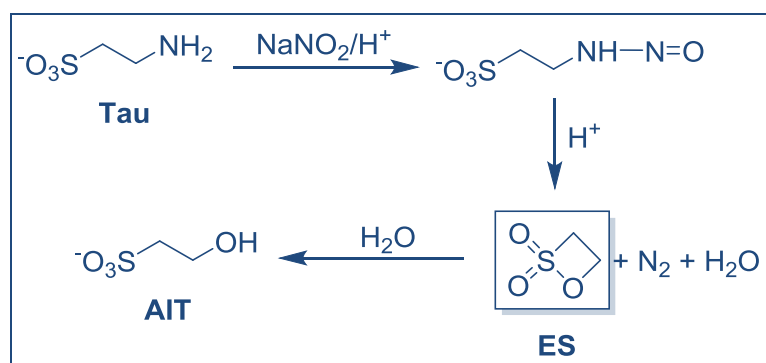


Figura 4.23. Espectrograma de masas en modo negativo de una mezcla de nitrosación de homotaurina en medio ácido.

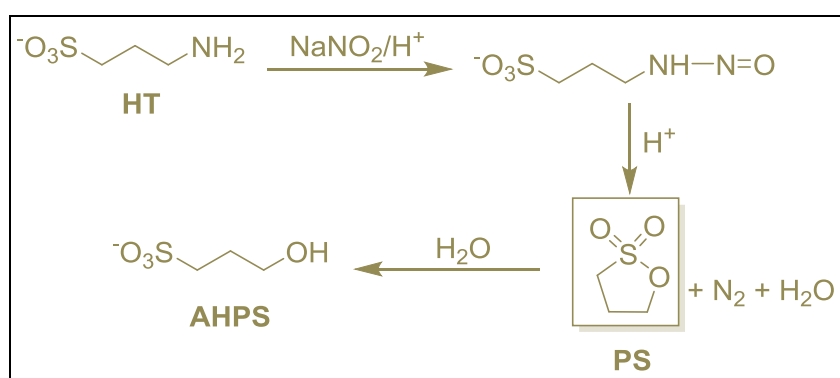
Estos resultados condujeron a la propuesta del mecanismo que muestran el Esquema 4.2 y el Esquema 4.3 para la evolución de los nitrosocompuestos formados

²⁵⁶ Osterman-Golkar, S.; Wachtmeister, C. E. *Chem.-Biol. Interact.* **1976**, *14*, 195.

en la nitrosación de taurina y homotaurina, respectivamente.



Esquema 4.2. Evolución del producto de nitrosación de taurina.

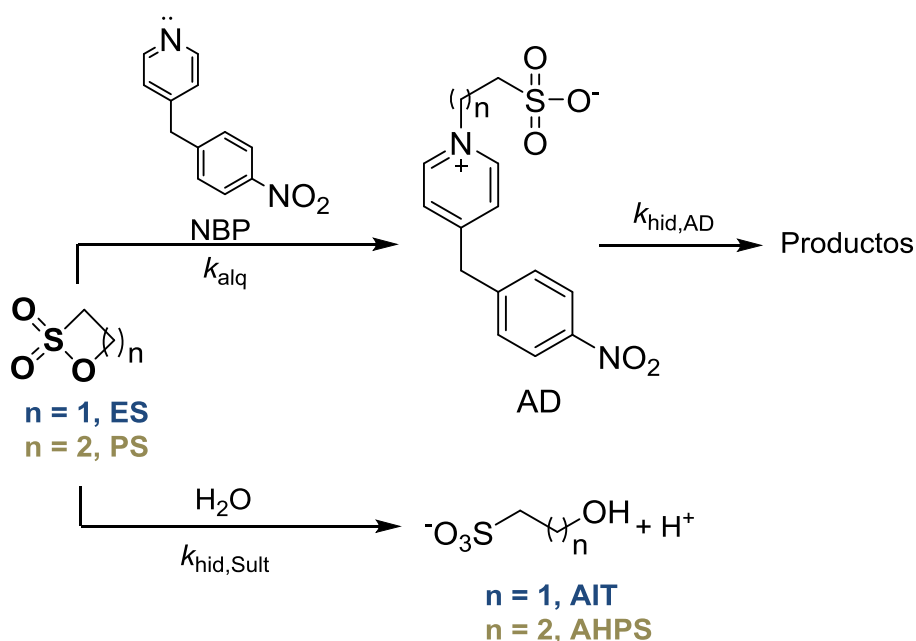


Esquema 4.3. Evolución del producto de nitrosación de homotaurina.

4.2. Estudio de la capacidad alquilante de la 1,2-etanosultona y 1,3-propanosultona.

4.2.1. Mecanismo de alquilación

Como se ha visto en el capítulo 3.3.2, los aductos formados por la NBP con las sultonas resultantes de las reacciones de nitrosación de los ácidos aminoalcano sulfónicos se hidrolizan en el medio de trabajo. Como las sultonas también se hidrolizan, a la hora de estudiar su capacidad alquilante, estas hidrólisis deben incluirse en el mecanismo general (véase Esquema 4.4).



Esquema 4.4. Mecanismo de reacciones consecutivas para la alquilación de NBP por ES y PS

Sobre la base de este mecanismo, la ecuación de velocidad para la variación de concentración de aducto es:

$$v = \frac{d}{dt}([AD]) = k_{\text{alq}}[NBP][Sult] - k_{\text{hid,AD}}[H_2O][AD] \quad 4.26$$

y para la desaparición de sultona:

$$v = -\frac{d}{dt}([\text{Sult}]) = k_{\text{alq}}[\text{NBP}][\text{Sult}] - k_{\text{hid,Sult}}[\text{H}_2\text{O}][\text{Sult}] \quad 4.27$$

La integración de la ecuación 4.27 (trabajando con exceso de NBP) conduce a:

$$[\text{Sult}] = [\text{Sult}]_0 \left(e^{-(k'_{\text{alq}} + k'_{\text{hid,Sult}})t} \right) \quad 4.28$$

donde, $k'_{\text{hid,Sult}} = k_{\text{hid,Sult}}[\text{H}_2\text{O}] \quad 4.29$

$$k'_{\text{alq}} = k_{\text{alq}}[\text{NBP}] \quad 4.30$$

La sustitución en la ecuación 4.26 del término [Sult] (expresión 4.28) conduce a la ecuación 4.31.

$$v = \frac{d}{dt}([\text{AD}]) = k'_{\text{alq}}[\text{Sult}]_0 \left(e^{-(k'_{\text{alq}} + k'_{\text{hid,Sult}})t} \right) - k'_{\text{hid,AD}}[\text{AD}] \quad 4.31$$

donde, $k'_{\text{hid,AD}} = k_{\text{hid,AD}}[\text{H}_2\text{O}] \quad 4.32$

La integración de 4.31 y paso de concentración de aducto a absorbancia (ley de Lambert-Beer), conduce a la expresión 4.33 que relaciona la absorbancia con el tiempo (ϵ_{ap} es el coeficiente de absorción molar del aducto y l es el paso óptico de la cubeta):

$$A_{\text{AD}} = \frac{c}{b-a} \left(e^{-at} - e^{-bt} \right) \quad 4.33$$

donde, $b = k'_{\text{hid,AD}} \quad 4.34$

$$a = k_{\text{alq}}[\text{NBP}] + k'_{\text{hid,Sult}} \quad 4.35$$

$$c = \epsilon_{\text{AD}} l [\text{Sult}]_0 k_{\text{alq}}[\text{NBP}] \quad 4.36$$

