



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química física

**Estudio cinético de la alquilación de
nucleósidos y 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP)
por compuestos α,β -insaturados**

TESIS DOCTORAL

Isaac Fabián Céspedes Camacho

– Salamanca, marzo de 2012 –

Memoria presentada por el Graduado Isaac Fabián
Céspedes Camacho para optar al Grado de Doctor

Salamanca, veintitrés de enero de dos mil doce



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química física

JULIO CASADO LINAREJOS, CATEDRÁTICO EMÉRITO DE QUÍMICA FÍSICA, EMILIO CALLE MARTÍN, PROFESOR TITULAR DE QUÍMICA FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y JOSÉ ANTONIO MANSO GARCÍA, INVESTIGADOR POSTDOCTORAL DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER (CSIC-USAL)

CERTIFICAN que la investigación de doctorado *“Estudio cinético de la alquilación de nucleósidos y 4-(p-nitrobencil)piridina (NBP) por compuestos α,β -insaturados”* se ha realizado bajo su dirección en este Departamento por el Graduado en Química don Isaac Fabián Céspedes Camacho.

En los términos establecidos por la normativa reguladora de los Estudios de Tercer Ciclo y Doctorado de la Universidad de Salamanca, se autoriza la presentación de este trabajo como investigación de Tesis Doctoral.

Salamanca, a 23 de enero de dos mil doce

J. Casado Linarejos

E. Calle Martín

J. A. Manso García

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 esos organismos.

El autor de esta Memoria agradece al Ministerio Español de Asuntos Exteriores y de Cooperación, la concesión de una Beca MAEC–AECID para la realización de la Tesis Doctoral.

There are ancient cathedrals which, apart from their consecrated purpose, inspire solemnity and awe. Even the curious visitor speaks of serious things, with hushed voice, and as each whisper reverberates through the vaulted nave, the returning echo seems to bear a message of mystery. The labor of generations of architects and artisans has been forgotten, the scaffolding erected for the toil has long since been removed, their mistakes have been erased, or have become hidden by the dust of centuries. Seeing only the perfection of the completed whole, we are impressed as by some superhuman agency. But sometimes we enter such an edifice that is still partly under construction; then the sound of hammers, the reek of tobacco, the trivial jests bandied from workman to workman, enable us to realize that these great structures are but the result of giving to ordinary human effort a direction and a purpose. Science has its cathedrals built by the efforts of a few architects and many workers...

Gilbert Newton Lewis

Prefacio de *Thermodynamics and the Free Energy of Chemical Substances*

*Il n'y a guère au monde un plus bel
excès que celui de la reconnaissance*
Jean de la Bruyère: Les caractères

AGRADECIMIENTOS

הזה ומזל ונעגהו ונמיקו וניחהש, סלועה רלמ וניהול-א' ה' התא רורב

A mis directores de tesis: los Drs Julio Casado, Emilio Calle y José Antonio Manso por todo el apoyo que me han brindado, tanto personal como científico. ¡Detrás de una buena cosecha está la mano de un gran agricultor!

A mis padres, Arturo Céspedes y Marielos Camacho, cuyo apoyo y consejo constantes han sido siempre incondicionales y sin los cuales nunca habría podido llegar hasta donde he llegado. ¡¡Los mejores padres del mundo!!

A mis compañeros de laboratorio: Jorge Arenas, Marina González y Rafael Gómez...quienes supieron ayudarme cuando lo pedí, guiarme cuando me perdí y escucharme cuando hablé.

A Dúnnia Llanes, quien fue mi compañera y mejor amiga durante casi toda mi experiencia doctoral en Salamanca, que supo aguantarme y que estuvo ahí...en las buenas y en las malas. Ese fue el regalo que me dio Cuba: ¡una amiga para toda la vida!

A Rubén Hernández, Víctor Ramos y Yolanda Merlo, quienes han hecho que mi vida en Salamanca sea como estar en mi propia casa. No le puedo pedir a la vida mejores anfitriones. Mis amigos, tienen ustedes una casa en Costa Rica.

A Matías Grau, Federico Toral, Mateo Torrachi, Angelika Abad, Yaima Ballester y Alejandro Collin, quienes me han hecho disfrutar y sentir el cariño latinoamericano...sin estar en Latinoamérica.

A Mario González, por su confianza absoluta, su apoyo constante y su amistad...más allá de los matraces y espectrofotómetros.

A mis padres y hermanos

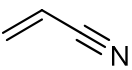
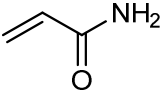
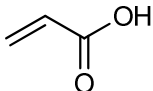
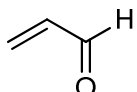
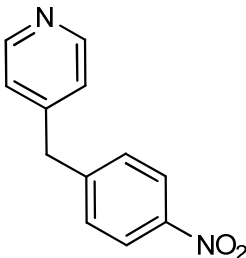
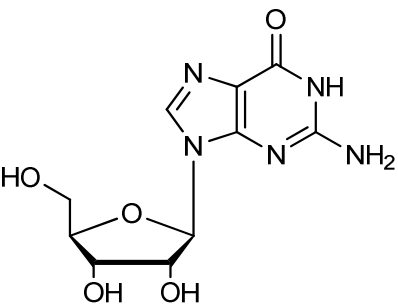
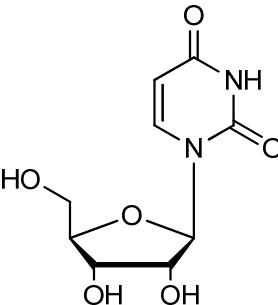
ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. INFORME BIBLIOGRÁFICO | 11 |
| 2.1 Compuestos carbonílicos α,β -insaturados: generalidades | 13 |
| 2.2 Toxicidad de los compuestos carbonílicos α,β -insaturados | 15 |
| 2.2.1 Formación de aductos | 15 |
| 2.2.2 Mutagenia y carcinogenia | 17 |
| 2.3 Nitrilos α,β -insaturados: el acrilonitrilo | 20 |
| 2.3.1 Generalidades | 20 |
| 2.3.2 Estudios toxicológicos | 22 |
| 2.3.2.1 Mutagenia y carcinogenia | 24 |
| 2.3.2.2 Aductos con proteínas y ADN | 25 |
| 2.4 Ácidos carboxílicos α,β -insaturados: el ácido acrílico | 27 |
| 2.4.1 Generalidades | 27 |
| 2.4.2 Estudios toxicológicos | 29 |
| 2.4.2.1 Mutagenia, carcinogenia y formación de aductos | 30 |
| 2.5 Amidas α,β -insaturadas: la acrilamida | 32 |
| 2.5.1 Generalidades | 32 |
| 2.5.2 Estudios toxicológicos | 33 |
| 2.5.2.1 Principales efectos toxicológicos | 35 |
| 2.5.2.2 Aductos con proteínas y ADN | 38 |
| 2.6 Aldehídos α,β -insaturados: la acroleína | 39 |
| 2.6.1 Generalidades y fuentes de exposición | 39 |
| 2.6.2 Evaluaciones toxicológicas | 41 |
| 2.6.2.1 Mutagenia y carcinogenia | 43 |
| 2.6.2.2 Aductos con proteínas y ADN | 44 |
| 2.7 Determinación del potencial alquilante de especies químicas | 47 |
| 2.7.1 Alquilación del ADN | 48 |
| 2.7.2 Aproximación biomimética a mecanismos de alquilación: test de la 4-(<i>p</i> -nitrobencil)piridina (NBP) | 50 |

| | |
|---|-----|
| 3. MÉTODO EXPERIMENTAL | 55 |
| 3.1 Alquilación de NBP | 58 |
| 3.2 Alquilación de nucleósidos | 60 |
| 3.3 Reactivos y equipo de trabajo | 61 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 65 |
| 4.1 Alquilación de NBP: estudio cinético | 67 |
| 4.1.1 Determinación de los coeficientes de absorción molar | 69 |
| 4.1.2 Parámetros cinéticos: órdenes de reacción | 70 |
| 4.1.3 Influencia de la composición del medio | 71 |
| 4.1.4 Influencia de la temperatura: parámetros termodinámicos | 72 |
| 4.2. Estudio cinético de la alquilación de nucleósidos | 81 |
| 4.2.1 Alquilación de guanosina por acrilonitrilo, ácido acrílico y acrilamida | 81 |
| 4.2.2 Alquilación de guanosina por acroleína | 94 |
| 4.2.3 Alquilación de uridina por compuestos α,β -insaturados | 99 |
| 5. CONCLUSIONES | 107 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 113 |

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | | |
|--------------------|--------------------------------------|--|
| AN | Acrilonitrilo |  |
| AM | Acrilamida |  |
| AA | Ácido acrílico |  |
| AC | Acroleína |  |
| NBP | 4-(<i>p</i> -nitrobenzil)piridina |  |
| Guo | Guanosina |  |
| Urd | Uridina |  |
| α,β -UC | Compuesto α,β -insaturado | |
| UFLC | Ultra Fast Liquid Chromatography | |

*Natura inest in mentibus nostris insatiabilis
quaedam cupiditas veri vivendi
Cicerón: Tusculanas*

1. INTRODUCCIÓN

Los daños en la macromolécula de ADN pueden dar lugar a cambios en la expresión genética, inhibición de la división celular o conducir a su muerte,^{1,2,3} pudiendo introducir errores (mutaciones) en el código genético.⁴ Por eso, el estudio de los mecanismos químicos que conducen a cambios en el ADN es importante, no solo por su intrínseco interés sino también por sus múltiples proyecciones en campos como Química Médica, Toxicología y Biotecnología.^{5,6}

Los agentes alquilantes son carcinógenos primarios de acción directa.⁷ Numerosos agentes cancerígenos no alquilantes *per se* sólo son efectivos tras haberse metabolizado hasta especies alquilantes.^{8,9,10}

El hallazgo de Magee y Barnes¹¹ de que la adición de nitrosodimetilamina a los alimentos suministrados a ratas induce la aparición de cáncer hepático 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 los años sesenta Magee *et al.* demostraron que la nitrosodimetilamina conduce enzimáticamente a un efectivo agente metilante,^{12,13} lo que centró el interés de la comunidad científica en los mecanismos de carcinogénesis por alquilación de proteínas y ácidos nucleicos.

¹ Norbury, C. J.; Hickson, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 367-401

² Rouse, J.; Jackson, S. P. Interfaces between the detection, signaling and repair DNA damage. *Science* **2002**, *297*, 547-551

³ Guengerich, F. P. Interactions of carcinogenic-bound DNA with individual DNA polymerases. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 420-452

⁴ Gates, K. S. Covalent modification of DNA by natural products. En: *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Pergamon: New York, 1999.

⁵ Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. Mechanisms of in situ activation for DNA-targeting antitumor agents. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477-2495

⁶ Hurley, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188-200

⁷ Lawley, P. D. Chemical Carcinogens. Am. Chem. Soc.: Washington DC, 1984; Vol. 1, p 428

⁸ González-Mancebo, S.; Gaspar, J.; Calle, E.; Pereira, S.; Mariano, A.; Rueff, J.; Casado, J. Stereochemical effects in the metabolic activation of nitrosopiperidines: correlations with genotoxicity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2004**, *558*, 45-51

⁹ Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F. 9-sulfooxymethylanthracene is an ultimate electrophilic and carcinogenic form of 9-hydroxymethylanthracene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 239-243

¹⁰ Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F. Carcinogenicity of 1-hydroxyl-3-methylcholanthrene and its electrophilic sulfate ester 1-sulfooxy-3-methylcholanthrene in Spague-Dawley rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 30-35

¹¹ Magee, P. N.; Barnes, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer* **1956**, *10*, 114-122

¹² Magee, P. N.; Hultin, T. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of proteins of rat-liver slices by dimethylnitrosamine in vitro *Biochem. J.* **1962**, *83*, 106-114

¹³ Magee, P. N.; Farber, E. Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **1962**, *83*, 114-124

Desde esas fechas los biólogos han centrado su atención en la capacidad cancerígena de los nitrosocompuestos¹⁴ mientras que los químicos han investigado principalmente sus mecanismos de formación^{15, 16, 17, 18, 19, 20} y las vías de bloqueo/inhibición de los mismos.^{21, 22, 23, 24} Actualmente se sabe que algunos nitrosocompuestos se descomponen o son metabolizados *in vivo* para formar electrófilos que dañan el ADN. Se admite que estos mecanismos son responsables de los efectos mutágenos y citotóxicos de los nitrosocompuestos.^{25, 26}

En este contexto, el trabajo de nuestro grupo en los últimos años se viene enfocando sobre tres objetivos:

1. Estudio de mecanismos de nitrosación de substratos lineales y cíclicos^{27, 28, 29} y búsqueda de correlaciones estructura/actividad en nitrosaminas.³⁰ Al estudiar la nitrosación de

¹⁴ Mirvish, S. S. Role of *N*-nitrosocompounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 17-48

¹⁵ Williams, D. L. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*. Elsevier: Amsterdam, 2004.

¹⁶ Casado, J. Nitrosation Reactions. En: *Fast Reactions in Solution*. Discussion Group. The Royal Society of Chemistry, Annual Meeting: Liverpool, 1994.

¹⁷ Casado, J. *Chemistry of nitrosation reactions in solution*. Invited lecture. Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie: Alemania, 1997.

¹⁸ Casado, J., *Mecanismos de alquilación y potencial mutágeno*. Conferencia Inaugural, XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental: Segovia, 2004.

¹⁹ Casado, J. *Nitrosation of amino acids as a precursor of alkylation mechanisms. Reactivity of lactones*. Invited Keynote, SIMEC06: Sevilla, 2006.

²⁰ Casado, J. *Reactividad de agentes alquilantes y nitrosantes de interés biológico*. Conferencia Invitada: Universidad de la República, Montevideo, 2011.

²¹ Archer, M. C. **N*-Nitroso Compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*. IARC Sci. Pub. N° 57: Lyon, 1984

²² González-Mancebo, S.; Calle, E.; García-Santos, M. P.; Casado, J. Inhibition of Nitrosation by Steric hindrance. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 334-336

²³ González-Mancebo, S.; Lacadena, J.; García-Alonso, Y.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. Nitrosation of phenolic compounds: effects of alkyl substituents and solvent. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 157-166

²⁴ Loepky, R. N.; Bao, Y. T.; Bae, J.; Yu, L.; Shevlin, G. *Nitrosamines and Related *N*-Nitrosocompounds: Chemistry and Biochemistry*. American Chemical Society: Washington DC, 1994

²⁵ Galtress, C. L.; Morrow, P. R.; Nag, S.; Smalley, T. L.; Tschantz, M. F.; Vaughn, J. S.; Wichems, D. N.; Ziglar, S. K.; Fishbein, J. C. Mechanism of the solvolytic decomposition of the carcinogen *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1406-1411

²⁶ Lewis, R. S.; Tannenbaum, S. R.; Deen, W. M. Kinetics of *N*-nitrosation in oxygenated nitric oxide solutions at physiological pH: role of nitrous anhydride and effects of phosphate and chloride. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3933-3939

²⁷ Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; Mateos, F. J.; Tostado, M. Formation of nitrosamines in alkaline conditions: A kinetic study of the nitrosation of linear and cyclic secondary amines by alkyl nitrites. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 987-991

²⁸ García-Santos, M. P.; Calle, E.; González-Mancebo, S.; Casado, J. Kinetics of the aminolysis and hydrolysis of alkyl nitrites: Evidence for an orbital-controlled mechanism. *Monatsh. Chem.* **1996**, *127*, 997-1003

²⁹ Casado, J.; González-Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. The Nitrosation of *N*-alkylureas: evidence for a proton transfer. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *28*, 301-313

aminoácidos con grupo amino secundario se demostró 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 migración intramolecular del grupo NO .^{31, 32, 33, 34}

2. Estudio de mecanismos conducentes a la degradación de nitrosocompuestos o a inhibir su formación.^{35, 36, 37}

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

La nitrosación de aminoácidos con grupo $-\text{NH}_2$ es muy interesante. Se sabía que conduce a la formación de especies mutágenas, pero se desconocía su naturaleza.^{38, 39} Ejemplo significativo es la nitrosación del dipéptido aspartamo, éster metílico de la *L*-aspartil-*L*-fenilalanina, edulcorante bajo en calorías de amplio uso.

El estudio en nuestro grupo de trabajo de los mecanismos de nitrosación de aminoácidos primarios ha revelado que los productos resultantes son lactonas, algunas de las cuales son activos agentes mutágenos/cancerígenos.^{40, 41}

Hasta ahora se ha investigado el potencial alquilante de seis lactonas: β -propiolactona (BPL), β -butirolactona (BBL), γ -butirolactona (GBL), δ -valerolactona (DVL), α -angélicolactona (AAL) y furanona (FUR).⁴²

³⁰ Vera, A.; Montes, M.; Usero, J. L.; Casado, J. Quantitative structure-reactivity relationship study of the biophysicochemical behavior of nitrosamine. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 791-796

³¹ Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; Mosquera, M.; Peña, M. E. The mechanism of the nitrosation of α -amino acids: evidence for an intramolecular pathway. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 1859-1864

³² Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. The Nitrosation of aminoacids. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1167-1178

³³ Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. Structural effects of the *N*-nitrosation of aminoacids. *Int. J. Chem. Kinet.* **1997**, *29*, 495-504

³⁴ García-Prieto, J. C.; Mateos, R.; Calle, E.; Casado, J. Inhibition of Nitrosation by the reaction medium. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3517-3520

³⁵ González-Mancebo, S.; García-Santos, M. P.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. Nitrosation of phenolic compounds: inhibition and enhancement. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2235-2240

³⁶ Fiz, N.; Usero, J. L.; Casado, J. Photolysis of *N*-nitrosamines in neutral media. *Int. J. Chem. Kinet.* **1993**, *25*, 341-351

³⁷ Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. Nitrosation of aspartic acid, aspartame and glycine ethylester. Alkylation of 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in vitro and binding to DNA in the rat. *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 193-201

³⁸ Shephard, S. E.; Hegi, M.; Lutz, W. K. In vitro assays to detect alkylating and mutagenic activities on dietary components nitrosated in situ. En: *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer*. Publication N° 84; IARC: Lyon, 1987

³⁹ García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of aminoacids in nitrosation reactions and its relation to the alkylating potential of their products. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177-2182

⁴⁰ García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Amino acid nitrosation products as alkylating agents. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7506-7510

⁴¹ García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. A method for the kinetic study of amino acid nitrosation reactions. *Polyhedron* **2003**, *22*, 1059-1066

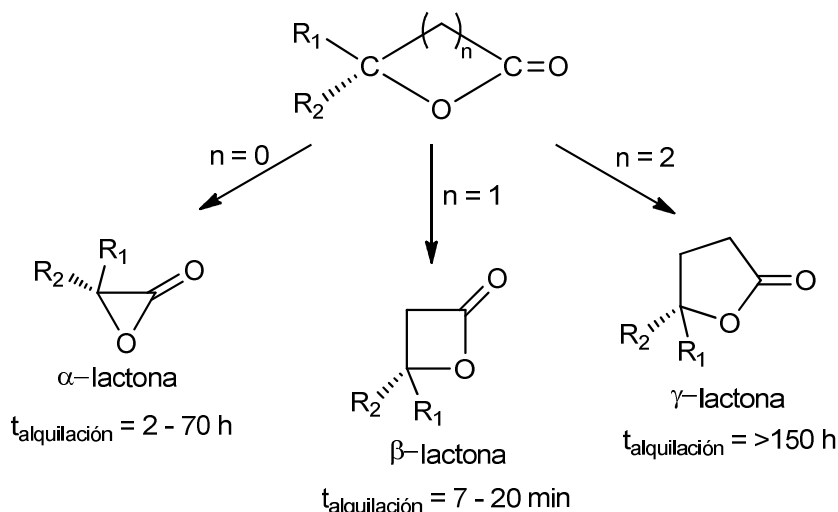


Figura 1.1. Capacidad alquilante de las lactonas.

La Figura 1.1 muestra en términos comparativos la capacidad alquilante de α -, β - y γ - lactonas. Se observa que las lactonas formadas en la nitrosación de los aminoácidos más importantes biológicamente son también las de más alto potencial alquilante.

Se ha comprobado así la existencia de correlación entre capacidad alquilante de las lactonas y su potencial mutágeno/cancerígeno (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Potencial alquilante de la β -propiolactona, β -butirolactona, γ -butirolactona, δ -valerolactona y capacidad mutágena/cancerígena.

| Lactona | Reactividad química | Carcinogenia | |
|---------|--|-----------------------------|--------------------------------|
| | $10 k_{\text{alq}} (35 \text{ }^\circ\text{C})$ ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ⁴³ | Dosis | Nº de tumores / Nº de animales |
| BPL | $8,2 \pm 0,3$ | 4 | 13/20 |
| BBL | $0,78 \pm 0,04$ | 100 | 9/20 |
| GBL | No reaccionan | Inactivos como carcinógenos | |
| DVL | | | |

En contraste con el comportamiento de esas lactonas, se sabe empíricamente que la α -angélicalactona (AAL) ‘a naturally occurring compound, even at relatively low concentrations may exert chemo-preventive effects’.⁴⁴

⁴² Manso, J. A. Estudio cinético del potencial alquilante de lactonas y N-alkil-N-nitrosoureas. *Grado de Salamanca*, Universidad de Salamanca, 2007

⁴³ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. A kinetic approach to the alkylating potential of carcinogenic lactones. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 1161-1166

⁴⁴ Huber, W. W.; McDaniel, L. P.; Kaderlik, K. R.; Teitel, C. H.; Lang, N. P.; Kadlubar, F. F. Chemoprotection against the formation of colon DNA adducts from the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, 376, 115-122

Se ha comprobado en ratones de experimentación que la incorporación de α -angélicalactona a la dieta inhibe la formación de aductos en pulmones e hígado entre metabolitos del cancerígeno benzopireno, administrado previamente, y el ADN de los tejidos. Por ello se ha investigado el potencial alquilante de la α -angélicalactona sobre el sustrato NBP, 4-(*p*-nitrobencil)piridina, *molécula trampa* de agentes alquilantes –de nucleofilia análoga a la de las bases del ADN– también utilizado con las demás lactonas. Los resultados muestran que la reacción de formación del aducto AAL-NBP es 900 mil veces más rápida que la del aducto BPL-NBP ($\Delta^\ddagger G^\ominus = 52$ y 87 kJ mol⁻¹, respectivamente)⁴⁵, siendo la β -propiolactona, la más cancerígena de las lactonas. El seguimiento cinético, mediante la técnica de flujo detenido, ha mostrado que la formación de aductos por la α -angélicalactona transcurre a través de un *entropy-strain-catalyzed mechanism* originado por la temprana rotura del anillo lactónico. Los resultados cinéticos obtenidos con la α -angélicalactona son coherentes con su carácter quimioprotector.⁴⁶

Entre el notable potencial carcinógeno de la β -propiolactona y el carácter quimioprotector de la α -angélicalactona se encuentra –en lo que a actividad biológica se refiere– la molécula 4-metilenoxetan-2-ona, (dicetena), no carcinógena. Van Duuren *et al.* lo atribuyeron a la rapidez de su reacción de hidrólisis y a su insolubilidad en agua.^{47, 48, 49} Investigada en nuestro grupo la reactividad de esta molécula, tanto desde una perspectiva cinética experimental como mediante estudio *in silico*,^{50, 51, 52} se ha llegado a la conclusión de que la ausencia de carcinogenia se debe a la inestabilidad de los aductos que forma con las bases del ADN.

La toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad de los epóxidos ha suscitado también gran interés. Son alquilantes muy activos, de carcinogenia probada. Debido a sus

⁴⁵ Fernández-Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. The unusual of α -angelicalactone to form adducts: a kinetic approach. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39*, 591-594

⁴⁶ Agarwal, S. C.; Van Duuren, B. L.; Kneip, T. J. Detection of epoxides with 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1979**, *23*, 825-829

⁴⁷ Van Duuren, B. L.; Langseth, L.; Goldschmidt, B. M.; Orris, L. Carcinogenicity of epoxides, lactones and peroxy compounds. VI. Structure and carcinogenic activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **1967**, *39*, 1217-1228

⁴⁸ Van Duuren, B. L.; Sivak, A.; Katz, C.; Melchionne, S. Inhibition of tumor induction in two-stage carcinogenesis on mouse skin. *Cancer Res.* **1969**, *29*, 947-952

⁴⁹ Van Duuren, B. L.; Goldschmidt, B. M.; Kats, C.; Seidman, I.; Paul, J. S. Carcinogenic activity of alkylating agents. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 695-700

⁵⁰ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Chemical reactivity and biological activity of diketene. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964-1969

⁵¹ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Kinetic study of the neutral and base hydrolysis of diketene. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 438

⁵² Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. Computational study of the acid dissociation of esters and lactones. A case study of diketene. *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 4943-4948

numerosas aplicaciones industriales, se han convertido en los últimos años en moléculas de relevante interés para químicos y biólogos.

Sobre el óxido de estireno o derivados del mismo se han centrado numerosos estudios, más en el ámbito de sus efectos biológicos que sobre su reactividad química como agentes alquilantes. Por esta razón se ha abordado recientemente el estudio de la reactividad del óxido de *p*-nitroestireno (especie de bajo potencial mutágeno) como agente alquilante del sustrato NBP.⁵³ Se ha encontrado que su potencial alquilante es similar al del agentes mutágenos tan efectivos como la β -propiolactona, explicándose su reducida mutagenicidad por la inestabilidad del aducto que forma con el sustrato NBP.

El grupo de las *N*-alquil-*N*-nitrosoureas ofrece particular interés, por conocerse la existencia de correlación entre su capacidad alquilante y su tumorigenicidad.⁵⁴ El estudio cinético de la capacidad alquilante de esta serie de compuestos ha mostrado que las reacciones de alquilación transcurren a través de mecanismos de control estérico, siendo significativo el hecho de que la nitrosación del sustrato NBP por *N*-fenil-*N*-nitrosourea transcurre a través de un mecanismo distinto al de los demás términos de la serie, lo que explica su baja tumorigenicidad.⁵⁵

Los ácidos mucohálicos, MXA (mucoclórico y mucobromico), tienen una gran proyección medioambiental. Son genotóxicos y potenciales agentes cancerígenos que se forman en la cloración de aguas para consumo humano. Un estudio de la reactividad de estas especies desde la doble perspectiva cinética e *in silico*, ha permitido interpretar los complejos mecanismos que condicionan la reactividad de esas especies.^{56, 57}

La metodología seguida en nuestro grupo para investigar mecanismos de alquilación sobre el sustrato de referencia NBP, ha mostrado su excelente adaptabilidad no solo para conocer la capacidad alquilante de electrófilos fuertes, sino también de moléculas de electrofilia débil, como los sorbatos, especies de notable interés industrial por su generalizado empleo como conservantes. Ha permitido también correlacionar reactividad

⁵³ González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Céspedes-Camacho, I. F.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of *p*-nitrostyrene oxide as an alkylating agent. A kinetic approach to biomimetic conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7016-7022

⁵⁴ Lijinsky, W.; Winter, C. Skin tumors induced by painting nitrosoalkylureas on mouse skin. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1981**, *102*, 13-20

⁵⁵ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes-Camacho, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Alkylating potential of *N*-phenyl-*N*-nitrosourea. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 386-389

⁵⁶ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of mucohalic acids in water. *Water Res.* **2011**, *45*, 714-720

⁵⁷ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Arenas-Valgañón, J.; Céspedes-Camacho, I. F.; Calle, E.; Casado, J. DNA-damaging disinfection byproducts: alkylation mechanism of mutagenic mucohalic acids. *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, *45*, 9009-9016

química (resultados cinéticos) y carácter mutágeno/cancerígeno (resultados biológicos/bioquímicos) y, como se ha apuntado antes, interpretar cinéticamente el carácter quimioprotector (antimutágeno) de alguna especie alquilante. Para lograr una mejor comprensión –y posible control– de mecanismos de alquilación que dan lugar a mutagénesis/carcinogénesis, se han investigado reacciones que concurren con la de alquilación propiamente dicha: solvólisis de reactivos y productos y estabilidad de los aductos, principalmente.

Objetivo último del trabajo descrito en las líneas anteriores es lograr el mayor acercamiento posible a mecanismos de alquilación responsables de efectos patógenos. Ello aconseja abordar el estudio de tales mecanismos utilizando como sustrato de alquilación no solo la molécula de referencia NBP, sino también otras que, como los nucleósidos, facilitan la aproximación a situaciones biomiméticas. Ese objetivo –que requiere el empleo de diferentes métodos cinéticos, adecuados a cada sustrato– ha orientado la investigación descrita en las páginas siguientes. Como agentes alquilantes se han manejado compuestos carbonílicos α,β -insaturados.

*Por nacer en espina
la rosa, yo no siento
que pierde, ni el buen vino
por salir del sarmiento;
ni vale el azor menos
porque en vil nido siga,
ni los buenos ejemplos
porque judío los diga*
Sem Tob de Carrión: Proverbios morales

2. INFORME BIBLIOGRÁFICO

2.1. Compuestos carbonílicos α,β -insaturados: Generalidades

Las sustancias con un doble o triple enlace conjugado con un grupo carbonilo se conocen comúnmente como compuestos carbonílicos α,β -insaturados (figura 2.1).⁵⁸ Estos compuestos tienen una considerable importancia industrial, ya que se utilizan como materias primas en la producción de plásticos, resinas, plaguicidas, colorantes y compuestos farmacéuticos. Están incluidos en la lista de compuestos químicos de Altos Volúmenes de Producción (HPV en inglés).^{59, 60} Pueden formarse en la combustión de material orgánico, gases de escape de vehículos automóviles, humo del tabaco, tuberías de conducción de gases y en algunas drogas.⁶¹ También pueden generarse en la degradación de la lignina y del ácido húmico, como productos de la peroxidación endógena lipídica o durante el metabolismo de compuestos exógenos.^{62, 63, 64, 65}

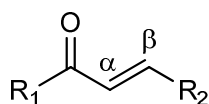


Figura 2.1. Estructura de los compuestos carbonílicos α,β -insaturados

En la última década se ha encontrado que, durante el proceso de cocinado de alimentos y como consecuencia de reacciones de Maillard, se generan diversos compuestos α,β -insaturados.^{66, 67} La figura 2.2 muestra esquemáticamente su formación.

⁵⁸ Smith, M. B. *Organic chemistry: an acid-base approach*. 1ra ed.; CRC Press: Boca Ratón, Florida. 2010

⁵⁹ Green, S.; Goldberg, A.; Zurlo, J. TestSmart-high production volume chemicals: an approach to implementing alternatives into regulatory toxicology. *Toxicol. Sci.* **2001**, *63*, 6-14

⁶⁰ Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2007. The 2007 OECD list of High Production Volume Chemicals. Environment, Health and Safety Division. Paris

⁶¹ Marnett, L. J.; Hurd, H. K.; Hollstein, M. C.; Levin, D. E.; Esterbauer, H.; Ames, B. N. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1985**, *148*, 25-34

⁶² Eder, E.; Hoffman, C.; Bastian, H.; Deininger, C. Molecular mechanisms of DNA damaged initiated by α,β -unsaturated carbonyl compounds as criteria for genotoxicity and mutagenicity. *Environ. Health Perspect.* **1991**, *88*, 99-106

⁶³ Eder, E.; Hoffman, C.; Deininger, C.; Scheckenbach, S. Risk assessment for mutagenic and carcinogenic activities of α,β -unsaturated carbonyl compounds by a screening strategy based on structure-activity relationships. *Toxic. In Vitro.* **1994**, *8*, 707-710

⁶⁴ Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Brooks, D. D.; Fujimoto, K. Fluorescence formation from the interaction of DNA with lipid oxidation degradation products. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *919*, 239-244

⁶⁵ Marnett, L. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* **2002**, *181*, 219-222

⁶⁶ Stadler, R. H.; Verzegnassi, L.; Varga, N.; Grigorov, M.; Studer, A.; Riediker, S.; Schilter, B. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1242-1250

⁶⁷ Stadler, R. H.; Robert, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davidek, T.; Devaud, S.; Goldmann, T.; Hau, J.; Blank, I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5550-5558

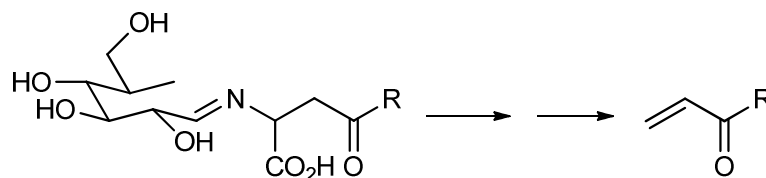


Figura 2.2. Formación de compuestos α,β -insaturados en la reacción de Maillard

Muchos compuestos α,β -insaturados se utilizan en la industria alimentaria como colorantes, saborizantes o como ingredientes activos de muchos alimentos.⁶⁸ La figura 2.3 muestra las estructuras de algunos de ellos. Su importancia industrial se ve reflejada en las numerosas patentes sobre su síntesis y aplicaciones técnicas.^{69, 70, 71}

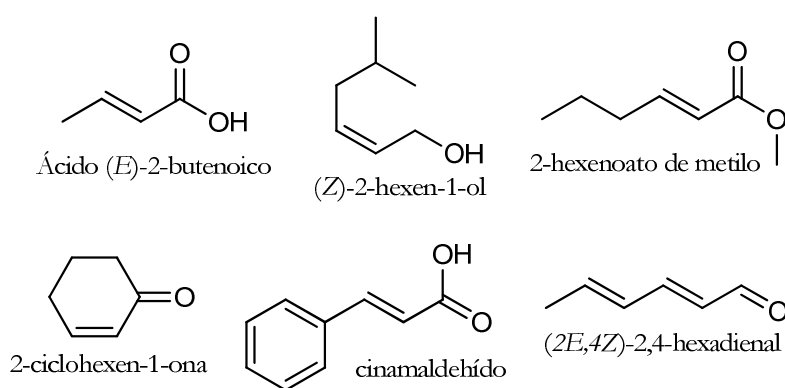


Figura 2.3. Algunos compuestos α,β -insaturados utilizados en la industria alimentaria

Los compuestos carbonílicos α,β -insaturados tienen dos sitios reactivos: el grupo carbonilo y el doble (o triple) enlace conjugado; el último presenta una deficiencia de carga que lo hace susceptible de reaccionar con grupos nucleófilos y de interactuar con macromoléculas biológicas mediante reacciones de adición de Michael.^{72, 73}

⁶⁸ Adams, T. B.; Gavin, C. L.; Taylor, S. V.; Waddell, W. J.; Cohen, S. M.; Feron, V. J.; Goodman, J.; Marnett, L. J.; Portoghese, P. S.; Smith, R. L. The FEMA GRAS assessment of α,β -unsaturated aldehydes and related substances used as flavor ingredients. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2935-2967

⁶⁹ Fink, W. Process for preparing α,β -unsaturated compounds. U. S. Patent 3,361,786, enero 2, 1968

⁷⁰ Walker, S. L.; Deeter, G. A.; Stuart, G. Resins formed from α,β -unsaturated monomers and unsaturated fatty acids. U. S. Patent 5,830,957, noviembre 3, 1998

⁷¹ Lilga, M. A.; Todd, E.; Holladay, J. E. Methods of forming α,β -unsaturated acids and esters. U. S. Patent 6,992,209, enero 31, 2006

⁷² Van Iersel, M. L. P.; Jan-Peter, H. T.; Ploemen, M.; Federici, G.; Van Bladeren, P. J. Interactions of α,β -unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem.-Biol. Interact.* **1997**, *108*, 67-78

⁷³ Chung, F. L.; Roy, K. R.; Hecht, S. S. A study of reactions of α,β -unsaturated carbonyl compounds with deoxyguanosine. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 14-17

2.2. Toxicidad de los compuestos carbonílicos α,β -insaturados

2.2.1. Formación de aductos

Para estudiar la toxicidad de estos compuestos es esencial identificar y caracterizar los aductos que forman con proteínas o bases del ADN. Ya sea de manera exógena o endógena, los compuestos α,β -insaturados tienen capacidad de formar aductos con diversas proteínas. Cronin *et al.* escriben que “*these compounds are particularly reactive and interact with electron-rich biological macromolecules, resulting in a wide range of adverse effects, including general toxicity, allergic reactions, mutagenicity and carcinogenicity*”.⁷⁴

Una de las interacciones más estudiadas ha sido con el tripéptido glutatión, de gran importancia en procesos de estrés oxidativo, siendo esta reacción la base de uno de los métodos más comunes de detoxificación de metabolitos. Los aldehídos α,β -insaturados muestran altos porcentajes de reacción con el glutatión, porcentajes mayores en animales experimentales que en seres humanos.⁷⁵ Como consecuencia de la formación de compuestos α,β -insaturados (mediante peroxidación lipídica), y de posterior interacción con el glutatión (estrés oxidativo), se producen muertes celulares y efectos patofisiológicos.⁷⁶

Al presentarse bajas concentraciones de glutatión a nivel celular (generando una disminución en la eficiencia de los pasos de detoxificación), aumenta la probabilidad de que los compuestos α,β -insaturados reaccionen con componentes celulares (p.e. ADN, péptidos o proteínas). Los grupos de Esterbauer en Austria y de Uchida en Japón han estudiado la formación de aductos de compuestos α,β -insaturados con el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo ϵ -amino de la lisina y el grupo imidazol en la histidina.^{77, 78} Otros estudios con albúmina de suero bovino han permitido identificar, aislar y caracterizar los correspondientes aductos;⁷⁹ algunos de ellos se muestran en la figura 2.4.

⁷⁴ Koleva, Y. K.; Madden, J. C.; Cronin, M. T. Formation of categories from structure-activity relationships to allow read-across for risk assessment: toxicity of α,β -unsaturated carbonyl compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2300-2312

⁷⁵ Eisenbrand, G.; Schuhmacher, J.; Golzer, P. The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 40-46

⁷⁶ Eckl, P. M.; Ortner, A.; Esterbauer, H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1993**, *290*, 183-192

⁷⁷ Esterbauer, H.; Schaur, R.; Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Chem.* **1991**, *11*, 81-128

⁷⁸ Uchida, K. Role of reactive aldehydes in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Chem.* **2000**, *28*, 1685-1696

⁷⁹ Ichihashi, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Uchida, K. Endogenous formation of protein adducts with carcinogenic aldehydes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23903-23913

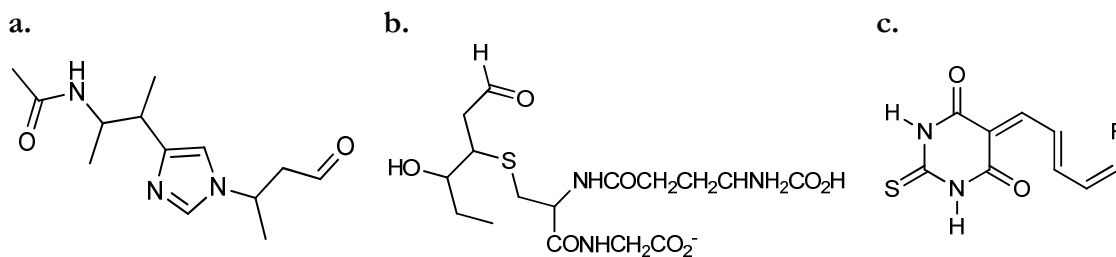


Figura 2.4. Aductos formados entre (a.) un derivado de la histidina y el crotonaldehído, (b.) el glutatión y el *trans*-4-hidroxi-2-hexenal, (c.) un 2,4-alcanodieneal y el ácido tiobarbitúrico.