Experimentalmente se ha comprobado que, concluida la reacción, se observa una absorbancia final constante y distinta de cero, lo que significa que alguno de los productos finales absorbe en la longitud de onda de medida. Por ello la absorbancia que se mide (A_T) es la suma de la absorbancia del aducto y la de dicho producto final (A_{PF}).

$$A_T = A_{AD} + A_{PF} \quad 4.37$$

Por ello, a la ecuación 4.33 se le ha añadido un término que contempla esta contribución.

$$A_T = \frac{c}{b-a} (e^{-at} - e^{-bt}) + D \quad 4.38$$

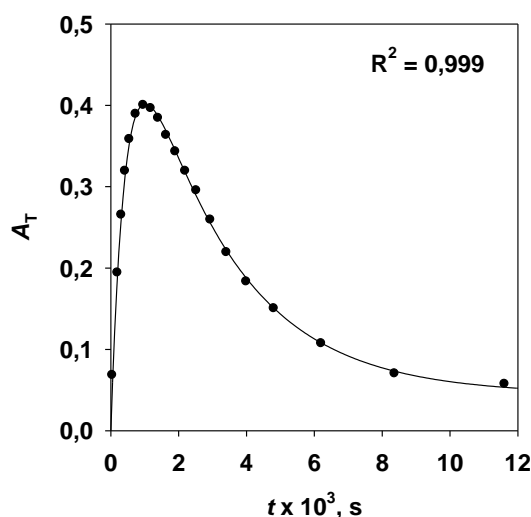


Figura 4.24. Ajuste de los datos de absorbancia del aducto ES-NBP a lo largo del tiempo a la ecuación 4.32. $[NBP]_0 = 0,012$ M; pH = 5,40; $T = 20,0$ °C; $t_{Nit} = 15$ min; $\lambda = 541$ nm; 7:3 (agua/dioxano).

La Figura 4.24 muestra el buen ajuste de los datos a la ecuación 4.38, lo que apoya el mecanismo propuesto.

Con estos ajustes se obtienen los valores de los parámetros a , b y c (ver ecuación 4.33) que van a permitir el cálculo de las constantes de alquilación, hidrólisis de la sultona e hidrólisis del aducto.

4.2.2. Orden de reacción respecto a la concentración de NBP

Para conocer el orden de reacción respecto a la concentración de NBP se realizaron diferentes experimentos en los que se varió su concentración inicial, mantenidas fijas el resto de variables.

La ecuación 4.39 (véase ecuación 4.33) conduce inmediatamente a la 4.40 (como se trabajó en exceso de NBP, $[NBP] = [NBP]_0$).

$$c = \varepsilon_{AD} / [Sult]_0 k_{alq} [NBP]_0^n \quad 4.39$$

$$\ln c = \ln(\varepsilon_{AD} / [Sult]_0 k_{alq}) + n \ln([NBP]_0) \quad 4.40$$

Ajustados a la ecuación 4.38 los valores absorbancia/tiempo, se obtuvo un valor de c para cada experimento.

1,2-etanosultona

Tabla 4.12. Variación de c con $[NBP]_0$ en la alquilación de NBP por ES; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 5,40$; $t_{\text{Nit}} = 15 \text{ min}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$10^3 \cdot c, \text{ s}^{-1}$	$[NBP]_0, \text{ M}$
0,22	0,0012
0,40	0,0020
1,13	0,0060
1,53	0,0080
1,86	0,0100
1,94	0,0120
2,36	0,0140
2,82	0,0160
3,03	0,0180
3,39	0,0200

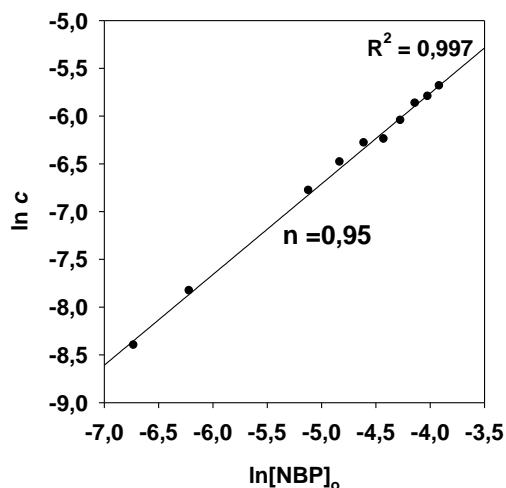


Figura 4.25. Variación de $\ln c$ con $\ln [NBP]_0$ en la alquilación de NBP por ES; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 5,40$; $t_{\text{Nit}} = 15 \text{ min}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

Orden con respecto a $[NBP]_0 = 1$

Los valores de c obtenidos para las distintas $[\text{NBP}]_o$ y su representación gráfica con el ajuste a la ecuación 4.40 se encuentran en la Tabla 4.12 y la Figura 4.25 para la alquilación con ES y en la Tabla 4.13 y la Figura 4.26 para alquilación con PS.

1,3-propanosultona

Tabla 4.13. Variación de c con $[\text{NBP}]_o$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[\text{PS}]_o = 10^{-4} \text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$10^5 \cdot c, \text{ s}^{-1}$	$[\text{NBP}]_o, \text{ M}$
2,66	0,0095
2,98	0,0110
3,43	0,0125
3,77	0,0140
4,25	0,0155
4,64	0,0170
5,01	0,0185
5,31	0,0200

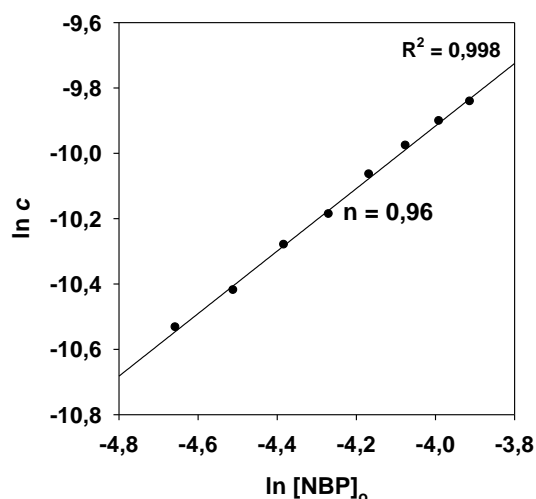


Figura 4.26. Variación de $\ln c$ con $\ln [\text{NBP}]_o$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[\text{PS}]_o = 10^{-4} \text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

Orden con respecto a $[\text{NBP}]_o = 1$

4.2.3. Orden de reacción respecto a la concentración de sultona

Para conocer el orden respecto a la concentración de sultona se procedió de igual forma que con el orden respecto a la concentración de NBP. Se obtuvieron los valores del parámetro c para alquilaciones que sólo diferían entre sí en la concentración de sultona, y del ajuste de los datos $c/[\text{Sult}]_o$ a la ecuación 4.42, se encontró el orden.

$$c = \varepsilon_{AD} / [\text{Sult}]_o^m k_{\text{alq}} [\text{NBP}]_o \quad 4.41$$

$$\ln c = \ln(\varepsilon_{AD} / k_{\text{alq}} [\text{NBP}]_o) + m \ln([\text{Sult}]_o) \quad 4.42$$

Como la concentración inicial de 1,2-etanosultona no es conocida (cf. 3.3.3.1), no se pudo determinar el orden de reacción respecto a su concentración. Sí fue posible con la 1,3-propanosultona.

En la Tabla 4.14 se encuentran los valores de c para cada $[PS]_0$. La Figura 4.27 ilustra el ajuste a la ecuación 4.42.

1,3-propanosultona

Tabla 4.14. Variación de c con $[PS]_0$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5\text{ °C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[NBP]_0 = 0,020\text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$10^5 \cdot c, \text{ s}^{-1}$	$10^4 \cdot [PS]_0, \text{ M}$
2,59	0,60
4,07	0,80
5,31	1,00
6,89	1,20
6,91	1,40
8,40	1,60
9,83	1,80
10,00	2,00

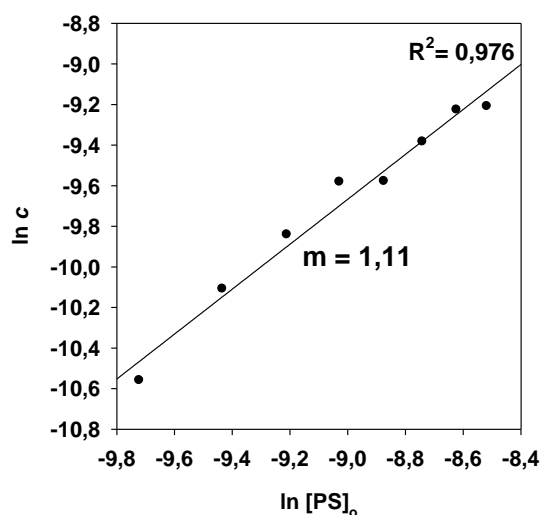


Figura 4.27. Variación de $\ln c$ con $\ln [PS]_0$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5\text{ °C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[NBP]_0 = 0,020\text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

Orden con respecto a $[PS]_0 = 1$

El orden respecto a la concentración de 1,3-propanosultona es también unitario. Estos resultados son coherentes con el mecanismo propuesto.

Aunque no se haya podido confirmar el orden 1 respecto a la concentración de 1,2-etanosultona, probablemente sea también la unidad, puesto que tiene una estructura muy similar a la 1,3-propanosultona y los datos se han ajustado muy bien al modelo de reacción propuesto.

4.2.4. Coeficiente de absorción molar

El valor del coeficiente de absorción molar del aducto, ϵ_{AD} , se puede calcular con los valores del parámetro c del ajuste y de la constante de alquilación, k_{alq} , de la NBP.

Con experimentos en los que se varió la concentración inicial de NBP se obtuvieron los valores de los parámetros a y c para cada experimento (ecuación 4.33). Con el valor de a se puede calcular fácilmente el de k_{alq} a partir del ajuste de datos $a/[NBP]_0$ a la ecuación 4.35. Con el valor de k_{alq} se obtiene el coeficiente de absorción molar del aducto a partir de la de la pendiente (ecuación 4.43) obtenida del ajuste de los valores de c a la ecuación 4.36.

$$a = k_{alq} [NBP] + k'_{Hid,Sult} \quad 4.35$$

$$c = \epsilon_{AD} / [Sult]_0 k_{alq} [NBP] = \text{pendiente} [NBP] \quad 4.36$$

$$\epsilon_{AD} = \frac{\text{pendiente}}{[Sult]_0 k_{alq}} \quad 4.43$$

Por las razones apuntadas (cf. 3.3.3.1), no se pudo calcular el valor del ϵ_{AD} para el aducto ES-NBP.

En la Tabla 4.15 están recogidos los valores de a y c obtenidos para distintos valores de $[NBP]_0$, así como el ajuste de los datos a las ecuaciones 4.35 (Figura 4.28) y 4.36 (Figura 4.29).

1,3-propanosultona

Tabla 4.15. Variación de a y c con $[\text{NBP}]_0$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5\text{ °C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$10^5 \cdot c, \text{ s}^{-1}$	$10^5 \cdot a, \text{ s}^{-1}$	$[\text{NBP}]_0, \text{ M}$
2,66	5,40	0,0095
3,77	5,78	0,0140
4,25	5,94	0,0155
5,01	6,20	0,0185
5,31	6,32	0,0200
2,98	5,70	0,0108
3,43	5,77	0,0110
4,64	5,89	0,0125
3,14	6,25	0,0170

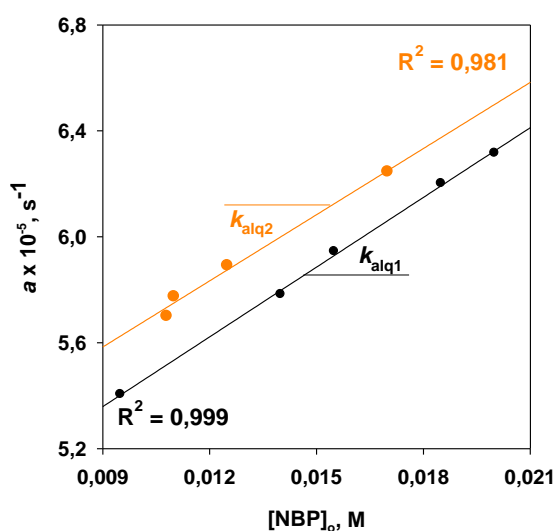


Figura 4.28. Variación de a con $[\text{NBP}]_0$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5\text{ °C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$k_{\text{alq1}} = (8,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{alq2}} = (8,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{\text{alq,media}} = (8,60 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

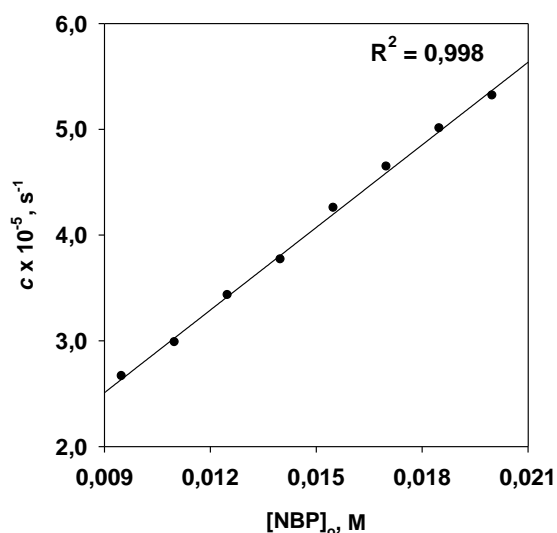


Figura 4.29. Variación de c con $[\text{NBP}]_0$ en la alquilación de NBP por PS; $T = 37,5\text{ °C}$; $\text{pH} = 7,10$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$\text{pendiente} = 2,6 \cdot 10^{-3}, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{AD}} = (3,0 \pm 0,3) \cdot 10^4, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Es de notar que, aunque el valor del coeficiente de absorción molar del aducto PS-NBP ($\epsilon_{AD} = 3,0 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es del mismo orden de magnitud que el de otros aductos estudiados en nuestro grupo hay diferencias apreciables entre ellos (Tabla 4.16). Ello implica que manejar los valores de ϵ_{AD} calculados para un aducto cuando se trabaja con otros aductos distintos (en algunas investigaciones así se ha hecho²⁶²) puede acarrear errores apreciables.

Tabla 4.16. Valores de ϵ_{AD} de los aductos de agentes alquilantes con la NBP (AA-NBP); $T = 37,5$ °C; pH = 7,0; medio 7:3 (agua/dioxano).