El estrés oxidativo también ha mostrado ser causa de la formación de aductos con bases del ADN [ref. 65]. Mediante espectroscopia de fluorescencia se ha observado que los 2-alquenaes forman aductos *in vitro* e *in vivo* con el ADN. Pruebas con animales experimentales han mostrado la formación de aductos exocíclicos entre el *trans*-2-hexenal (producto de la peroxidación lipídica) y bases del ADN.⁸⁰ También se han encontrado aductos con el (*E*)-2-hexenal,^{81, 82} 2,4-hexadienal,⁸³ crotonaldehído^{84, 85} y 4-hidroxi nonenal.^{86, 87}

Otros compuestos α,β -insaturados cuyo potencial alquilante y efectos sobre la salud han sido investigados son los haluros de vinilo, especialmente el cloruro y bromuro de vinilo. Uno y otro son potentes agentes alquilantes que forman aductos *in vivo* e *in vitro*

⁸⁰ Cadet, J.; Carvalho, V. M.; Onuki, J.; Douki, T.; Medeiros, M. G.; Di Mascio, P. Purine DNA adducts of 4,5-dioxovaleric acid and 2,4-decadienal. *IARC Sci. Public.* **1999**, *150*, 103-113

⁸¹ Gölzer, P.; Janzowski, C.; Pool-Zobel, B. L.; Eisenbrand, G. (*E*)-2-hexenal induced DNA damage and formation of cyclic 1-*N*²-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1207-1213

⁸² Schuler, D.; Eder, E. Detection of 1-*N*²-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in organs of Fischer 344 rats by a 32P-post-labeling technique. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1345-1350

⁸³ National Toxicology Program (NTP), 2003. Final report: toxicology and carcinogenesis studies of 2,4-hexadienal in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical Report Series 509. US Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences. Carolina del Norte

⁸⁴ Eder, E.; Hoffman, C. Identification and characterization of deoxyguanosine-crotonaldehyde adducts. Formation of 7,8 cyclic adducts and 1-*N*²,7,8 bis-cyclic adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 802-808

⁸⁵ Chung, F. L.; Hecht, S. S. Formation of cyclic 1-*N*²-adducts by reaction of deoxyguanosine with α -acetoxo-*N*-nitrosopyrrolidine, 4-(carbethoxynitrosamino)butanal or crotonaldehyde. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1230-1235

⁸⁶ Chung, F. L.; Nath, R. G.; Ocano, J.; Nishikawa, A.; Zhang, L. Deoxyguanosine adducts of *t*-4-hidroxi-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1507-1511

⁸⁷ Nair, U.; Bartsch, H.; Nair, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adducts types and levels in humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 1109-1120

con bases del ADN, bien *per se* o mediante sus metabolitos epóxidos.^{88, 89, 90, 91} La figura 2.5 muestra las estructuras de algunos aductos con bases del ADN.

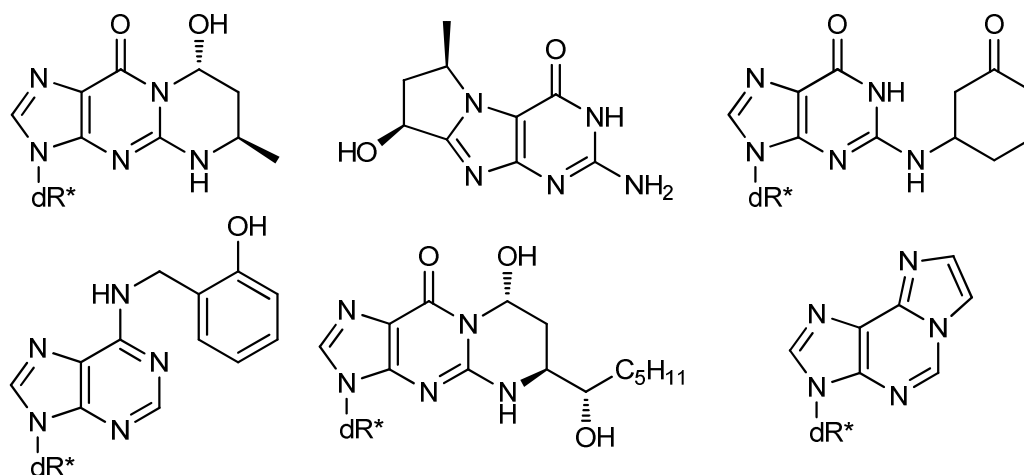


Figura 2.5. Estructuras de algunos aductos de compuestos α,β -insaturados con bases del ADN (dR* = desoxirribosa)

2.2.2. Mutagenia y carcinogenia

Los compuestos α,β -insaturados son altamente reactivos, tanto con proteínas como con bases del ADN. Tal reactividad implica consecuencias para la salud de los seres vivos. Witz afirma que “*interactions of these reactive compounds with proteins and enzymes not only lead to cytotoxicity but can also contribute indirectly to genotoxicity*”.⁹² No obstante, la falta de evidencia experimental sobre la formación de aductos con proteínas o ADN no presupone ausencia de mutagenia.

Desde hace muchos años se han estudiado ciertas propiedades de los compuestos α,β -insaturados que sugieren un papel importante en la formación de algunos cánceres humanos. En la década de los 90's, Erwin Eder indicaba que “*...to date all data published are consistent with the assumption that this widespread class of compounds represents a potential risk to human health*”. Por ejemplo, se ha encontrado que muchos de estos compuestos inhiben la síntesis

⁸⁸ Bergman, K. Reactions of vinyl chloride with RNA and DNA of various mouse tissues in vivo. *Arch. Toxicol.* **1982**, 49, 117-129

⁸⁹ Bolt, H. M.; Laib, H. P.; Ottenwälder, H. DNA adducts of halogenated hydrocarbons. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, 112, 92-96

⁹⁰ Bolt, H. M. Vinyl chloride: a classical industrial toxicant of new interest. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, 35, 307-323

⁹¹ Wang, Q.; Ji, F.; Sun, Y. A.; Wang, W.; Wu, F.; Miao, W. B.; Brandt-Rauf, P. W.; Xia, Z. L. Genetic polymorphisms of XRCC1, HOGG1 and MGMT and micronucleus occurrence in Chinese vinyl chloride-exposed workers. *Carcinogenesis* **2010**, 31, 1068-1073

⁹² Witz, G. Biological interactions of α,β -unsaturated aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 7, 333-349

de ADN, ARN^{93, 94} y de la enzima ADN polimerasa⁹⁵ o llegan a interactuar con la tubulina.⁹⁶

Ciertos efectos genotóxicos se han encontrado al estudiar esta clase de compuestos: mutagenicidad en células bacteriales y eucariotas,^{97, 98, 99} formación de micronúcleos, rotura de cromátidas¹⁰⁰ y *cross-linking*.¹⁰¹ Algunos de estos compuestos pueden llegar a causar diferenciación en las células epiteliales bronquiales, lo que contribuye a la iniciación de cáncer de pulmón (causado por el humo del tabaco).

Estudios con animales de experimentación han mostrado que la toxicidad aguda (valores de LD₅₀) de más de 50 compuestos α,β -insaturados es relativamente baja.^{102, 103} Investigaciones de bajo espectro (corto tiempo de análisis) han confirmado la baja actividad mutágena de algunos de esos compuestos. No obstante, en estudios de alto espectro (amplios periodos de tiempo) se han detectado efectos pronunciados en el organismo y aumento en las tasas de mortalidad.

Ensayos *in vitro* de genotoxicidad de algunos aldehídos, ésteres y dienales α,β -insaturados han mostrado bajos efectos genotóxicos y citotoxicidad considerable. Esos ensayos se han hecho con linfocitos humanos, hepatocitos de ratas y diferentes cadenas de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.^{104, 105, 106}

⁹³ White, J. S.; Rees, K. R. The mechanism of action of 4-hydroxynonenal in cell injury. *Chem.-Biol. Interact.* **1984**, *52*, 233-241

⁹⁴ Janzowski, C.; Glaab, V.; Mueller, C.; Straesser, U.; Kamp, H. G.; Eisenbrand, G. α,β -unsaturated carbonyl compounds of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis* **2003**, *18*, 465-470

⁹⁵ Wawra, E.; Zollner, H.; Schaur, R. J.; Tillian, H. M. Schauenstein, E. The inhibitory effect of 4-hydroxyl nonenal on DNA-polymerase alpha and beta from rat liver and rapidly dividing Yoshida ascites hepatoma. *Cell. Biochem. Funct.* **1986**, *4*, 31-36

⁹⁶ Gabriel, L.; Bonelli, G.; Dianzani, M. U. Inhibition of colchicine binding to rat liver tubulin by aldehydes and by linoleic acid hydroperoxide. *Chem.-Biol. Interact.* **1977**, *19*, 101-109

⁹⁷ Basu, A. K.; Marnett, L. J. Molecular requirements for the mutagenicity of malonaldehyde and related acroleins. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2848-2858

⁹⁸ Czerny, C.; Eder, E.; Runger, T. M. Genotoxicity and mutagenicity of the α,β -unsaturated carbonyl compound crotonaldehyde (butenal) on a plasmid shuttle vector. *DNA Repair* **1998**, *407*, 125-134

⁹⁹ Fernandes, P. H.; Kanuri, M.; Nechev, L. V.; Harris, T. M.; Lloyd, R. S. Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde. *Environ. Mol. Mutagen.* **2005**, *45*, 455-459

¹⁰⁰ De Bont, R.; van Larebeke, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **2004**, *19*, 169-185

¹⁰¹ Stone, M. P.; Cho, Y.; Huang, H.; Kim, H. Y.; Kozekov, I. D.; Kozekova, A.; Minko, I. G.; Lloyd, R. S.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J. Interstrand DNA cross-links induced by α,β -unsaturated aldehydes derived from lipid peroxidation and environmental sources. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 793-804

¹⁰² Smyth, H. F.; Weil, C. S.; West, J. S.; Carpenter, C. P. An exploration of joint toxic action. II. Equitoxic versus equivolume mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1970**, *17*, 498-503

¹⁰³ Grootveld, M.; Atherton, M. D.; Sheerin, A. N.; Hawkes, J.; Blake, D. R.; Richens, T. E. In vivo absorption, metabolism and urinary excretion of α,β -unsaturated aldehydes in experimental animals. *J. Clin. Nutr.* **1998**, *101*, 1210-1218

¹⁰⁴ Eder, E.; Scheckenbach, S.; Deininger, C.; Hoffman, C. The possible role of α,β -unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **1993**, *67*, 87-103

Ensayos *in vivo* han revelado mutagenicidad y carcinogenicidad significativas.^{107, 108}

Los compuestos α,β -insaturados pueden experimentar diferentes interacciones con el ADN, conducentes a respuestas genotóxicas y mutágenas. Entre los posibles mecanismos figuran la formación de aductos cíclicos, rotura de cadenas y *cross-linking*. Junto a esas interacciones pueden darse activaciones metabólicas (p. e. epoxidación, formación de radicales o activación de grupos amino).

Es de interés señalar que los distintos protocolos sobre pruebas de actividad mutágena y carcinógena no permiten interpretar, de manera uniforme, los mecanismos de toxicidad de esta clase de compuestos insaturados. Por eso, como indica McKinney, “...there is an increased need to obtain information relating to the hazardous effects of such chemicals from molecular structure”.¹⁰⁹

Para soslayar exhaustivas pruebas de toxicidad, las llamadas Relaciones Cuantitativas de Estructura-Reactividad (QSAR en inglés) han adquirido gran desarrollo. Estos métodos permiten estimar (sin necesidad de experimentación) la mutagenia y/o carcinogenia de grupos de compuestos relacionados estructural y mecanísticamente. En el caso de los compuestos α,β -insaturados se han encontrado correlaciones que muestran un amplio espectro de actividades mutágenas dependientes de la estructura química del compuesto.^{110, 111} Entre las conclusiones significativas derivadas de este tipo de modelos pueden mencionarse las siguientes:

- Un triple enlace terminal conjugado implica más toxicidad que un doble enlace.
- Sustituyentes alquílicos en posición α o β respecto al grupo carbonilo fomentan la mutagenia.

¹⁰⁵ National Toxicology Program (NTP), 2001. Draft report: toxicology and carcinogenesis studies of citral in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). Technical Report Series 505. US Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences. Carolina del Norte

¹⁰⁶ Dittberner, U.; Eisenbrand, G.; Zankl, H. Genotoxic effects of the α,β -unsaturated aldehydes 2-*trans*-butenal, 2-*trans*-hexenal and 2-*trans*, 6-*cis*-nonadienal. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1995**, 335, 259-265

¹⁰⁷ Wild, D.; King, M. T.; Gocke, E.; Eckhardt, K. Study of artificial flavouring substances for mutagenicity in the Salmonella/microsome, Basc and micronucleus tests. *Food Chem. Toxicol.* **1983**, 21, 707-719

¹⁰⁸ Dittberner, U.; Schmetzer, B.; Golzer, P.; Eisenbrand, G.; Zankl, H. Genotoxic effects of 2-*trans*-hexenal in human buccal mucosa cells in vivo. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1997**, 390, 161-165

¹⁰⁹ McKinney, J. D.; Richard, A.; Waller, C.; Newman, M. C.; Gerberick, F. The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicol. Sci.* **2000**, 56, 8-17

¹¹⁰ Schultz, T. W.; Netzeva, T. I.; Roberts, D. W.; Cronin, M. T. Structure-toxicity relationships for the effects to *Tetrahymena pyriformis* of aliphatic, carbonyl-containing α,β -unsaturated chemicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18, 330-341

¹¹¹ Yarbrough, J. W.; Schultz, T. W. Abiotic sulfhydryl reactivity: a predictor of aquatic toxicity for carbonyl containing α,β -unsaturated compounds. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, 558-562

- Compuestos con >100 revertientes/mmol no presentan actividad mutágena significativa
- Un aumento en el peso molecular produce disminución en la mutagenia.

2.3. Nitrilos α,β -insaturados: el acrilonitrilo

2.3.1. Generalidades

El acrilonitrilo (2-propenenitrilo, cianuro de vinilo, CAS 107-13-1; figura 2.6) es un líquido estable, incoloro y de olor penetrante. Es soluble en agua y muy soluble en acetona, benceno, éter y etanol.¹¹² Puede llegar a polimerizar espontáneamente en presencia de luz, medios alcalinos concentrados o en ausencia de O_2 .¹¹³

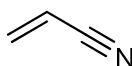


Figura 2.6. Estructura del acrilonitrilo

El doble enlace de esta molécula es susceptible de ataques nucleofílicos mediante reacciones de adición de Michael. Puede ser oxidado por el citocromo P-450 hasta óxido de 2-cianoetileno o glicidonitrilo.¹¹⁴

A finales del siglo XIX el acrilonitrilo se obtenía por deshidratación de la acrilamida (o de la cianhidrina etilénica) con P_2O_5 . Fue en la década de los 60's cuando la empresa Sohio empezó a utilizar industrialmente la oxidación selectiva de propileno y amoníaco (actualmente, el proceso Sohio se utiliza en más del 90% de las industrias de producción de acrilonitrilo).¹¹⁵ Otra ruta de síntesis comercial fue la adición catalítica de cianuro de hidrógeno a acetileno, pero perdió interés desde 1970.¹¹⁶

Para la determinación cuantitativa de acrilonitrilo se manejan técnicas de colorimetría,¹¹⁷ cromatografía de gases,¹¹⁸ HPLC¹¹⁹ y polarografía, útiles en una gran variedad de matrices.

¹¹² Davis, H. S.; Wiedeman, O. F. Physical properties of acrylonitrile. *Ind. Eng. Chem.* **1945**, *37*, 482-485

¹¹³ Smeltz, K. C.; Dyer, E. The effect of oxygen on the polymerization of acrylonitrile. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *74*, 623-628

¹¹⁴ Kedderis, G. L.; Batra, R.; Koop, D. R. Epoxidation of acrylonitrile by rat and human cytochromes P450. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 866-871

¹¹⁵ Brazdil, J. F. Acrylonitrile. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4ta ed., Vol. 1; Wiley-Interscience: New York, 1993

¹¹⁶ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1990. *Toxicological profile for acrylonitrile*. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA.

¹¹⁷ Hall, M. E.; Stevens, J. W. Spectrophotometric determination of acrylonitrile. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 2277-2280

La producción mundial de acrilonitrilo ha pasado de cerca de cien mil toneladas métricas en 1960 a más de seiscientas mil en 2006.¹²⁰ Entre sus principales usos pueden mencionarse los siguientes: preparación de fibras acrílicas, resinas de acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS) o estireno-acrilonitrilo (SAN), cauchos de nitrilo y elastómeros. También se utiliza como precursor en la síntesis de intermedios como acrilamida y adiponitrilo (para la producción de nilón).

El acrilonitrilo se descompone rápidamente en el aire y algo más despacio en medios acuosos (~2 semanas), por lo que la exposición ambiental de la población a este compuesto es baja. Sin embargo, se han llegado a detectar cantidades significativas en el humo del tabaco.^{121, 122, 123}

A nivel industrial, los seres humanos están expuestos durante las distintas etapas de su producción y síntesis hasta su incorporación en los productos comerciales.¹²⁴ Exposiciones superiores a 500 ppm durante pocos minutos se consideran letales.¹²⁵ Según algunos organismos gubernamentales de Europa y Estados Unidos, la cantidad de trabajadores potencialmente expuestos al acrilonitrilo es considerablemente alta, sobre todo en la producción de monómeros y fibras.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha clasificado al acrilonitrilo como “contaminante significativo del agua” y “contaminante peligroso del aire”.¹²⁶

¹¹⁸ Vassilaros, D. L.; Bzik, T. J.; Cara, C. A. Quantitative determination of acrylonitrile in an industrial effluent by ambient-temperature purge and trap capillary CG-MS and by heated purge and trap GC-FID. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 878-883

¹¹⁹ Saroja, N.; Gowda, L. R.; Tharanathan, R. N. Chromatographic determination of residual monomers in starch-g-polyacrylonitrile and starch-g-polyacrylate. *Chromatographia* **2000**, *51*, 345-348

¹²⁰ Sesto, B.; Mori, H.; Yi, Z. 2007. Acrylonitrile. *Chemical Economics Handbook*. Marketing research report. http://www.sriconsulting.com/CEH/available_reports.html (acceso: Enero 25, 2011)

¹²¹ Darral, K. G.; Figgins, J. A.; Brown, R. D.; Phillips, G. F. Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* **1998**, *123*, 1095-1101

¹²² Miller, S. L.; Branoff, S.; Nazaroff, W. W. Exposure to toxic air contaminants in environmental tobacco smoke: an assessment for California based on personal monitoring data. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **1998**, *8*, 287-311

¹²³ Fennell, T. R.; MacNeela, J. P.; Morris, R. W.; Watson, M.; Thompson, C. L.; Bell, D. A. Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: effects of glutathione S-transferase T1 null and M1 null genotypes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 705-712

¹²⁴ Czeizel, A. E.; Szilvási, R.; Tímár, L.; Puho, E. Occupational epidemiological study of workers in an acrylonitrile using factory with particular attention to cancers and birth defects. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *547*, 79-89

¹²⁵ Sakurai, H. Carcinogenicity and other health effects of acrylonitrile with reference to occupational exposure limit. *Ind. Health* **2000**, *38*, 165-180

¹²⁶ Basu, D.; Hsu, R.; Neal, M.; Santodonato, J.; Sugatt, R. *Health Assessment Document for Acrylonitrile. Final Report*. U. S. Environmental Protection Agency (EPA): Washington D. C., 2007; Vol. EPA/600/8-82/007F

2.3.2. Estudios toxicológicos

Para evaluar la toxicidad de un compuesto es necesario conocer su metabolismo y distribución en el cuerpo. Muchos compuestos orgánicos, potencialmente carcinógenos, no lo son directamente *per se*, sino que actúan a través de sus metabolitos.

El metabolismo del acrilonitrilo transcurre por dos rutas diferentes: 1) conjugación directa con el glutatión y 2) epoxidación a glicidonitrilo. La figura 2.7 muestra de forma esquemática estos procesos.

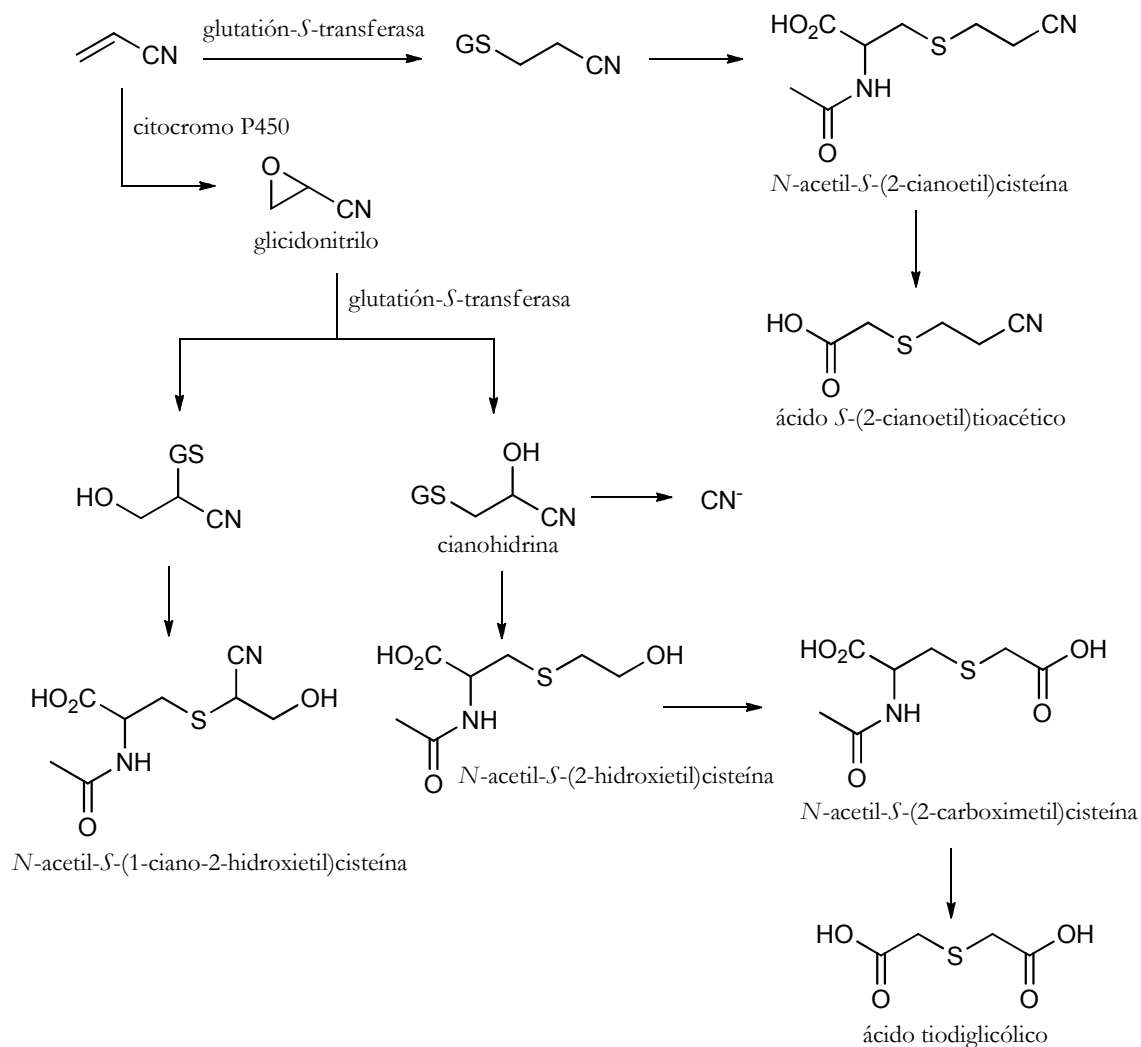


Figura 2.7. Rutas metabólicas del acrilonitrilo

Algunos grupos de investigación han asociado la toxicidad del acrilonitrilo a la liberación de cianuro en algunas etapas de su metabolismo, tales como la generación de cianohidrina¹²⁷ o por degradación del glicidonitrilo debido a hidrolasas epóxidas en

¹²⁷ Lambotte-Vandepaer, M.; Duverger van Bogaert, M.; Rollmann, B. Metabolism and mutagenicity of acrylonitrile: an in vivo study. *Environ. Mutagenesis* **1985**, 7, 655-662

microsomos humanos y de ratas.¹²⁸ Por otra parte, Appel indica que “*based on the effectiveness of different antidotes (...) it was concluded that the acute toxicity of acrylonitrile resulted from its intrinsic biological reactivity, not from cyanide as metabolite*”,¹²⁹ lo que evidencia las divergencias respecto a este tema.

Se ha encontrado que la epoxidación por el citocromo P-450 transcurre mediante una reacción de orden cero,¹³⁰ mientras que la conjugación del glutatión sigue una cinética de orden dos.^{131,132}

Las vías de administración influyen de manera considerable en el metabolismo del acrilonitrilo. Por ejemplo, la N-acetil-S-(2-cianoetil)cisteína es el principal metabolito detectado en la orina cuando la administración es intraperitoneal, no siéndolo si es por inhalación (75% frente a 8%). Si la administración es oral, la absorción tiene lugar en el tracto gastrointestinal, para luego distribuirse en otros tejidos.

En los seres humanos el acrilonitrilo puede penetrar en el organismo por ingestión, inhalación o por absorción a través de la piel. Se sabe que el hígado es el sitio más importante de su metabolismo y que las células epiteliales pulmonares son capaces de metabolizarlo a glicidonitrilo.¹³³ Incluso se ha reportado peroxidación lipídica en eritrocitos de personas ocupacionalmente expuestas al acrilonitrilo.¹³⁴

Aunque los ensayos que utilizan la orina son una buena herramienta para monitorizar la exposición al acrilonitrilo, los aductos con proteínas son biomarcadores toxicológicamente más relevantes. Al igual que otros carcinógenos, el acrilonitrilo forma

¹²⁸ Kedderis, G. L.; Batra, R. Species differences in the hydrolysis of 2-cyanoethylene oxide, the epoxide metabolite of acrylonitrile. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 685-689

¹²⁹ Appel, K. E.; Peter, H.; Bolt, H. M. Effect of potential antidotes on the acute toxicity of acrylonitrile. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1981**, *49*, 157-163

¹³⁰ Wang, S. H.; Lu, R. Z.; Xu, W. R.; Xing, G. W.; Zhao, X. W.; Wang, S. Z.; Zhang, Y.; Han, F. A.; Aschner, M. Induction or inhibition of cytochrome P450 2E1 modifies the acute toxicity of acrylonitrile in rats: biochemical evidence. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 461-469

¹³¹ Gargas, M. L.; Andersen, M. E.; Teo, S. K.; Batra, R.; Fennell, T. R.; Kedderis, G. L. A physiologically based dosimetry description of acrylonitrile and cyanoethylene oxide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1995**, *134*, 185-194

¹³² Kedderis, G. L.; Teo, S. K.; Batra, R.; Held, S. D.; Gargas, M. L. Refinement and verification of the physiologically based dosimetry description for acrylonitrile in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *140*, 422-435

¹³³ Roberts, A. E.; Lacy, S. A.; Pilon, D.; Turner, M. J.; Rickert, D. E. Metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide in F344 rat liver microsomes, lung microsomes and lung cells. *Drug Metab. Dispos.* **1989**, *17*, 481-486

¹³⁴ Ghanayem, B. I.; Boor, P. J.; Ahmed, A. E. Acrylonitrile induced gastric mucosal necrosis: role of gastric glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *232*, 570-577

aductos con el N terminal de la valina en la hemoglobina, que pueden ser valorados mediante distintas técnicas cuantitativas.^{135, 136}

2.3.2.2. Mutagenia y carcinogenia

La actividad mutágena del acrilonitrilo se ha evaluado mediante una gran variedad de tests en procariotas (*Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*), eucariotas primitivas (*Aspergillus* y *Saccharomyces cerevisiae*), insectos (*Drosophila melanogaster*), plantas (*Vicia faba*), células de mamíferos, animales de ensayo o mediante observaciones en personas profesionalmente expuestas al compuesto. La mayoría de las investigaciones se hicieron en la década de los 80.^{137, 138} El interés por el tema ha aumentado mucho en los últimos años, debido a la alta producción y variedad de usos del acrilonitrilo.¹³⁹

El acrilonitrilo puede dar lugar a sustitución de pares de bases y mutaciones en los marcos de lectura en distintas cadenas de *Salmonella typhimurium* pero, como prerequisite para la inducción de mutagenia, deben estar presentes sistemas de enzimas microsomiales (S9).^{140, 141} Mediante estudios en cadenas de *Escherichia coli*, el grupo de Venitt ha sugerido, que el acrilonitrilo podría actuar como mutágeno de acción directa.¹⁴² Whittaker *et al.* han reportado que dicho compuesto es incapaz de causar pérdida de cromosomas en *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su actividad antimitocondrial.¹⁴³ Otros estudios han mostrado que es un potente inductor de conversión génica mitótica y de mutaciones nucleares y mitocondriales. También se ha encontrado que es mutágeno en linfoblastos

¹³⁵ Wong, J. L.; Liu, D. Z.; Zheng, Y. T. Lysine conjugate of acrylonitrile as antigenic sites in hemoglobin adducts. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 171-174

¹³⁶ Schettgen, T.; Muller, J.; Fromme, H.; Angerer, J. Simultaneous quantification of haemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile, acrylamide and glycidamide in human blood by isotope dilution GC/NCI-MS/MS. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2467-2473

¹³⁷ Lambotte-Vandepaer, M.; Duverger van Bogaert, M. Genotoxic properties of acrylonitrile. *Mutat. Res.* **1984**, *134*, 49-54

¹³⁸ De Meester, C.; Poncellet, F.; Roberfroid, M.; Mercier, M. Mutagenicity of acrylonitrile. *Toxicology* **1978**, *11*, 19-27

¹³⁹ Léonard, A.; Gerber, G. B.; Stecca, C.; Rueff, J.; Borba, H.; Farmer, P. B.; Sram, R. J.; Czeizel, A. E.; Kalina, I. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of acrylonitrile. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **1999**, *436*, 263-283

¹⁴⁰ Venitt, S. Mutagenic studies with acrylonitrile. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1978**, *57*, 107-113

¹⁴¹ Zhurkov, V. S.; Sram, R. J.; Dugan, A. M. Evaluation of acrylonitrile mutagenic activity. *Gig. Sanit.* **1983**, *1*, 71-72

¹⁴² Venitt, S.; Bushell, C. T.; Osborne, M. Mutagenicity of acrylonitrile in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1977**, *45*, 283-288

¹⁴³ Whittaker, S. G.; Zimmermann, F. K.; Dicus, B.; Piegorsch, W. W.; Resnick, M. A.; Fogel, S. Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae*. An interlaboratory assessment of 12 chemicals. *Mutat. Res.* **1990**, *241*, 225-241

humanos¹⁴⁴ y que da lugar a inducción en el intercambio de cromátidas hermanas,¹⁴⁵ además de poseer actividad clastógena.

Numerosos ensayos con animales han conducido –de manera significativa– al hallazgo de tumores en la glándula de Zymbal, papilomas estomacales y gliomas. Con seres humanos se han realizado diversos estudios epidemiológicos aunque, como indica Rothman, “...*the combined information from these studies is insufficient to support confidence about a lack of carcinogenicity at all sites. Nevertheless, despite the flaws in some of the individual studies, the summarized findings offer reassurance that workers exposed to acrylonitrile face no striking increase in mortality for all cancer or for respiratory cancer*”.¹⁴⁶ Los resultados de estos estudios parecen no respaldar una relación causal entre exposición a acrilonitrilo y algún tipo de cáncer.¹⁴⁷ Además, se observa cierta discordancia, cualitativa y cuantitativa, al extrapolar resultados en animales de ensayo a seres humanos.¹⁴⁸

El último informe de la IARC indica que “*there is inadequate evidence in humans for the carcinogenicity of acrylonitrile*” y concluye que “*acrylonitrile is possibly carcinogenic to humans (Group 2B)*”.¹⁴⁹ La EPA lo clasifica como “*probable human carcinogen*”¹⁵⁰ y la Comisión Europea señala: “*It is concluded that acrylonitrile is unlikely to present a risk to workers/consumers due to physico-chemical hazard*”.¹⁵¹

2.3.2.2. Aductos con proteínas y ADN

Cuando se intenta conocer el riesgo genético de un compuesto químico para el ser humano y los estudios epidemiológicos son dificultosos (por ej. por exigir mucho tiempo),

¹⁴⁴ Eastmond, D. A.; Hartwig, A.; Anderson, D.; Anwar, W. A.; Cimino, M. C.; Dobrev, I.; Douglas, G. R.; Nohmi, T.; Phillips, D. H.; Vickers, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS harmonized scheme. *Mutagenesis* **2009**, *24*, 341-349

¹⁴⁵ Perocco, P.; Pane, G.; Bolongnei, S.; Zannotti, M. Increase of sister-chromatid exchange and unscheduled synthesis of deoxyribonucleic acid by acrylonitrile in human lymphocytes in vitro. *Scan. J. Work. Environ. Health* **1984**, *8*, 290-293

¹⁴⁶ Rothman, K. J. Cancer occurrence among workers exposed to acrylonitrile. *Scand. J. Work. Environ. Health* **1994**, *20*, 313-321

¹⁴⁷ Cole, P.; Mandel, J. S.; Collins, J. J. Acrylonitrile and cancer: a review of the epidemiology. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *52*, 342-351

¹⁴⁸ Ward, C. E.; Starr, T. B. Comparison of cancer risks projected from animal bioassays to epidemiologic studies of acrylonitrile-exposed workers. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1993**, *18*, 214-232

¹⁴⁹ International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 71. IARC: Lyon, Francia

¹⁵⁰ U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 2000. Health effects assessment for acrylonitrile. EPA/600/8-88/014. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment. Office of Research and Development: Cincinnati, OH

¹⁵¹ European Commission (EC), 2004. European Union risk assessment report: acrylonitrile. Volumen 32, EUR 20857EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia

el empleo de indicadores biológicos es una buena alternativa para estudiar esos daños genéticos y sus efectos. En el caso del acrilonitrilo, Peter y Bolt encontraron en la década de los 80 que esta molécula puede unirse covalentemente a proteínas microsomiales en hígado de ratas mediante alquilación directa en distintos sitios nucleófilos.¹⁵² Desde entonces se han encontrado e investigado reacciones de alquilación con el ADN, ARN y algunos polinucleótidos.¹⁵³

El acrilonitrilo y su análogo epóxido son capaces de enlazarse con nucleófilos en biomoléculas, para formar aductos. En el caso del glicidonitrilo se ha encontrado que puede unirse irreversiblemente al ADN en timo de ternera, o a proteínas en el hígado y cerebro de ratas; no obstante, los límites de detección han sido relativamente bajos.¹⁵⁴ Incluso se ha llegado a presentar al glicidonitrilo como responsable directo de los efectos carcinógenos de la exposición a acrilonitrilo, aunque otros estudios han mostrado que los productos de la reacción con nucleótidos del ADN son inestables.¹⁵⁵ Whysner *et al.* han postulado que la generación de tumores debida al acrilonitrilo se debe a la formación del aducto 8-oxodeoxiguanosina (daño oxidativo).¹⁵⁶

Se ha encontrado que el acrilonitrilo forma aductos con diversos péptidos,¹⁵⁷ pudiendo enlazarse a la hemoglobina *in vitro* e *in vivo*, para formar aductos cianoetil-, especialmente con residuos de cisteína y valina.^{158, 159} Esos aductos han sido muy útiles al estudiar la formación de acrilonitrilo en el humo del tabaco.^{160, 161} La alquilación del ADN en animales de ensayo es lenta a pH y temperatura fisiológicos, generando aductos

¹⁵² Peter, H.; Bolt, H. M. Irreversible protein binding of acrylonitrile. *Xenobiotica* **1981**, *11*, 51-56

¹⁵³ Abdel-Rahman, S. Z.; Nouraldeen, A. M.; Ahmed, A. E. Molecular interaction of [2,3-¹⁴C]acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J. Biochem. Toxicol.* **1996**, *9*, 191-198

¹⁵⁴ Guengerich, F. P.; Geiger, L. E.; Hogy, L. L.; Wright, P. L. In vitro metabolism of acrylonitrile to cyanoethylene oxide, reaction with glutathione, and irreversible binding to proteins and nucleic acids. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 4925-4933

¹⁵⁵ Yates, J. M.; Fennell, T. R.; Turner, M. J.; Recio, L.; Sumner, S. C. Characterization of phosphodiester adducts by the reaction of cyanoethylene oxide with nucleotides. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 277-283

¹⁵⁶ Whysner, J.; Conaway, C. C.; Verna, L. K.; Rosen, J. E.; Prahalad, A. K.; Rihies, J. P.; Ali, N.; Williams, G. M. Formation of 8-oxodeoxyguanosine in brain DNA of rats exposed to acrylonitrile. *Fundamen. Appl. Toxicol.* **1996**, *30*, 67-71

¹⁵⁷ Lawrence, R. M.; Sweetman, G. M.; Tavares, R.; Farmer, P. B. Synthesis and characterization of peptide adducts for use in monitoring human exposure to acrylonitrile and ethylene oxide. *Teratog. Carcinog. Mutag.* **1996**, *16*, 139-148

¹⁵⁸ Osterman-Golkar, S.; MacNeela, J. P.; Turner, M. J.; Walker, V. E.; Swenberg, J. A.; Sumner, S. J.; Youtsey, S.; Fennell, T. R. Monitoring exposure to acrylonitrile using adducts with N-terminal valine in hemoglobin. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 2701-2707

¹⁵⁹ Fennell, T. R.; MacNeela, J. P.; Turner, M. J.; Swenberg, J. A. Hemoglobin adducts formed on administration of acrylonitrile (AN) to rats. *The Toxicologist* **1989**, *9*, 128-130

¹⁶⁰ Pérez, H. L.; Segerbäck, D.; Osterman-Golkar, S. Adducts of acrylonitrile with hemoglobin in nonsmokers and in participants in a smoking cessation program. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 869-873

¹⁶¹ Thier, R.; Lewalter, J.; Selinski, S.; Bolt, H. M. Reevaluation of the effect of smoking on the methylation of N-terminal valine in haemoglobin. *Arch. Toxicol.* **2001**, *75*, 270-273

carboxietil- y cianoetil-. Aductos similares se han encontrado en reacciones con varios nucleósidos y 2-deoxinucleósidos.^{162, 163}

Es importante recalcar que la velocidad de reacción es mucho mayor con el glicidonitrilo que con el acrilonitrilo.