Agente alquilante	$10^{-4} \cdot \epsilon_{AD},$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Óxido de propileno ²⁵⁷	$2,6 \pm 0,1$
1,2-epoxibutano ²⁵⁷	$2,2 \pm 0,1$
Acrilamida ²⁵⁸	$0,54 \pm 0,02$
Acrlonitrilo ²⁵⁹	$0,45 \pm 0,02$
Óxido de estireno, α ²⁶⁰	$4,0 \pm 0,8$
Óxido de estireno, β ²⁶⁰	$0,8 \pm 0,1$
1,4-dinitro-2-metilpirrol ²⁶¹	$1,14 \pm 0,01$
PS	$3,0 \pm 0,3$

4.2.5. Estudio de las reacciones implicadas en el proceso de alquilación: Influencia de la temperatura

Como se ha descrito en el apartado 4.2.1, al proceso de alquilación de la NBP por ES y PS lo acompañan las reacciones de hidrólisis de las sultonas y de los correspondientes aductos.

²⁵⁷ González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Arenas-Valgañón, J.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2755.

²⁵⁸ Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.*, **2010**, *23*, 171-175.

²⁵⁹ Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; González-Jiménez, M.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **2012**, *143*, 723.

²⁶⁰ González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Arenas-Valgañón, J.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, *27*, 1853.

²⁶¹ Pérez Prior, M. T.; Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Manso, J. A.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 1444.

²⁶² Deneer, J. W.; Sinnige, T. L.; Seinen, W.; Hermens, J. L. M. *Aquat. Toxicol.* **1998**, *13*, 195.

Como en muchos casos no se pueden alcanzar conclusiones sobre la posible carcinogenicidad de una molécula sin saber si es estable o si sus daños en el ADN son permanentes (es decir, si los aductos del compuesto con el ADN son estables), en este trabajo también se han investigado las reacciones de hidrólisis implicadas en el mecanismo de alquilación. Como parámetro de referencia se han utilizado las constantes de velocidad. Para conocer los parámetros termodinámicos de activación se han hecho experimentos a diferentes temperaturas.

Para conocer las constantes de velocidad de esas reacciones basta con ajustar los datos absorbancia/tiempo a la ecuación 4.38 y obtener los valores de los parámetros a , b y c . El valor del b coincide con el de la constante de hidrólisis del aducto, y con c se puede calcular la constante de alquilación; conocida ésta, con el valor del parámetro a se puede calcular el de la constante de hidrólisis del aducto.

$$b = k'_{\text{hid,AD}} \quad 4.34$$

$$a = k_{\text{alq}} [\text{NBP}] + k'_{\text{hid,Sult}} \quad 4.35$$

$$c = \epsilon_{\text{AD}} / [\text{Sult}]_0 k_{\text{alq}} [\text{NBP}] \quad 4.36$$

El cálculo de las constantes para la PS se hizo trabajando a $\text{pH} = 7$, en busca de un acercamiento biomimético a las condiciones del entorno celular. En el caso de la ES, como su aducto con la NBP se descompone rápidamente a ese pH , el estudio se hizo a $\text{pH} = 5,4$.

Determinación de las constantes de la alquilación e hidrólisis para la ES

En el caso de la 1,2-etanosultona, conocer las constantes de alquilación y de hidrólisis no es tan directo puesto que, como no se conoce su concentración inicial, no se puede calcular su coeficiente de absorción y, por tanto, no puede usarse el parámetro c para calcular k_{alq} . Por ello, hay que realizar experimentos con distinta concentración inicial de NBP, obtener el valor de a para cada uno de ellos y después representar los datos de a (ecuación 4.35) frente a los de $[\text{NBP}]_0$ (como para el cálculo de ϵ_{AD}). De la pendiente de ese ajuste se obtiene k_{alq} y de la ordenada en el origen $k'_{\text{hid,ES}}$.

A modo de ejemplo en la Tabla 4.17 se encuentran los datos del parámetro a obtenidos para cada valor de $[\text{NBP}]_0$ y en la Figura 4.30 su representación y ajuste a la ecuación 4.35.

Tabla 4.17. Variación de a con $[\text{NBP}]_0$ en la alquilación de NBP por ES; $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 5,40$; $t_{\text{Nit}} = 15\text{ min}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$10^3 \cdot a, \text{ s}^{-1}$	$[\text{NBP}]_0, \text{ M}$
2,04	0,0100
2,52	0,0120
2,84	0,0140
3,01	0,0160
3,53	0,0200

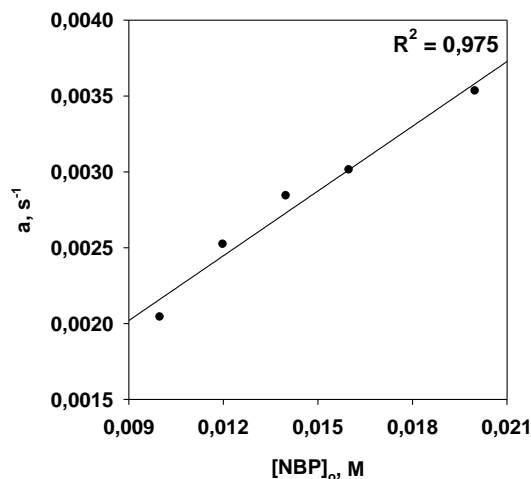


Figura 4.30. Variación de a con $[\text{NBP}]_0$ en la alquilación de NBP por ES; $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 5,40$; $t_{\text{Nit}} = 15\text{ min}$; medio 7:3 (agua/dioxano).

Así se han obtenido los valores $k_{\text{alq}} = 0,14 \pm 0,01\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $k'_{\text{hid,ES}} = (7 \pm 2) \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ($k_{\text{hid,ES}} = (1,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-5}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) para la ES a $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 5,4$.

4.2.5.1. Estudio de la reacción de alquilación

Para estudiar esta reacción se determinó el valor de la constante de alquilación de las dos sultonas (capítulo 4.2.5) a diferentes temperaturas y se calculó el valor de los parámetros termodinámicos de activación (cf. 4.1.9).

Los valores de k_{alq} en función de la temperatura y su ajuste a las ecuaciones linealizadas de Arrhenius y Eyring-Wynne-Jones se encuentran en la Tabla 4.18, Figura 4.31 y Figura 4.32 para ES y en la Tabla 4.19, Figura 4.33 y Figura 4.34 para PS.

1,2-etanosultona

Tabla 4.18. Influencia de la temperatura en la k_{alq} de la ES; $t_{Nit} = 15$ min; $[NBP]_o = 0,010-0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ C$	$10^3 \cdot 1/T, K^{-1}$	$k_{alq}, M^{-1} s^{-1}$	$-\ln k_{alq}$	$-\ln (k_{alq}/T)$
15,0	3,47	$0,109 \pm 0,005$	2,2210	7,8845
17,5	3,44	$0,12 \pm 0,01$	2,1244	7,7966
20,0	3,41	$0,126 \pm 0,005$	2,0715	7,7522
22,5	3,38	$0,13 \pm 0,01$	2,0394	7,7286
25,0	3,35	$0,14 \pm 0,01$	1,9519	7,6495

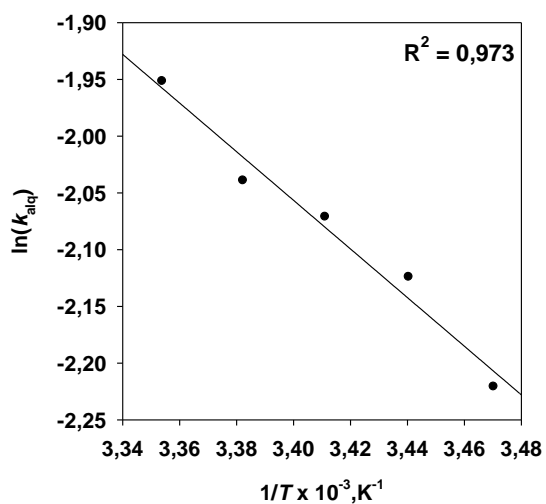


Figura 4.31. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental k_{alq} ; $t_{Nit} = 15$ min; $[NBP]_o = 0,010-0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

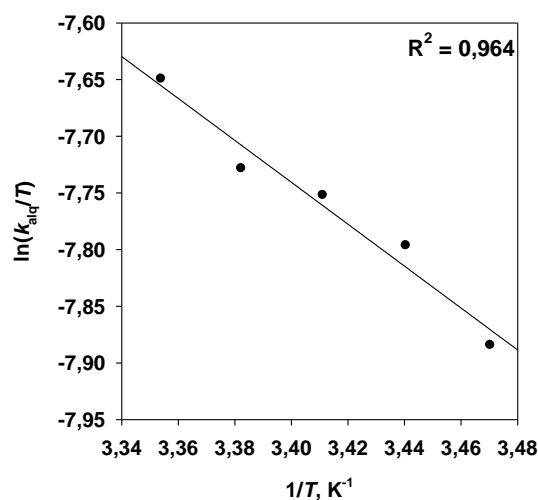


Figura 4.32. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental k_{alq} ; $t_{Nit} = 15$ min; $[NBP]_o = 0,010-0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,alq} = 18 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger_{alq} = 15 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta S^\ddagger_{alq} = -210 \pm 6 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

1,3-propanosultona

Tabla 4.19. Influencia de la temperatura en la k_{alq} de la PS; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^4 \cdot k_{\text{alq}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{alq}}$	$-\ln (k_{\text{alq}}/T)$
25,0	3,35	$3,4 \pm 0,4$	7,9792	13,6768
27,5	3,33	$4,2 \pm 0,4$	7,7817	13,4877
30,0	3,30	$5,1 \pm 0,4$	7,5817	13,2997
32,5	3,27	$6,7 \pm 0,3$	7,3143	13,0367
35,0	3,24	$7,4 \pm 0,4$	7,2042	12,9348
37,5	3,22	$8,9 \pm 0,4$	7,0283	12,7667
42,5	3,17	$10,1 \pm 0,3$	6,9016	12,6563

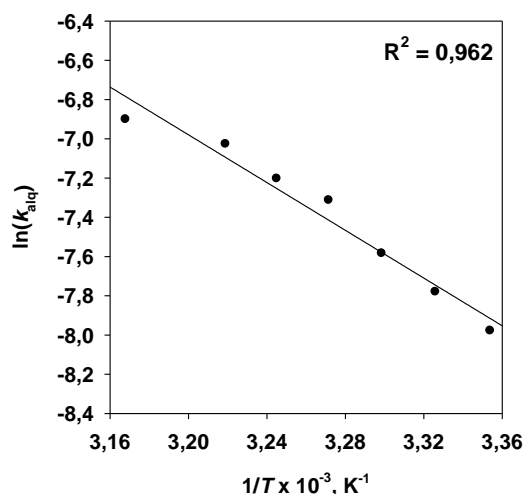


Figura 4.33. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental k_{alq} ; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

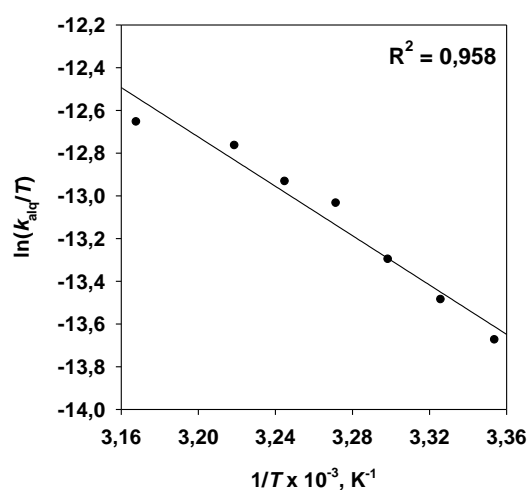


Figura 4.34. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental k_{alq} ; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,\text{alq}} = 51 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger_{\text{alq}} = 48 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta S^\ddagger_{\text{alq}} = -150 \pm 15 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

4.2.5.1. Estudio de la reacciones de hidrólisis de la sultonas

El estudio de la reacción de hidrólisis de estas sultonas se hizo de manera análoga al de la reacción de alquilación. Se calcularon los valores de las constantes de

velocidad a diferentes temperaturas (cf. 4.2.5) y los parámetros de activación.

1,2-etanosultona

Tabla 4.20. Influencia de la temperatura en la $k_{\text{hid,ES}}$; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^5 \cdot k_{\text{hid,ES}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{hid,ES}}$	$-\ln (k_{\text{hid,ES}}/T)$
15,0	3,47	$0,9 \pm 0,4$	11,6182	17,2817
17,5	3,44	$1,1 \pm 0,4$	11,4430	17,1152
20,0	3,41	$1,4 \pm 0,5$	11,1790	16,8597
22,5	3,38	$1,6 \pm 0,5$	11,0317	16,7209
25,0	3,35	$1,9 \pm 0,5$	10,8641	16,5617

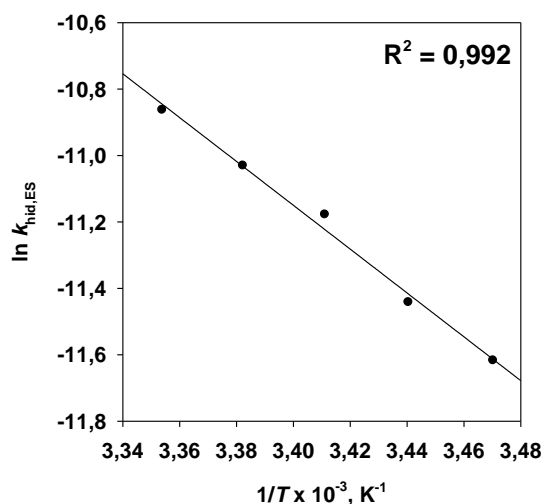


Figura 4.35. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental $k_{\text{hid,ES}}$; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

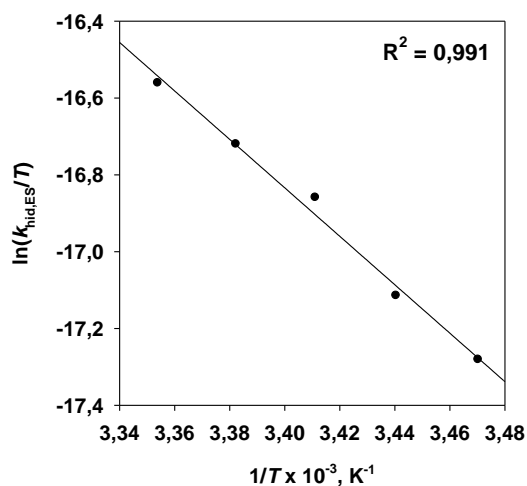


Figura 4.36. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental $k_{\text{hid,ES}}$; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,\text{hid,ES}} = 55 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H_{\text{hid,ES}}^\ddagger = 52 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta S_{\text{hid,ES}}^\ddagger = -159 \pm 10 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