En la figura 2.8 se muestran las estructuras de algunos de los aductos ya identificados y caracterizados.

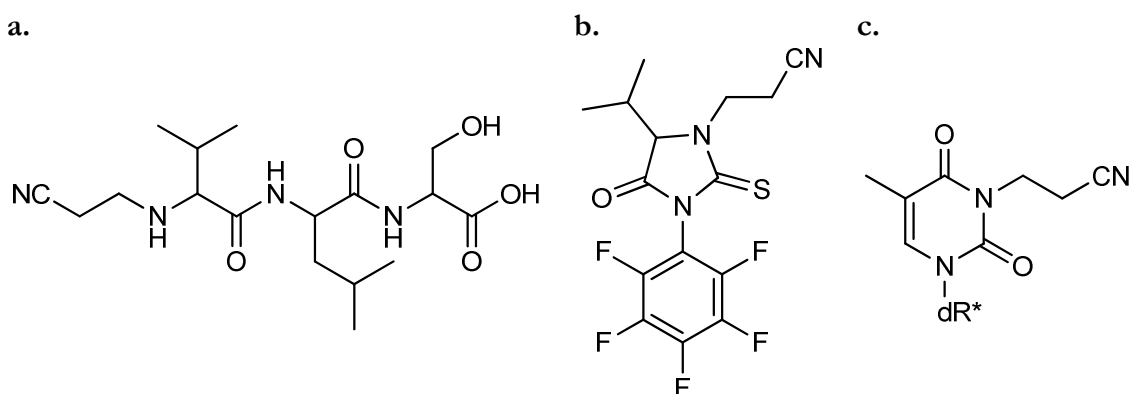


Figura 2.8. Estructuras de aductos del acrilonitrilo con (a.) el péptido Val–Leu–Ser, (b.) el derivado pentafluorofeniltiohidantoína (PFPH), (c.) la deoxitimidina (dR* = deoxirribosa)

2.4. Ácidos carboxílicos α,β -insaturados: el ácido acrílico

2.4.1. Generalidades

El ácido acrílico (ácido 2-propenoico, CAS 79–10–7; figura 2.9) es un líquido incoloro a temperatura y presión ambiente, de olor acre. Su $pK_a = 4.25$ revela que se encuentra predominantemente en forma ionizada. Es miscible con el agua y con la mayoría de disolventes orgánicos.¹⁶⁴ Tiende a polimerizarse a altas temperaturas en presencia de luz o de compuestos que formen peróxidos o radicales libres;¹⁶⁵ por ello es necesario usar inhibidores en sus disoluciones.¹⁶⁶

¹⁶² Solomon, J. J.; Cote, I. L.; Wortman, M.; Decker, K.; Segal, A. In vitro alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile. Isolation of cyanoethyl-adducts of guanine and thymine and carboxyethyl-adducts of adenine and cytosine. *Chem.-Biol. Interact.* **1984**, *51*, 167-190

¹⁶³ Solomon, J. J.; Segal, A. Direct alkylation of calf thymus DNA by acrylonitrile. Isolation of cyanoethyl adducts of guanine and thymine and carboxyethyl adducts of adenine and cytosine. *Environ. Health Persp.* **1985**, *62*, 227-230

¹⁶⁴ Bauer, W. Acrylic acid and derivatives. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 5ta ed., Vol. 1; Wiley-Interscience: New York, 2003

¹⁶⁵ Muthukrishnan, S.; Hau-Pan, E.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C.; Davis, T. P.; Lewis, D.; Barner, L. Ambient temperature RAFT polymerization of acrylic acid initiated with ultraviolet radiation in aqueous solution. *Macromolecules* **2007**, *40*, 2978-2980

¹⁶⁶ Li, R.; Schork, F. J. Modeling of the inhibition mechanism of acrylic acid polymerization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 3001-3008

En 2003 la producción mundial de ácido acrílico alcanzó más de diez millones de toneladas métricas, con un crecimiento anual del 5%, que lo sitúa entre uno de los compuestos químicos más importantes de uso industrial.¹⁶⁷

El método más utilizado para fabricar ácido acrílico es la oxidación parcial del propano,¹⁶⁸ aunque también puede hacerse por hidrólisis del acrilonitrilo. En los últimos años se han desarrollado métodos de síntesis que utilizan fuentes renovables, que minimizan las emisiones de CO₂.¹⁶⁹

El ácido acrílico posee una amplia variedad de aplicaciones industriales, aunque su uso primario (~70% del total) es la producción de esteres acrílicos y resinas, que se utilizan especialmente para recubrimientos y adhesivos. También se emplea en el tratamiento químico de aguas y como intermedio en la producción de detergentes. En los últimos años se está utilizando en la producción de polímeros superabsorbentes.¹⁷⁰

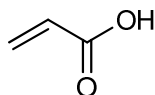


Figura 2.9. Estructura del ácido acrílico

El ácido acrílico se forma de manera natural en una gran variedad de algas marinas (*Chlorophyceae* y *Polysiphonia lanosa*)¹⁷¹ y en fluidos del estómago de rumiantes (como resultado de la fermentación bacteriana de carbohidratos) También ha sido identificado, como especie antibacteriana, en ostras y pectínidos.

Para la determinación de ácido acrílico en muestras de agua, aire y sistemas biológicos se han desarrollado métodos cuantitativos como cromatografía de gases, HPLC, cromatografía de intercambio iónico y polarografía.^{172, 173, 174}

¹⁶⁷ Ouellette, J. Acrylic acid outlook remains bullish. *Chemical Industry News & Intelligence*. ICIS Chemical Business: Inglaterra, 1 de mayo de 2000

¹⁶⁸ Lin, M. M. Selective oxidation of propane to acrylic acid with molecular oxygen. *Appl. Catal. A: Gen.* **2001**, *207*, 1-16

¹⁶⁹ Straathof, A. J. J.; Sie, S.; Franco, T. T.; van der Wielen, L. A. M. Feasibility of acrylic acid production by fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 727-734

¹⁷⁰ Yu, C.; Hui-min, T. Crosslinking carboxymethylchitosan-g-poly(acrylic acid) copolymer as a novel superabsorbent polymer. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 887-896

¹⁷¹ Verschueren, K. *Handbook of environmental data on organic chemicals*. 4ta ed.; Wiley-Interscience: Nueva York, 1991

¹⁷² Husain, S.; Sastry, G. S. R.; Prasad, P. R.; Sarma V. R. Differential pulse polarographic determination of residual acrylic acid in sodium polyacrylate. *Electroanalysis* **1991**, *3*, 71-72

¹⁷³ Zanella, R.; Schilling, M.; Klockow, D. Determination of acrylic acid in air by using diffusion denuder tubes combined with HPLC technique. *J. Environ. Monitor.* **1999**, *1*, 441-443

¹⁷⁴ Casella, I. G.; Pierri, M.; Contursi, M. Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 198-203

El ácido acrílico liberado a la atmósfera puede sufrir reacciones químicas (polimerización en presencia de O₂) y fotoquímicas (reacciones con O₃ para producir H₂O₂ y ácido cítrico), teniendo una vida media menor de un mes. El que se libera en el agua, puede sufrir degradación microbiana o sufrir irradiación UV para generar aminoácidos. También se puede biodegradar aerobia o anaeróbicamente^{175, 176}

Sobre la exposición humana al ácido acrílico, no hay datos respecto a sus niveles en el aire, agua o suelos. No obstante, se cree que puede haber exposición a partir de productos como pinturas de esmalte, recubrimientos, adhesivos o plásticos, o bien en personas que vivan cerca de plantas de producción de ácido acrílico o de manufactura de esteres acrílicos y otros polímeros (aunque no existen datos sobre su concentración en el aire cerca de estas zonas). La exposición ocupacional es el medio más importante de exposición humana a este compuesto, sobre todo por inhalación y contacto con la piel.¹⁷⁷

2.4.2. Estudios toxicológicos

Excepto algunos estudios *in vitro* sobre absorción a través de la piel,¹⁷⁸ apenas hay datos sobre la distribución, metabolismo y eliminación de ácido acrílico en seres humanos.

Pruebas en animales de ensayo han mostrado que el esta molécula se absorbe principalmente en el tracto gastrointestinal. Las mayores concentraciones se han encontrado en el hígado, intestino delgado y cerebro. Black *et al.* han encontrado que el ácido acrílico se absorbe y metaboliza rápidamente (~90% de la dosis administrada se elimina como CO₂ en 24 horas).¹⁷⁹

El paso metabólico del ácido acrílico, mediante la acrilil coenzima A, se da en la mitocondria. Consiste en reacciones análogas a la β-oxidación de los ácidos grasos. Se ha encontrado que el ácido 3-hidroxi propiónico y el N-acetil-S-(2-carboxietil)cisteína son

¹⁷⁵ Andreoni, V.; Bernasconi, S.; Sorlini, C.; Villa, M. Microbial degradation of acrylic acid. *Ann. Microbiol.* **1990**, *40*, 279-287

¹⁷⁶ Qu, M.; Bhattacharya, S. K. Degradation and toxic effects of acrylic acid on anaerobic systems. *J. Environ. Eng.* **1996**, *122*, 749-756

¹⁷⁷ International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1997. Environmental health criteria 191: Acrylic acid. United Nations Environment Program: World Health Organization: Ginebra

¹⁷⁸ D'Souza, R. W.; Francis, W. R. Vehicle and pH effects on the dermal penetration of acrylic acid: in vitro-in vivo correlation. *Toxicologist* **1988**, *8*, 831-836

¹⁷⁹ Black, K. A.; Beskitt, J. L.; Finch, L.; Tallant, M. J.; Udinsky, J. R.; Frantz, S. W. Disposition and metabolism of acrylic acid in C3H mice and Fischer-344 rats after oral or cutaneous administration. *J. Toxicol. Environ. Health* **1995**, *45*, 291-311

los metabolitos mayoritarios excretados en la orina.^{180, 181} La figura 2.10 muestra, de manera esquemática, esta ruta metabólica.

Sobre su toxicidad aguda, se ha encontrado que puede causar daños en ojos y fosas nasales, así como una toxicidad sistémica que llega a producir daños en riñones, hígado y pulmones (en animales de prueba).¹⁸² En el caso de los seres humanos estos efectos sistémicos son poco probables debido a la capacidad irritante de este compuesto.

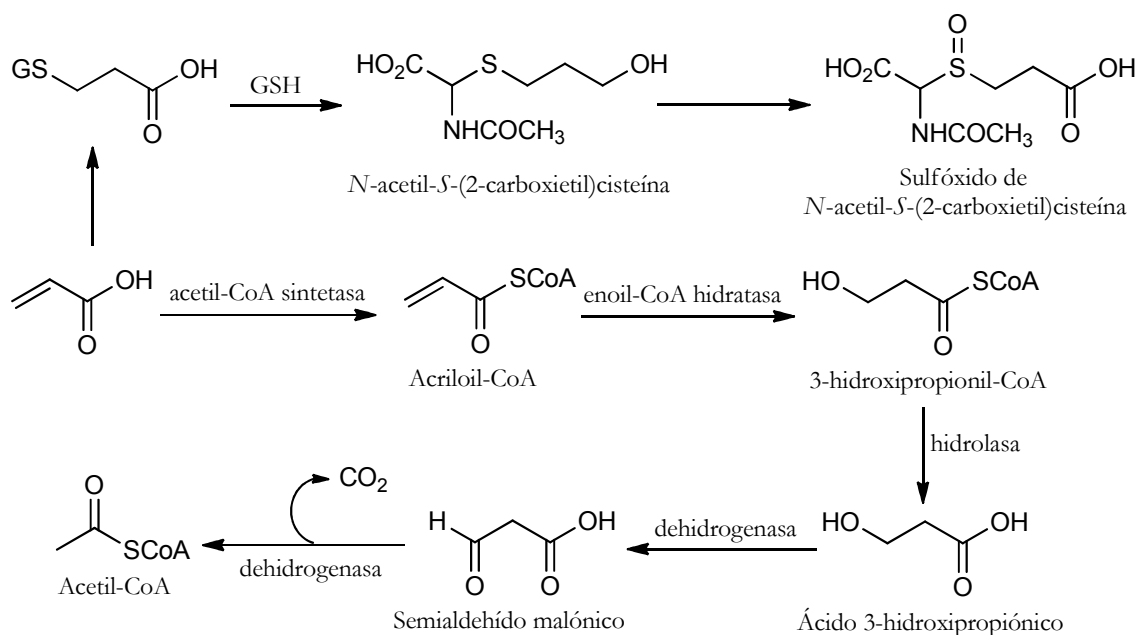


Figura 2.10. Esquema general de la ruta metabólica del ácido acrílico [Black *et al.*¹⁸³]

2.4.2.1. Mutagenia, carcinogenia y formación de aductos

Pruebas de mutación bacteriana con distintas cadenas de *Salmonella typhimurium* (con y sin activación metabólica) dieron resultados negativos.¹⁸⁴ Los ensayos de mutación genética en células de mamíferos también mostraron ausencia de actividad mutágena.

¹⁸⁰ Winter, S. M.; Sipes, I. G. The disposition of acrylic acid in the male Sprague–Dawley rat following oral or topic administration. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, *31*, 615-621

¹⁸¹ Finch, L.; Frederick, C. B. Rate and route of oxidation of acrylic acid to carbon dioxide in rat liver. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1992**, *19*, 498-505

¹⁸² Hellwig, J.; Gembardt, C.; Murphy, S. R. Acrylic acid: two generation reproduction toxicity study in Wistar rats with continuous administration in the drinking water. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 859-868

¹⁸³ Black, K. A.; Finch, L.; Frederick, C. B. Metabolism of acrylic acid to carbon dioxide in mouse tissues. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1993**, *21*, 97-104

¹⁸⁴ Cameron, T. P.; Rogers-Back, A. M.; Lawlor, T. E.; Harabell, J. W.; Seifried, H. E.; Dunkel, V. C. Genotoxicity of multifunctional acrylates in the Salmonella/mammalian–microsome assay and mouse lymphoma TK+/- assay. *Environ. Molecul. Mutagen.* **1991**, *17*, 264-271

Estudios de aberraciones cromosómicas *in vivo* e *in vitro* y ensayos en linfomas de ratón también dieron resultados negativos. Los efectos citotóxicos y el tamaño de las colonias formadas no fueron significativos.

McCarthy *et al.* encontraron, en hepatocitos primarios de rata, que el ácido acrílico no induce la síntesis de ADN no programada (síntesis que ocurre fuera de la fase S del ciclo celular; el test mide la reparación del ADN tras la escisión y eliminación de segmentos dañados por agentes químicos). No observaron mutaciones en la prueba de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila*.¹⁸⁵ También se han obtenido resultados negativos en pruebas de inducción de micronúcleos.¹⁸⁶

Sobre la carcinogenia del ácido acrílico, estudios realizados con animales han mostrado que no posee actividad carcinógena ni neurotóxica apreciable. Tampoco se han observado efectos en la función reproductiva o anormalidades durante la etapa prenatal.¹⁸⁷

¹⁸⁸ No hay, pues, razones para clasificar a este compuesto como tóxico para la reproducción. Según un documento de la Comisión Europea, “*it is unlikely that acrylic acid is mutagenic in vivo*”.¹⁸⁹

Por otro lado, Segal *et al.* lograron aislar y caracterizar aductos entre el ácido acrílico y adenina, timina y guanina mediante reacciones *in vitro* en timo de ternero.¹⁹⁰ No obstante, la relevancia de estos resultados se ha cuestionado mucho debido a limitaciones encontradas durante la génesis de dichos aductos.

Con dos nucleófilos modelo (metilamina e imidazol), Frederick y Reynolds encontraron que la formación de aductos con el anión acrilato no es viable. Con el ácido acrílico la reacción es teóricamente posible aunque, debido a su rápido metabolismo y excreción, no presenta interés biológico.¹⁹¹

Sobre la carcinogenia y mutagenia del ácido acrílico en seres humanos, hasta la fecha los estudios realizados son escasos y poco concluyentes. La EPA lo expresa de

¹⁸⁵ McCarthy, K. L.; Thomas, W. C.; Aardema, M. J.; Seymour, J. L.; Putman, D. L.; Yang, L. L.; Curren, R. D.; Valencia, R. Genetic toxicology of acrylic acid. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 505-515

¹⁸⁶ Wiegand, H. J.; Schiffmann, D.; Henschler, D. Non-genotoxicity of acrylic acid and *n*-butyl acrylate in a mammalian cell system (SHE cells). *Arch. Toxicol.* **1989**, *63*, 250-251

¹⁸⁷ DePass, L. R.; Woodside, M. D.; Garman, R. H.; Weil, C. S. Subchronic and reproductive toxicology studies on acrylic acid in the drinking water of the rat. *Drug Chem. Toxicol.* **1983**, *6*, 1-20

¹⁸⁸ Neeper-Bradley, T. L. Acrylic acid: reproductive study in rabbits. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 152

¹⁸⁹ European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylic acid. Volumen 28, EUR 19836EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia

¹⁹⁰ Segal, A.; Fedyk, J.; Melchionne, S.; Seidman, I. The isolation and characterization of 2-carboxyethyl adducts following in vitro reaction of acrylic acid with calf thymus DNA and bioassay of acrylic acid in female Hsd: (ICR)Br mice. *Chem.-Biol. Interact.* **1987**, *61*, 189-197

¹⁹¹ Frederick, C. B.; Reynolds, C. H. Modeling the reactivity of acrylic acid and acrylate anion with biological nucleophiles. *Toxicol. Lett.* **1989**, *47*, 241-247

manera clara en uno de sus informes: “no information was found in the secondary sources searched regarding the carcinogenicity of acrylic acid to humans”.¹⁹² La última evaluación de la IARC indica que el ácido acrílico “is not classifiable as to its carcinogenicity to humans (Group 3)” [ref. 149].

2.5. Amidas α,β -insaturadas: la acrilamida

2.5.1. Generalidades

La acrilamida (propenamida, CAS 79-06-1; figura 2.11) es un sólido blanco, cristalino a temperatura ambiente y sin olor. Es soluble en agua y en otros disolventes polares, como acetona o etanol.

Adquirió importancia industrial desde que pudo producirse por hidratación catalítica del acrilonitrilo (1954). Debido a su gran reactividad en reacciones de polimerización, se utiliza principalmente como intermedio en la producción y síntesis de poliacrilamidas.

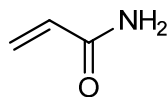


Figura 2.11. Estructura de la acrilamida

Los polímeros de acrilamida se utilizan mucho en tecnología química para una gran variedad de fines: floculantes de aguas residuales, coagulantes para clarificar aguas potables, sellantes en la construcción de presas y túneles o estabilizadores de suelo en construcción de carreteras, aglutinantes en la industria del papel, o como aditivos en la manufactura de productos cosméticos e industriales. En bioquímica analítica esos polímeros se utilizan en cromatografía y electroforesis.¹⁹³

La acrilamida es uno de los componentes del humo de tabaco, pudiendo formarse por calentamiento de material biológico.¹⁹⁴

La acrilamida posee dos centros reactivos: el grupo amida y el doble enlace terminal. El grupo amida puede sufrir reacciones de hidrólisis catalizadas en medios ácidos y básicos, aunque se requieren disoluciones concentradas y calentamiento superior a 100 °C

¹⁹² U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 1994. Chemical summary for acrylic acid. EPA 749F-94-006a. Office of Pollution, Prevention and Toxics: Cincinnati, OH

¹⁹³ European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylamide. Volumen 24, EUR 19835EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia

¹⁹⁴ Bergmark, E.; Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and non smokers. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 78-84

durante horas¹⁹⁵ (entre los derivados de ácidos carboxílicos, las amidas son las menos reactivas en reacciones de hidrólisis¹⁹⁶). La electrofilia de este compuesto le permite interactuar con macromoléculas biológicas nucleófilas.

Su baja masa molecular y alta solubilidad en agua permiten a la acrilamida atravesar con facilidad diversas membranas biológicas.¹⁹⁷ Por ello y por la facilidad con que sufre transformaciones metabólicas, puede reaccionar en distintos sitios celulares, especialmente mediante reacciones de adición de Michael. Además de las reacciones mencionadas, en los últimos años se ha descubierto que la acrilamida sufre biotransformaciones oxidativas, en especial por el citocromo P-450 2E1 (CYP2E1).^{198, 199} El resultado más importante de esas transformaciones es el metabolito epóxido conocido como glicidamida.

2.5.2. Estudios toxicológicos

“I am justified in concluding from the results of these experiments that extracts of roasted food contain one or more carcinogenic substances”.²⁰⁰ Con estas palabras en *Nature*, Widmark iniciaba en 1939 un estudio sobre los efectos patógenos que diversos componentes generados en los alimentos podían producir en seres humanos.

Investigadores de la Universidad de Estocolmo propusieron en 2000 la hipótesis de que el proceso de cocinado de alimentos es la principal fuente de acrilamida en el cuerpo humano.²⁰¹ Afirmaron que *“...an evaluation of cancer tests of acrylamide and available data for its metabolism leads to the estimation that the background dose of acrylamide is associated with a considerable cancer risk”*. Dos años después, los mismos investigadores encontraron altos niveles de acrilamida en el procesado de algunos alimentos.²⁰² La noticia causó conmoción en la comunidad científica mundial pues, aunque la acrilamida se producía comercialmente desde tiempo atrás y sus propiedades toxicológicas eran conocidas, la idea de que se generara de

¹⁹⁵ Carey, F.; Sundberg, R. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*, 4ta ed.; Springer Science: Virginia, USA. 2007, 662-664

¹⁹⁶ O'Connor, C. Acidic and basic amide hydrolysis. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1970**, *24*, 553-564

¹⁹⁷ Friedman, M. Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4504-4526

¹⁹⁸ Sumner, S. C.; Fennell, T.; Moore, T. A.; Chanas, B.; Ghanayem, B. I. Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1110-1116

¹⁹⁹ Doroshenko, O.; Fuhr, U.; Kunz, D.; Frank, D.; Kinzig, M.; Jetter, A.; Reith, Y.; Lazar, A.; Taubert, D.; Kirchheiner, J.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Berger, F. I.; Bertow, D.; Berkessel, A.; Sorgel, F.; Schomig, E.; Tomalik-Scharte, D. In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2009**, *18*, 433-443

²⁰⁰ Widmark, E. M. Presence of cancer producing substances in roasted food. *Nature* **1939**, *143*, 984

²⁰¹ Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 517-522

²⁰² Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4998-5006

forma casual era nueva. Tras una consulta a expertos sobre el caso de la acrilamida, organizada por la Organización Mundial de la Salud, se concluyó que “...*the available data were not adequate to present specific quantitative estimates of cancer risk to humans, but that the presence of acrylamide in food at relatively high levels is of mayor concern due to its genotoxic potential*”.²⁰³

Dos artículos publicados en *Nature* en 2002 mostraron que la formación de acrilamida en distintos alimentos está ligada con la reacción de Maillard, ruta principal de generación del color y sabor en alimentos cocinados.²⁰⁴ Mottram escribe “*our findings indicate that Maillard reactions (...) can produce acrylamide and might explain the increased concentrations of acrylamide in certain plant-derived foods after cooking*”.²⁰⁵ Por su parte, Stadler concluye: “*Our findings indicate that the Maillard reaction can, under particular conditions, be linked to the formation of acrylamide*”.²⁰⁶

Antes de esas fechas Tilson había estudiado algunas propiedades neurotóxicas de la acrilamida en animales y humanos.²⁰⁷ Dearfield y Johnson investigaron, de manera independiente, los efectos carcinógenos, genotóxicos y reproductivos del compuesto en animales de experimentación.^{208, 209}

En 1991 Calleman y Bergmark encuentran que, en ratas de experimentación, la acrilamida se transforma *in vivo* en glicidamida.^{210, 211} Otros estudios se centraron en pruebas biológicas convencionales.^{212, 213}

En la actualidad se continúa investigando la relación que pudiera existir entre ingesta diaria de acrilamida y riesgo de cáncer. En la Tabla 2.1 se muestran los contenidos de acrilamida encontrados en algunos productos de consumo habitual.

²⁰³ World Health Organization (WHO), 2002. Health implications of acrylamide in food: Report of a joint FAO/WHO consultation. WHO Headquarters: Ginebra, Suiza

²⁰⁴ Kawamura, S. Seventy years of the Maillard reaction. En: Walker, G. R.; Feather, M. S. *The Maillard reaction in foods and nutrition*. American Chemical Society: Washington, US. 1983

²⁰⁵ Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L.; Dodson, A. T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **2002**, *419*, 448-449

²⁰⁶ Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Riediker, S. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **2002**, *419*, 449-450

²⁰⁷ Tilson, H. A. The neurotoxicity of acrylamide: an overview. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **1981**, *3*, 445-461

²⁰⁸ Dearfield, K. L.; Abernathy, C. O.; Ottley, M. S.; Brantner, J. H.; Hayes, P. F. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* **1988**, *195*, 45-77

²⁰⁹ Johnson, K. S.; Gorzinski, K.; Bodner, R.; Campbell, C.; Wolf, C.; Friedman, M.; Mast, R. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fisher 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1986**, *85*, 154-168

²¹⁰ Calleman, C. J.; Bergmark, E.; Costa, L. G. Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 406-412

²¹¹ Bergmark, E.; Calleman, C. J.; Costa, L. G. Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1991**, *111*, 352-363

²¹² Bull, R. J.; Robinson, M.; Laurie, R. D.; Stoner, G. D.; Greisiger, E.; Meier, J. R.; Stober, J. Carcinogenic effects of acrylamide in SENCAR and A/J mice. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 107-111

²¹³ Wang, R. S.; McDaniel, L. P.; Manjanatha, M. G.; Shelton, S. D.; Doerge, D. R.; Mei, N. Mutagenicity of acrylamide and glycidamide in the testes big blue mice. *Toxicol. Sci.* **2010**, *117*, 72-80

Tabla 2.1. Niveles de acrilamida en $\mu\text{g kg}^{-1}$ en alimentos y bebidas²¹⁴

| Alimento / producto | Concentración promedio | Concentración máxima |
|------------------------------|------------------------|----------------------|
| Patatas fritas (comerciales) | 752 | 4080 |
| Patatas fritas (caseras) | 334 | 5312 |
| Pescado y productos marinos | 25 | 233 |
| Cereales para el desayuno | 96 | 1346 |
| Frutos secos y semillas | 84 | 1925 |
| Café (descafeinado) | 668 | 5399 |
| Café (preparado) | 13 | 116 |
| Té verde | 306 | 660 |
| Frutas procesadas | 131 | 770 |
| Productos lácteos | 5.8 | 36 |
| Frutas frescas | < 1 | 10 |

Aunque los niveles de consumo medio de acrilamida reportados por la OMS muestran contenidos entre 0,3 y 2,0 μg por kg de peso corporal por día ($\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bw}}/\text{día}$) para una población promedio, pueden variar entre 0,6 y 3,5 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bw}}/\text{día}$ e incluso llegar a 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{bw}}/\text{día}$.²¹⁵

Respecto al metabolismo de la acrilamida –esencial en investigaciones sobre sus efectos toxicológicos– se produce con rapidez, bien por conjugación con el glutatión (catalizada por el glutatión-S-transferasa) para generar derivados de ácidos mercaptúricos y N-acetil-S-(3-amino-3-oxopropil)cisteína, bien por reacción con el citocromo P450 2E1, para formar glicidamida.

2.5.2.1. Principales efectos toxicológicos

Los principales efectos patógenos de la exposición a la acrilamida son neurotoxicidad, efectos reproductivos y de desarrollo, genotoxicidad y carcinogénesis.

Numerosos estudios en animales experimentales y en humanos, han mostrado que el sistema nervioso (periférico y central) es el blanco principal para la toxicidad de la

²¹⁴ World Health Organization (WHO), 2005. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA/64/SC: Roma, Italia

²¹⁵ Dybing, E.; Farmer, P. B.; Andersen, M.; Fennell, T. R.; Lallje, S. P.; Muller, D. J.; Olin, S.; Petersen, B. J.; Scholz, G.; Slimani, M.; Törnqvist, M.; Verger, P. Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 365-410

acrilamida. La neurotoxicidad humana se caracteriza por daños en los nervios periféricos.^{216, 217, 218}

Hay evidencia de que los nervios terminales son objetivos primarios de la acrilamida, desarrollando una disfunción presináptica y la subsecuente degeneración del nervio (provocando disfunción autonómica y daños en zonas críticas del cerebro).^{219, 220, 221} También se cree que esta actividad neurotóxica tiende a reducir la fertilidad.²²² No obstante, se desconoce si dicha actividad se debe a la acrilamida *per se* o a su metabolito glicidamida. Estudios *in vivo* e *in vitro* apoyan la hipótesis de la interacción directa de la acrilamida (electrófilo débil) con grupos sulfhidrilos (nucleófilos débiles) en proteínas de los nervios terminales.²²³ Quizás debido a su débil electrofilia, la acrilamida presenta baja reactividad frente a las bases del ADN, que son nucleófilos fuertes.²²⁴

La acrilamida no muestra mutagenia sobre la *Salmonella typhimurium* (con y sin activación metabólica)²²⁵ y tampoco parece inducir mutación en pruebas tradicionales como la hipoxantina fosforosiltransferasa (HPRT) y la de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila*. Por otro lado, la acrilamida es clastógena y mutágena en células mamarias *in vivo* e *in vitro*.^{226, 227}

Los trabajos de Ghanayem *et al.* han mostrado que la conversión metabólica de acrilamida a glicidamida prece ser un prerrequisito para la actividad genotóxica del

²¹⁶ Spencer, P. S.; Schaumburg, H. H. A review of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* **1974**, *1*, 143-169

²¹⁷ LoPachin, R. M. The changing view of acrylamide neurotoxicity. *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 617-630

²¹⁸ Erkekoglu, P.; Baydar, T. Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 323-333

²¹⁹ LoPachin, R. M.; Ross, J. F.; Lehning, E. J. Nerve terminals as the primary site of acrylamide action: a hypothesis. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 43-59

²²⁰ LoPachin, R. M.; Balaban, C. D.; Ross, J. F. Acrylamide axonopathy revisited. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *188*, 135-153

²²¹ Lehning, E. J.; Balaban, C. D.; Ross, J. F.; LoPachin, R. M. Acrylamide neuropathy. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology* **2003**, *24*, 109-123

²²² Tyl, R. W.; Marr, M. C.; Myers, C. B.; Ross, W. P.; Friedman, M. A. Relationships between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reprod. Toxicol.* **2000**, *14*, 147-157

²²³ Costa, L. G.; Deng, H.; Gregotti, C.; Manzo, L.; Faustman, E. M.; Bergmark, E.; Calleman, C. J. Comparative studies on the neuro and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glicidamide in the rat. *Neurotoxicology* **1992**, *13*, 219-224

²²⁴ Besaratinia, A.; Pfeifer, G. P. DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 31-40

²²⁵ Lijinsky, W.; Andrews, A. W. Mutagenicity of vinyl compounds in *Salmonella typhimurium*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1980**, *1*, 259-267

²²⁶ Abramsson-Zetterberg, L. The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *535*, 215-222

²²⁷ Besaratinia, A.; Pfeifer, G. P. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1023-1029

compuesto.^{228, 229} Esta genotoxicidad puede conducir a mutaciones en las células somáticas, implicando desarrollo de cáncer o mutaciones en células germinales que podrían dar lugar a enfermedades genéticas transmisibles.²³⁰

También se ha demostrado que la acrilamida da lugar a efectos adversos en la reproducción: morfología anormal del espermatozoides, problemas de apareamiento y eyaculación así como una reducción en la concentración de testosterona y prolactina.^{231, 232} No obstante, aún no hay datos concluyentes sobre esos aspectos.

Pruebas de carcinogenicidad en ratas y ratones expuestos a distintas dosis de acrilamida han mostrado un incremento en la incidencia y número de adenomas pulmonares, tumores en la piel y mesoteliomas peritoneales y peritesticulares.^{233, 234} Respecto a la especie humana, se han realizado distintos estudios epidemiológicos en individuos ocupacionalmente expuestos a la acrilamida aunque, como indica Marsh “...these studies provided little evidence for a causal relationship between acrylamide exposure and cancer mortality”.²³⁵ Otros grupos de investigación, como los de Mucci y Pelucchi, también han buscado posibles relaciones entre exposición a acrilamida y riesgo de contraer cáncer.^{236, 237, 238} La relación entre variables aún no ha podido ser establecida con certeza. Por las razones descritas, el último informe de la IARC ha clasificado a la acrilamida como “probably carcinogenic to humans (Group 2A)”.²³⁹

²²⁸ Ghanayem, B. I.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Snyder, R.; Fennell, T. R.; Doerge, D. R. Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.* **2005**, *88*, 311-318

²²⁹ Ghanayem, B. I.; Witt, K. L.; El Hadri, L.; Hoffler, U.; Kissling, G. E.; Shelby, M. D.; Bishop, J. B. Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 157-163

²³⁰ Skog, K.; Alexander, J. Risk assessment techniques for acrylamide. En: *Acrylamide and other hazardous compounds in heated-treated foods*. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK. 2006

²³¹ Tyl, R. W.; Friedman, M. A. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* **2003**, *17*, 1-13

²³² Wang, H.; Huang, P.; Lie, T.; Li, J.; Hutz, R. J.; Li, K.; Shi, F. X. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *29*, 225-230

²³³ Rice, J. M. The carcinogenicity of acrylamide. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 3-20

²³⁴ Hogervorst, J. G. F.; Baars, B. J.; Schouten, L. J.; Konings, E. J. M.; Goldbohm, R. A.; van der Brandt, P. A. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 485-512

²³⁵ Marsh, G. M.; Lucas, L. J.; Youk, A. O.; Schall, L. C. Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* **1999**, *56*, 181-190

²³⁶ Mucci, L. A.; Sandin, S.; Balter, K.; Adami, H. O.; Magnusson, C.; Weiderpass, E. Acrylamide intake and breast cancer risk in Swedish women. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *293*, 1326-1327

²³⁷ Mucci, L. A.; Wilson, K. A. Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6013-6019

²³⁸ Pelucchi, C.; Galeone, C.; Dal Mas, L.; Talamini, R.; Montella, M.; Ramazzotti, V.; Negri, E.; Franceschi, S.; La Vecchia, C. Dietary acrylamide and renal cell cancer. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 1376-1377

²³⁹ International Agency for Research on Cancer (IARC), 1994. Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volumen 60. IARC: Lyon, Francia

2.5.2.2. Aductos con proteínas y ADN

Como se ha indicado antes, la acrilamida (y su metabolito epóxido glicidamida) pueden unirse a sitios nucleofílicos en biomoléculas como proteínas o ADN para formar aductos (biomarcadores–dosimetría molecular). Entre los métodos más utilizados para monitorizar exposiciones a acrilamida están los productos excretados por la orina,²⁴⁰ aductos con el glutatión^{241,242} o acrilamida libre en fluidos corporales.^{243,244}

En 1970 Hashimoto mostró, en ensayos con ratas, que los aductos de acrilamida se forman mediante el azufre de la cisteína en la hemoglobina.²⁴⁵ Desde entonces se han desarrollado distintos métodos analíticos para determinar acrilamida mediante la formación de aductos con proteínas.^{246, 247} Dichos métodos son lo suficientemente sensibles como para evaluar aductos de acrilamida (o glicidamida) en personas expuestas a ellos.²⁴⁸

En cuanto a la formación de aductos con el ADN, se ha encontrado que su génesis es muy lenta. Se forman aductos 2–carboxietil y 2–formamidoetil en varios sitios reactivos del ADN, tras prolongados tiempos de incubación.²⁴⁹ Las estructuras de los aductos no han podido ser elucidadas *in vivo*. Entre los métodos habitualmente usados para la

²⁴⁰ Boettcher, M. I.; Bolt, H. M.; Drexler, H.; Angerer, J. Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium–labeled acrylamide. *Arch. Toxicol.* **2005**, *80*, 55-61

²⁴¹ Peters, W. H.; Roelofs, H. M. Time dependent activity and expression of glutathione–S–transferase in the human colon adenocarcinoma cell line Caco–2. *Biochem. J.* **1989**, *264*, 613-616

²⁴² Zödl, B.; Schmid, D.; Wassler, G.; Gundacker, C.; Leibetseder, V.; Thalhammen, T.; Ekmekcioglu, C. Intestinal transport and metabolism of acrylamide. *Toxicology* **2007**, *232*, 99-108

²⁴³ Twaddle, N. C.; McDaniel, L. P.; da Costa, G. G.; Churchwell, M. I.; Beland, F. A.; Doerge, D. R. Determination of acrylamide and glycidamide serum toxicokinetics in B6C3F₁ mice using LC–ES/MS/MS. *Cancer Lett.* **2004**, *207*, 9-17

²⁴⁴ Il'yasova, D.; McCarthy, B. J.; Erdal, S.; Shimek, J.; Goldstein, J.; Doerge, D. R.; Myers, S. R.; Vineis, P.; Wishnok, J.; Swenberg, J.; Bigner, D.; Davis, F. G. Human exposure to selected animal neurocarcinogens: a biomarker–based assessment and implications for brain tumor epidemiology. *J. Toxicol. Env. Health -Pt b-Crit. Rev.* **2009**, *12*, 175-187

²⁴⁵ Hashimoto, K.; Aldridge, W. N. Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochem. Pharmacol.* **1970**, *19*, 2591-2604

²⁴⁶ Pérez, H. L.; Cheong, H. K.; Yang, J. S.; Osterman-Golkar, S. Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by chromatography–mass spectroscopy. *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 59-68

²⁴⁷ Törnqvist, M.; Mowrer, J.; Jensen, S.; Ehrenberg, L. Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 255-266

²⁴⁸ Fennell, T. R.; Sumner, S. C.; Snyder, R. W.; Burgess, J.; Spicer, R.; Bridson, W.; Friedman, M. Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* **2005**, *85*, 447-459

²⁴⁹ Solomon, J. J.; Fedyk, J.; Mukai, F.; Segal, A. Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3465-3470

determinación de los aductos de acrilamida con bases del ADN son frecuentes los inmuno ensayos, espectrometría de masas y CL-MS.^{250, 251, 252}

La figura 2.12 muestra las estructuras de algunos aductos de acrilamida ya caracterizados e identificados.