1,3-propanosultona

Tabla 4.21. Influencia de la temperatura en la $k_{\text{hid,PS}}$; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^6 \cdot k_{\text{hid,PS}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{hid,PS}}$	$-\ln (k_{\text{hid,PS}}/T)$
25,0	3,35	$0,41 \pm 0,03$	14,6959	20,3935
27,5	3,33	$0,56 \pm 0,03$	14,3982	20,1042
30,0	3,30	$0,77 \pm 0,04$	14,0736	19,7879
35,0	3,24	$1,06 \pm 0,05$	13,7527	19,4833
37,5	3,22	$1,17 \pm 0,06$	13,6599	19,3646
40,0	3,19	$1,50 \pm 0,06$	13,4080	19,1546
42,5	3,17	$2,05 \pm 0,06$	13,0956	18,8502

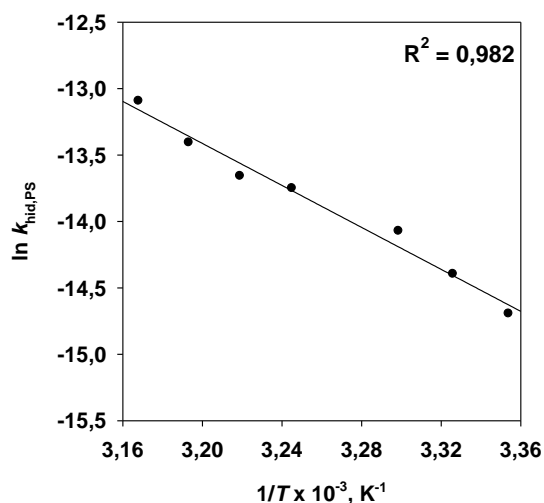


Figura 4.37. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental $k_{\text{hid,PS}}$; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

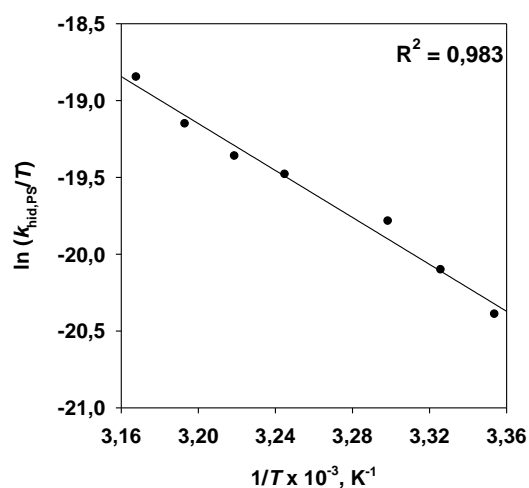


Figura 4.38. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental $k_{\text{hid,PS}}$; $[\text{NBP}]_0 = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,\text{hid,PS}} = 66 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger_{\text{hid,PS}} = 63 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta S^\ddagger_{\text{hid,PS}} = -153 \pm 12 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$$

4.2.5.1. Estudio de la reacciones de hidrólisis de los aductos Sult-NBP

La Tabla 4.22 muestra los resultados obtenidos para la reacción de hidrólisis del aducto NBP-ES. La Figura 4.39 y la Figura 4.40 ilustran su ajuste a las ecuaciones

de Arrhenius y Eyring. La Tabla 4.23, la Figura 4.41 y la Figura 4.42 reflejan los datos obtenidos para el aducto PS-NBP.

1,2-etanosultona

Tabla 4.22. Influencia de la temperatura en la $k_{\text{hid,AD}}$ del aducto ES-NBP; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^6 \cdot k_{\text{hid,AD}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{hid,ES}}$	$-\ln (k_{\text{hid,ES}}/T)$
15,0	3,47	$5,7 \pm 0,1$	12,0734	17,7369
17,5	3,44	$7,8 \pm 0,3$	11,7657	17,4378
20,0	3,41	$10,7 \pm 0,3$	11,3713	17,0520
22,5	3,38	$16,2 \pm 0,8$	11,0317	16,7209
25,0	3,35	25 ± 1	10,5978	16,2954

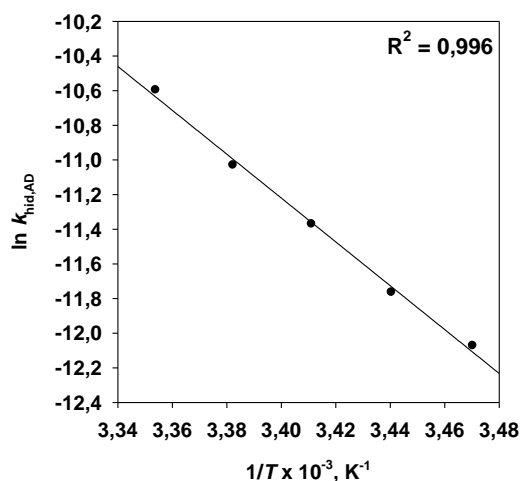


Figura 4.39. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental $k_{\text{hid,AD}}$; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

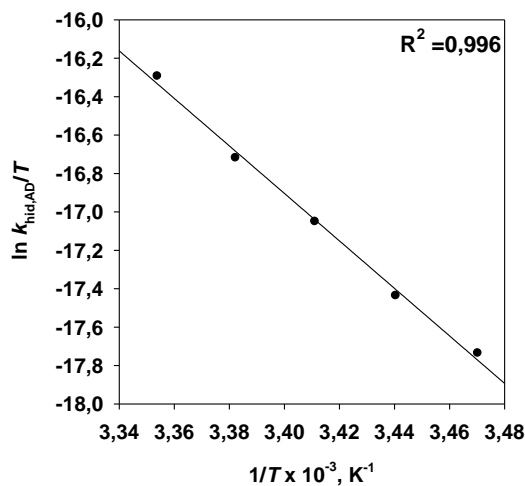


Figura 4.40. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental $k_{\text{hid,AD}}$; $t_{\text{Nit}} = 15$ min; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020$ M; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,\text{hid,AD}} = 105 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H^\ddagger_{\text{hid,AD}} = 103 \pm 4 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}.$$

1,3-propanosultona

Tabla 4.23. Influencia de la temperatura en la $k_{\text{hid,AD}}$ del aducto PS -NBP; $[\text{NBP}]_o = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_o = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^\circ\text{C}$	$10^3 \cdot 1/T, \text{K}^{-1}$	$10^8 \cdot k_{\text{hid,AD}}, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$-\ln k_{\text{hid,AD}}$	$-\ln (k_{\text{hid,AD}}/T)$
25,0	3,35	$4,1 \pm 0,2$	17,0168	22,7144
27,5	3,33	$5,9 \pm 0,3$	16,6442	22,3502
30,0	3,30	$9,5 \pm 0,6$	16,1652	21,8794
35,0	3,24	16 ± 1	15,6335	21,3641
37,5	3,22	20 ± 1	15,4137	21,1524
40,0	3,19	23 ± 1	15,2640	21,0107
42,5	3,17	32 ± 2	14,9541	20,7087

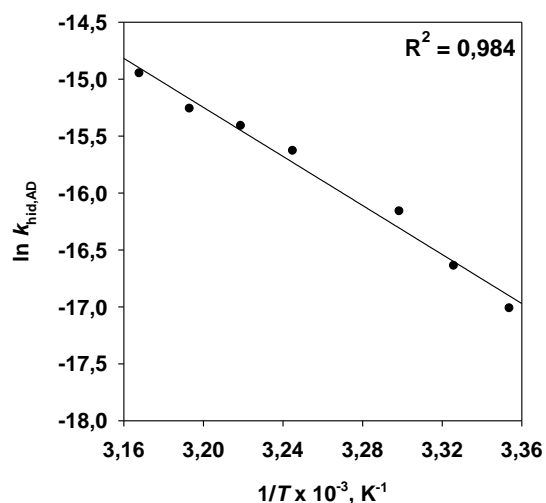


Figura 4.41. Diagrama de Arrhenius para la constante experimental $k_{\text{hid,AD}}$; $[\text{NBP}]_o = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_o = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

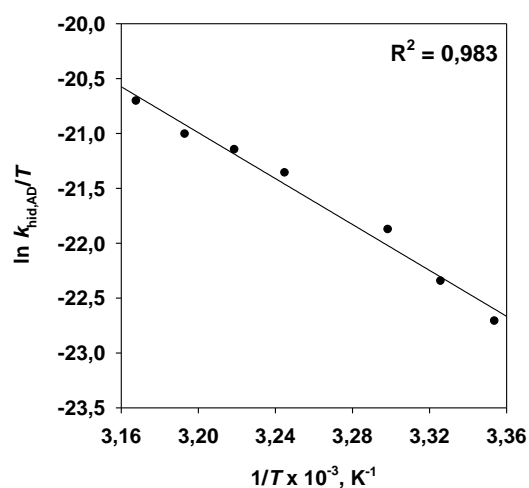


Figura 4.42. Diagrama de Eyring-Wynne-Jones para la constante experimental $k_{\text{hid,AD}}$; $[\text{NBP}]_o = 0,020 \text{ M}$; $[\text{PS}]_o = 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 7,11$; medio 7:3 (agua/dioxano).

$$E_{a,\text{hid,AD}} = 89 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}; \Delta H_{\text{hid,AD}}^\ddagger = 87 \pm 5 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}.$$

4.2.5.1. Discusión

Como muestran la Tabla 4.24 y la Tabla 4.25, los valores de la constante de velocidad de alquilación de la NBP por 1,2-etanosultona –resultante de la nitrosación

de taurina— son mucho mayores que los de la 1,3-propanosultona formada en la nitrosación de homotaurina. Como los valores de esas constantes se obtuvieron a diferentes valores de pH (pH = 5,4 para la ES y pH = 7,1 para la PS), se hizo un experimento con PS a pH = 5,4 y $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, para poder comparar los valores de la constante de alquilación a una misma temperatura. Se obtuvo el valor $k_{\text{alq}} = 1,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ para la PS, casi mil veces más pequeño que el obtenido con la ES; $k_{\text{alq}} = 0,14\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$. Naturalmente, estos resultados son coherentes con los valores de los respectivos parámetros de activación (Tabla 4.26).

Tabla 4.24. Valores de las constantes de velocidad de alquilación en función de T para la ES; $t_{\text{Nit}} = 15\text{ min}$; $[\text{NBP}]_0 = 0,010\text{-}0,020\text{ M}$; pH = 5,40; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^{\circ}\text{C}$	$k_{\text{alq}}, \text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
15,0	0,109
17,5	0,12
20,0	0,126
22,5	0,13
25,0	0,14

Tabla 4.25. Valores de las constantes de velocidad de alquilación en función de T para la PS; $[\text{NBP}]_0 = 0,020\text{ M}$; $[\text{PS}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$; pH = 7,11; medio 7:3 (agua/dioxano).

$T, ^{\circ}\text{C}$	$10^4 \cdot k_{\text{alq}}, \text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$
25,0	3,4
27,5	4,2
30,0	5,1
32,5	6,7
35,0	7,4
37,5	8,9
42,5	10,1

Los valores de los parámetros de activación mostrados en la Tabla 4.26 reflejan que la reactividad de las sultonas en sus reacciones de hidrólisis parece estar controlada entálpicamente.

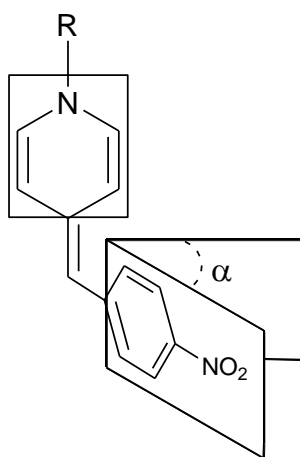
Tabla 4.26. Parámetros de activación en las reacciones de hidrólisis de las sultonas formadas en la nitrosación de taurina y homotaurina.

Agente alquilante	$\Delta^{\ddagger}H^{\circ}, \text{kJ mol}^{-1}$	$-\Delta^{\ddagger}S^{\circ}, \text{J K}^{-1}\text{ mol}^{-1}$	$\Delta^{\ddagger}G^{\circ}, \text{kJ mol}^{-1} (35\text{ }^{\circ}\text{C})$
1,2-etanosultona	52 ± 3	159 ± 10	101 ± 4
1,3-propanosultona	63 ± 4	153 ± 12	110 ± 8

Tabla 4.27. Parámetros de activación en las reacciones de alquilación de NBP por las sultonas formadas en la nitrosación de taurina y homotaurina.

Agente alquilante	$\Delta^\ddagger H^\circ$, kJ mol ⁻¹	$-\Delta^\ddagger S^\circ$, J K ⁻¹ mol ⁻¹	$\Delta^\ddagger G^\circ$, kJ mol ⁻¹ (35 °C)
1,2-etanosultona	15 ± 2	210 ± 6	80 ± 3
1,3-propanosultona	48 ± 4	150 ± 15	94 ± 6

Respecto a las reacciones de alquilación (Tabla 4.27), el menor valor absoluto de la entropía (negativa) de activación en el caso de la 1,3-propanosultona podría atribuirse al menor impedimento estérico del grupo etilo, comparado con el propilo de la PS, lo que implicaría un estado de transición más ordenado en el primer caso (menor pérdida de planaridad de la estructura de la NBP en el proceso de alquilación; Figura 4.43) y, en consecuencia, una entropía de activación mayor en valor absoluto, coherentemente con los resultados observados.

**Figura 4.43.** Pérdida de planaridad en la formación de los aductos NBP-sultonas.

Aspecto significativo de la investigación descrita en páginas anteriores es el de las proyecciones de los resultados cinéticos obtenidos sobre potenciales efectos de mutagenia/carcinogenia asociados a la presencia de taurina/homotaurina en la dieta alimentaria (como se ha indicado en los capítulos 2.1.1 y 2.1.2), la taurina es parte importante de la composición de suplementos alimentarios, bebidas energéticas como la popular *Red Bull*[®], etc.