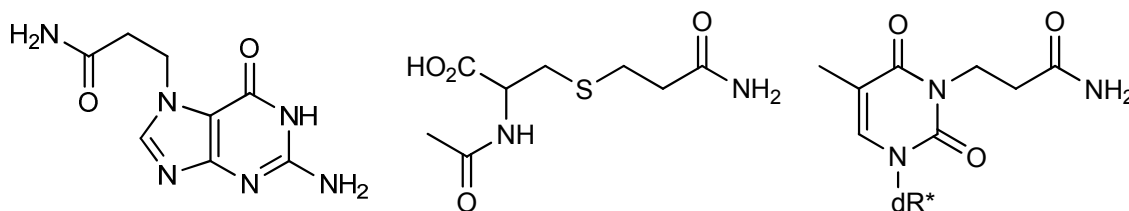


Figura 2.12. Estructuras de algunos aductos de la acrilamida (dR* = deoxirribosa)

2.6. Aldehídos α,β -insaturados: la acroleína

2.6.1. Generalidades y fuentes de exposición

La acroleína (2-propenal, CAS 107-02-8; figura 2.13) es un líquido incoloro y con un intenso olor acre. Soluble en agua y otros disolventes polares como etanol. Es susceptible de polimerizar en presencia de luz o disoluciones fuertemente alcalinas.²⁵³

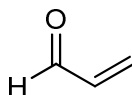


Figura 2.13. Estructura de la acroleína

En 1839 Berzelius encontró que uno de los productos de la degradación térmica de la glicerina es un aldehído, al que llamó acroleína, como contracción de *acris* (debido a su olor) y *oleum* (debido a su consistencia aceitosa). Posteriormente se demostró que la acroleína puede prepararse por destilación de la glicerina en presencia de agentes deshidratantes. Actualmente se utiliza la oxidación catalítica del propeno en fase gaseosa

²⁵⁰ da Costa, G. G.; Churchwell, M. I.; Hamilton, L. P.; von Tungeln, L. S.; Beland, F. A.; Marques, M. M.; Doerge, D. R. DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1328-1337

²⁵¹ Farmer, P. B.; Brown, K.; Tompkins, E.; Emms, V. L.; Jones, D. J.; Phillips, D. H. DNA adducts: mass spectrometry methods and future prospects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 293-301

²⁵² Inagaki, S.; Hirashima, H.; Esaka, Y.; Higashi, T.; Min, J. Z.; Toyooka, T. Screening DNA adducts by LC-ESI-MS-MS: application to screening new adducts formed from acrylamide. *Chromatographia* **2010**, *72*, 1043-1048

²⁵³ Mackay, D.; Shiu, W. Y.; Ma, K. C. *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*. Volumen 4. Lewis Publishers: Boca Raton, Florida. 1995

para la producción industrial de acroleína, aunque también puede obtenerse como producto secundario durante la producción de ácido acrílico o de acrilonitrilo.

La producción mundial de acroleína supera las doscientas mil toneladas métricas/año con un crecimiento anual superior al 7%. En la Unión Europea se utiliza casi en su totalidad como intermedio en la industria química para la producción de plásticos, aditivos, biocidas y curtientes. En otros países se usa principalmente como biocida en circuitos hídricos, canales de riego, torres de enfriamiento y plantas de tratamiento de agua.²⁵⁴

Para la determinación de acroleína en aire, disoluciones acuosas o muestras biológicas se han desarrollado diversos métodos cuantitativos: cromatografía líquida y de gases, colorimetría, fluorimetría y espectrometría de masas.^{255, 256, 257}

Las vías más frecuentes de exposición humana a la acroleína son tres: alimentación, endógenas y ambientales. Esterbauer indicó en 1991: “*The ubiquitous presence of acrolein is attributed to incomplete combustion of petrol, wood and plastic, to smoking of tobacco products, frying of foods in oils and endogenous lipid peroxidation*” [ref. 77]. Estudios más recientes han propuesto a la metionina y treonina como precursores de la acroleína (ver figura 2.14).²⁵⁸

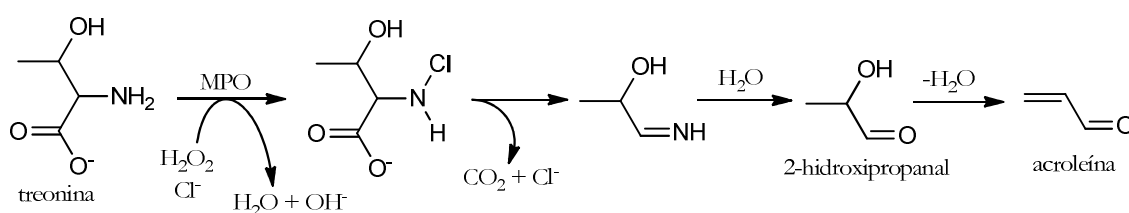


Figura 2.14. Mecanismo de formación de acroleína a partir de treonina, mediada por mieloperoxidasa (MPO)

La exposición a la acroleína en el humo de cigarro se considera muy relevante. En la orina de fumadores se han encontrado concentraciones del principal metabolito de la

²⁵⁴ World Health Organization (WHO), 2002. Acrolein. Concise International Chemical Assessment Document 43. International Programme on Chemical Safety, WHO: Ginebra, Suiza

²⁵⁵ Glaze, W. H.; Koga, M.; Cancilla, D. Ozonation byproducts. Improvement of an aqueous-phase derivatization method for the detection of formaldehyde and other carbonyl compounds formed by the ozonation of drinking water. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, 23, 838-847

²⁵⁶ Bohnenstengel, F.; Eichelbaum, M.; Golbs, E.; Kroemer, H. K. High performance liquid chromatographic determination of acrolein as a marker for cyclophosphamide bioactivation in human liver microsomes. *J. Chromatogr. B* **1997**, 692, 163-168

²⁵⁷ Casella, I. G.; Contursi, M. Quantitative analysis of acrolein in heated vegetable oils by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 5816-5821

²⁵⁸ Anderson, M. M.; Hazen, S.; Hsu, F.; Heinecke, J. W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chlorine system to convert hydroxyl-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* **1997**, 99, 424-432

acroleína (ácido 3-hidroxi-propilmercaptúrico) casi dobles que en no fumadores.²⁵⁹ También se ha observado que, tras varias semanas de abstinencia, los niveles de ese metabolito disminuían alrededor de un 80%. Se cree que el glicerol agregado al tabaco para mantener la humedad y absorber ciertos sabores, es una de las fuentes principales de acroleína en los cigarrillos²⁶⁰ (por cada gramo de glicerol agregado a 100g de tabaco aumenta la emisión de acroleína por cigarrillo en alrededor de 0,9µg), aunque quizás la fuente más importante sean los carbohidratos.²⁶¹

Se ha encontrado que altas cantidades de acroleína se pueden generar al cocinar con aceites a temperaturas superiores a 180 °C, para ser liberadas posteriormente a la atmósfera.²⁶² En Hong Kong, por ejemplo, las emisiones de acroleína procedentes de cocinas comerciales han excedido las emitidas por vehículos en la ciudad, en casi 5 ton/año, lo que se ha llegado a asociar con la alta incidencia de cáncer de pulmón en la población.^{263, 264}

Estudios *in vivo* han mostrado que la acroleína también puede resultar del metabolismo de la ciclofosfamida.^{265, 266}

2.6.2. Evaluaciones toxicológicas

Debido a la gran reactividad de la acroleína, se ha encontrado que la mayor proporción de esta especie inhalada exógenamente transcurre en el sitio de exposición, enlazándose rápidamente y de manera irreversible con grupos sulfhidrilos libres o en proteínas, mediante interacciones que se completan en pocos segundos.

²⁵⁹ Carmella, S. G.; Chen, M.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Hatsukami, D. K.; Hecht, S. S. Quantitation of acrolein-derived (3-hydroxypropyl)mercapturic acid in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry: effects of cigarette smoking. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 986-990

²⁶⁰ Carmines, E. L.; Gaworski, C. L. Toxicological evaluation of glycerin as a cigarette ingredient. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1521-1539

²⁶¹ Talhout, R.; Opperhuizen, A.; van Amsterdam, J. G. Sugars as tobacco ingredient: effects on mainstream smoke composition. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1789-1798

²⁶² Fullana, A.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Sidhu, S. Comparison of volatile aldehydes present in the cooking fumes of extra virgin olive, olive and canola oils. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5207-5214

²⁶³ Gao, Y. T.; Blot, W. J.; Zheng, W.; Ershow, A. G.; Cheng, W. H.; Levin, L. I.; Rong, Z.; Fraumeni, J. R. Lung cancer among Chinese women. *Int. J. Cancer* **1987**, *40*, 604-609

²⁶⁴ Hecht, S. S.; Seow, A.; Wang, M. Y.; Wang, R. W.; Meng, L.; Koh, W. P.; Carmella, S. G.; Chen, M.; Han, S. M.; Yu, M. M.; Yuan, J. M. Elevated levels of volatile organic carcinogens and toxicant biomarkers in Chinese women who regularly cook at home. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 1185-1192

²⁶⁵ Wrabetz, E.; Peter, G.; Hohorst, H. J. Does acrolein contribute to the cytotoxicity of cyclophosphamide? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1980**, *98*, 119-126

²⁶⁶ Gunther, M.; Wagner, E.; Ogris, M. Acrolein: unwanted side product or contribution to antiangiogenic properties of metronomic cyclophosphamide therapy? *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2704-2716

La principal vía de eliminación de la acroleína transcurre en el hígado por reacción con el glutatión (catálisis por glutatión-*S*-transferasa), siendo los ácidos mercaptúricos *S*-(2-carboxietil) y *S*-(3-hidroxipropil) los metabolitos principales.^{267, 268} Otros productos metabólicos identificados *in vivo* son el ácido acrílico y el gliceraldehído. Por acción del citocromo P450 la acroleína se transforma en su epóxido glicidaldehído que posteriormente, mediante una epoxidasa, generag gliceraldehído.²⁶⁹ La figura 2.15 esquematiza la ruta metabólica de la acroleína.

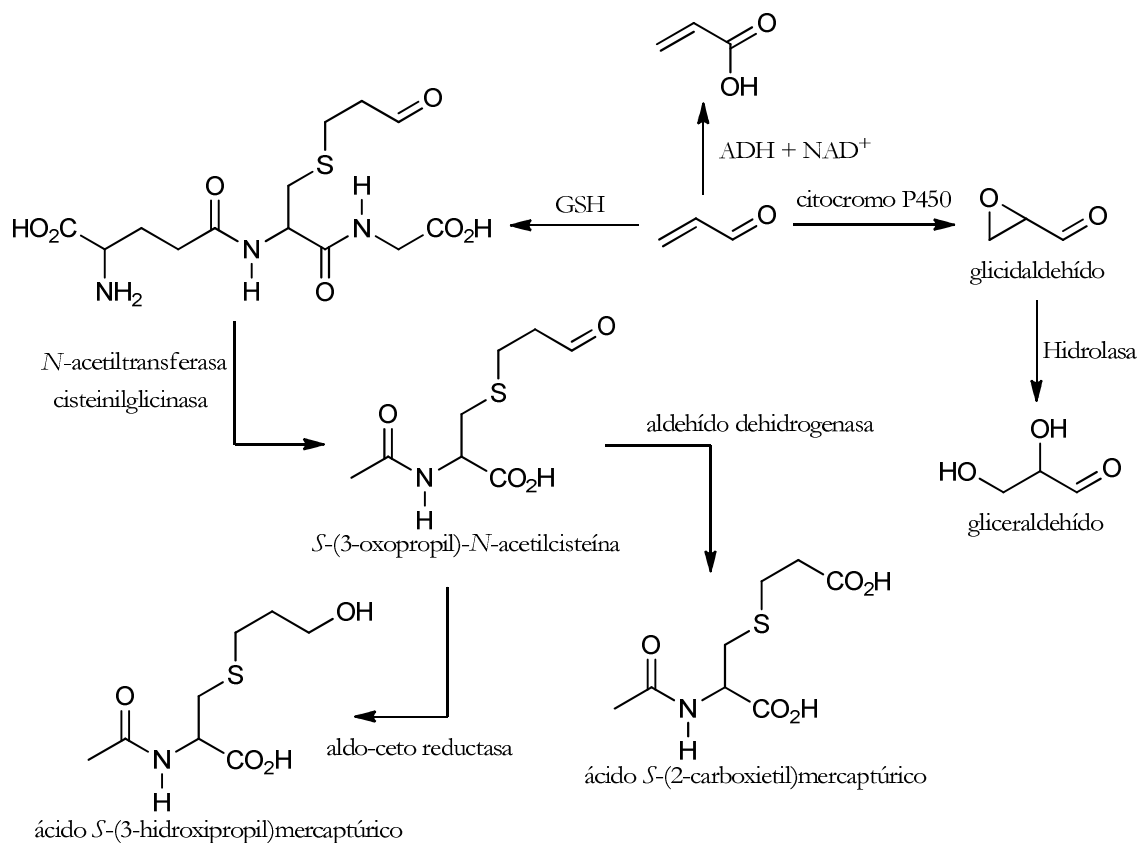


Figura 2.15. Principales rutas metabólicas de la acroleína²⁷⁰

La alta toxicidad aguda de la acroleína se ha asociado a estrés oxidativo debido a la pérdida de glutatión, o por reacciones de alquilación en sitios celulares nucleófilos.²⁷¹

²⁶⁷ Berhane, K.; Mannervik, B. Inactivation of the genotoxic aldehydes acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu and pi. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 251-254

²⁶⁸ Meacher, D. M.; Menzel, D. B. Glutathione depletion in lung cells by low molecular weight aldehydes. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 163-171

²⁶⁹ Patel, J. M.; Wood, J. C.; Leibman, K. C. The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab. Dispos.* **1980**, *8*, 305-308

²⁷⁰ Draminski, W.; Eder, E.; Henschler, D. A new pathway of acrolein metabolism in rats. *Arch. Toxicol.* **1983**, *52*, 243-247

²⁷¹ Kehrer, J. P.; Biswal, S. S. The molecular effect of acrolein. *Toxicol. Sci.* **2000**, *57*, 6-15

Debido a esa aguda toxicidad, estudios con animales han revelado procesos degenerativos en el hígado y estómago, aunque sin cambios histopatológicos considerables. También hay evidencia de que la acroleína interfiere en algunas funciones del sistema inmune.²⁷²

2.6.2.1. Mutagenia y carcinogenia

Ensayos con animales de experimentación sobre el potencial cancerígeno de la acroleína, han mostrado una reducción del peso corporal y ligeros aumentos en las tasas de mortalidad,²⁷³ aunque el alcance de estos resultados aún es objeto de discusión.

Estudios sobre mutagenia en bacterias han evidenciado que la acroleína actúa como agente mutágeno directo en distintas cadenas de *Salmonella typhimurium*.^{274, 275} Estudios *in vitro* muestran que puede inducir aberraciones cromosómicas en células de mamíferos^{276, 277} e intercambio de cromátidas hermanas (tanto en células de ovario de hámster como en linfocitos humanos).²⁷⁸ No se han observado efectos clastogénicos atribuibles directamente a la acroleína, aunque sí se observaron mutaciones en la prueba de letalidad recesiva ligada al sexo en *Drosophila*.²⁷⁹

Mientras que los estudios *in vivo* de la toxicidad de la acroleína sobre la reproducción son escasos y poco concluyentes, ensayos *in vitro* muestran que puede causar retardos en el crecimiento y malformaciones.²⁸⁰

²⁷² Jakab, G. J. The toxicologic interactions resulting from inhalation of carbon black and acrolein on pulmonary antibacterial and antiviral defenses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, *121*, 167-175

²⁷³ Lijinsky, W.; Reuber, M. Chronic carcinogenesis studies of acrolein and related compounds. *Toxicol. Ind. Health* **1987**, *3*, 337-345

²⁷⁴ Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W.; Zeiger, E. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **1983**, *5*, 3-142

²⁷⁵ Parent, R. A.; Caravello, H. E.; San, R. H. C. Mutagenic activity of acrolein in *S. typhimurium* and *E. coli*. *J. Appl. Toxicol.* **1996**, *16*, 103-108

²⁷⁶ Galloway, S. M.; Armstrong, M. J.; Reuben, C.; Colman, S.; Brown, B.; Cannon, C.; Bloom, A. D.; Nakamura, F.; Ahmed, M.; Duk, S.; Rimpou, J.; Margolin, B. H.; Resnick, M. A.; Anderson, B.; Zeiger, E. Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells: evaluation of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **1987**, *10*, 1-175

²⁷⁷ Saxena, A. K.; Singh, G. Acrolein induces unilateral hypertrophy and associated histopathological changes during germ cell differentiation in mature rat ovary. *Biomed. Res.* **2009**, *20*, 89-93

²⁷⁸ Wilmer, J. L.; Erexson, G. L.; Kligerman, A. D. Effects of acrolein on phosphoramidate mustard-induced sister chromatid exchange in cultured human-lymphocytes. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4635-4638

²⁷⁹ Sierra, L. M.; Barros, A. R.; García, M.; Ferreiro, J. A.; Comendador, M. A. Acrolein genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. I. Somatic and germinal mutagenesis under proficient repair conditions. *Mutat. Res.* **1991**, *260*, 247-256

²⁸⁰ European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylaldehyde. Volumen 7, EUR 19728EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection. National of Public Health and the Environment: Bilthoven, Países Bajos

Respecto a su neurotoxicidad, los pocos datos disponibles muestran ausencia de cambios morfológicos en nervios traqueales y pulmonares.²⁸¹ Los efectos en el sistema inmune incluyen una disminución en la capacidad de respuesta de los anticuerpos, blastogénesis de linfocitos y daños respiratorios.²⁸² Otros efectos inmunológicos observados han sido transitorios y a largo plazo.

El último informe de la IARC en el que se trata el caso de la acroleína, indica que tanto en animales como en humanos “*there is inadequate evidence*” respecto a su carcinogenicidad, por lo que concluye que “*...is not classifiable as to its carcinogenicity to humans (Group 3)*”.²⁸³

2.6.2.2. Aduetos con proteínas y ADN

En líneas precedentes se ha descrito que la toxicidad de la acroleína puede asociarse en cierto grado a una reducción del GSH celular [ref. 273]. Adicionalmente, la acroleína ejerce sus efectos biológicos a través de reacciones en sitios nucleófilos de algunas proteínas: el grupo sulfhidril de la cisteína, el imidazol de la histidina o los grupos ϵ -amino de la lisina.²⁸⁴ Incluso prefiere formar aductos, mediante reacciones de adición de Michael, con los residuos de la cisteína, debido a su alta polarizabilidad y su sistema π conjugado.²⁸⁵ También lo hace con el grupo guanidina de la arginina y aductos-*bis* con los residuos de la lisina.

Otra reacción de interés biológico es la que presenta con el ascorbato.²⁸⁶ Se ha encontrado que el aducto formado puede llegar a disminuir la citotoxicidad de la acroleína o proteger contra la misma, debido a la presencia del ácido ascórbico a nivel celular.²⁸⁷

A inicios de los 80 los grupos de Galliani y Hecht caracterizaron un par de aductos cíclicos al hacer reaccionar la acroleína con la deoxiguanosina en condiciones fisiológicas.

²⁸¹ Springall, D.; Edginton, J.; Price, P.; Swanston, J.; Noel, C.; Bloom, S.; Polak, J. Acrolein depletes the neuropeptides CGRP and substance P in sensory nerves in rat respiratory tract. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *85*, 51-157

²⁸² Leach, C.; Hatoum, N.; Ratajczak, H.; Gerhart, J. The pathologic and immunologic effects of inhaled acrolein in rats. *Toxicol. Lett.* **1987**, *39*, 189-198

²⁸³ International Agency for Research on Cancer (IARC), 1995. Dry cleaning some chlorinated solvents and other industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 63. IARC: Lyon, Francia

²⁸⁴ Stevens, J. F.; Maier, C. S. Acrolein: sources, metabolism and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 7-25

²⁸⁵ LoPachin, R. M.; Barber, D. S.; Geohagen, B. C.; Gavin, T.; He, D.; Das, S. Structure-toxicity analysis of type-2 alkenes: in vitro neurotoxicity. *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 136-146

²⁸⁶ Eger, K.; Folkers, G.; Zimmerman, W.; Schmid, J.; Hiller, W. Unexpected formation of a heterocyclic spiran in the Michael reaction of ascorbic acid with acrolein. *J. Chem. Res.-S* **1987**, *9*, 277

²⁸⁷ Nardini, M.; Finkelstein, E. I.; Reddy, S.; Valacchi, G.; Traber, M.; Cross, C. E.; van der Vliet, A. Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by α -tocopherol and ascorbic acid. *Toxicology* **2002**, *170*, 173-185

Señalaron que “...the adducts described in this study may be involved in the mutagenicity of acrolein”.^{288, 289} Dichos aductos se obtienen mediante adición de Michael a alguno de los nitrógenos exocíclicos del nucleósido (N^1 o N^2), y posterior ciclación. Como resultado se obtienen dos productos regioisómeros: α - y γ -hidroxi-propanodeoxi guanosina (α -OH-PdG y γ -OH-PdG; figura 2.16), cada uno de los cuales existe como un par de estereoisómeros. Se ha encontrado que el isómero γ es mayoritario.

Desde esas fechas se han desarrollado numerosas rutas sintéticas para la preparación y caracterización de este tipo de aductos,^{290, 291} existiendo diversos métodos analíticos para su detección y cuantificación.^{292, 293, 294}

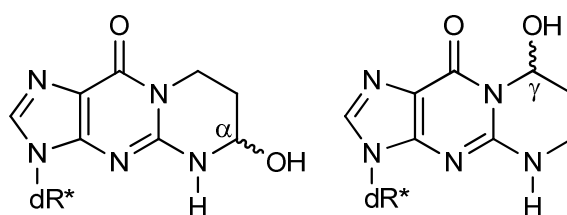


Figura 2.16. Estructura de los aductos formados entre acroleína y deoxiguanosina (dR* = deoxirribosa)

Así ha sido posible detectar aductos PdG en tejidos pulmonares de humanos y roedores.^{295, 296, 297} Los niveles del aducto γ fueron de casi el triple en tejidos de fumadores que en no fumadores.²⁹⁸

²⁸⁸ Galliani, G.; Pantarotto, C. The reaction of guanosine and 2'-deoxyguanosine with acrolein. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4491-4492

²⁸⁹ Chung, F. L.; Young, R.; Hecht, S. S. Formation of cyclic 1, N^2 -propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 990-995

²⁹⁰ Khullar, S.; Varaprasad, C. V.; Johnson, F. Postsynthetic generation of a major acrolein adduct of 2'-deoxyguanosine in oligomeric DNA. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 947-950

²⁹¹ Nechev, L. V.; Harris, C. H.; Harris, T. M. Synthesis of nucleosides and oligonucleotides containing adducts of acrolein and vinyl chloride. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 421-429

²⁹² Chung, F. L.; Nath, R. G.; Nagao, M.; Nishikawa, A.; Zhou, G.; Randerath, K. Endogenous formation and significance of 1, N^2 -propanodeoxyguanosine adducts. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *424*, 71-81

²⁹³ Emami, A.; Dyba, M.; Cheema, A. K.; Pan, J.; Nath, R. G.; Chung, F. L. Detection of the acrolein-derived cyclic DNA by a quantitative P-32 postlabeling/solid phase extraction/HPLC method: blocking its artifact formation with glutathione. *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 163-172

²⁹⁴ Candy, H. J.; Lin, W. P. Simultaneous quantification of 1, N^2 -propano-2'-deoxyguanosine adducts derived from acrolein and crotonaldehyde in human placenta and leukocytes by isotope dilution nanoflow LC nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9812-9818

²⁹⁵ Nath, R. G.; Chung, F. L. Detection of exocyclic 1, N^2 -propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodent and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 7491-7495

²⁹⁶ Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Chung, F. L. Detection of 1, N^2 -propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 452-456

Feng *et al.* reportaron que la exposición de células pulmonares humanas a acroleína causa un patrón de daño en el ADN similar a los patrones encontrados en cáncer de pulmón. Observaron también que la acroleína disminuye la capacidad de reparación de ADN dañado a causa del epóxido de benzo[α]pireno diol (*i.e.* procarcinógeno presente en los cigarrillos y asociado a la generación de cáncer pulmonar), lo que les ha hecho pensar que: “...acrolein may represent a major etiological agent for cigarette smoke-related lung cancer”.²⁹⁹ No obstante, estudios realizados en leucocitos humanos por Zhang *et al.*³⁰⁰ y las investigaciones en fibroblastos de humanos y ratones de Pfeifer *et al.*³⁰¹, han puesto en duda el papel de la acroleína para inducir cáncer de pulmón. Todo ello ha generado un fuerte debate científico que aún continúa.^{302, 303, 304} Lo que sí es claro es que los aductos del ADN con la acroleína se forman, de manera preferente, en secuencias ricas en guanina, que son puntos de acceso mutacionales.³⁰⁵

De los dos regioisómeros formados por la reacción entre deoxiguanosina y acroleína, la mutagenia del isómero α ha sido bien establecida mientras que la del isómero γ es objeto de controversia. Estudios realizados por los grupos de Moriya y Marnett revelaron que el isómero γ no presenta actividad mutágena en *Escherichia coli*, e indican que “one possible explanation for OHPdG’s nonmutagenic nature is that the structure of OHPdG may exist in multiple forms”.^{306, 307} Desde entonces se ha admitido que la baja mutagenia del isómero γ se debe a que el aducto cíclico adopta conformación de anillo abierto, con perturbaciones estructurales mínimas de la doble hélice del ADN. Así pues, el isómero minoritario α

²⁹⁷ Zhang, S.; Villalta, P. W.; Wang, M.; Hecht, S. S. Detection and quantification of acrolein-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 565-571

²⁹⁸ Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Guttenplan, J. B.; Chung, F. L. 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 581-584

²⁹⁹ Feng, Z.; Hu, W.; Hu, Y.; Tang, M. S. Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 15404-15409

³⁰⁰ Zhang, S.; Balbo, S.; Wang, M.; Hecht, S. S. Analysis of acrolein-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in human leukocyte DNA from smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 119-124

³⁰¹ Kim, S.; Pfeifer, G. P.; Besaratinia, A. Lack of mutagenicity of acrolein-induced DNA adducts in mouse and human cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11640-11647

³⁰² Besaratinia, A. Acrolein: excessive cytotoxicity or potent mutagenicity? *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 751

³⁰³ Wang, H. T.; Tang, M. Acrolein–DNA adducts are mutagenic. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 753

³⁰⁴ Stevens, J. F.; Maier, C. S. Acrolein. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1275-1276

³⁰⁵ Wang, H.; Zhang, S.; Hu, Y.; Tang, M. Mutagenicity and sequence specificity of acrolein–DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 511-517

³⁰⁶ VanderVeen, L. A.; Hashim, M. F.; Nechev, L. V.; Harris, T. M.; Harris, C. M.; Marnett, L. J. Evaluation of the mutagenic potential of the principal DNA adduct of acrolein. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9066-9070

³⁰⁷ Yang, I.; Johnson, F.; Grollman, A. P.; Moriya, M. Genotoxic mechanism for the major acrolein-derived deoxyguanosine adduct in human cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 160-164

bloquea fuertemente la replicación del ADN en células humanas,^{308, 309} lo que sugiere que este isómero contribuye de manera significativa a la mutagenia de la acroleína.^{310, 311} Esta actividad mutágena también puede presentarse debido a que la acroleína puede formar *cross-linking* en el ADN.^{312, 313}

Por último puede indicarse que también se ha investigado la formación de aductos de la acroleína con la deoxiadenosina,³¹⁴ deoxicitidina y deoxiuridina,³¹⁵ obteniendo resultados similares a los obtenidos con la deoxiguanosina.

2.7. Determinación del potencial alquilante de especies químicas

Se cree que el modo de acción de los carcinógenos genotóxicos y/o agentes alquilantes involucra, como primera etapa, la interacción de una molécula electrófila con un sitio nucleofílico del ADN para producir un aducto que, si no es reparado, puede generar una mutación. Como se ha apuntado antes, esos compuestos también pueden reaccionar con otros sitios nucleofílicos en proteínas o en el ARN.

Para evaluar el potencial alquilante de diversos compuestos químicos y, en consecuencia, hacer predicciones sobre su potencial toxicidad³¹⁶ se han propuesto diversos métodos de trabajo: i) determinación cuantitativa del agente alquilante o alguno de sus metabolitos activos en fluidos corporales, ii) análisis de la interacción entre el posible compuesto carcinógeno con una biomolécula (formación de aductos con proteínas o ADN), iii) cuantificación de algún efecto biológico causado por el aducto formado.

³⁰⁸ Zaliznyak, T.; Lukin, M.; El-khateeb, M.; Bonala, R.; Johnson, F.; de los Santos, C. NMR structure of duplex DNA containing the α -OH-PdG · dA base pair: a mutagenic intermediate of acrolein. *Biopolymers* **2009**, *93*, 391-401

³⁰⁹ Zaliznyak, T.; Bonala, R.; Attaluri, S.; Johnson, F.; de los Santos, C. Solution structure of DNA containing α -OH-PdG: the mutagenic adduct produced by acrolein. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2153-2163

³¹⁰ Yang, I.; Chan, G.; Miller, H.; Huang, Y.; Torres, M. C.; Johnson, F.; Moriya, M. Mutagenesis of acrolein-derived propanodeoxyguanosine adducts in human cells. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13826-13832

³¹¹ Minetti, C. A. S.; Remeta, D. P.; Johnson, F.; Iden, C. R.; Bresslauer, K. J. Impact of α -hydroxy-propanodeoxyguanine adducts on DNA duplex energetic: opposite base modulation and implications for mutagenicity and genotoxicity. *Biopolymers* **2010**, *93*, 370-382

³¹² Kozekov, I. D.; Nechev, L. V.; Moseley, S.; Harris, C. M.; Rizzo, C. J.; Stone, M. P.; Harris, T. M. DNA interchain cross-links by acrolein and crotonaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 50-61

³¹³ Kozekov, I. D.; Turesky, R. J.; Alas, G. R.; Harris, C. M.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J. Formation of deoxyguanosine cross-links from calf thymus DNA treated with acrolein and 4-hydroxyl-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1701-1713

³¹⁴ Pawłowicz, A. J.; Munter, T.; Klika, K. D.; Kronberg, L. Reaction of acrolein with 2'-deoxyadenosine and 9-ethyladenine. Formation of cyclic adducts. *Bioorganic Chem.* **2006**, *34*, 39-48

³¹⁵ Chenna, A.; Iden, C. R. Characterization of 2'-deoxycytidine and 2'-deoxyuridine adducts formed in reactions with acrolein and 2-bromoacrolein. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 261-268

³¹⁶ Farmer, P. B.; DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* **2004**, *149*, 3-9

2.7.1. Alquilación del ADN

En una excelente revisión bibliográfica, Gates señala que la mayoría de los daños causados al ADN por moléculas bioactivas y agentes mutágenos, pueden encuadrarse en dos grandes grupos: (1) alquilación de un nucleófilo en el ADN por un electrófilo; (2) reacción de un enlace π en el ADN con un intermedio radicalario.³¹⁷

Debido a los numerosos sitios nucleófilos del ADN, las reacciones con electrófilos generados extracelularmente o producidos endógenamente, suelen dar lugar a diversos tipos de lesiones en el material genético.³¹⁸ Estas lesiones pueden producir daños de tres maneras: i) mala reparación y/o replicación de las lesiones, ii) poner en peligro el programa epigenético impreso en el ADN por modificaciones enzimáticas y iii) bloquear las ADN y ARN polimerasas, lo que, directa o indirectamente, rompe las hebras del ADN.³¹⁹ Algunas de las lesiones más relevantes en el ADN se reflejan en la figura 2.17.

La alquilación de los diversos sitios nucleófilos en el ADN depende de la naturaleza del agente alquilante. Por ejemplo, para el dietilsulfato los sitios preferidos presentan la secuencia: N7-G >> N3-A >> N1-A ~ N7-A ~ N3-G >> O⁶-G,³²⁰ mientras que los iones etildiazonio suelen seguir el orden: N7-G > O²-T > O⁶-G > N3-A ~ O²-C > N3-G ~ N3-T ~ N7-A.³²¹ La posición N7 de la guanina es el sitio preferido por la mayoría de los agentes alquilantes. Se han hecho intentos de predecir el grado de selectividad en las interacciones electrófilo-nucleófilo mediante la teoría de Pearson³²²: agentes electrófilos *suaves* (baja densidad de carga y altamente polarizables) forman aductos, de manera preferente, con nucleófilos de *suavidad* comparable, mientras que electrófilos *duros* forman aductos con nucleófilos *duros*.^{323, 324, 325} Cabe esperar, pues, que las velocidades de reacción entre un electrófilo *suave* y un nucleófilo *duro* sean relativamente bajas.^{326, 327}

³¹⁷ Gates, K. S. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation and reaction with radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747-1760

³¹⁸ Shrivastav, N.; Li, D.; Essigmann, J. M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 59-70

³¹⁹ Loeb, L. A.; Harris, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6863-6872

³²⁰ Beranek, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1990**, *231*, 11-30

³²¹ Singer, B.; Grunberger, D. *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Plenum Press: Nueva York, 1983

³²² Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases—The evolution of a chemical concept. *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 403-425

³²³ Loechler, E. L.; A violation of the Swain-Scott principle, and Not S_N1 versus S_N2 reaction mechanisms, explains why carcinogenic alkylating agents can form different proportions of adducts at oxygen versus nitrogen in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 277-280

³²⁴ Lu, X.; Heilman, J.; Blans, P.; Fishbein, J. C. The structure of DNA dictates purine atom site selectivity in alkylation by primary diazonium ions. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1462-1470

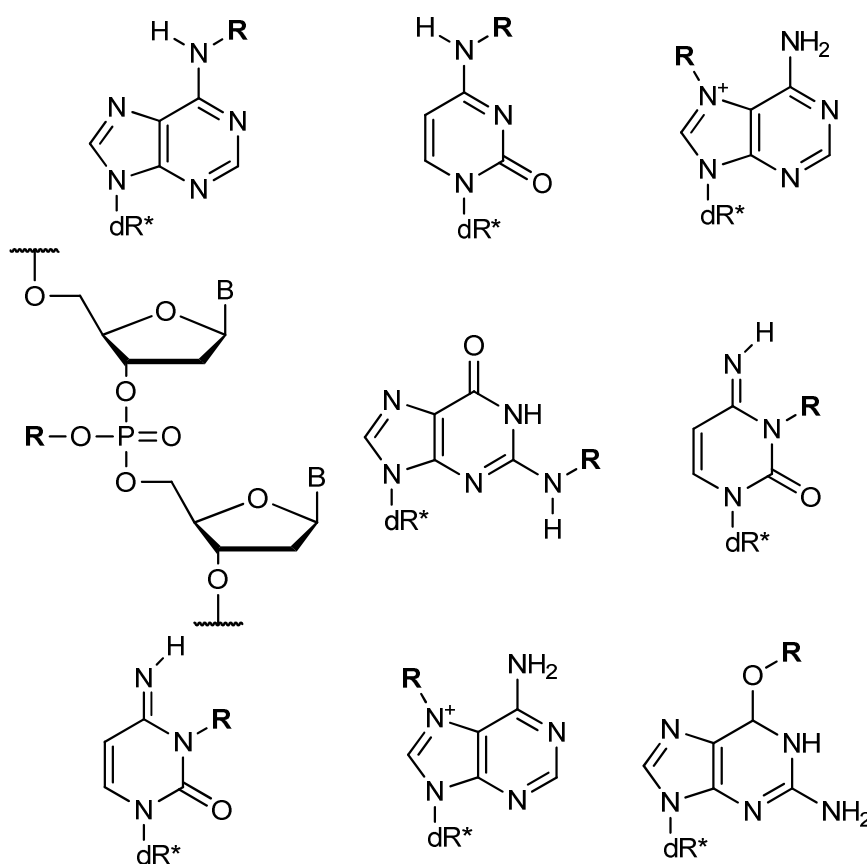


Figura 2.17. Algunas lesiones resultantes de la alquilación del ADN
(B = nucleobase; dR* = deoxirribosa; R = grupo alquilo)

Aductos químicamente estables se obtienen al alquilar los nitrógenos exocíclicos N^2 -G, N^6 -A y N^4 -C y los amídicos N1-G y N1-T,^{328, 329} así como los oxígenos O^6 -G y O^4 -T.³³⁰ La alquilación de los nitrógenos endocíclicos tiende a desestabilizar las nucleobases, lo que facilita la deglicosilación y las reacciones de apertura de anillo.³³¹

³²⁵ LoPachin, R. M.; Gavin, T.; Petersen, D. R.; Barber, D. S. Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1499-1508

³²⁶ Pearson, R. G. Maximum chemical and physical hardness. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 267-275

³²⁷ Chattaraj, P. K. Chemical reactivity and selectivity: local HSAB principal versus frontier orbital theory. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 511-513

³²⁸ Guy, A.; Molko, D.; Wagrez, L.; Teoule, R. Chemical synthesis of oligonucleotides containing N6-methyladenine residues in the GATC site. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1034-1040

³²⁹ Perrino, F. W.; Blans, P.; Harvey, S.; Gelhaus, S. L.; McGrath, C.; Akman, S. A.; Jenkins, S.; LaCourse, W. R.; Fishbein, J. C. The N^2 -ethylguanine and the O^6 -methylguanine lesions in DNA: contrasting responses from the "bypass" DNA polymerase ν and the replicative DNA polymerase α . *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1616-1623

³³⁰ Bignami, M.; O'Driscoll, M.; Aquilina, G.; Karran, P. Unmasking a killer: DNA O^6 -methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2000**, *462*, 71-82

³³¹ Loeb, L. A.; Preston, B. D. Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201-230

Al abordar el estudio de los mecanismos de alquilación es importante tener en cuenta que las variables condicionantes de los mismos pueden ser numerosas,^{332, 333} llegando a afectar a la selectividad frente al ADN. A este respecto Moschel *et al.* señalan: “*reactions on ring nitrogen atoms and on exocyclic sites are distinguishable in terms of their relative responses to changes in solvent composition*”.³³⁴

2.7.2. Aproximación biomimética a mecanismos de alquilación: test de la 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP)

La formación de aductos con compuestos potencialmente mutágenos/cancerígenos puede investigarse mediante otras metodologías *in vitro* que emplean como sustratos de alquilación moléculas de nucleofilia análoga a la de las bases del ADN.

El análisis cinético de los mecanismos de alquilación de esos sustratos de referencia puede ser útil no sólo como herramienta de detección, sino también para prevenir posibles riesgos.³³⁵ Sucede también que muchos métodos biológicos presentan ciertas limitaciones en la interpretación de resultados negativos, o bien no son capaces de detectar algunos daños genéticos (sin olvidar el elevado coste económico que entrañan, su laboriosidad y las limitaciones de los ensayos con animales).