Como las reacciones de alquilación no transcurren aisladamente, no es inmediato responder a la pregunta ¿qué criterios pueden utilizarse para comparar los

riesgos potenciales de la taurina y homotaurina como sustratos nitrosables susceptibles de desencadenar *in vivo* mecanismos patógenos de alquilación? Una respuesta rápida, pero insuficiente, sería basarse en los valores de la constante de velocidad de alquilación (mucho mayor, como se ha visto, en el caso de la taurina). Los resultados cinéticos muestran claramente que es necesario conjugar los valores de esa constante con los de las reacciones de hidrólisis en cada caso.

Para ello se han manejado dos parámetros de alquilación (véase capítulo 2.6.1.2.2.1): *capacidad alquilante*, f , o fracción de agente alquilante que forma aducto (4.44) y *vida del aducto*, AL, que refleja la supervivencia temporal del mismo (4.45).²⁶³

$$f = \frac{k_{\text{alq}} [\text{NBP}]}{k_{\text{alq}} [\text{NBP}] + k_{\text{hid,Sult}} [\text{H}_2\text{O}]} \quad 4.44$$

$$\text{AL} = \frac{k_{\text{alq}} [\text{NBP}]}{(k_{\text{alq}} [\text{NBP}] + k'_{\text{hid,Sult}}) k'_{\text{hid,AD}}} = \frac{f}{k'_{\text{hid,AD}}} \quad 4.45$$

La Tabla 4.28 y la Tabla 4.29 reflejan los valores de f y AL para las reacciones de alquilación, hidrólisis de sultona e hidrólisis de aducto a diferentes temperaturas.

Los valores de f y AL muestran que, aunque la capacidad alquilante la ES es mayor que la de la PS, la vida de su aducto con la NBP es más corta. Esto significa que la fracción de ES que forma aducto es mucho mayor (entre el doble y el triple) y, por tanto, alquila más cantidad de NBP que la PS. Sin embargo, esto no quiere decir que la ES sea más peligrosa como agente alquilante, porque la vida de sus aductos es más corta que la de los aductos que forma la PS (13,6 min frente a más de dos días; a 25 °C). Si se extrapolan estos resultados al ADN, supone que la ES está mucho menos tiempo unida a las bases nitrogenadas.

²⁶³ a) Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1444.

b) González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Céspedes-Camacho, I. F.; Calle, E.; Casado, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7016.

Tabla 4.28. Parámetros de alquilación para la reacción entre ES y NBP a diferentes temperaturas.

T, °C	f	AL, min
15,0	0,86	64,6
17,5	0,85	47,0
20,0	0,82	30,6
22,5	0,81	20,6
25,0	0,79	13,6
37,5	0,70*	2,0*

*valor extrapolado

Tabla 4.29. Parámetros de alquilación para la reacción entre PS y NBP a diferentes temperaturas.

T, °C	f	AL, min
25,0	0,298	3139
27,5	0,278	2013
30,0	0,252	1135
32,5	0,253	566
37,5	0,274	582
40,0	0,216	394
42,5	0,201	269

La PS está catalogada por la IARC como 2B, es decir, “posible carcinógeno”,²⁶⁴ mientras que en la bibliografía no se ha encontrado nada acerca de la carcinogenicidad de la ES. Por eso, para poder estimar su actividad carcinógena, se han comparado los valores de *f* y AL de la ES con los de otros agentes alquilantes estudiados en nuestro grupo (Tabla 4.30). Se observa que la *f* de la ES es alta y muy parecida a la de la BBL y BPL. Sin embargo, el pequeño valor de AL sugiere que será un agente alquilante menos eficiente que dichas lactonas. Si se compara la ES con la DIK, se observa que tienen valores de AL muy bajos y semejantes; pero como la *f* de la DIK es mucho mayor, ésta última será más eficaz como agente alquilante. Puesto que la DIK es inactiva como carcinógeno, se estima que la ES tampoco mostrará actividad carcinógena.

Tabla 4.30. Parámetros de alquilación de las sultonas estudiadas y algunos compuestos con estructura análoga. *T* = 37,5 °C.

Compuesto	Abreviatura	f	AL, min
β -propiolactona ²⁶⁵	BPL	0,74	estable
β -butirolactona ²⁶⁵	BBL	0,62	estable
Dicetena ²⁶⁶	DIK	1,00	1,2
1,2-etanosultona	ES	0,70	2
1,3-propanosultona	PS	0,27	582

²⁶⁴ IARC, W. G. o. C. C. S. (1999). Reevaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Lyon, France: IARC monograph 71.

²⁶⁵ Manso, J. A., Pérez Prior, M. T., García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 161.

²⁶⁶ Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 1964.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos al investigar las reacciones de nitrosación de los ácidos 2-aminoetano sulfónico (taurina) y 3-aminopropano sulfónico (homotaurina) han conducido a las siguientes conclusiones:

1. La nitrosación de taurina y homotaurina en disoluciones ácidas de nitrito sódico transcurre a través de reacciones de orden uno respecto a la concentración de sustrato y de orden dos respecto a la de nitrito. Esto último sugiere que el agente nitrosante efectivo es el N_2O_3 .

2. La velocidad de la reacción de nitrosación de taurina es máxima a $pH \cong 3,0$ y la de homotaurina en torno a $pH = 3,3$.

3. La reacción de descomposición del HNO_2 no es despreciable frente a la de nitrosación, siendo necesario considerarla en el estudio cinético del proceso global de nitrosación.

4. El orden de magnitud (10^8) de las constantes de velocidad de las reacciones de nitrosación de la taurina y la homotaurina por N_2O_3 y el valor de la entalpía de activación de la nitrosación de taurina (8 kJ mol^{-1}) son propios de mecanismos controlados por difusión.

5. El hecho de que las velocidades de nitrosación de la taurina y la homotaurina son proporcionales al cuadrado de la concentración de nitrito permite prever que la formación *in vivo* de productos de nitrosación aumentará notablemente con el aumento de la concentración de nitratos/nitritos en la dieta alimentaria.

6. Como productos de las reacciones de nitrosación se forman 1,2-etanosultona (nitrosación de taurina) y 1,3-propanosultona (nitrosación de homotaurina), productos potencialmente carcinógenos para el ser humano. Su hidrólisis conduce a la formación de los ácidos 2-hidroxietano sulfónico (isetiónico) y 3-hidroxiopropano sulfónico, respectivamente.

7. La hipoclorhidria estomacal podría aumentar el riesgo de formación de nitrosocompuestos resultantes de la nitrosación de taurina y homotaurina.

De los resultados obtenidos al investigar las reacciones de alquilación del sustrato 4-*p*-nitrobencilpiridina (NBP) por 1,2-etanosultona (ES) y 1,3-propanosultona (PS) se desprenden las siguientes conclusiones:

1. Las reacciones de alquilación de NBP por ES y PS en medio agua/dioxano son de orden uno respecto a la concentraciones de NBP y de sultona.
2. La alquilación de la NBP por las sultonas ocurre a través de un mecanismo de reacciones consecutivas en el que intervienen, además de la alquilación, las reacciones de hidrólisis de las sultonas y del aducto NBP-sultona.
3. La constante de alquilación por ES es mucho mayor que por PS.
4. La constante de hidrólisis de la ES y la del aducto con la NBP-ES son mayores que las correspondientes de PS, es decir, la PS es más estable en disolución acuosa que la ES, y su aducto con la NBP también es más estable.
5. La capacidad alquilante de la ES es 2-3 veces mayor que la de PS, pero su eficacia de alquilación es mucho menor.
6. Las sultonas son, en general, agentes alquilantes menos eficientes que las lactonas análogas.