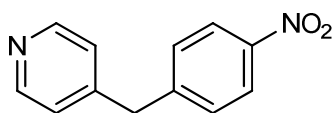


Figura 2.18. Estructura del sustrato de alquilación 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP)

Uno de los métodos para determinar cualitativa y cuantitativamente la capacidad alquilante de un electrófilo es el test de NBP ó 4-(*p*-nitrobencil)piridina; figura 2.18. Entre las ventajas que presenta está su capacidad de actuar como *agente trampa* de especies alquilantes y acilantes, además de una nucleofilia similar a la de las bases del ADN.³³⁶ Por otra parte, su empleo puede reducir significativamente el número de falsos negativos

³³² Hemminki, K. Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Arch. Toxicol.* **1983**, 52, 249-285

³³³ Lyle, T. A.; Royer, R. E.; Daub, G. H.; Vander Jagt, D. L. Reactivity-selectivity properties of reactions of carcinogenic electrophiles and nucleosides: influence of pH on site selectivity. *Chem.-Biol. Interact.* **1980**, 29, 197-207

³³⁴ Moschel, R. C.; Hudgins, W. R.; Dipple, A. Selectivity in nucleoside alkylation and aralkylation in relation to chemical carcinogenesis. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 3324-3328

³³⁵ Ehrenberg, L.; Osterman-Golkar, S. Alkylation of macromolecules for detecting mutagenic agents. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1981**, 1, 105-127

³³⁶ Shepard, S. E.; Lutz, W. K. Nitrosation of dietary precursors. *Cancer Surv.* **1989**, 8, 401-421

inherentes a otros métodos. En palabras de Kim y Thomas "...the test may prove to be a simple, non biological indicator of carcinogenic risks".³³⁷

El empleo de la NBP como molécula modelo para la identificación de agentes alquilantes se remonta a principios del siglo veinte. Koenigs y colaboradores observaron que, tanto la NBP como las especies 2- y 4-bencilpiridina, reaccionan con yoduro de metilo formando una sal que, en presencia de hidróxido potásico, da lugar a una coloración azul.³³⁸ La aplicación de esta reacción fue clave para la detección del gas mostaza por Brown en 1941. Del mismo modo Gehauf y Braun detectaron gran número de compuestos orgánicos alquilantes.^{339, 340} Los vapores de los haluros de alquilo se adsorbían en sílica gel impregnada con NBP y la adición de una base daba lugar a la aparición de color que variaba desde el azul al violeta, e incluso marrón. Entre los compuestos identificados destacan: sulfato de dietilo, tiocianato de butilo, cloruro de sulfonilbenceno, difenilcloroarsina y dietilfosforofluoridato.

Los estudios de detección de especies alquilantes realizados hasta entonces eran cualitativos. Swift y colaboradores³⁴¹ ampliaron el estudio de Gehauf y Braun. Agruparon las moléculas orgánicas en función de la reactividad. Observaron que los compuestos que contienen los grupos $-\text{COX}$, $-\text{CH}_2\text{X}$ y $-\text{OCH}_2\text{X}$, muestran reactividad similar. Al comparar la intensidad de color que presentan las especies con estos grupos funcionales se puede establecer la siguiente secuencia de actividad alquilante: $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{X} > \text{RCH}_2\text{CHX}_2 > \text{RCH}_2\text{CX}_3 > \text{ArCH}_2\text{X} > \text{ArX}$, $\text{ROCH}_2\text{X} > \text{ROCH}_2\text{CH}_2\text{X}$ y $\text{COCH}_2\text{X} > \text{COX}$.

Epstein y colaboradores³⁴² hicieron un estudio cuantitativo de la reacción de la NBP con diversas especies alquilantes. Del mismo modo midieron, de forma cuantitativa, concentraciones de agentes acilantes.³⁴³

³³⁷ Kim, J. H.; Thomas, J. J. Use of 4-(4-nitrobenzyl)pyridine (4-NBP) to test mutagenic potential of slow reacting epoxides, their corresponding olefins and other alkylating agents. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 879-885

³³⁸ Koenigs, E.; Kohler, K.; Blindow, K. Regarding pyridine methide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, *58*, 933-940

³³⁹ Gehauf, B. Chemical warfare service. CWS Field Lab., Memo 1-2-8, 1943

³⁴⁰ Braun, C. E.; Seydel, P. V.; Sauer, C. W.; Dubin, I. M.; Chao, Y. T.; Lemiey, J. D. MIT-MR N° 177. MIT, Cambridge: MA. 1945

³⁴¹ Swift, E. H.; Gould, C. W.; Holzman, G.; Sease, J. W.; Niemann, C. Chemical warfare service. CWS Field Lab., Memo 1-2-16, 1943

³⁴² Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. Use of γ -(4-nitrobenzyl)pyridine as analytical reagent for ethylenimines and alkylating agents. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1435-1439

³⁴³ Agree, A. M.; Meeker, R. L. Quantitative determination of micro and semi-micro concentrations of acylating agents by 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine reagent. *Talanta* **1966**, *13*, 1151

Con la NBP como sustrato de alquilación se han hecho estudios para analizar la capacidad alquilante de herbicidas,³⁴⁴ plaguicidas organofosforados,³⁴⁵ sulfonatos,³⁴⁶ aziridinas,³⁴⁷ agentes anticancerígenos,³⁴⁸ haluros de alquilo^{349, 350} y epóxidos.^{351, 352}

En nuestro grupo de trabajo se ha manejado la molécula de NBP como sustrato de alquilación para investigar cinéticamente el potencial alquilante de diferentes agentes. Se han obtenido resultados satisfactorios no sólo con agentes de elevada electrofilia y mutagenia probada como algunas lactonas^{353, 354, 355} y *N*-alquil-*N*-nitrosoureas,³⁵⁶ sino también con otras moléculas de débil electrofilia, como ácido sórbico^{357, 358, 359} y sus sales,³⁶⁰ utilizados pródigamente en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

³⁴⁴ Schuldt, P. H.; Priddle, W. E.; Klein, S.; Burchfield, H. P.; Stallard, D. E. Colorimetric determination of micro amounts of dimethyl tetrachloroterephthalate. *Contr. Boyce Thomson Inst.* **1961**, *21*, 163

³⁴⁵ Getz, M. E.; Watts, R. R. Application of 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine as rapid quantitative reagent for organophosphate pesticides. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* **1964**, *47*, 1094

³⁴⁶ Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. Studies on chemical carcinogens and mutagens. XXV. Chemo-selectivity of alkyl sulfonates toward 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP) in phosphate buffer. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 1326-1332

³⁴⁷ Bardos, T. J.; Datta-Gupts, N.; Hebborn, P.; Triggler, D. J. A study of comparative chemical and biological activities of alkylating agents. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 167-174

³⁴⁸ Dierickx, K. M. E.; Journé, F.; Gerbaux, P.; Morandini, R.; Kauffmann, J. M.; Ghanem, G. E. Improving the spectrophotometric determination of the alkylating activity of anticancer agents: a new insight into the mechanism of the NBP method. *Talanta* **2009**, *77*, 1370-1375

³⁴⁹ Bellucci, G.; Lippi, A.; Marioni, F. A simple conductimetric method as an alternative to the colorimetric *p*-nitrobenzylpyridine test for the measurement of the reactivity of potentially mutagenic alkylating compounds. *Chem.-Biol. Interact.* **1986**, *59*, 255-263

³⁵⁰ Sobol, Z.; Engel, M. E.; Rubitski, E.; Ku, W. W.; Aubrecht, J.; Schiestl, R. H. Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2007**, *633*, 80-94

³⁵¹ Hemminki, K.; Falck, K. Correlation of mutagenicity and 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine alkylation by epoxides. *Toxicol. Lett.* **1979**, *4*, 103-106

³⁵² Ehrenberg, L.; Hussain, S. Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutat. Res.* **1981**, *86*, 1-113

³⁵³ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. A kinetic approach to the alkylating potential of carcinogenic lactones. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161-1168

³⁵⁴ Fernández-Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. The unusual activity of α -angelicalactone to form adducts: a kinetic approach. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39*, 591-594

³⁵⁵ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Chemical reactivity and biological activity of diketene. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964-1969

³⁵⁶ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Steric effect in alkylation reactions by *N*-alkyl-*N*-nitrosoureas: a kinetic approach. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932-938

³⁵⁷ Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Sorbic acid as an alkylating agent. *J. Solution Chem.* **2007**, *37*, 459-466

³⁵⁸ Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Sorbate-nitrite interactions: acetonitrile oxide as an alkylating agent. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1320-1324

³⁵⁹ Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of the mutagen 1,4-dinitro-2-methylpyrrole as an alkylating agent. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1444-1449

³⁶⁰ Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Alkylating potential of potassium sorbate. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244-1024

Así se han encontrado correlaciones entre reactividad química (capacidad alquilante sobre la NBP) y potencial mutágeno de los agentes alquilantes. Ello permite hacer predicciones de carácter biológico (mutagenia, carcinogenia) sin necesidad (o, al menos, en mucho menor grado) de ensayos con animales de experimentación. Al mismo tiempo, el conocimiento de los mecanismos por los que transcurren las reacciones de alquilación ha permitido, en algunos casos, proponer vías de bloqueo/inhibición de tales mecanismos³⁶¹.

³⁶¹ García-Prieto, J. C.; Mateos, R.; Calle, E.; Casado, J. Inhibition of Nitrosation by the reaction médium. *J. Agric. Food. Chem.* **1998**, *46*, 3517-3520

*L'art de l'investigation scientifique est la pierre
angulaire de toutes les sciences expérimentales.
Si les faits qui servent de base au raisonnement
sont mal établis ou erronés, tout s'écroulera ou
tout deviendra faux; et c'est ainsi que, le plus
souvent, les erreurs dans les théories scientifiques
ont pour origine des erreurs de faits*
Claude Bernard

3. MÉTODO EXPERIMENTAL

En este trabajo se ha investigado la reactividad química –en términos de capacidad alquilante– de una selección de compuestos bioactivos α,β -insaturados (α,β -UC, figura 3.1).

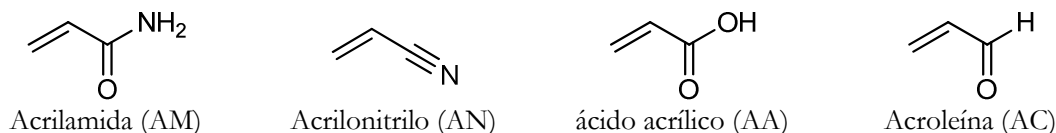


Figura 3.1. Estructura de los α,β -UC estudiados

Muchos carcinógenos químicos inician su actuación patógena enlazándose a constituyentes del ADN y ARN.³⁶² Como entre ellos se encuentran las bases nitrogenadas guanosina (Guo) y uridina (Urd), se han elegido estas moléculas como sustratos de alquilación en condiciones biomiméticas.

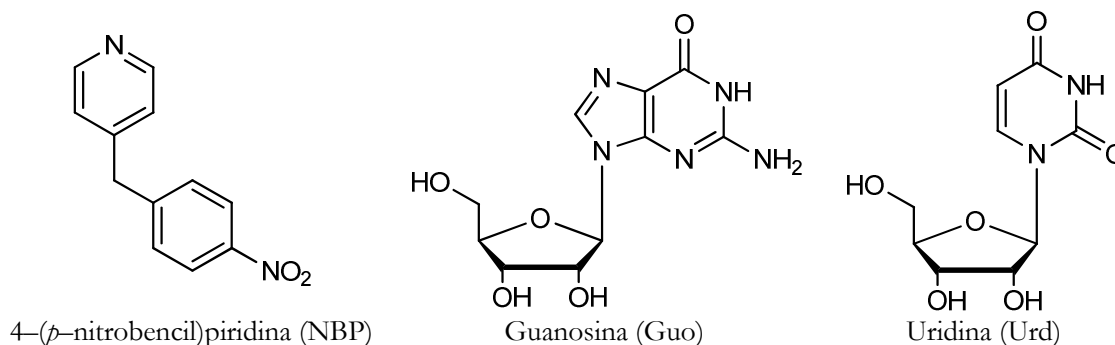


Figura 3.2. Estructura de los sustratos de alquilación estudiados

Como sustrato de alquilación de referencia se ha trabajado con la molécula 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP), por dos razones: *i*) su análoga nucleofilia a la de las bases del ADN,³⁶³ lo que permite considerarla como molécula modelo; *ii*) porque permite el seguimiento cinético cuantitativo de sus reacciones de alquilación, tanto por agentes alquilantes fuertes,^{364, 365} como débiles.^{366, 367, 368}

³⁶² Lawley, P. D. From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA-reactive compounds. En Hemminki, K.; Dipple, A.; Kadlubar, F. F.; Segerbäck, D.; Bartsch, H. *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, IARC Scientific Publications N° 125. IARC: Lyon, Francia. 1994

³⁶³ Shepard, S. E.; Lutz, W. K. Nitrosation of dietary precursors. *Cancer Surv.* **1989**, *8*, 401-421

³⁶⁴ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. A kinetic approach to the alkylating potential of carcinogenic lactones. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161-1168

³⁶⁵ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Chemical reactivity and biological activity of diketene. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964-1969

³⁶⁶ Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Sorbic acid as an alkylating agent. *J. Solution Chem.* **2007**, *37*, 459-466

³⁶⁷ Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Sorbate-nitrite interactions: acetonitrile oxide as an alkylating agent. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1320-1324

Las estructuras de los substratos de alquilación con que se ha trabajado se muestran en la figura 3.2.

3.1. Alquilación de NBP

La figura 3.3 muestra esquemáticamente el mecanismo de alquilación de la NBP por un agente alquilante con un doble enlace común y sustituyente R. El aducto formado inicialmente es incoloro. Al agregar una base como trietilamina, Et_3N , se congela la reacción por estabilización de la NBP y el aducto coloreado ya es susceptible de seguimiento cinético por espectrofotometría visible.

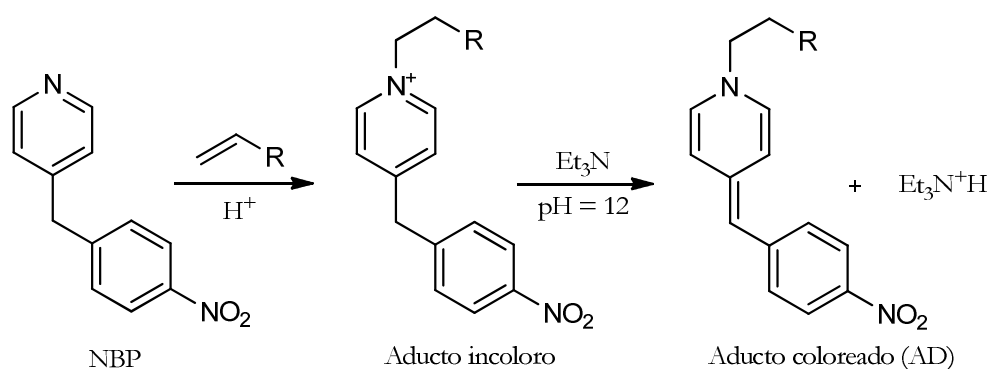


Figura 3.3. Alquilación de la NBP por compuestos α,β -insaturados

Cuando las mezclas cinéticas alcanzan equilibrio térmico, alícuotas de $2,4 \text{ cm}^3$ se retiran a distintos tiempos y se introducen en la cubeta del espectrofotómetro (paso óptico = 1 cm) con $0,6 \text{ cm}^3$ de Et_3N . Las medidas de absorbancia se hicieron a las longitudes de onda de los máximos de absorción de cada cromóforo.

Debido a la escasa solubilidad de la NBP en agua, se han utilizado como medio de reacción mezclas agua/dioxano, lo que ha permitido también investigar la influencia del medio en las reacciones de alquilación.

Como las reacciones de alquilación de la NBP por los compuestos con que se ha trabajado son muy lentas y, en algunos casos, transcurren con aparición de otras reacciones, para su seguimiento cinético se ha utilizado el método de velocidades iniciales.³⁶⁹

La velocidad de formación del aducto, AD, por reacción entre los agentes alquilantes α,β -insaturados (α,β -UC) y el substrato NBP viene dada por la ecuación (3.1):

³⁶⁸ Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of the mutagen 1,4-dinitro-2-methylpyrrole as an alkylating agent. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 1444-1449

³⁶⁹ Casado, J.; López-Quintela, M. A.; Lorenzo-Barral, F. M. The initial rate method in chemical kinetics: evaluation and experimental illustration. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 450-452

$$v_o = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}} [\alpha, \beta - \text{UC}]_o^c [\text{NBP}]_o^d \quad (3.1)$$

donde k_{alq} es la constante de alquilación y c, d los órdenes de reacción respecto a las concentraciones iniciales del compuesto α, β -insaturado, $[\alpha, \beta - \text{UC}]_o$, y de NBP, $[\text{NBP}]_o$, respectivamente.

Para conocer los órdenes de reacción respecto a las concentraciones del α, β -UC y de NBP, se ha utilizado el método de aislamiento.³⁷⁰

Cuando $[\text{NBP}]_o \gg [\alpha, \beta - \text{UC}]_o$, de la ecuación (3.1) se deduce que:

$$\ln v_o = c \ln [\alpha, \beta - \text{UC}]_o + C \quad (3.2)$$

Cuando $[\alpha, \beta - \text{UC}] \gg [\text{NBP}]$, se tiene que:

$$\ln v_o = d \ln [\text{NBP}]_o + C \quad (3.3)$$

Al representar gráficamente los valores de $\ln v_o$ frente a los de $\ln [\alpha, \beta - \text{UC}]_o$ (o $\ln [\text{NBP}]_o$), la pendiente de cada recta es el orden de reacción correspondiente.

En las circunstancias de trabajo, la velocidad inicial de formación del aducto es:

$$v_o = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = \frac{1}{(\varepsilon \cdot l)} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.4)$$

donde ε y l son el coeficiente de absorción molar del aducto y el paso óptico, respectivamente. Conocido el valor de ε , al representar los valores de la absorbancia en función del tiempo, la pendiente de la recta obtenida permite conocer la velocidad inicial de reacción.

El valor de ε se ha calculado con la ecuación de Lambert-Beer. Habida cuenta de que la absorbancia medida corresponde al aducto de la NBP con el α, β -UC y que la concentración inicial de NBP (cuando es el reactivo limitante) es igual a la concentración del aducto final, se tiene que:

$$A_\infty = \varepsilon \cdot l \cdot [\text{NBP}]_o \quad (3.5)$$

donde A_∞ es la absorbancia a tiempo infinito. Por tanto, al representar los valores de A_∞ frente a los de $[\text{NBP}]_o$, la pendiente de la recta dará al valor de ε .

Admitidos a priori órdenes de reacción unitarios respecto a las concentraciones de NBP y del α, β -UC (*vide infra*), la constante de velocidad de alquilación viene dada por la expresión (3.6):

³⁷⁰ Senent, S. *Química física II*. UNED: Madrid. 1984

$$k_{\text{alq}} = \frac{v_0}{[\alpha, \beta - \text{UC}]_0 [\text{NBP}]_0} \quad (3.6)$$

Para conocer la influencia de la temperatura sobre la velocidad de reacción y determinar los correspondientes parámetros termodinámicos de activación, se han manejado las ecuaciones de Arrhenius (3.7) y de Eyring–Winne–Jones (3.8).

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (3.7)$$

$$k = \frac{k_B T}{h} K_e^\ddagger = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta^\ddagger H^\circ/RT} e^{\Delta^\ddagger S^\circ/R} \quad (3.8)$$

3.2. Alquilación de nucleósidos

Para el seguimiento cinético de las reacciones de formación de aductos entre los nucleósidos y los α, β -UC se ha utilizado la técnica *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC) de gradiente controlado, con columna de fase reversa y detector de red de diodos. Para las reacciones de alquilación de Guo, el estudio cromatográfico se realizó en $\lambda = 254$ nm, mientras que para la alquilación de Urd se hizo en $\lambda = 261$ nm.

Cuando las mezclas cinéticas alcanzan equilibrio térmico, se extraen muestras de $\sim 0,6$ cm³ que se introducen en un vial de 1,5 cm³, para la medida cromatográfica. En las reacciones de alquilación de Guo se utilizaron H₂O y acetonitrilo como fases móviles, mientras que en la alquilación de Urd se utilizaron H₂O y metanol. En todos los casos el flujo fue 1 cm³ min⁻¹.

El análisis cinético se ha realizado mediante seguimiento de la variación en las áreas de los picos cromatográficos correspondientes.

Para mejorar la separación de los picos y optimizar el seguimiento cinético, la temperatura del horno se mantuvo a 20 °C. La temperatura de las celdas del detector fue de 40 °C.

Las mezclas de reacción se preparaban en medio acuoso con exceso de agente alquilante. Los valores de pH se ajustaron con disoluciones de NaOH 0,1M. Se mantuvieron constantes durante el transcurso de todas las reacciones

Los aductos formados en cada caso se identificaban y caracterizaban mediante espectrometría de masas, espectroscopía UV–vis, H¹–RMN y C¹³–RMN.

Las figuras 3.4. y 3.5. reflejan los gradientes utilizados para la obtención de los picos cromatográficos en las reacciones de alquilación de Guo y Urd, respectivamente.

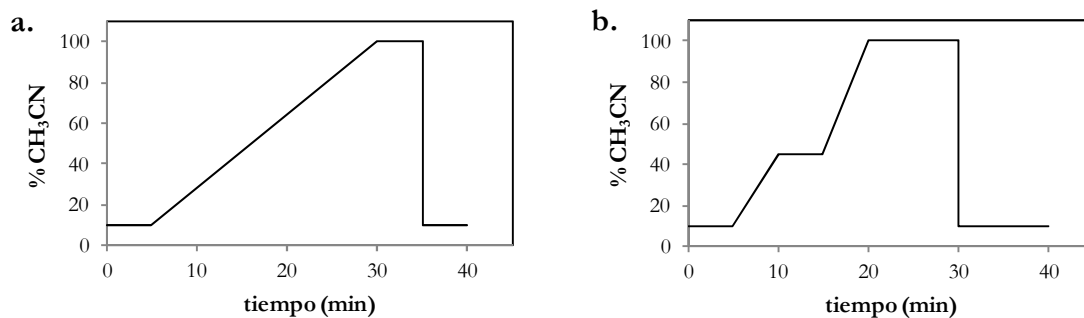


Figura 3.4. Gradientes utilizados para la obtención de los picos cromatográficos en las reacciones de alquilación de Guo por (a) AN, AC, AA y (b) AM.

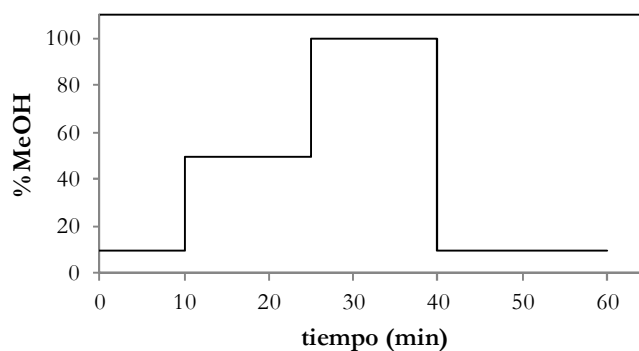


Figura 3.5. Gradiente utilizado para la obtención de los picos cromatográficos en las reacciones de alquilación de Urd por los α,β -UC estudiados

3.3. Reactivos y equipo de trabajo

a) Reactivos generales

1,4-dioxano: Panreac[®] (99%, $\rho = 1,032 \text{ g cm}^{-3}$). Estabilizado con ~ 25 ppm de BHT PRS.

Trietilamina: Sigma Aldrich[®] (99% de pureza, $\rho = 0,726 \text{ g cm}^{-3}$)

Acetonitrilo: Fischer Scientific[®] (Grado HPLC)

Metanol: Panreac[®] (Grado HPLC-preparativa)

Hidróxido de sodio: Fluka[®] ($\geq 98\%$)

Se utilizó agua desionizada con un sistema Milli-Q-Gradient (Millipore).

b) Reactivos específicos

Guanosina: Sigma Aldrich[®] (98%)

Uridina: Sigma Aldrich[®] (99%)

NBP: Sigma Aldrich[®] (98%)

Acrilamida: Fluka[®] ($\geq 98\%$)

Acrilonitrilo: Sigma Aldrich[®] ($\geq 99\%$, $\rho = 0,806 \text{ g cm}^{-3}$)

Acroleína: Aldrich® (90%, $\rho = 0,839 \text{ g cm}^{-3}$).

Ácido acrílico: Panreac Síntesis® (99%, $\rho = 1,049 \text{ g cm}^{-3}$). Estabilizado con éter metílico de la hidroquinona PS.

Para el seguimiento cinético de las reacciones de alquilación de NBP se ha utilizado un espectrofotómetro *Shimadzu*® UV-2450(PC) de doble haz con portacubetas CSP-260 y seis celdas termostatadas por sistema Peltier. Se manejaron cubetas de cuarzo Hellma®, 110.600-QC, de 1 cm de paso óptico.

Para mantener constante la temperatura de reacción ($\pm 0,04 \text{ }^\circ\text{C}$) se han utilizado termostatos *Lauda*®, Ecoline RE 120.

Las medidas de pH ($\pm 0,01$) se han realizado con un pH-metro *Crison Micro pH 2000*.

En el caso de las medidas cromatográficas, previamente a la inyección las disoluciones se pasaron por filtros de poliamida *Chromafil AO-20/25*, de $0,20 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de poro, para eliminar cualquier impureza.

Se utilizaron volúmenes de inyección de $100 \text{ }\mu\text{L}$ en una columna *Mediterranea Sea18*TM de fase reversa de $5\text{ }\mu\text{m}$ de poro, $250 \times 10 \text{ mm}$, unida a una precolumna *Mediterranea Sea18*TM, utilizando un sistema *Shimadzu*® UFLC (LC-20AD) de gradiente controlado, equipado con un detector de red de diodos *Shimadzu*® con canal de detección UV. El equipo cromatográfico utilizado se muestra en la figura 3.6.

La temperatura de columna se controló con un horno *Shimadzu*® CTO-10AS.

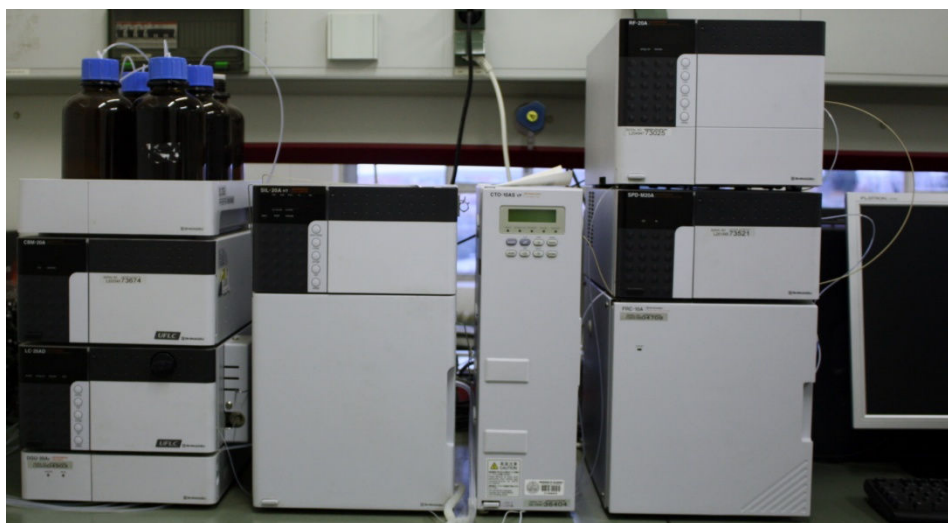


Figura 3.6. Equipo cromatográfico utilizado para el seguimiento cinético de los aductos formados en las reacciones de alquilación

Para la caracterización de aductos, se utilizó un colector de fracciones *Shimadzu*[®] *FRC-10A*. Para el proceso de purificación se utilizó un concentrador *Genevac miVac Duo*[®] acoplado a una bomba *miVac* (figura 3.7).



Figura 3.7. Equipo evaporador–concentrador de muestras utilizado en el proceso de purificación de los aductos formados en las reacciones de alquilación

Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro *Waters ZQ4000* y los de RMN con un equipo *Bruker Avance* de 400 MHz.

El tratamiento numérico de los datos se hizo con los programas *Microsoft Excel 2007* y *Wolfram Mathematica 7.0*.

*Pulchra sunt quae videntur,
pulchroria quare scientur,
longe pulcherrima quae ignorantur.
Niels Steensen (Steno)*

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Alquilación de NBP: Estudio cinético

No se observó reacción de alquilación de la NBP por AC después de dos semanas. Esta falta de reactividad se atribuye a que ese agente alquilante suele requerir dos sitios de enlace en el substrato de alquilación para generar un aducto cíclico. Más adelante se volverá sobre este resultado.

Los aductos cromóforos (tonalidad morada) NBP-AN, NBP-AM y NBP-AA presentan sus máximos de absorción en $\lambda = 560$ nm, $\lambda = 570$ nm y $\lambda = 580$ nm, respectivamente. Las figuras 4.1 a 4.3 muestran los espectrogramas obtenidos durante la formación de esos aductos. Las reacciones de alquilación se siguieron cinéticamente hasta no observar cambios en la absorbancia. Como se trabajó con fuerte exceso de agente alquilante frente a la NBP, se admite que, al finalizar la reacción, todo el substrato alquilable ha reaccionado.

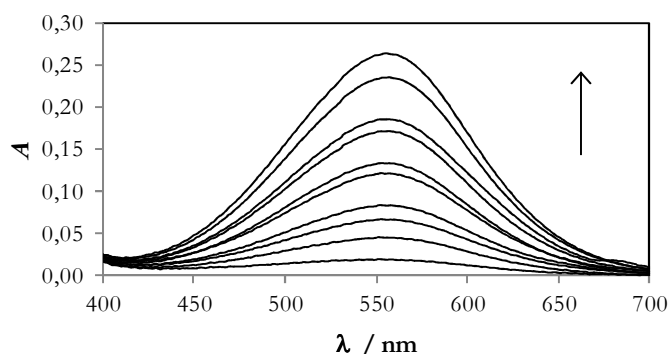


Figura 4.1. Formación del aducto NBP-AN (13–14000 min) en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano. [AN]_o = 0,05 M; [NBP]_o = 5×10^{-4} M; $T = 35,0$ °C; pH = 7,2

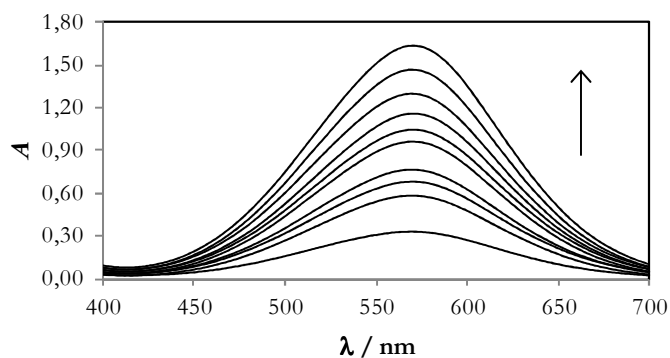


Figura 4.2. Formación del aducto NBP-AM (200–58000 min) en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano. [AM]_o = 0,10 M; [NBP]_o = 3×10^{-4} M; $T = 37,5$ °C; pH = 6,9

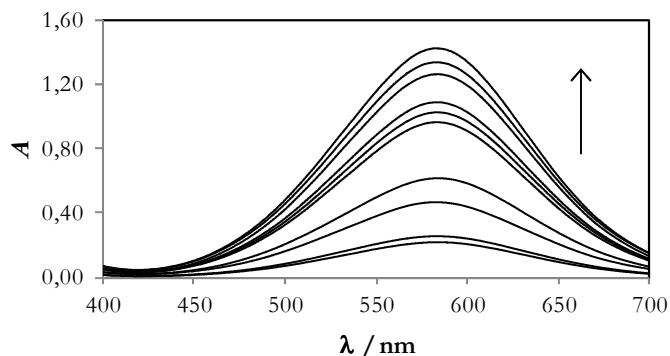


Figura 4.3. Formación del aducto NBP-AA (150–80000 min) en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano. [AN]₀ = 0,05 M; [NBP]₀ = 5 × 10⁻⁴ M; T = 35,0 °C; pH = 3,6

Las estructuras de los aductos entre la NBP y los α,β-UC se investigaron mediante espectrometría de masas (figura 4.4).

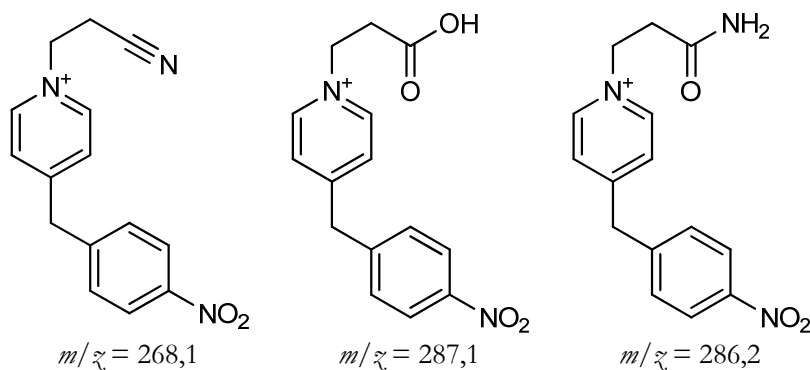


Figura 4.4. Estructura de los aductos formados entre la NBP y los agentes alquilantes α,β-insaturados

Como ejemplo ilustrativo, la figura 4.5 muestra los perfiles cinéticos de la formación de los aductos en función del tiempo. Puede observarse que los tiempos de reacción son considerablemente largos (~3 semanas), lo que hace que el seguimiento cinético convencional sea poco práctico, pudiendo implicar además la interferencia de reacciones concurrentes (p. e. polimerización, descomposición) que complicarían el estudio mecanístico de las reacciones objeto de estudio. Por estas razones, tras diversos ensayos, se ha utilizado el método de velocidades iniciales.³⁷¹

³⁷¹ Casado, J.; López-Quintela, M. A.; Lorenzo-Barral, F. M. The initial rate method in chemical kinetics. Evaluation and experimental illustration. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 450-452

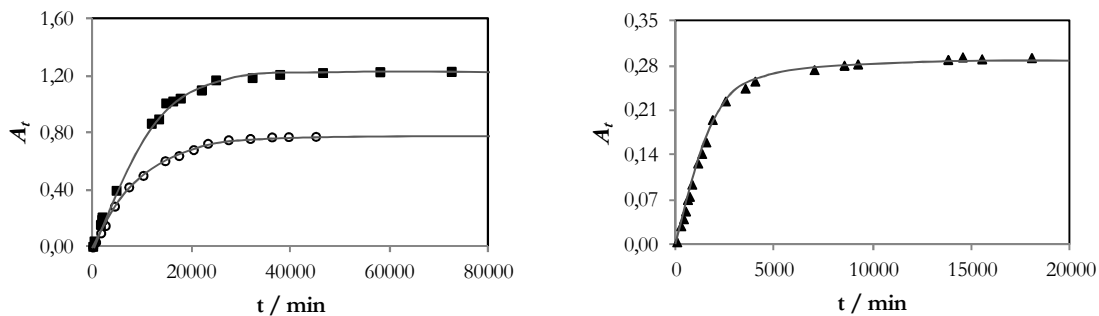


Figura 4.5. Perfiles cinéticos de las reacciones de alquilación de NBP por (■) AA, (○) AM y (▲) AN en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano. [AA]₀ = 1,0 M; [AM]₀ = 0,10 M; [AN]₀ = 0,05 M; [NBP]₀ = 2 × 10⁻⁴ M; T = 35,0 °C; pH = 7,2

4.1.1. Determinación de los coeficientes de absorción molar

Como la variable objeto de seguimiento ha sido la absorbancia de los aductos, para conocer sus concentraciones a lo largo del tiempo es necesario determinar los coeficientes de absorción molar, ϵ , de cada uno de aquellos.

La figura 4.6-a muestra la variación de la absorbancia (A_t) del aducto NBP-AA durante su formación. Cuando $[NBP]_0 \ll [\alpha,\beta-UC]_0$, la NBP es el reactivo limitante, de modo que, una vez alcanzada la meseta (figura 4.5), se admite que la absorbancia máxima ($A_{m\acute{a}x}$) debe corresponder a una concentración de aducto igual a la de partida de NBP en cada experimento, $[NBP]_0$. Por consiguiente, al representar los valores de $A_{m\acute{a}x}$ frente a los de $[NBP]_0$, deberá obtenerse una línea recta el valor de cuya pendiente será el de ϵ . La figura 4.6-b muestra el buen cumplimiento de la ecuación de Lambert-Beer por el aducto formado.

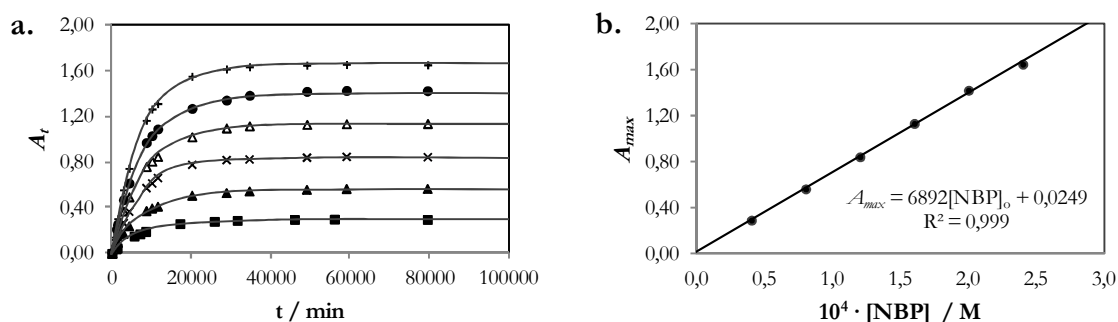


Figura 4.6. Determinación de ϵ para el aducto NBP-AA en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano. [AA]₀ = 0,10 M; (■) [NBP]₀ = 5 × 10⁻⁵ M; (▲) [NBP]₀ = 1 × 10⁻⁴ M; (×) [NBP]₀ = 1,5 × 10⁻⁴ M; (Δ) [NBP]₀ = 2 × 10⁻⁴ M; (●) [NBP]₀ = 2,5 × 10⁻⁴ M; (+) [NBP]₀ = 3 × 10⁻⁵ M; T = 37,5 °C; pH = 3,7

Estos resultados son consistentes con la hipótesis, antes mencionada, de que, alcanzada la meseta de cada curva de saturación, la concentración inicial de NBP debe ser igual a la del aducto formado en ese momento.

Con los demás α,β -UC se procedió de la misma forma que con AA, mostrando en todos los casos el mismo comportamiento.

Como el disolvente podría ejercer alguna influencia sobre las bandas de absorción del aducto,³⁷² el protocolo de trabajo reseñado en líneas anteriores se ha repetido con medios de reacción H₂O/dioxano 5:5 y 6:4 (vol.). Se ha encontrado que la variación de ϵ con la composición del medio es despreciable.³⁷³ La Tabla 4.1 recoge los valores de ϵ calculados para cada uno de los compuestos estudiados.

Tabla 4.1. Coeficientes de absorción molar de los aductos formados entre NBP y α,β -UC

| Compuesto α,β -insaturado | $10^{-3} \cdot \epsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a |
|--------------------------------------|---|
| AN | 4,50 \pm 0,17 |
| AM | 5,40 \pm 0,20 |
| AA | 6,70 \pm 0,10 |

^(a) $T = 37,5$ °C; $[AA]_0 = [AN]_0 = [AM]_0 = 0,10$ M
Valores con sus desviaciones estándar

Al analizar los valores de ϵ para cada uno de los α,β -UC estudiados, se observa una relación directamente proporcional entre la longitud de onda del máximo de absorción del aducto, $\lambda_{\text{máx}}$, y el correspondiente coeficiente de absorción molar, ϵ (disminución del espaciado HOMO-LUMO).

4.1.2. Parámetros cinéticos: órdenes de reacción

Para conocer los valores de las constantes de velocidad de alquilación se ha manejado la ecuación 3.1. Antes de aplicar esta ecuación es preciso determinar los valores de los órdenes de reacción, c y d . Las figuras 4.7-**a** y 4.7-**b** ilustran su cálculo en medio 7:3 (vol.) H₂O/dioxano.

La tabla 4.2 recoge los datos manejados para la determinación de los órdenes de reacción en la formación del aducto NBP-AM.

³⁷² Rao, C. N. Espectroscopía ultravioleta y visible. Ed. Alhambra: Madrid. 1970

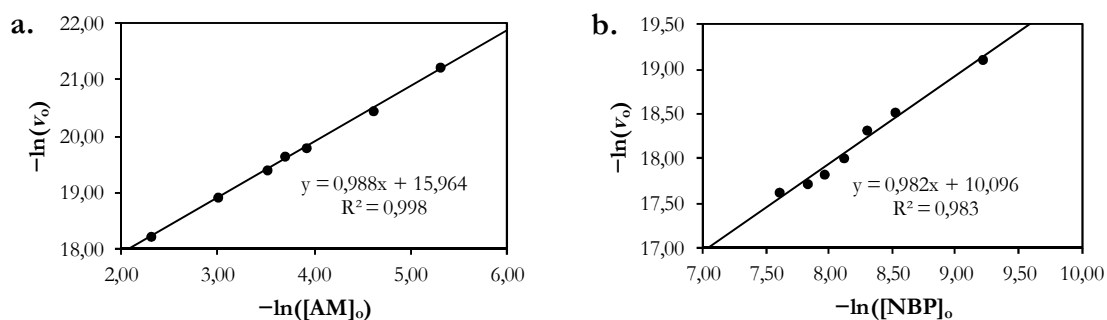
³⁷³ Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of acrylamide as an alkylating agent: a kinetic approach. *J. Phys. Org. Chem.* **2010**, *23*, 171-175.

Tabla 4.2. Determinación de los órdenes de reacción en la formación del aducto NBP–AM.

| Orden de reacción respecto a AM | | Orden de reacción respecto a la NBP | |
|---------------------------------|---|-------------------------------------|---|
| $10^2 \cdot [AM]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^8 \cdot v_0$ (M min ⁻¹) ^a | $10^4 \cdot [NBP]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^8 \cdot v_0$ (M min ⁻¹) ^b |
| 10,0 | 1,20 ± 0,05 | 1,0 | 0,50 ± 0,05 |
| 5,0 | 0,60 ± 0,02 | 2,0 | 0,90 ± 0,04 |
| 3,0 | 0,37 ± 0,03 | 2,5 | 1,10 ± 0,05 |
| 2,5 | 0,29 ± 0,02 | 3,0 | 1,50 ± 0,06 |
| 2,0 | 0,25 ± 0,03 | 3,5 | 1,80 ± 0,06 |
| 1,0 | 0,13 ± 0,01 | 4,0 | 2,00 ± 0,13 |
| 0,5 | 0,06 ± 0,01 | 5,0 | 2,20 ± 0,11 |

(^a) $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[NBP]_0 = 1,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ (^b) $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[AA]_0 = 0,10 \text{ M}$

Valores con sus desviaciones estándar.

**Figura 4.7.** Órdenes de reacción respecto a: (a) AM, (b) NBP.

Los gráficos 4.7-a y 4.7-b revelan órdenes de reacción unitarios respecto a las concentraciones $[NBP]_0$ y $[AM]_0$ (cf. *Método experimental*, ecuación 3.1, $c = d = 1$). La misma situación se presenta en las reacciones de alquilación de NBP por AA y AN.

Los resultados obtenidos conducen a la ecuación de velocidad (4.1) para las reacciones de alquilación de NBP por α, β -UC.

$$v_0 = \frac{d[AD]}{dt} = k_{\text{alq}} [\alpha, \beta\text{-UC}]_0 [NBP]_0 \quad (4.1)$$

4.1.3. Influencia de la composición del medio de reacción

Como se ha indicado antes, las reacciones de alquilación de NBP se estudiaron en tres medios de reacción H_2O /dioxano: 7/3, 6/4 y 5/5 (vol.). La razón de ello ha sido doble: 1) la baja solubilidad en agua de la NBP; 2) el objetivo de conocer la influencia que el medio puede ejercer en este tipo de reacciones. La Tabla 4.3 muestra cómo, al aumentar

la proporción de medio orgánico (dioxano), las velocidades de formación del aducto disminuyen significativamente.

Tabla 4.3. Velocidad de formación del aducto NBP–AN en función del medio de reacción

| Proporción H ₂ O/dioxano (vol.) | Veloc. inic. de reacción $10^8 \cdot v_0$ (M ⁻¹ cm ⁻¹) ^a |
|---|--|
| 7/3 | 7,06 ± 0,12 |
| 6/4 | 3,41 ± 0,10 |
| 5/5 | 1,97 ± 0,03 |

(^a) $T = 30,0$ °C; $[AN]_0 = 0,05$ M; $[NBP]_0 = 2 \times 10^{-4}$ M
Valores con sus desviaciones estándar.

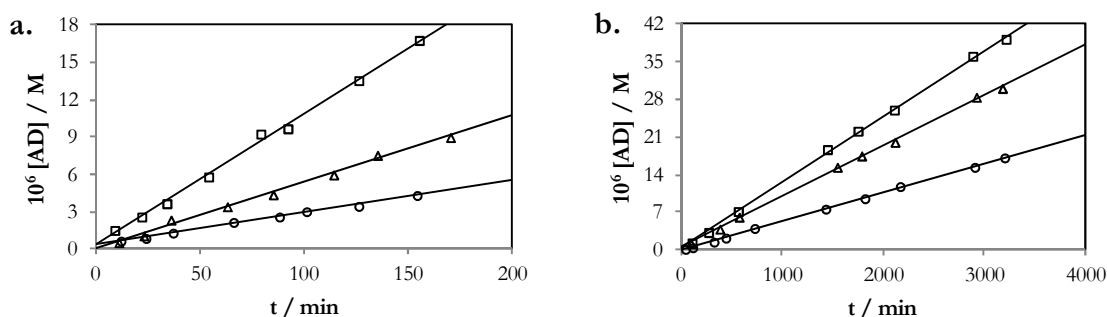


Figura 4.8. Velocidad de formación de los aductos (a) NBP–AN y (b) NBP–AA en medios de reacción H₂O/dioxano (vol.) (□) 7:3, (Δ) 6:4 y (○) 5:5.; $[NBP]_0 = 2 \times 10^{-4}$ M; $[AN]_0 = [AA]_0 = 0,05$ M; $T = 37,5$ °C

La figura 4.8 ilustra la variación de las velocidades de formación de los aductos NBP–AN y NBP–AA al modificar la composición del medio. Se observa que la disminución en la componente acuosa del medio de reacción, ocasiona una merma en la velocidad de formación del aducto. Se ve también que la concentración del aducto NBP–AN formado es considerablemente mayor que el de NBP–AA en un mismo tiempo. Más adelante se volverá sobre este resultado.

4.1.4. Influencia de la temperatura: parámetros termodinámicos de activación

La tabla 4.4 recoge los valores de las constantes de velocidad de alquilación (ecuación 4.1) en los diferentes medios agua/dioxano, en el intervalo de temperaturas 15,0 °C–40,0 °C.

Con las ecuaciones de Arrhenius (ecuación 3.7) y Eyring–Wynne–Jones (ecuación 3.8) se han calculado los valores de las energías, entalpías y entropías de activación en cada

caso. En todos los casos se observó un excelente ajuste a esas ecuaciones (figura 4.9) lo que, por otra parte, constituye una sanción del método de trabajo utilizado.

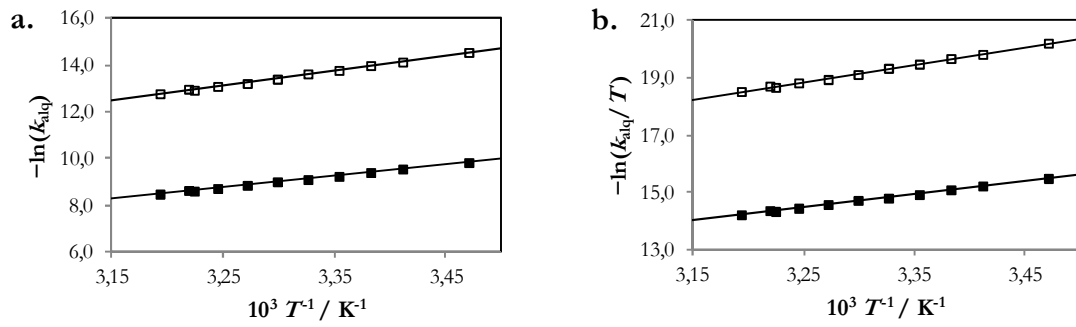


Figura 4.9. Diagramas de Arrhenius (a) y Eyring–Wynne–Jones (b) para las reacciones de alquilación de NBP por (■) AN y (□) AA en medio de reacción 7:3 (vol.) de H₂O/dioxano.

Tabla 4.4. Constantes de velocidad de la reacción de alquilación de NBP por compuestos α,β -insaturados a diferentes temperaturas y medios de reacción

| Temperatura (°C) | $10^5 \cdot k_{\text{alq}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})^a$ | | | | | | | | |
|---------------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|
| | AN | | | AM | | | AA | | |
| | Relación H ₂ O/dioxano (vol.) | | | | | | | | |
| | 7/3 | 6/4 | 5/5 | 7/3 | 6/4 | 5/5 | 7/3 | 6/4 | 5/5 |
| 15,0 | 5,30 ± 0,30 | 2,40 ± 0,09 | 1,10 ± 0,09 | 0,32 ± 0,06 | 0,08 ± 0,02 | 0,026 ± 0,007 | 0,05 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 |
| 20,0 | 7,00 ± 0,30 | 3,20 ± 0,06 | 1,30 ± 0,02 | 0,45 ± 0,06 | 0,12 ± 0,01 | 0,042 ± 0,005 | 0,07 ± 0,03 | 0,06 ± 0,01 | 0,035 ± 0,002 |
| 22,5 | 8,10 ± 0,70 | 3,60 ± 0,15 | 1,40 ± 0,01 | 0,53 ± 0,06 | 0,14 ± 0,01 | 0,053 ± 0,006 | 0,08 ± 0,03 | 0,07 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| 25,0 | 9,60 ± 0,90 | 4,00 ± 0,06 | 1,70 ± 0,03 | 0,61 ± 0,08 | 0,18 ± 0,02 | 0,070 ± 0,008 | 0,10 ± 0,01 | 0,08 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 |
| 27,5 | 11,0 ± 0,7 | 4,80 ± 0,10 | 1,90 ± 0,03 | 0,72 ± 0,07 | 0,21 ± 0,01 | 0,081 ± 0,005 | 0,12 ± 0,06 | 0,09 ± 0,02 | 0,06 ± 0,01 |
| 30,0 | 12,0 ± 0,8 | 5,70 ± 0,12 | 2,20 ± 0,09 | 0,90 ± 0,07 | 0,26 ± 0,01 | 0,094 ± 0,003 | 0,15 ± 0,05 | 0,11 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 |
| 32,5 | 14,0 ± 0,7 | 6,50 ± 0,11 | 2,30 ± 0,06 | 1,01 ± 0,07 | 0,32 ± 0,02 | 0,13 ± 0,02 | 0,18 ± 0,05 | 0,13 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 |
| 35,0 | 16,0 ± 0,7 | 6,90 ± 0,10 | 2,70 ± 0,04 | 1,10 ± 0,07 | 0,38 ± 0,02 | 0,16 ± 0,02 | 0,21 ± 0,05 | 0,16 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 |
| 37,0 | 17,5 ± 0,3 | 7,70 ± 0,12 | 3,00 ± 0,04 | 1,29 ± 0,07 | 0,43 ± 0,02 | 0,18 ± 0,02 | 0,23 ± 0,04 | 0,17 ± 0,02 | 0,093 ± 0,002 |
| 37,5 | 18,0 ± 0,7 | 7,80 ± 0,12 | 3,10 ± 0,04 | 1,37 ± 0,07 | 0,47 ± 0,02 | 0,20 ± 0,01 | 0,24 ± 0,04 | 0,18 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 |
| 40,0 | 20,4 ± 0,3 | 9,00 ± 0,20 | 3,40 ± 0,05 | 0,61 ± 0,08 | 0,55 ± 0,03 | 0,24 ± 0,02 | 0,28 ± 0,04 | 0,21 ± 0,02 | 0,12 ± 0,02 |

^(a) Valores con un intervalo de confianza del 95%

La tabla 4.5 da cuenta de los valores de los parámetros termodinámicos de activación para cada una de las reacciones de formación de los aductos α,β -UC en los distintos medios de reacción agua/dioxano investigados.

Los elevados valores negativos de las entropías de activación son coherentes con un mecanismo bimolecular de formación de los aductos.

Los resultados obtenidos en diferentes medios revelan que las reacciones de alquilación se ven inhibidas por el aumento del componente orgánico, es decir, con la disminución de la constante dieléctrica del medio ($\epsilon_{7/3} = 48,5$; $\epsilon_{6/4} = 40,5$; $\epsilon_{5/5} = 32$)³⁷⁴. Este resultado puede ser de utilidad cuando se trabaja en medios hidrófilo/lipófilo, frecuentes en *Ciencia y tecnología de los alimentos*. Por ejemplo, puede afectar al potencial alquilante de algunos componentes de ciertos alimentos (cf. Tabla 2.1)^{375, 376} en el estómago humano. La presencia simultánea en el mismo de bebidas alcohólicas o alimentos ricos en aceites –como las ensaladas o conservas en aceite– podrían inhibir el potencial alquilante de sus componentes α,β -insaturados.³⁷⁷

El análisis de los resultados recogidos en la Tabla 4.4, muestra la siguiente secuencia de potenciales alquilantes de los α,β -UC: AN > AM > AA, de modo que la formación del aducto NBP-AN es aproximadamente 10 veces mayor que la del aducto NBP-AM y 100 veces mayor que la del NBP-AA.

Los resultados descritos revelan la existencia de una correlación entre reactividad química *in vitro* y capacidad mutágena/cancerígena,³⁷⁸ lo que permite conferirles cierto carácter predictivo, minimizando al mismo tiempo ensayos con animales de experimentación (*vide infra*).³⁷⁹

³⁷⁴ Åkerlöf, G.; Short, O. A. The dielectric constant of dioxane-water mixtures between 0 and 80°. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1241

³⁷⁵ Stadler, R. H.; Verzegnassi, L.; Varga, N.; Grigorov, M.; Studer, A.; Riediker, S.; Schilter, B. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1242-1250

³⁷⁶ Stadler, R. H.; Robert, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davidek, T.; Devaud, S.; Goldmann, T.; Hau, J.; Blanck, I. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5550-5558

³⁷⁷ García-Prieto, J. C.; Mateos, R.; Calle, E.; Casado, J. Inhibition of Nitrosation by the reaction medium. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3517-3520

³⁷⁸ Léonard, A.; Gerber, G. B.; Stecca, C.; Rueff, J.; Borba, H.; Farmer, P. B.; Sram, R. J.; Czeizel, A. E.; Kalina, I. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of acrylonitrile. *Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.* **1999**, *436*, 263-283

³⁷⁹ Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. A kinetic approach to the alkylating potential of carcinogenic lactones. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161-1166

Tabla 4.5. Parámetros termodinámicos de activación de las reacciones de alquilación de NBP por compuestos α,β -insaturados, en distintos medios de reacción

| Compuesto α,β -insaturado | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol ⁻¹) ^a | | | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹) ^a | | | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35,0 °C) (kJ mol ⁻¹) ^a | | |
|---|---|--------|--------|---|---------|---------|---|---------|---------|
| | Relación H ₂ O/dioxano | | | | | | | | |
| | 7/3 | 6/4 | 5/5 | 7/3 | 6/4 | 5/5 | 7/3 | 6/4 | 5/5 |
| AN | 38 ± 1 | 38 ± 1 | 35 ± 1 | 194 ± 3 | 203 ± 5 | 219 ± 4 | 98 ± 1 | 100 ± 1 | 96 ± 2 |
| AM | 45 ± 1 | 55 ± 1 | 64 ± 1 | 194 ± 4 | 169 ± 3 | 149 ± 4 | 104 ± 1 | 107 ± 1 | 110 ± 1 |
| AA | 51 ± 1 | 49 ± 1 | 45 ± 1 | 189 ± 4 | 197 ± 2 | 216 ± 3 | 109 ± 1 | 110 ± 1 | 112 ± 1 |
| AC | No se observó reacción | | | | | | | | |

^(a) Valores con sus desviaciones estándar.

Al contrario de lo que ocurre con algunos biomarcadores (como los nucleósidos Guo y Ade), no se ha observado alquilación de NBP por AC. Este hecho es significativo, porque en la alquilación del sustrato Guo³⁸⁰ el AC reacciona con este nucleósido (de la misma manera que con Ade) en dos sitios de enlace: el N1 exocíclico y el N² endocíclico.³⁸¹ La ausencia de estas características estructurales en la molécula de NBP puede explicar su falta de reactividad frente a AC.

Si se toma como referencia el medio de reacción agua/dioxano 7:3 (vol.), los valores de los parámetros termodinámicos de activación (Tabla 4.5) muestran que las reacciones de alquilación del sustrato NBP por α,β -UC transcurren por un mecanismo de control entálpico.

En términos comparativos, la pequeña influencia de la entropía de activación (Tabla 4.5) sobre la reactividad de los α,β -UC frente al común sustrato de alquilación NBP, es coherente con las estructuras moleculares de los mismos (*cf.* Fig. 4.10) que, en términos meramente estéricos, no deben dar lugar a cambios estructurales significativos en los correspondientes complejos activados, como reflejan los valores de $\Delta^\ddagger S^\ominus$ (Tabla 4.5).

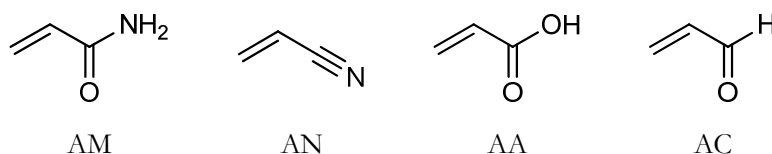


Figura 4.10. Estructuras de los agentes alquilantes α,β -insaturados estudiados en este trabajo

Al modificar el medio de reacción se observa que, tanto AN como AA, presentan valores de entalpía prácticamente invariables. En el caso de AM, al aumentar la componente acuosa del medio de reacción, disminuyen los valores de las entalpías de activación y, al mismo tiempo, aumentan los valores absolutos de las entropías de activación. Ello sugiere un complejo activo de naturaleza polar, análogo a la del propio aducto resultante de la alquilación ([ref. 373]; *cf.* figura 4.4).³⁸² Dicho complejo puede ser resultado de la formación de puentes de hidrógeno entre el dioxano y los grupos amida.³⁸³ La figura 4.12 ilustra este modo de pensar.

³⁸⁰ Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Alkylating potential of α,β -unsaturated compounds. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6226-6233

³⁸¹ Kozekov, I. D.; Nechev, L. V.; Moseley, M. S.; Harris, C. M.; Rizzo, C. J.; Stone, M. P.; Harris, T. M. DNA interchain cross-links formed by acrolein and crotonaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 50-61

³⁸² Jungers, J. J.; Sajus, L. *L'analyse cinétique de la transformation chimique*. Ed. Technip: Paris, 1968

³⁸³ Snyder, J. K.; Stock, L. M. Conformational preferences in alkylnitrosoureas. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 886-891

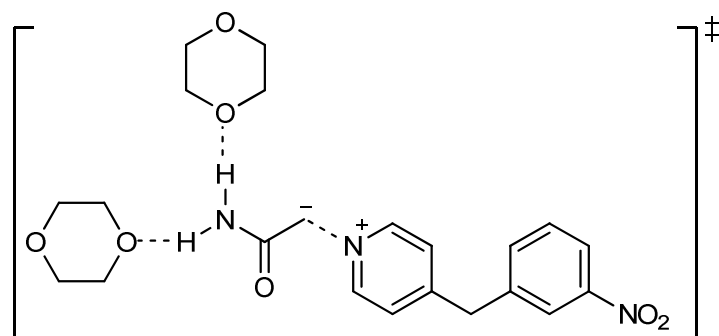


Figura 4.10. Puentes de hidrógeno dioxano–AM durante la alquilación de NBP

Como es sabido, la correlación de Hammett es una de las herramientas más utilizadas en el análisis de la influencia de los sustituyentes sobre las constantes de velocidad de distintas series de reacciones.³⁸⁴ En nuestro caso puede escribirse así:

$$\log [k_{\text{alq}}(\alpha, \beta\text{-UC})] = \rho \cdot \sigma + \log k_0 \quad (4.2)$$

donde $k_{\text{alq}}(\alpha, \beta\text{-UC})$ es la constante de velocidad de alquilación de la NBP por cada uno de los $\alpha, \beta\text{-UC}$, σ representa el efecto electrónico (efecto polar) y ρ es la constante de reacción.

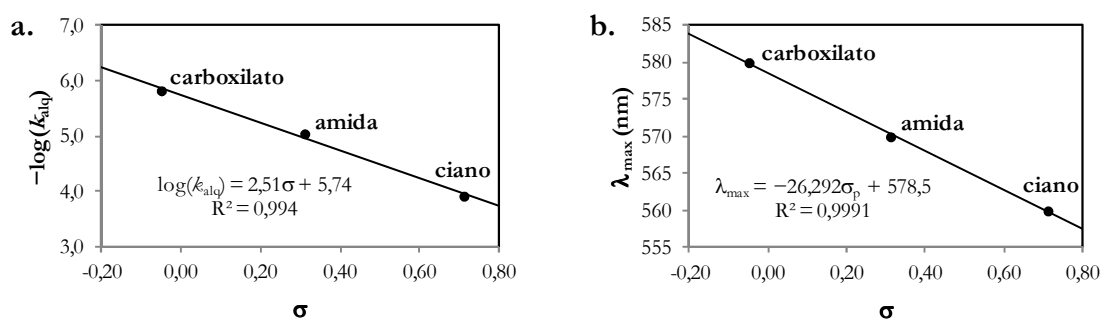


Figura 4.11. Correlaciones de Hammett sobre la influencia de los sustituyentes en la reactividad de los $\alpha, \beta\text{-UC}$

La figura 4.11-**a** ilustra la excelente correlación obtenida utilizando los parámetros de Hammett³⁸⁵ y revela que las reacciones de alquilación de la NBP por $\alpha, \beta\text{-UC}$ están controladas por efecto polar. El valor positivo de ρ confirma que las reacciones transcurren

³⁸⁴ Leffler, J. E.; Grunwald, E. *Rate and equilibria of organic reactions as treated by statistical, thermodynamic and extra-thermodynamic methods*. Dover Publications Inc.: New York, 1989

³⁸⁵ Exner, O. *Correlation analysis of chemical data*. Plenum Press: New York, 1988

por un mecanismo de adición nucleofílica,³⁸⁶ siendo moderadamente aceleradas por grupos aceptores de electrones.

Como la introducción de sustituyentes aceptores de electrones en los sistemas π de una molécula pueden dar lugar a desplazamientos hipsóchromos,³⁸⁷ se ha buscado una posible correlación entre los valores del parámetro polar, σ , de Hammett y los desplazamientos hipsóchromos de los distintos sustituyentes. La figura 4.11-**b** muestra una excelente correlación.

Las correlaciones reflejadas en las figuras 4.11-**a** y 4.11-**b** constituyen un argumento de apoyo al mecanismo de reacción propuesto para la formación de los aductos NBP- α,β -UC.

De acuerdo con la Teoría de Eyring del Complejo Activo,

$$k_{\text{alq}} = \left(\frac{\mathbf{k}_B T}{h} \right) e^{-\Delta^\ddagger G^\ominus / RT} \quad (4.3)$$

los valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ pueden ser parámetros cinéticos muy útiles para establecer, en términos cuantitativos, una escala de potenciales de alquilación. La Tabla 4.6 muestra algunos de estos valores.

Junto a la merma de reactividad de AN, AM y AA como agentes alquilantes al aumentar la proporción de componente orgánico (dioxano) del medio de reacción, los valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ reseñados en la Tabla 4.6 revelan: i) la existencia de una correlación entre reactividad química y carcinogenicidad: mientras la β -propiolactona y β -butirolactona están clasificadas como posibles carcinógenos humanos,³⁸⁸ los sorbatos –aunque clasificados como “*Generally recognized as safe*” (GRAS) por la FDA americana– han mostrado una débil capacidad genotóxica.^{389, 390} Los valores más altos de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ en los casos de AM y AA, responsable de sus bajas reactividades, son congruentes con los estudios epidemiológicos realizados con ellos. Aunque, en el caso de AM y como se ha reseñado en páginas

³⁸⁶ March, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. 6ta ed., John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2007

³⁸⁷ Plumb, J. A.; Milray, R.; Kaye, S. B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4435-4440

³⁸⁸ International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 71. IARC: Lyon, Francia

³⁸⁹ Würigler, F. E.; Schlatter, J.; Maier, P. The genotoxicity status of sorbic acid, potassium sorbate and sodium sorbate. *Mutat. Res.* **1992**, *283*, 107-111

³⁹⁰ Münzner, R.; Guigas, C.; Renner, H. W. Re-examination of potassium sorbate for possible genotoxic potential. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 397-401

anteriores, su potencial genotóxico ha sido –y sigue siéndolo– objeto de debate,^{391, 392} ya que la molécula ha sido clasificada como “*probably carcinogenic to humans*” por la IARC (Grupo 2A). En el caso de AA –el compuesto, de todos los estudiados, que presenta el mayor valor de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ – los datos son concordantes con su bajo potencial carcinógeno y mutágeno dentro del grupo de compuestos estudiados (es el único de los α, β –UC estudiados incluido en el Grupo 3 de la IARC, “*not classifiable as to its carcinogenicity to humans*”).

Tabla 4.6. Reactividad química de algunas moléculas alquilantes

| Agente alquilante | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol ⁻¹) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (kJ mol ⁻¹) ^a |
|---|---|---|---|
| β –propiolactona ^b | 41 ± 2 | 148 ± 6 | 87 ± 2 |
| β –butirolactona ^b | 47 ± 2 | 148 ± 6 | 93 ± 2 |
| dicetena ³⁹³ | 26 ± 2 | 152 ± 5 | 73 ± 3 |
| óxido de <i>p</i> –nitroestireno ³⁹⁴ | 54 ± 2 | 139 ± 5 | 97 ± 2 |
| Sorbato potásico ³⁹⁵ | 78 ± 7 | 70 ± 12 | 99 ± 6 |
| Acilonitrilo | 38 ± 1 | 194 ± 3 | 98 ± 1 |
| Acilamida | 45 ± 2 | 193 ± 9 | 104 ± 2 |
| Ácido acrílico | 51 ± 1 | 189 ± 4 | 109 ± 1 |

(^a) Medio de reacción 7:3 (vol.) de H₂O/dioxano (^b) Ref. 43

Valores con sus desviaciones estándar

Finalmente, el valor más bajo de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ para la alquilación por acilonitrilo es congruente con lo discutido en líneas anteriores respecto a su actividad mutágena/cancerígena (*cf.* Tabla 4.4, [ref. 34]).

Mientras que los valores de $\Delta^\ddagger H^\ominus$ para las reacciones de alquilación del substrato NBP por los diferentes α, β –UC son prácticamente los mismos que para la alquilación por β –propiolactona y β –butirolactona (algunos de los agentes alquilantes más potentes), es el término termentrópico $T\Delta^\ddagger S^\ominus$ el responsable directo de la menor reactividad. Se trata de un resultado de notable interés en términos cinéticos (mecanismo de reacción), con posibles

³⁹¹ Friedman, M.; Mottram, D. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Springer Science: New York, 2005

³⁹² Mottram, D. S.; Friedman, M. Symposium on the chemistry and toxicology of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5983–6184

³⁹³ Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. Chemical reactivity and biological activity of diketene. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964–1969

³⁹⁴ González-Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Céspedes-Camacho, I. F.; Calle, E.; Casado, J. Reactivity of *p*–nitrostyrene oxide as an alkylating agent. A kinetic approach to biomimetic conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7016–7022

³⁹⁵ Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. Alkylating potential of potassium sorbate. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244–10247

proyecciones prácticas de carácter bioquímico (*cf.* en Tabla 4.5 la notable influencia de la composición del medio en el valor de $\Delta^\ddagger G^\ominus$).

4.2. Estudio cinético de la alquilación de nucleósidos

Las reacciones de alquilación de nucleósidos por α,β -UC se investigaron en los intervalos de pH = 8,0–11,0 y $T = 15$ –40 °C. Las disoluciones de Guo y Urd en NaOH son estables a temperatura ambiente.³⁹⁶ Los valores de pH se mantuvieron constantes durante el tiempo de reacción.

4.2.1. Alquilación de guanosina por acrilonitrilo, ácido acrílico y acrilamida

El análisis cromatográfico permitió resolver los picos mayoritarios de la mezcla de reacción de Guo y AN. Los tiempos de retención fueron 19,5 min y 25,5 min para Guo y para el aducto Guo-AN, respectivamente. La figura 4.12 muestra uno de los cromatogramas obtenidos para esta reacción.

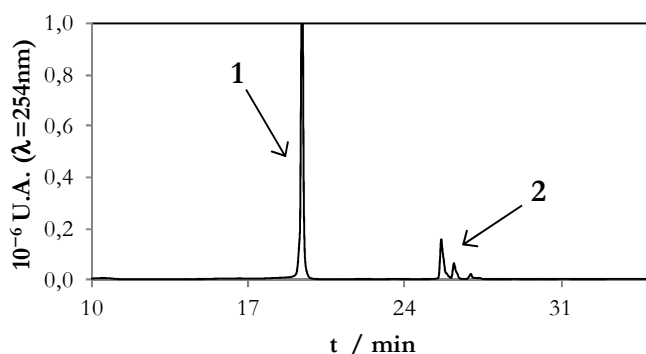


Figura 4.12. Cromatograma de la mezcla de reacción Guo-AN (*cf.* figura 3.4-a). **1:** Guo, **2:** aducto Guo-AN (U.A. = unidades arbitrarias)

Las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica se recogieron y purificaron para su caracterización. La figura 4.13 muestra el espectro de masas correspondiente al pico del aducto Guo-AN (*cf.* pico **2**, figura 4.12).

Los picos del compuesto protonado y de éste con los iones sodio se observaron a m/z 337,2 y m/z 359,2, respectivamente, y corresponden al compuesto (2-cianoetil) guanosina. La señal a m/z 117,8 corresponde a la fragmentación del azúcar en el aducto (la ribosa menos una molécula de H₂O) así como la señal a m/z 101,8 (la ribosa menos dos

³⁹⁶ Zoltewicz, J. A.; Clarck, D. F.; Sharpless, T. W.; Grahe, G. Kinetics and mechanism of the acid-catalyzed hydrolysis of some purine nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1741-1750

moléculas de H₂O). Ello prueba que no se han producido reacciones de cianoetilación en las posiciones 3' y 5' del anillo de ribosa. La señal a m/z 204,9 se ha atribuido a la pérdida de la ribosa en la guanosina alquilada. La señal a m/z 151,8 corresponde a la parte glicosídica no alquilada.

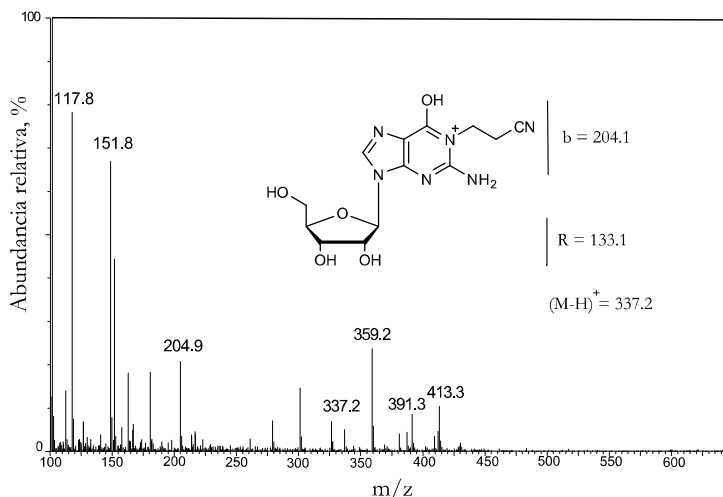


Figura 4.13. Espectro de masas del aducto Guo-AN

Los espectros H¹-RMN confirman la presencia del aducto esperado. La ausencia de la señal a 10,6 ppm —que corresponde al protón del nitrógeno N1 de la base nitrogenada— es evidencia de la alquilación de Guo en esa posición.

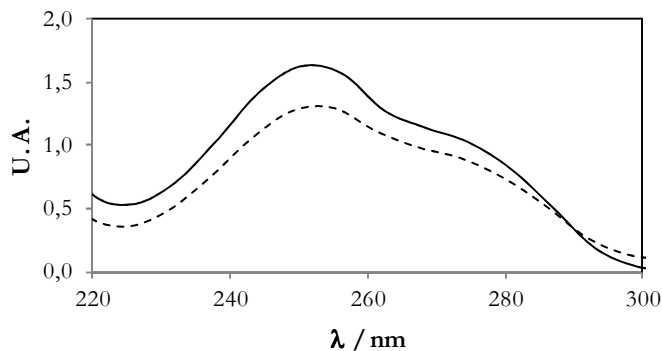


Figura 4.14. Espectros UV-Vis de Guo (línea continua) y del aducto Guo-AN (línea de puntos)

El espectro UV-Vis del aducto presenta las características propias de una alquilación en la posición N1 de Guo, con un máximo de absorción en $\lambda = \sim 250$ nm (suele

presentar un pequeño hombro en $\lambda = \sim 270$ nm).³⁹⁷ La figura 4.14 muestra los espectros UV-Vis de Guo y del aducto Guo-AN.

La figura 4.15 ilustra la influencia del pH sobre la reacción de alquilación de Guo por AN. Se observa que el aducto formado es estable en $\text{pH} < 10,0$. A $\text{pH} < 8,0$ no se observó reacción alguna.

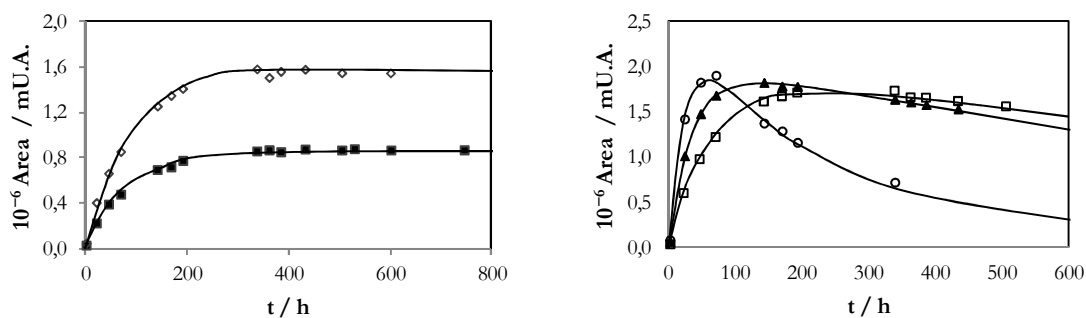


Figura 4.15. Influencia del pH en la reacción de alquilación de Guo por AN.

$[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4}$ M; $[\text{AN}]_0 = 0,05$ M; $T = 37,5$ °C; (■) $\text{pH} = 9,6$; (◇) $\text{pH} = 9,9$; (□) $\text{pH} = 10,4$; (▲) $\text{pH} = 10,7$; (○) $\text{pH} = 11,1$

Debido a la no reactividad de Guo frente a AN a $\text{pH} < 8,0$ y, como:

$$v_o \propto \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (\text{cf. figura 4.16}),$$

la molécula de Guo debe estar en forma desprotonada, Guo^- , para formar aductos. Para confirmarlo, se midió el $\text{p}K_a$ del nucleósido. En la reacción de alquilación por AN, se encontró el valor $\text{p}K_a = 10,1$ ($T = 37,5$ °C). Considerando los efectos de la fuerza iónica y de la temperatura, el valor corregido concuerda bien con el bibliográfico ($\text{p}K_a = 9,25$ a $T = 25,0$ °C).³⁹⁸ La figura 4.17 muestra las curvas de valoración obtenidas para las reacciones de alquilación.

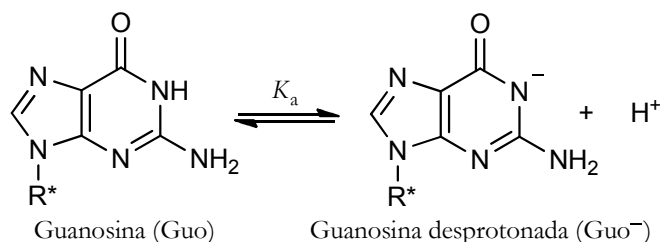


Figura 4.16. Desprotonación de Guo a $\text{pH} > 8,0$ ($\text{R}^* = \text{ribosa}$)

³⁹⁷ Munter, T.; Cottrell, L.; Hill, S.; Kronberg, L.; Watson, W. P.; Golding, B. T. Identification of adducts derived from reactions of (1-chloroethenyl)oxirane with nucleosides and calf thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1549-1560

³⁹⁸ Christensen, J. J. Rytting, J. H.; Izatt, R. M. Thermodynamic $\text{p}K$, ΔH° , ΔS° and ΔC_p° values for proton dissociation from several purines and their nucleosides in aqueous solution. *Biochemistry* **1970**, *9*, 4907-4913

Como los tiempos de alquilación de Guo son largos (~ 40 días, *cf.* figura 4.15), para la determinación de las constantes cinéticas se utilizó el método de velocidades iniciales ([ref. 369]). La tabla 4.7 y figura 4.18 muestran los datos manejados para la determinación de los órdenes en la reacción de alquilación de Guo por AN. Se observa que los órdenes de reacción respecto a las concentraciones de cada reactivo son unitarios.

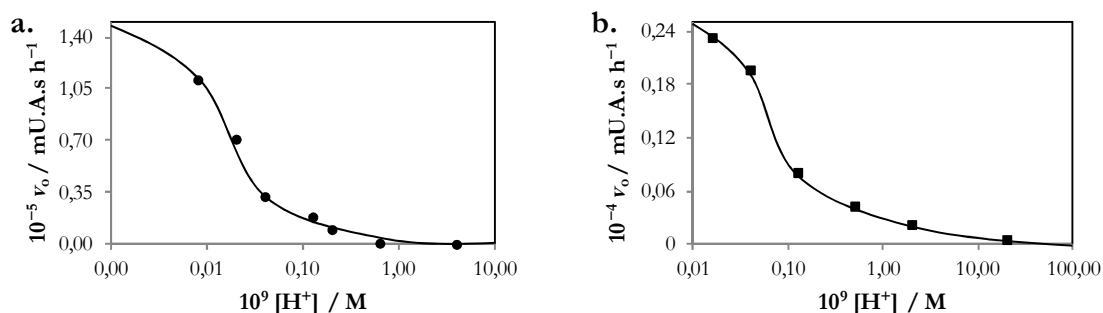


Figura 4.17. Curvas de valoración en las reacciones de alquilación de Guo por (a) AN y (b) AM. $[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{AN}]_0 = [\text{AM}]_0 = 0,05 \text{ M}$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabla 4.7. Determinación de los órdenes de reacción en la alquilación de Guo por AN

| Orden de reacción respecto a $[\text{AN}]$ | | Orden de reacción respecto a $[\text{Guo}]$ | |
|--|--|---|--|
| $10^2 \cdot [\text{AN}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-3} \cdot v_0$ (mU.A. s h^{-1}) ^a | $10^4 \cdot [\text{Guo}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-3} \cdot v_0$ (mU.A. s h^{-1}) ^b |
| 10,0 | $5,02 \pm 0,05$ | 0,5 | $2,52 \pm 0,06$ |
| 5,0 | $2,86 \pm 0,03$ | 1,0 | $4,34 \pm 0,05$ |
| 3,0 | $1,88 \pm 0,04$ | 2,0 | $4,78 \pm 0,05$ |
| 1,0 | $0,70 \pm 0,02$ | 4,0 | $11,7 \pm 0,12$ |
| 0,5 | $0,35 \pm 0,01$ | 6,0 | $31,8 \pm 0,15$ |
| | | 8,0 | $49,6 \pm 0,11$ |

(^a) $[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $\text{pH} = 9,6$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (^b) $[\text{AN}]_0 = 0,05 \text{ M}$; $\text{pH} = 10,4$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Valores con sus desviaciones estándar.

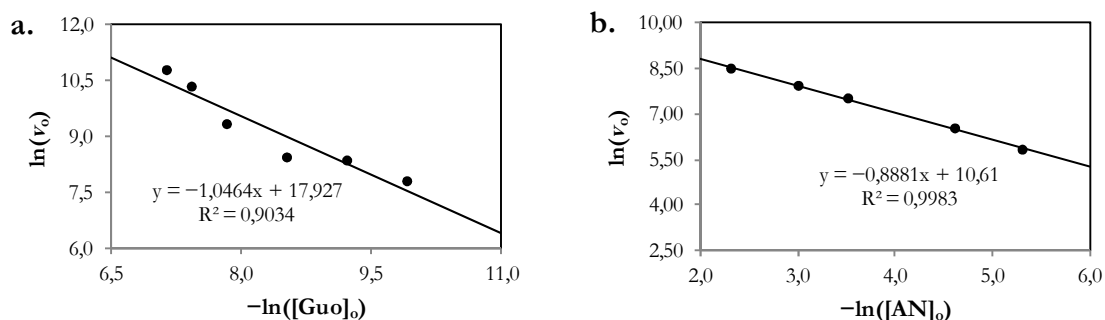


Figura 4.18. Órdenes de reacción respecto a: (a) $[\text{Guo}]$ y (b) $[\text{AN}]$.

Como: i) en la alquilación de Guo por AN, el agente alquilante se encuentra en gran exceso respecto al nucleósido (más de cincuenta veces), ii) la guanosina nunca se consumió completamente y iii) las reacciones de alquilación en la posición *N1* de distintos deoxinucleósidos son reversibles,³⁹⁹ se propone la existencia de un equilibrio químico (donde $K_{AN} = k_{alq}/k_{dealq}$) entre Guo^- y Guo alquilada. La figura 4.19 muestra el mecanismo propuesto.

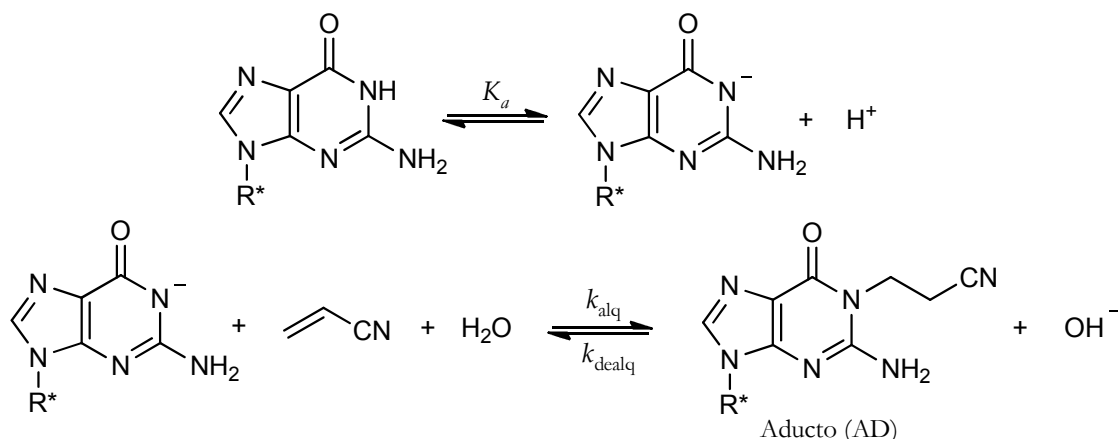


Figura 4.19. Mecanismo de alquilación de Guo por AN ($R^* = \text{ribosa}$)

De ese mecanismo se deduce la siguiente ecuación de velocidad ($\text{pH} < 10,0$):

$$\frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{alq}^{\text{Guo}^-} [\text{Guo}^-][\text{AN}]_o - k_{dealq}^{\text{Guo}^-} [\text{AD}][\text{OH}^-] \quad (4.4)$$

donde $[\text{AD}]$ es la concentración del aducto Guo–AN, y $k_{alq}^{\text{Guo}^-}$, $k_{dealq}^{\text{Guo}^-}$ las constantes de orden uno de alquilación y desalquilación de Guo^- , respectivamente.

Como $[\text{Guo}]_{\text{total}} = [\text{Guo}^-] + [\text{Guo}]$, la ecuación 4.4 puede reescribirse así:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{AD}]}{dt} &= k_{alq}^{\text{Guo}^-} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{AN}]_o ([\text{Guo}]_o - [\text{AD}]) - k_{dealq}^{\text{Guo}^-} [\text{AD}][\text{OH}^-] = \\ &= k'_{alq}{}^{\text{Guo}^-} ([\text{Guo}]_o - [\text{AD}]) - k'_{dealq}{}^{\text{Guo}^-} [\text{AD}] \end{aligned} \quad (4.5)$$

donde $k'_{alq}{}^{\text{Guo}^-} = k_{alq}^{\text{Guo}^-} [\text{AN}]_o \left(\frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \right)$ y $k'_{dealq}{}^{\text{Guo}^-} = k_{dealq}^{\text{Guo}^-} [\text{OH}^-]$ son las pseudoconstantes de orden uno de alquilación y desalquilación, respectivamente.

Al integrar la ecuación 4.5 y expresar $[\text{AD}]$ en términos de las áreas cromatográficas se obtiene la siguiente expresión:

³⁹⁹ Veldhuyzen, W. F.; Shallop, A. J.; Jones, R. A.; Rokita, S. E. Thermodynamic versus kinetic products of DNA alkylation as modeled by reaction of deoxyadenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11126-11132

$$\text{Area} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \Delta t_{\text{eluc}} [\text{Guo}]_0 \times \frac{k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-} (1 - e^{-(k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-} + k'_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-})t})}{k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-} + k'_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-}} \quad (4.6)$$

donde el área se expresa en mU.A.·s, ε es el coeficiente de absorción molar del aducto Guo–AN (expresado en U.A. M⁻¹ cm⁻¹), l es el paso óptico y Δt_{eluc} el tiempo de elución (~0,4 min).⁴⁰⁰

Para conocer el valor de ε ($\lambda = 254$ nm), mantenida constante la concentración del nucleósido, se varían las concentraciones del α,β -UC. La figura 4.20 muestra el excelente ajuste de los resultados a la ecuación 4.6.

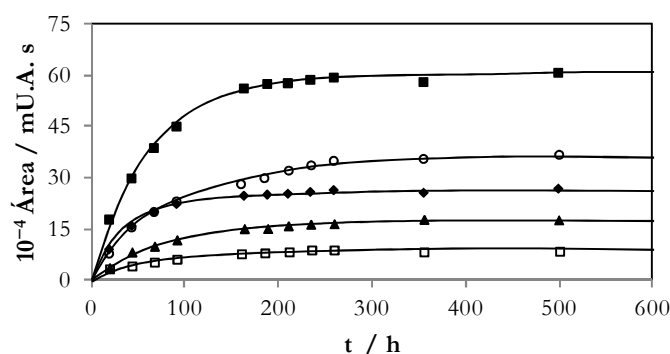


Figura 4.20. Determinación del coeficiente de absorción molar del aducto Guo–AN. $[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4}$ M; (\square) $[\text{AN}]_0 = 0,005$ M; (\blacktriangle) $[\text{AN}]_0 = 0,01$ M; (\blacklozenge) $[\text{AN}]_0 = 0,03$ M; (\circ) $[\text{AN}]_0 = 0,05$ M; (\blacksquare) $[\text{AN}]_0 = 0,10$ M; $T = 37,5$ °C; $\text{pH} = 9,6$

Cuando $t \rightarrow \infty$ (es decir, cuando se alcanzan las mesetas; cf. figura 4.20), la ecuación 4.6 se convierte en la 4.7:

$$\frac{\text{Area}_{t \rightarrow \infty}}{\Delta t_{\text{eluc}}} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot [\text{Guo}]_0 \times \frac{[\text{AN}]_0 \left(\frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \right)}{[\text{AN}]_0 \left(\frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \right) + \frac{k'_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-}}{k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-}}} \quad (4.7)$$

La ecuación 4.7 es de la forma general: $y = \frac{ax}{(b+x)}$, donde:

$$a = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot [\text{Guo}]_0 \quad (4.8)$$

$$b = \frac{k'_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-}}{k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-}} = \frac{k'_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-} [\text{OH}^-]}{k'_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-}} = \frac{[\text{OH}^-]}{K_{\text{AN}}} \quad (4.9)$$

⁴⁰⁰ Pelillo, M.; Cuvelier, M. E.; Biguzzi, B.; Gallina-Toschi, T.; Berset, C.; Lercker, G. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection: the case of carnosic acid. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1023*, 225-229

Los parámetros a y b se han calculado mediante ajuste no lineal de los resultados experimentales. La figura 4.21 muestra el buen ajuste a la ecuación 4.7 para las reacciones de alquilación por AN y AM.

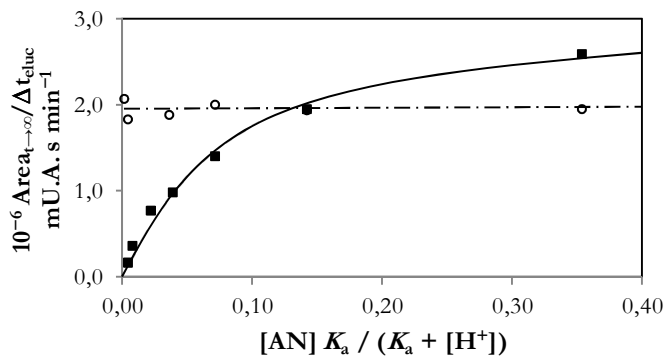


Figura 4.21. Determinación de los valores de ε y K_{AN} para la alquilación de Guo por (■) AN y (○) AM; pH = 9,6; $T = 37,5$ °C

En el caso de la alquilación de Guo por AN se obtuvieron los valores siguientes: $\varepsilon = (5,1 \pm 0,3) \times 10^5$ U.A. $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 254$ nm; $T = 37,5$ °C) y $K_{AN} = (5,5 \pm 0,6) \times 10^{-4}$.

Por otra parte, la determinación experimental de la constante de equilibrio mediante la expresión $K_{AN} = \frac{k_{alq}^{Guo^-}}{k_{dealq}^{Guo^-}} = \frac{[AD]_{eq}[OH^-]}{[Guo]_{eq}[AN]_o}$, conduce al valor $K_{AN} = (6,2 \pm 1,4) \times 10^{-4}$. La

similitud en los valores de K_{AN} obtenidos mediante ajuste no lineal y experimentalmente respalda el mecanismo de alquilación propuesto (figura 4.19).

Conocido el valor de ε , los valores de las constantes de velocidad de alquilación se han calculado mediante la expresión:

$$v_o = \left(\frac{dArea}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \Delta t_{eluc} \cdot k_{alq}^{Guo^-} \cdot [AN]_o \times \frac{K_a}{K_a + [H^+]} [Guo]_o \quad (4.10)$$

La Tabla 4.8 muestra los valores obtenidos para las constantes de velocidad y de equilibrio y su variación con la temperatura. Finalmente, con las ecuaciones de Arrhenius y Eyring–Wynne–Jones (ecuaciones 3.7 y 3.8), se han calculado los valores de los parámetros termodinámicos de activación. La tabla 4.9 da cuenta de los resultados.

Con los valores de la constante de equilibrio, K_{AN} , a diferentes temperaturas, mediante la ecuación de van't Hoff⁴⁰¹ se calculó la entalpía de reacción, encontrándose el valor $\Delta H^\circ = (47 \pm 2) \text{ kJ mol}^{-1}$.

⁴⁰¹ Connors, K. A. *Chemical Kinetics: The study of reaction rates in solution*. VCH Publishers, Inc.: New York, 1990

Tabla 4.8. Constante de velocidad de alquilación de Guo por AN a diferentes temperaturas

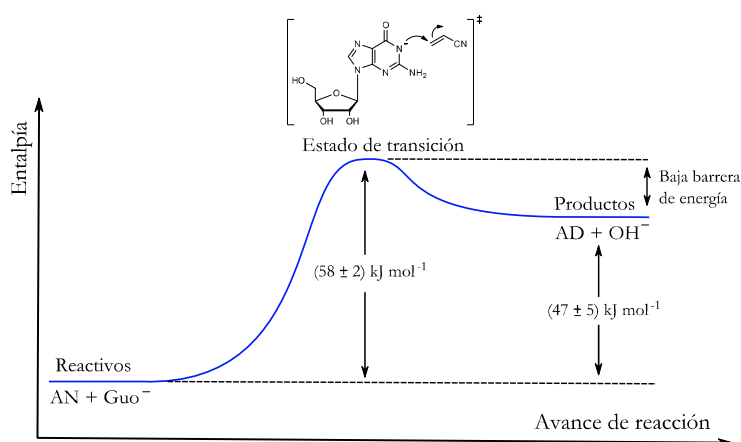
| Temperatura (°C) | $10^5 \cdot k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ^a | $10^4 \cdot K_{\text{AN}}$ ^a |
|---------------------|---|---|
| 15,0 | $1,33 \pm 0,08$ | $1,1 \pm 0,1$ |
| 20,0 | $2,1 \pm 0,2$ | $2,2 \pm 0,2$ |
| 25,0 | $3,5 \pm 0,3$ | $2,5 \pm 0,1$ |
| 30,0 | $5,7 \pm 0,4$ | $2,5 \pm 0,1$ |
| 35,0 | $6,8 \pm 0,8$ | $4,7 \pm 0,2$ |
| 37,0 | $8,5 \pm 0,6$ | $5,3 \pm 0,3$ |
| 37,5 | $8,7 \pm 0,6$ | $5,5 \pm 0,3$ |
| 40,0 | $10,0 \pm 0,7$ | $7,1 \pm 0,4$ |

(a) Valores con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 4.9. Parámetros de activación para la reacción de alquilación de Guo por AN

| E_a (kJ mol^{-1}) ^a | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol^{-1}) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35 °C) (kJ mol^{-1}) ^a |
|--|--|--|--|
| 61 ± 2 | 58 ± 2 | 136 ± 7 | 100 ± 2 |

(a) Valores con sus desviaciones estándar.

**Figura 4.22.** Diagrama de energía de la reacción de alquilación de Guo por AN

La figura 4.22 muestra el diagrama de energía para la reacción de alquilación de Guo por AN. La diferencia en $\sim 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ entre los valores ΔH^\ominus y $\Delta^\ddagger H^\ominus$ ilustra la fácil reversibilidad de esta reacción. Esto es consistente con el hecho de que las alquilaciones de Guo en la posición N1 por AN pueden corregirse fácilmente mediante mecanismos de

reparación (*e.g.* la desalquilación oxidativa es una ruta mecánica que repara daños por N–alquilaciones en bases del ADN, regenerando las nucleobases a su estado original).^{402, 403}

La alquilación de Guo por AM es más lenta que por AN. La reacción de hidrólisis no se ha tomado en consideración, por precisar temperaturas elevadas.⁴⁰⁴

La figura 4.23 muestra los perfiles cinéticos de las reacciones de alquilación de Guo por AN y AM. Puede observarse la considerable diferencia en los tiempos de reacción necesarios para alcanzar saturación (~500 h más en el caso de AM).

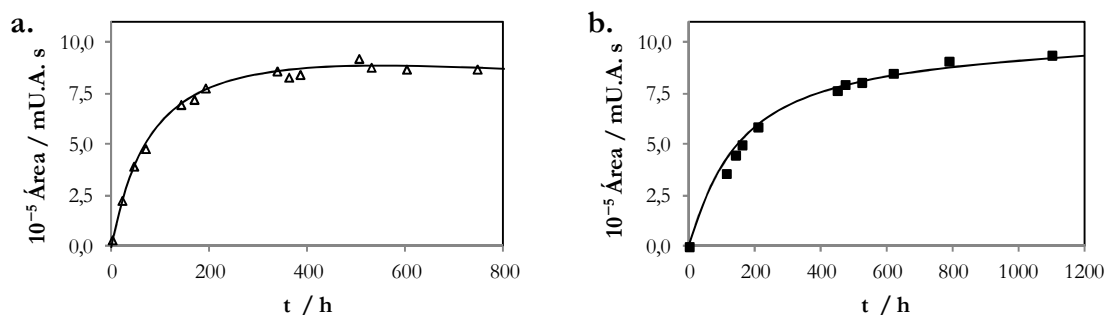


Figura 4.23. Perfiles cinéticos para la reacción de alquilación de Guo por (a) AN y (b) AM. $[Guo]_0 = 1 \times 10^{-4} M$; $[AN]_0 = 0,05 M$; $[AM]_0 = 0,10 M$; $pH = 9,6$; $T = 37,5 \text{ } ^\circ C$

El análisis cromatográfico (*cf.* figura 3.4-b) permitió resolver los picos mayoritarios de la mezcla de reacción de Guo y AM. Los tiempos de retención fueron 11,2 min, 18,0 min y 20,0 min, para el aducto Guo–AM, AM y Guo, respectivamente.

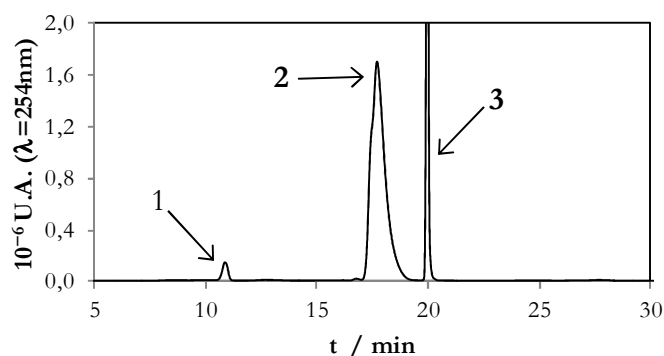


Figura 4.24. Cromatograma de la mezcla de reacción Guo–AM. **1:** aducto Guo–AM; **2:** AM; **3:** Guo (U.A. = unidades arbitrarias)

⁴⁰² Drabløs, F.; Feyzi, M.; Aas, P. A.; Vaagbø, C.B.; Kavli, B.; Bratlie, M. S.; Peña-Díaz, J.; Otterlei, M.; Slupphaug, G.; Krokan, H. E. Alkylation damage in DNA and RNA. Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1389-1407

⁴⁰³ Mishina, Y.; He, C. Oxidative dealkylation DNA repair. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 670-678

⁴⁰⁴ Carey, F.; Sundberg, R. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*, 4th ed.; Springer Science: Virginia, USA. 2007

Los aductos obtenidos son estables en el margen de pH utilizado.⁴⁰⁵ La figura 4.24 muestra uno de los cromatogramas obtenidos.

Como en el caso de la alquilación por AN, las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica se purificaron para su caracterización. La figura 4.25 muestra el espectro de masas correspondiente al aducto Guo-AM (*cf.* pico **1**, figura 4.24).

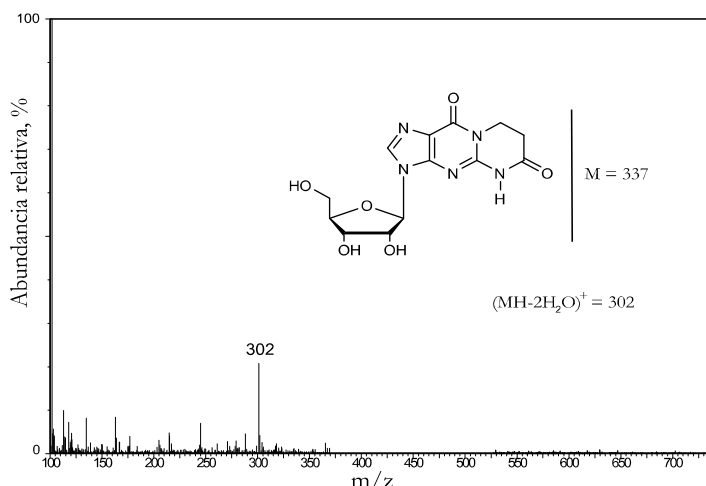


Figura 4.25. Espectro de masas del aducto Guo-AM

No se observó formación del aducto 1-(2-formamidoetil)guanosina, lo que se atribuyó a la hidrólisis del grupo amida para formar el aducto 1-(2-carboxietil)guanosina.⁴⁰⁶ El pico en m/z 302, junto a la ausencia del correspondiente al aducto 1-(2-carboxietil)guanosina, confirman que el compuesto final ha ciclado hasta un aducto del tipo 1,N²-Guo (figura 4.25).

El espectro ¹H-RMN mostró las señales esperadas para una alquilación de Guo en la posición N1 (*i.e.* ninguna señal a campo más bajo de 10,0 ppm). El espectro UV-Vis presenta las características propias de una N-alquilación (*cf.* figura 4.14).

Al igual que en las reacciones de alquilación por AN, no se observó reacción de alquilación por AM en pH < 8,0, lo que indica que la forma desprotonada de Guo es la que actúa como sustrato de alquilación (figura 4.16). Para confirmarlo se midió el pK_a encontrándose el valor 9,8 ($T = 37,5$ °C; *cf.* figura 4.17-b), muy semejante al bibliográfico (pK_a = 9,5; [ref. 398]).

Como se ha apuntado antes, las reacciones de alquilación por AM presentan tiempos de reacción superiores a 1200 h (*cf.* figura 4.23-b), por lo que, para su tratamiento

⁴⁰⁵ Solomon, J. J. DNA adducts of lactones, sultones, acylating agents and acrylic compounds. *IARC Sci. Publ.* **1994**, 125, 179-198

⁴⁰⁶ Solomon, J. J.; Fedyk, J.; Mukai, F.; Segal, A. Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* **1985**, 45, 3465-3470

cinético, se ha utilizado el método de velocidades iniciales ([ref. 369]). La tabla 4.10 y figura 4.26 dan cuenta de los datos y resultados obtenidos. Como puede observarse, la reacción de alquilación de Guo por AM es de orden uno respecto a la concentración de cada uno de los reactivos.

Tabla 4.10. Determinación de los órdenes de reacción en la alquilación de Guo por AM

| Orden de reacción respecto a [AM] | | Orden de reacción respecto a [Guo] | |
|-----------------------------------|--|------------------------------------|--|
| $10 \cdot [\text{AM}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-3} \cdot v_0$ (mU.A. s h ⁻¹) ^a | $10^4 \cdot [\text{Guo}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-3} \cdot v_0$ (mU.A. s h ⁻¹) ^b |
| 5,0 | 11,05 ± 0,10 | 0,5 | 0,83 ± 0,04 |
| 2,0 | 5,82 ± 0,09 | 1,0 | 1,11 ± 0,04 |
| 1,0 | 3,13 ± 0,09 | 2,5 | 3,88 ± 0,05 |
| 0,5 | 1,63 ± 0,06 | 5,0 | 6,12 ± 0,07 |
| 0,1 | 0,30 ± 0,02 | 7,5 | 8,47 ± 0,07 |
| 0,05 | 0,11 ± 0,01 | | |

(^a) $[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4}$ M; pH = 9,6; $T = 37,5$ °C (^b) $[\text{AM}]_0 = 0,10$ M; pH = 9,6; $T = 37,5$ °C

Valores con sus desviaciones estándar.

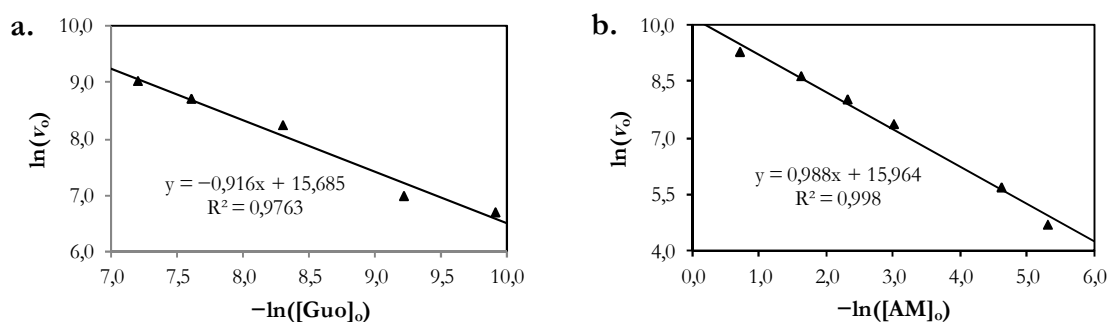


Figura 4.26. Órdenes de reacción respecto a: (a) [Guo] y (b) [AM].

A diferencia de lo observado en la alquilación de Guo por AN, el sustrato de alquilación se consumió completamente, lo que indica que ahora no hay un equilibrio entre el nucleósido desprotonado y el aducto. Además, en la alquilación por AM la relación $\text{Área}_{t \rightarrow \infty} / \Delta t_{\text{eluc}}$ no varía al hacerlo la concentración de la amida α, β -insaturada (figura 4.21), lo que indica que en esta reacción no hay reversibilidad.

Los resultados obtenidos han conducido a proponer el mecanismo de reacción reflejado en la figura 4.27.

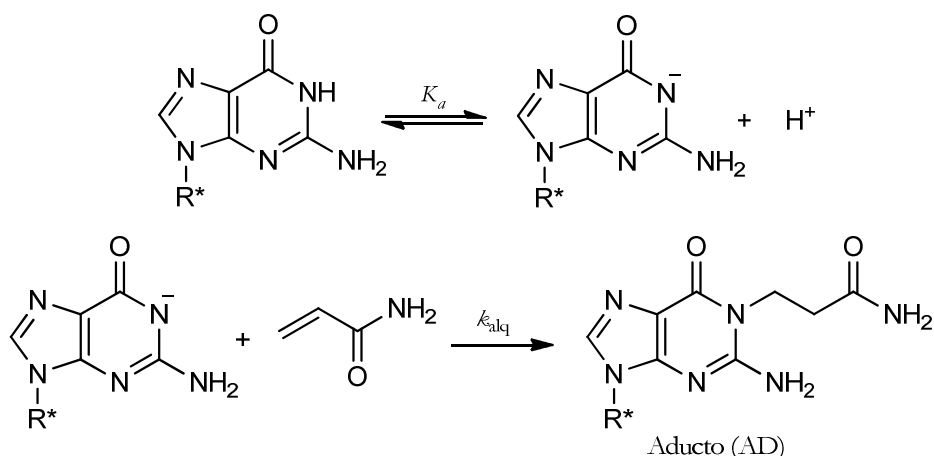


Figura 4.27. Alquilación de Guo por AM ($R^* = \text{ribosa}$)

Al no haber reacción reversible ($k_{\text{dealq}}^{\text{Guo}^-} = 0$), la ecuación de velocidad para la formación del aducto, AD, entre Guo y AM viene dada por la expresión:

$$\frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{AM}]_0 ([\text{Guo}]_0 - [\text{AD}]) \quad (4.11)$$

Las ecuaciones 4.6 y 4.7 adoptan las formas siguientes:

$$\text{Area} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \Delta t_{\text{eluc}} [\text{Guo}]_0 (1 - e^{-k_{\text{alq}}^{\text{Guo}^-} t}) \quad (4.12)$$

$$\frac{\text{Area}_{t \rightarrow \infty}}{\Delta t_{\text{eluc}}} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot [\text{Guo}]_0 \quad (4.13)$$

La figura 4.23-b muestra el buen ajuste de los datos a la ecuación 4.12. Para determinar el coeficiente de absorción molar, el ajuste de datos a la ecuación 4.13 (cf. figura 4.21) conduce al valor $\varepsilon = (3,3 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ U.A. M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 254 \text{ nm}$; $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Con el valor de ε se calcularon los de las correspondientes constantes de velocidad. En la tabla 4.11 y 4.12 se muestran los valores obtenidos para las constantes de velocidad y para los parámetros termodinámicos de activación.

Con el ácido acrílico no se observó reacción de alquilación significativa después de cuatro semanas. Como el AA tiene un $\text{p}K_a = 4,25$, a valores de $\text{pH} > 7,0$ la adición de Michael a Guo no puede tener lugar mediante el ion carboxilato, AA^- . La adición nucleófila al doble enlace terminal de AA^- genera una carga negativa en el carbono α que desfavorece el ataque nucleofílico de Guo hacia AA.

La tabla 4.13 muestra la correlación entre la reactividad química (k_{alq} , $\Delta^\ddagger G^\ominus$) de los agentes alquilantes aquí estudiados y su capacidad para formar aductos con el biomarcador hemoglobina. Dada la influencia exponencial de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ sobre los coeficientes de velocidad

(ecuación de Eyring), sus valores son buenos indicadores de la eficiencia de los agentes alquilantes para formar aductos con substratos nucleófilos (*e.g.* nucleósidos).

Tabla 4.11. Constantes de velocidad para la reacción de alquilación de Guo por AM a diferentes temperaturas

| Temperatura (°C) | $10^5 \cdot k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ^a |
|---------------------|---|
| 15,0 | – ^b |
| 20,0 | $0,090 \pm 0,001$ |
| 25,0 | $0,18 \pm 0,01$ |
| 30,0 | $0,28 \pm 0,01$ |
| 35,0 | $0,58 \pm 0,01$ |
| 37,0 | $0,69 \pm 0,01$ |
| 37,5 | $0,72 \pm 0,05$ |
| 40,0 | $0,92 \pm 0,08$ |

(^a) Valores con un intervalo de confianza del 95%

(^b) Reacción muy lenta.

Tabla 4.12. Parámetros termodinámicos de activación para la alquilación de Guo por AM

| E_a (kJ mol^{-1}) ^a | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol^{-1}) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35 °C) (kJ mol^{-1}) ^a |
|--|--|--|--|
| 89 ± 2 | 87 ± 2 | 65 ± 7 | 107 ± 2 |

(^a) Valores con sus desviaciones estándar.

Tabla 4.13. Correlación entre la reactividad química de AN, AM y AA con su capacidad para formar aductos con la hemoglobina

| Agente alquilante | $10^4 \cdot k_{\text{alq}}$ (37 °C) ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (37 °C) (kJ mol^{-1}) ^b | Aductos de hemoglobina 20 cigarros/día (pmol g^{-1}) ⁴⁰⁷ |
|-------------------|---|--|---|
| AN | $0,85 \pm 0,06$ | 100 ± 2 | 168 ± 4 |
| AM | $0,069 \pm 0,001$ | 107 ± 2 | 144 ± 5 |
| AA | N.R. | | Clasificado como no cancerígeno para los seres humanos ⁴⁰⁸ |

(^a) Valores dados con un intervalo de confianza del 95%.

(^b) Valores con sus desviaciones estándar.

⁴⁰⁷ Bergmark, E.; Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and non smokers. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 78-84

⁴⁰⁸ International Agency for Research on Cancer (IARC), 1995. Dry cleaning some chlorinated solvents and other industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 63. IARC: Lyon, Francia

La comparación de los datos contenidos en las tablas 4.8 y 4.11 revela que la capacidad alquilante de AN es mayor que la de AM (~10 veces mayor). Estos resultados, semejantes a los obtenidos con la NBP como sustrato de alquilación (tablas 4.4 y 4.5), son congruentes con los alcanzados al estudiar el potencial mutágeno/carcinógeno de las mismas especies alquilantes ([ref. 139]).

Por otra parte, el hecho de que estas reacciones se hayan estudiado a valores de $\text{pH} > 8,0$ implica que en medios alcalinos –frecuentes en órganos humanos como intestino y páncreas, y en fluidos corporales como saliva y orina– las alquilaciones por AN y AM se vean particularmente favorecidas.

En la alquilación de Guo por AM existe la posibilidad de que el aducto final cicle (figura 4.25). La formación de este tipo de aductos puede obstruir la formación de pares de bases en la doble hélice de Watson–Crick, lo que puede dar lugar a efectos genotóxicos en los humanos.^{409, 410} Este resultado puede ser de utilidad dentro del actual debate respecto al potencial efecto tóxico de AM sobre el organismo humano.

4.2.2. Alquilación de guanosina por acroleína

Como en los casos anteriores, el análisis cromatográfico permitió resolver los picos mayoritarios (figura 3.4-a). Los tiempos de retención fueron: 20,0 min para Guo, 22,6 min y 24,8 min para el aducto **1** ($\alpha\text{-OH-Guo}$) y 27,3 min para el aducto **2** ($\gamma\text{-OH-Guo}$). La figura 4.28 muestra, a título de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos.

A diferencia de la alquilación por AN, AM y AA, las reacciones de alquilación por AC transcurren en el margen de $\text{pH} = 7,2\text{--}7,4$ (condiciones celulares) lo que indica que Guo se encuentra en forma neutra al formar el aducto correspondiente.

La reacción de alquilación de Guo por AC genera dos regioisómeros: los aductos $\alpha\text{-OH-Guo}$ y $\gamma\text{-OH-Guo}$.

Los dos diastereoisómeros del aducto $\alpha\text{-OH-Guo}$ eluyen más rápidamente, como dos picos intercambiables, mientras que el aducto $\gamma\text{-OH-Guo}$ eluye como un único pico. El aducto $\gamma\text{-OH-Guo}$ es resultado de una adición de Michael al grupo NH_2 exocíclico,

⁴⁰⁹ Eder, E.; Hoffman, C.; Deininger, C.; Scheckenbach, S. Risk assessment for mutagenic and carcinogenic activities of α,β -unsaturated carbonyl compounds by a screening strategy based on structure–activity relationships. *Toxic. In Vitro.* **1994**, *8*, 707-710

⁴¹⁰ Singer, B.; Bartsch, H. *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis*. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, Francia. 1999

mientras que el aducto α -OH-Guo resulta de un ataque en la posición N1. La figura 4.29 muestra las estructuras de los dos aductos.⁴¹¹

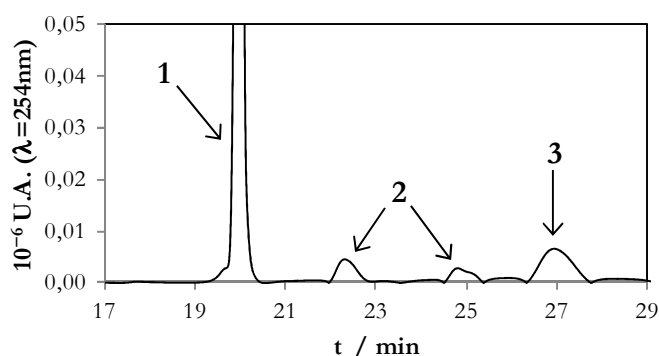


Figura 4.28. Cromatograma de la mezcla de reacción Guo-AC. **1:** Guo; **2:** aducto α -OH-Guo; **3:** aducto γ -OH-Guo (U.A. = unidades arbitrarias)

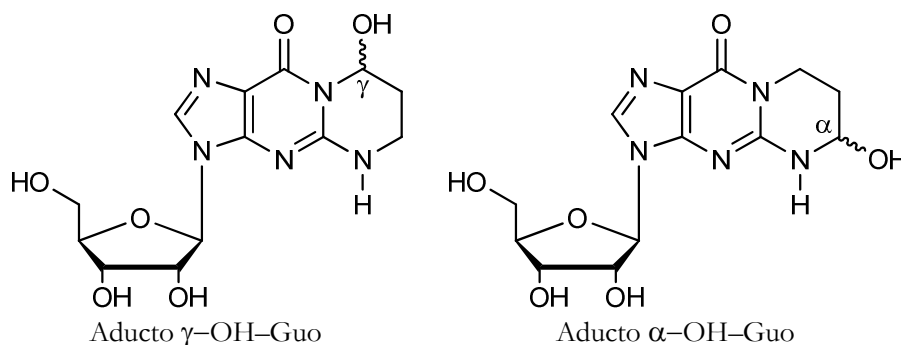


Figura 4.29. Estructuras de los aductos formados en la alquilación de Guo por AC.

Los espectros H^1 -RMN encontrados son consistentes con los reportados en la bibliografía ([ref. 411]). En cuanto a los espectros UV-Vis, ambos aductos muestran su máximo de absorción en $\lambda = 259$ nm, característico de una *N*-alquilación típica. Finalmente, el espectro de masas de ambos aductos mostró una señal a $m/z = 340$, correspondiente al ion $[M + H]^+$.

Mediante el método de aislamiento se encontró que la reacción de alquilación de Guo por AC es de orden uno respecto a las concentraciones de cada uno de los reactivos. Sobre esta base y, al estar Guo en su forma neutra al formar los aductos, se propone el mecanismo de reacción reflejado en la figura 4.30.

⁴¹¹ Chung, F. L.; Young, R.; Hecht, S. S. Formation of cyclic 1,*N*²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 990-995

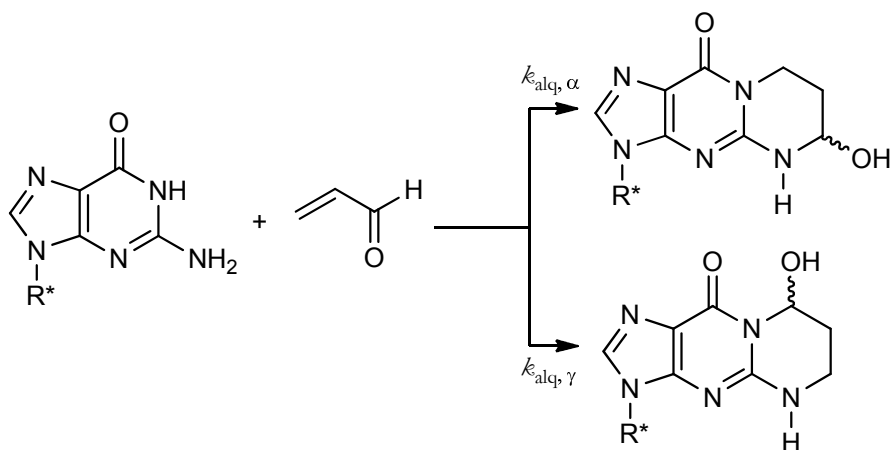


Figura 4.30. Alquilación de Guo por AC ($R^* = \text{ribosa}$)

Al tratarse de reacciones concurrentes, las ecuaciones de velocidad para la formación de los aductos $\alpha\text{-OH-Guo}$ y $\gamma\text{-OH-Guo}$ vienen dadas por las siguientes expresiones:

$$\frac{d[\text{AD}_\alpha]}{dt} = k_{\text{alk},\alpha}[\text{AC}]_0 ([\text{Guo}]_0 - [\text{AD}_\alpha]) \quad (4.14)$$

$$\frac{d[\text{AD}_\gamma]}{dt} = k_{\text{alk},\gamma}[\text{AC}]_0 ([\text{Guo}]_0 - [\text{AD}_\gamma]) \quad (4.15)$$

donde $k_{\text{alk},\alpha}$ y $k_{\text{alk},\gamma}$ son las constantes de alquilación de Guo por AC para formar los aductos $\alpha\text{-OH-Guo}$ y $\gamma\text{-OH-Guo}$, respectivamente.

Al resolver el sistema de ecuaciones y expresar el resultado en términos de áreas cromatográficas se obtiene, para el aducto $\alpha\text{-OH-Guo}$, la expresión:

$$\text{Area}_\alpha = 60000 \cdot \varepsilon_\alpha \cdot k_{\text{alk},\alpha} \cdot l \cdot \Delta t_{\text{eluc}} \cdot [\text{Guo}]_0 \times \frac{1 - e^{-(k_{\text{alk},\alpha} + k_{\text{alk},\gamma})t}}{k_{\text{alk},\alpha} + k_{\text{alk},\gamma}} \quad (4.16)$$

donde ε_α es el coeficiente de absorción molar del aducto $\alpha\text{-OH-Guo}$. Una ecuación similar se obtiene para el aducto $\gamma\text{-OH-Guo}$, con su correspondiente ε_γ y constante de alquilación.

En la figura 4.31 se muestra el buen ajuste de los resultados a la ecuación 4.16, tanto para el aducto $\alpha\text{-OH-Guo}$ como para el $\gamma\text{-OH-Guo}$.

Se tiene así que el cociente entre las áreas de los picos cromatográficos de ambos aductos, cuando $t \rightarrow \infty$, puede expresarse de la siguiente forma:

$$\left(\frac{\text{Area}_\alpha}{\text{Area}_\gamma} \right)_{t \rightarrow \infty} = \frac{k_{\text{alk},\alpha} \cdot \varepsilon_\alpha}{k_{\text{alk},\gamma} \cdot \varepsilon_\gamma} \quad (4.17)$$

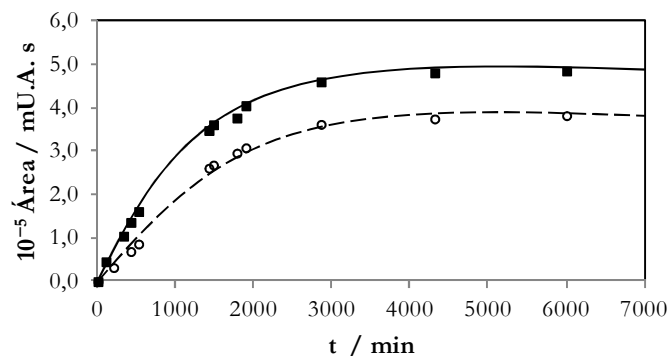


Figura 4.31. Perfiles cinéticos de la reacción de alquilación de Guo por AC para generar los aductos (○) α -OH-Guo y (■) γ -OH-Guo; $[\text{Guo}]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{AC}]_0 = 0,10 \text{ M}$; $\text{pH} = 7,2$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$

Como la relación $\varepsilon_\alpha/\varepsilon_\gamma$ es conocida ($\sim 1,07$)⁴¹² y la suma de las constantes de alquilación para la formación de los dos aductos ($k_{\text{alq-}\alpha} + k_{\text{alq-}\gamma}$) se obtiene mediante ajuste de los datos a la ecuación 4.16, los valores de cada una de las constantes pueden calcularse con facilidad. Los valores así calculados están tabulados en la tabla 4.14. La tabla 4.15 muestra los parámetros termodinámicos de activación correspondientes a la formación de cada uno de los aductos.

Tabla 4.14. Constantes de velocidad de las reacciones de formación de aductos Guo-AC

| Temperatura ($^\circ\text{C}$) | $10^5 \cdot k_{\text{alq-}\alpha}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^a | $10^5 \cdot k_{\text{alq-}\gamma}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^a |
|-------------------------------------|---|---|
| 15,0 | $0,40 \pm 0,08$ | $0,70 \pm 0,05$ |
| 20,0 | $0,67 \pm 0,05$ | $1,30 \pm 0,07$ |
| 25,0 | $1,30 \pm 0,08$ | $2,90 \pm 0,15$ |
| 30,0 | $2,50 \pm 0,08$ | $4,20 \pm 0,15$ |
| 35,0 | $5,20 \pm 0,32$ | $7,20 \pm 0,07$ |
| 37,0 | $5,00 \pm 0,20$ | $7,60 \pm 0,09$ |
| 37,5 | $5,20 \pm 0,30$ | $8,00 \pm 0,12$ |
| 40,0 | $5,40 \pm 0,35$ | $11,3 \pm 0,20$ |

(^a) Valores con un intervalo de confianza del 95%

El hecho, revelado por los resultados cinéticos, de que la formación del aducto γ -OH-Guo es $\sim 1,5$ veces más rápida que la del aducto α -OH-Guo, es significativo ya

⁴¹² Zhang, S.; Villalta, P. W.; Wang, M.; Hecht, S. S. Detection and Quantitation of acrolein-derived 1, N²-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 565-571

que puede correlacionarse con otros resultados de naturaleza biológica,^{413, 414, 415} que han evidenciado que el aducto γ -OH-Guo es el producto mayoritario en la alquilación del ADN en tejidos de humanos y animales.

Tabla 4.15. Parámetros termodinámicos de activación en las reacciones de formación de aductos Guo-AC

| Aducto | E_a (kJ mol ⁻¹) ^a | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol ⁻¹) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35 °C) (kJ mol ⁻¹) ^a |
|------------------|---|---|---|---|
| α -OH-Guo | 85 ± 4 | 83 ± 4 | 62 ± 10 | 102 ± 3 |
| γ -OH-Guo | 80 ± 3 | 78 ± 3 | 72 ± 9 | 100 ± 3 |

(^a) Valores con sus desviaciones estándar.

Tabla 4.16. Correlación reactividad química/mutagenicidad en compuestos α,β -insaturados

| Agente alquilante | Reactividad química | | Mutagenicidad (test de Ames) ^{416, 417, 418} |
|-------------------|---|---|--|
| | $10^4 \cdot k_{\text{alq-}\alpha}$ (37 °C) (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a | $10^4 \cdot k_{\text{alq-}\gamma}$ (37 °C) (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a | |
| AC | 0,50 ± 0,05 | 0,76 ± 0,05 | +++ |
| AN | | N.R. ^b | — |
| AM | | N.R. ^b | — |
| ÁA | | N.R. ^b | — |

(^a) Valores con un intervalo de confianza del 95%.

(^b) No se observó reacción a pH < 8,0.

Es oportuno señalar también que, como muestra la tabla 4.16, existe relación entre la reactividad de los α,β -UC como agentes alquilantes (en términos de k_{alq}) de Guo y la mutagenia de los mismos (test de Ames) en medios biomiméticos. Se observa el alto

⁴¹³ Nath, R. G.; Chung, F. L. Detection of exocyclic 1, N²-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 7491-7495

⁴¹⁴ Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Guttenplan, J. B.; Chung, F. L. 1, N²-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 581-584

⁴¹⁵ Zaliznyak, T.; Bonala, R.; Attaluri, S.; Johnson, F.; de los Santos, C. Solution structure of DNA containing α -OH-PdG: the mutagenic adduct produced by acrolein. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2153-2163

⁴¹⁶ Emmert, B.; Bönger, J.; Keuch, K.; Miller, M.; Emmert, S.; Hallier, E.; Westphal, G. A. Mutagenicity of cytochrome P450 2E1 substrates in the Ames test with the metabolic competent *S. typhimurium* strain YG7108pin2ERb5. *Toxicology* **2006**, *228*, 66-76

⁴¹⁷ Wiegand, H. J.; Schiffmann, D.; Henschler, D. Non-genotoxicity of acrylic acid and *n*-butyl acrylate in a mammalian cell system (SHE cells). *Arch. Toxicol.* **1989**, *63*, 250

⁴¹⁸ Marnett, L. J.; Hurd, H. K.; Hollstein, M. C.; Levin, D. E.; Esterbauer, H.; Ames, B. N. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1985**, *148*, 25-34

potencial alquilante y alta mutagenia de AC, en términos comparativos con los otros tres agentes alquilantes investigados en este trabajo.

4.2.3. Alquilación de uridina por compuestos α,β -insaturados

En la alquilación de uridina (Urd) por AN el análisis cromatográfico permitió resolver los picos mayoritarios (*cf.* figura 3.5), Los tiempos de retención fueron 24,1 min para Guo y 27,8 min para el aducto Urd-AN. La figura 4.32 muestra uno de los cromatogramas obtenidos durante la reacción de alquilación.

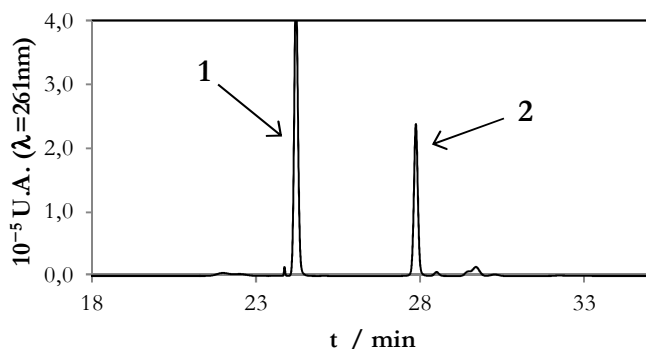


Figura 4.32. Cromatograma de la mezcla de reacción Urd-AN. 1: Urd, 2: aducto Urd-AN (U.A. = unidades arbitrarias)

Como en las reacciones de alquilación de Guo, las fracciones obtenidas en la separación cromatográfica se recogieron y purificaron para su caracterización. La figura 4.33 muestra el espectro UV-Vis del aducto formado.

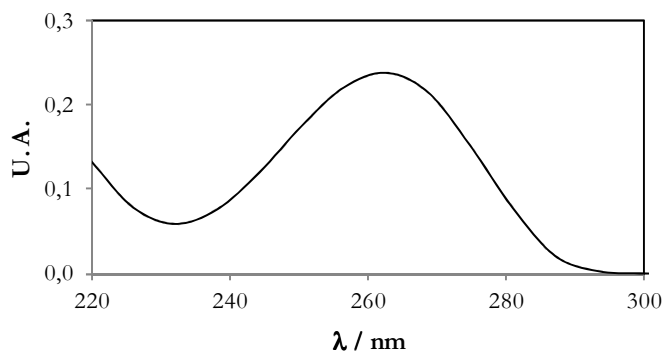


Figura 4.33. Espectros UV-Vis del aducto Urd-AN

Por otra parte, en el espectro de ^1H -RMN del aducto formado no se observó la señal a 11,1 ppm –que corresponde al protón del nitrógeno $N1$ – lo que evidencia que la alquilación de Urd por AN tiene lugar en esa posición.

Finalmente, el espectro de masas del aducto mostró una señal a $m/z = 317$, indicativa de que el aducto se hidroliza para generar el correspondiente ácido.

Tras la caracterización de los aductos se investigó la influencia del pH. Como a $\text{pH} < 8,0$ no se observa reacción de alquilación, se desprende que Urd se encuentra en su forma desprotonada al formar el aducto (figura 4.34).

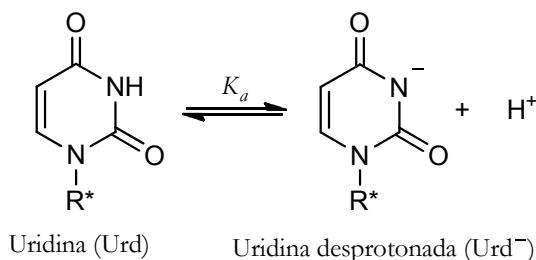


Figura 4.34. Desprotonación de Urd a $\text{pH} > 8$ ($\text{R}^* = \text{ribosa}$)

Para confirmar la situación descrita se determinó el pK_a del nucleósido, encontrándose el valor 9,10 ($T = 37,5$ °C). Corregido con los efectos de la fuerza iónica y temperatura, se encontró el valor $\text{pK}_a = 9.20$ a $T = 25,0$ °C en buena concordancia con el bibliográfico ($\text{pK}_a = 9.50$).^{419, 420} La figura 4.35 muestra la curva de valoración.

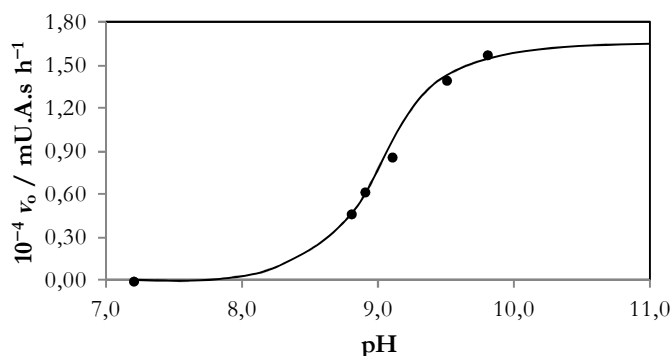


Figura 4.35. Curva de valoración en la alquilación de Urd por AN

Mediante el método de aislamiento se determinaron los órdenes de reacción para la alquilación de Urd por AN. La tabla 4.17 y figura 4.36 dan cuenta de los datos manejados y resultados obtenidos. Se deduce así que la reacción de alquilación de Urd por AN es de orden uno respecto a las concentraciones de cada reactivo.

⁴¹⁹ Saenger, W. *Principles of nucleic acids structure*. Springer: New York, 1984

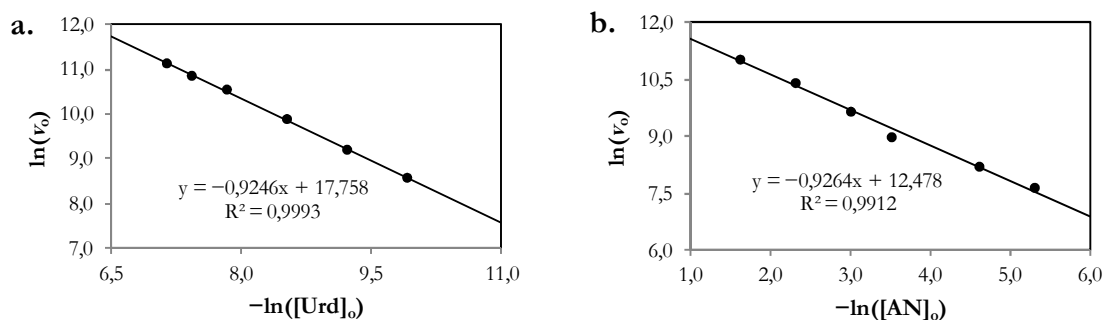
⁴²⁰ Izatt, R. M.; Christensen, J. J.; Rytting, J. H. Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and their constituent bases, nucleosides and nucleotides. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439-481

Tabla 4.17. Determinación de los órdenes de reacción en la alquilación de Urd por AN

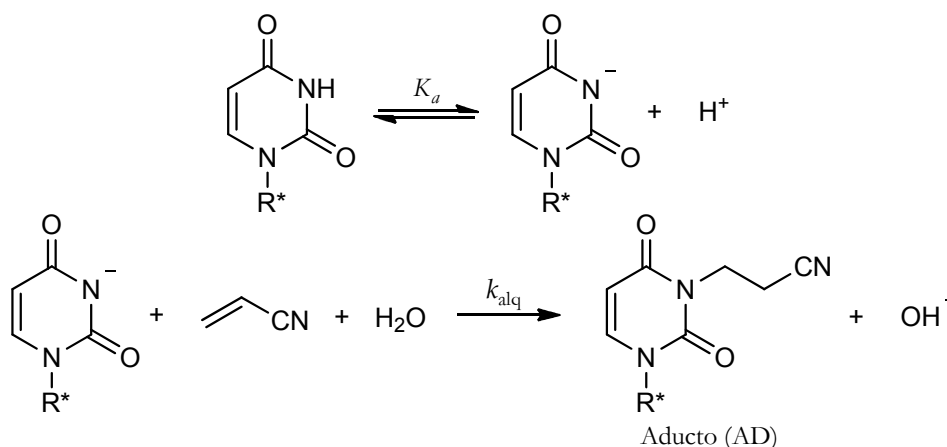
| Orden de reacción respecto a [AN] | | Orden de reacción respecto a [Urd] | |
|-----------------------------------|--|------------------------------------|--|
| $10^2 \cdot [\text{AN}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-4} \cdot v_0$ (mU.A. s h ⁻¹) ^a | $10^4 \cdot [\text{Urd}]_0$ (M) | Veloc. inic. de reacción $10^{-4} \cdot v_0$ (mU.A. s h ⁻¹) ^b |
| 20,0 | 6,26 ± 0,10 | 0,5 | 0,54 ± 0,05 |
| 10,0 | 3,38 ± 0,08 | 1,0 | 1,01 ± 0,08 |
| 5,0 | 1,59 ± 0,05 | 2,0 | 2,00 ± 0,11 |
| 3,0 | 0,81 ± 0,04 | 4,0 | 3,88 ± 0,10 |
| 1,0 | 0,37 ± 0,05 | 6,0 | 5,27 ± 0,13 |
| 0,5 | 0,21 ± 0,03 | 8,0 | 6,96 ± 0,16 |

(^a) [Urd]₀ = 1 × 10⁻⁴ M ; pH = 9.3; T = 37,5 °C (^b) [AN]₀ = 0,05 M; pH = 9.2; T = 37,5 °C

Valores con sus desviaciones estándar.

**Figura 4.36.** Órdenes de reacción respecto a: (a) [Urd] y (b) [AN].

Sobre la base de los resultados obtenidos se propone el mecanismo reflejado en la figura 4.37 (pH > 8,0).

**Figura 4.37.** Alquilación de Urd por AN (R* = ribosa)

Del mecanismo propuesto se desprende la ecuación de velocidad (4.18).

$$\frac{d[AD]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{Urd}^-} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} [AN]_0 ([Urd]_0 - [AD]) \quad (4.18)$$

donde $k_{\text{alq}}^{\text{Urd}^-}$ es la constante de velocidad de orden uno.

Como en el caso de la alquilación de Guo por AM, de la ecuación anterior se desprenden fácilmente las ecuaciones 4.19 y 4.20.

$$\text{Area} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot \Delta t_{\text{eluc}} [Urd]_0 (1 - e^{-k_{\text{alq}}^{\text{Urd}^-} t}) \quad (4.19)$$

$$\frac{\text{Area}_{t \rightarrow \infty}}{\Delta t_{\text{eluc}}} = 60000 \cdot \varepsilon \cdot l \cdot [Urd]_0 \quad (4.20)$$

Mediante ajuste de los datos a la ecuación 4.20 se obtiene el coeficiente de absorción molar del aducto ε ($\lambda = 261 \text{ nm}$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$) = $(1,6 \pm 0,4) \times 10^6 \text{ U.A. M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Con el valor de ε se han calculado las constantes de velocidad de alquilación y los parámetros termodinámicos de activación. Las tablas 4.18 y 4.19 reflejan los resultados obtenidos.

Tabla 4.18. Constantes de velocidad de la reacción de alquilación de Urd por AN en función de la temperatura

| Temperatura ($^\circ\text{C}$) | $10^5 \cdot k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^a |
|-------------------------------------|--|
| 15,0 | $0,14 \pm 0,05$ |
| 20,0 | $0,35 \pm 0,11$ |
| 25,0 | $0,84 \pm 0,12$ |
| 30,0 | $1,23 \pm 0,10$ |
| 35,0 | $2,01 \pm 0,08$ |
| 37,0 | $2,50 \pm 0,11$ |
| 37,5 | $2,82 \pm 0,15$ |
| 40,0 | $3,30 \pm 0,21$ |

^(a) Valores con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 4.19. Parámetros termodinámicos de activación de la reacción de alquilación de Urd por AN

| E_a (kJ mol^{-1}) ^a | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol^{-1}) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35 $^\circ\text{C}$) (kJ mol^{-1}) ^a |
|--|--|---|---|
| 84 ± 3 | 89 ± 3 | 45 ± 13 | 102 ± 3 |

^(a) Valores con sus desviaciones estándar.

Al comparar los valores obtenidos para las reacciones de alquilación de Urd (tabla 4.19) y Guo (tabla 4.9) por AN, se observa que los valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ son virtualmente

iguales, mientras que los de $\Delta^\ddagger S^\ominus$ y $\Delta^\ddagger H^\ominus$ varían significativamente, lo que parece indicar que hay un efecto de compensación, coherente con un mismo mecanismo de reacción en los dos casos.

La reacción de alquilación de Urd por AC se investigó de forma análoga. La figura 4.38 muestra, a título de ejemplo, uno de los cromatogramas obtenidos.

Para la caracterización del aducto obtenido (*cf.* pico **2**, figura 4.38) se obtuvo su espectro UV-Vis (figura 4.39), congruente con la estructura del aducto propuesto. El espectro H^1 -RMN no presenta ninguna señal a campo bajo (> 10 ppm), lo que es indicativo de que la alquilación transcurre en la posición N1. El espectro de masas muestra una señal a $m/z = 301$, correspondiente al ion $[M + H]^+$.

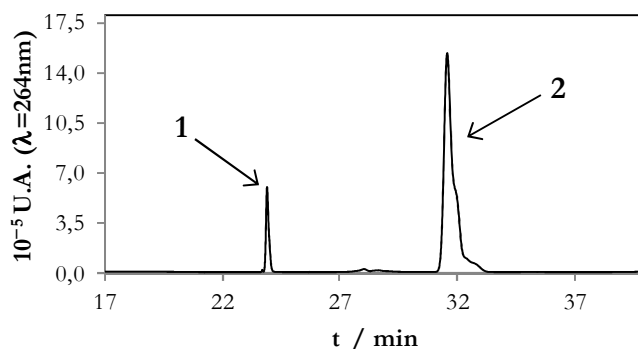


Figura 4.38. Cromatograma de la mezcla de reacción Urd-AC. **1:** Urd, **2:** aducto Urd-AC (U.A. = unidades arbitrarias)

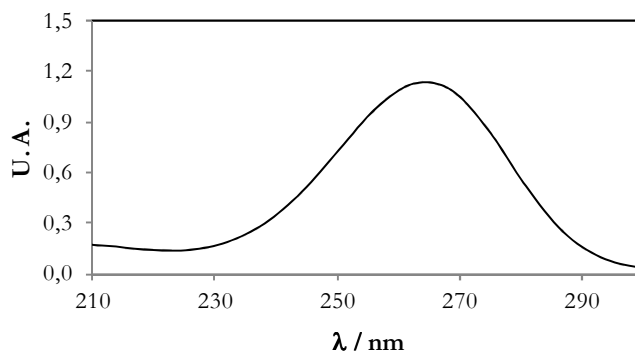


Figura 4.39. Espectro UV-Vis del aducto Urd-AC

Como en el caso de Guo, la alquilación de Urd por AC transcurre a pH neutro, sin desprotonamiento de la base pirimidínica. La reacción es de orden uno respecto a la concentración de cada uno de los reactivos. La figura 4.40 refleja el mecanismo propuesto.

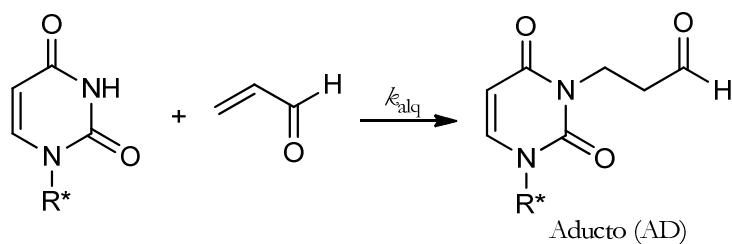


Figura 3.8. Alquilación de Urd por AC ($R^* = \text{ribosa}$)

La correspondiente ecuación de velocidad es:

$$\frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{Urd}} [\text{AC}]_0 ([\text{Urd}]_0 - [\text{AD}]) \quad (4.21)$$

Al integrar la ecuación anterior y expresar el resultado en términos de áreas cromatográficas, se obtiene la expresión 4.22.

$$\frac{\text{Area}_t}{\Delta t_t} = \frac{\text{Area}_{t \rightarrow \infty}}{\Delta t_{t \rightarrow \infty}} (1 - e^{-k_{\text{alq}}^{\text{Urd}} t}) \quad (4.22)$$

donde Δt es el tiempo de elución y $k_{\text{alq}}^{\text{Urd}} = k_{\text{alq}}^{\text{Urd}} [\text{AC}]_0$. Así es posible calcular el valor de la constante de velocidad de alquilación. Las tablas 4.20 y 4.21 resumen los resultados obtenidos.

Tabla 4.20. Constantes de velocidad de la reacción de alquilación de Urd por AC en función de la temperatura

| Temperatura (°C) | $10^6 \cdot k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ^a |
|---------------------|---|
| 15,0 | $0,21 \pm 0,08$ |
| 20,0 | $0,34 \pm 0,09$ |
| 25,0 | $0,44 \pm 0,06$ |
| 30,0 | $0,88 \pm 0,07$ |
| 35,0 | $1,85 \pm 0,12$ |
| 37,5 | $2,80 \pm 0,11$ |
| 40,0 | $3,84 \pm 0,10$ |

^(a) Valores con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 4.21. Parámetros termodinámicos de activación de la reacción de alquilación de Urd por AC.

| E_a (kJ mol^{-1}) ^a | $\Delta^\ddagger H^\ominus$ (kJ mol^{-1}) ^a | $-\Delta^\ddagger S^\ominus$ ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ^a | $\Delta^\ddagger G^\ominus$ (35 °C) (kJ mol^{-1}) ^a |
|--|--|--|--|
| 89 ± 3 | 86 ± 3 | 75 ± 12 | 109 ± 3 |

^(a) Valores con sus desviaciones estándar.

Al comparar estos valores con los de las tablas 4.14 y 4.15 se observa que hay una diferencia apreciable en los valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ que se traduce en velocidades de alquilación de Guo ~ 30 veces mayores que las de la alquilación de Urd por el mismo agente alquilante.

La menor reactividad de Urd como substrato de alquilación probablemente se deba a la presencia de los dos grupos carbonilos adyacentes al N1, que deben reducir la nucleofilia en esta posición, lo que no ocurre en la molécula de Guo.

Respecto a los demás α,β -UC, tras varias semanas de ensayo no se observó reacción significativa entre AM y AA con Urd (pH > 8,0). Como esos agentes alquilantes son los menos reactivos de la serie estudiada y como Urd presenta un potencial nucleofílico menor al de Guo, estos resultados son perfectamente congruentes.

5. CONCLUSIONES

6.1. Alquilación de la 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP)

1. Los compuestos α,β -insaturados (α,β -UC) acrilamida (AM), acrilonitrilo (AN) y ácido acrílico (AA) presentan actividad alquilante sobre el sustrato 4-*p*-(nitrobencil)piridina (NBP). No se ha observado reacción de alquilación por la acroleína (AC).

2. La formación de los aductos (AD) NBP- α,β -UC, obedece a la ecuación de velocidad: $v_o = \frac{d[AD]}{dt} = k_{alq} [\alpha,\beta-UC]_o [NBP]_o$

3. La secuencia encontrada, respecto al potencial alquilante de los α,β -UC, es la siguiente: AN > AM > AA > AC.

4. Las constantes de velocidad de formación del aducto NBP-AN son ~10 veces mayores que las del aducto NBP-AM y ~100 mayores que las del aducto NBP-AA, lo que es congruente con el potencial carcinógeno/mutágeno de dichos compuestos.

5. Al aumentar la proporción de medio orgánico (dioxano), las velocidades de formación de los aductos disminuyen significativamente. Este resultado es de interés ya que, al disminuir la constante dieléctrica del medio de reacción, se puede inhibir la capacidad alquilante de los α,β -UC, lo que puede ser de utilidad cuando se trabaja con medios hidrófilo/lipófilo, frecuentes en *Ciencia y Tecnología de los alimentos*.

6. Las reacciones de alquilación de NBP por α,β -UC, que transcurren por mecanismos de adición de Michael controlados entálpicamente, son moderadamente aceleradas por grupos aceptores de electrones.

6.2. Alquilación de nucleósidos

6.2.1. Alquilación de guanosina

1. Los compuestos AN, AM y AC presentan actividad alquilante sobre el nucleósido guanosina (Guo). No se ha observado reacción de alquilación por AA.

2. En un mismo medio, la reacción de alquilación de Guo por AC transcurre por un mecanismo diferente al de las reacciones de alquilación por AN, AM y AA.

3. AC es el agente de mayor potencial alquilante de los α,β -UC. Reacciona con Guo en su forma neutra (pH celular), mientras que los otros agentes alquilantes lo hacen con la forma desprotonada, Guo^- (pH > 8,0). Este resultado es de interés, ya que puede extrapolarse a medios biológicos y ayuda a entender los efectos genotóxicos que AC puede causar *in vivo*.

4. La secuencia, respecto al potencial alquilante de los α,β -UC sobre Guo, es la siguiente: $AC > AN > AM > AA$.

5. Se ha encontrado correlación entre reactividad química de los α,β -UC (parámetros cinéticos de sus reacciones con Guo) y mutagenicidad.

6. Las reacciones de alquilación de Guo por AN y AM transcurren por sendos mecanismos de adición de Michael, reversible en el primer caso e irreversible en el segundo. La constante del equilibrio de formación del aducto Guo-AN es K_{AN} (37 °C) = 5×10^4 .

7. La formación del aducto (AD) Guo-AN está regida por la ecuación de velocidad siguiente:
$$\frac{d[AD]}{dt} = k_{alq}^{Guo^-} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} [AN]_o ([Guo]_o - [AD]) - k_{dealq}^{Guo^-} [AD][OH^-]$$

8. La baja barrera de energía ($\sim 10 \text{ kJ mol}^{-1}$) necesaria para revertir la reacción de alquilación de Guo por AN refleja, en términos cuantitativos, la fácil reversibilidad de esta reacción que, consecuentemente, facilita mecanismos de reparación.

9. La alquilación de Guo por AM transcurre de acuerdo con la ecuación de velocidad:
$$\frac{d[AD]}{dt} = k_{alq}^{Guo^-} \frac{K_a}{K_a + [H^+]} [AM]_o ([Guo]_o - [AD])$$

10. Los valores de los coeficientes de velocidad y de las energías libres de activación, $\Delta^\ddagger G^\circ$, de las reacciones de alquilación de los substratos NBP y Guo son mutuamente congruentes.

11. Durante la alquilación de Guo por AC se forman dos aductos isoméricos: α -OH-Guo y γ -OH-Guo. Las constantes de velocidad de formación del aducto α (el isómero mayoritario) son 1,5 veces mayores que las del aducto γ .

12. La formación del aducto α -OH-Guo obedece a la ecuación de velocidad:
$$\frac{d[AD_\alpha]}{dt} = k_{alq,\alpha} [AC]_o ([Guo]_o - [AD_\alpha])$$
. Una ecuación similar se observa en la formación del aducto γ -OH-Guo.

13. La coherencia de los resultados obtenidos con los substratos de alquilación NBP y Guo, con resultados precedentes obtenidos en nuestro grupo, tanto con electrófilos fuertes (de alto poder mutágeno/cancerígeno; *e.g.* β -propiolactona), como con moléculas de electrofilia débil (*e.g.* sorbatos, especies de destacado interés industrial por su empleo como conservantes), permiten considerar al ensayo de NBP como una prueba sencilla, biomimética, de carácter predictivo.

6.2.2. Alquilación de uridina

1. Los compuestos AN y AC presentan actividad alquilante sobre el nucleósido uridina (Urd). No se ha observado reacción de alquilación por AM y AA.

2. Mientras que la alquilación de Urd por AN transcurre a valores de $\text{pH} > 8,0$ donde el nucleósido está en forma desprotonada (Urd^-), la alquilación por AC se da con Urd en su forma neutra.

3. En términos generales, la secuencia sobre el potencial alquilante de los α, β -UC sobre Urd es la siguiente: $\text{AC} > \text{AN} > \text{AM} \sim \text{AA}$.

4. Los valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ para las reacciones de alquilación de Urd y Guo por AN son virtualmente iguales, mientras que los de $\Delta^\ddagger S^\ominus$ y $\Delta^\ddagger H^\ominus$ varían significativamente. Esto parece indicar que hay un efecto de compensación coherente con un mismo mecanismo de reacción en los dos casos.

5. La alquilación de Urd por AN transcurre de acuerdo con la ecuación de

$$\text{velocidad: } \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{Urd}^-} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{AN}]_0 ([\text{Urd}]_0 - [\text{AD}])$$

6. La formación del aducto, AD, entre Urd y AC obedece a la ecuación de

$$\text{velocidad: } \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{Urd}} [\text{AC}]_0 ([\text{Urd}]_0 - [\text{AD}])$$

7. La reactividad de Urd como sustrato alquilable es menor que la de Guo.

*Para Niels Bohr –y quizás para Thomas Mann– hay dos clases de verdades:
las triviales, donde lo opuesto es obviamente absurdo, y las profundas,
que se reconocen porque lo contrario es también una verdad profunda*
Camilo José Cela

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, S. Z.; Nouraldeen, A. M.; Ahmed, A. E. *J. Biochem. Toxicol.* **1996**, *9*, 191-198
- Abramsson-Zetterberg, L. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *535*, 215-222
- Adams, T. B.; Gavin, C. L.; Taylor, S. V.; Waddell, W. J.; Cohen, S. M.; Feron, V. J.; Goodman, J.; Marnett, L. J.; Portoghese, P. S.; Smith, R. L. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2935-2967
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1990. *Toxicological profile for acrylonitrile*. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Atlanta, GA.
- Agree, A. M.; Meeker, R. L. *Talanta* **1966**, *13*, 1151
- Åkerlöf, G.; Short, O. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1241
- Anderson, M. M.; Hazen, S.; Hsu, F.; Heinecke, J. W. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 424-432
- Andreoni, V.; Bernasconi, S.; Sorlini, C.; Villa, M. *Ann. Microbiol.* **1990**, *40*, 279-287
- Appel, K. E.; Peter, H.; Bolt, H. M. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1981**, *49*, 157-163
- Bartsch, H.; Singer, B. *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis*. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, Francia, 1999
- Basu, A. K.; Marnett, L. J. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2848-2858
- Basu, D.; Hsu, R.; Neal, M.; Santodonato, J.; Sugatt, R. *Health Assessment Document for Acrylonitrile. Final Report*. U. S. Environmental Protection Agency (EPA): Washington D. C., 2007; Vol. EPA/600/8-82/007F
- Bardos, T. J.; Datta-Gupta, N.; Hebborn, P.; Triggle, D. J. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 167-174
- Bauer, W. Acrylic acid and derivatives. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 5ta ed., Vol. 1; Wiley-Interscience: New York, 2003
- Beauchamp, R. O.; Andjelkovich, D. A.; Kligerman, A. D.; Morgan, K. T.; Heck, H. *Crit. Rev. Toxicol.* **1985**, *14*, 309-378
- Bellucci, G.; Lippi, A.; Marioni, F. *Chem.-Biol. Interact.* **1986**, *59*, 255-263
- Beranek, D. T. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1990**, *231*, 11-30
- Bergman, K. *Arch. Toxicol.* **1982**, *49*, 117-129
- Bergmark, E. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 78-84
- Bergmark, E.; Calleman, C. J.; Costa, L. G. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1991**, *111*, 352-363
- Berhane, K.; Mannervik, B. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *37*, 251-254
- Besaratinia, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 751
- Besaratinia, A.; Pfeifer, G. P. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 31-40
- Besaratinia, A.; Pfeifer, G. P. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1023-1029
- Biedermann, M.; Noti, A.; Biedermann-Brem, A.; Mozzetti, V.; Grob, K. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **2002**, *93*, 668-687
- Bignami, M.; O'Driscoll, M.; Aquilina, G.; Karran, P. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **2000**, *462*, 71-82
- Black, K. A.; Beskitt, J. L.; Finch, L.; Udinsky, J. R.; Frantz, S. W. *J. Toxicol. Environ. Health* **1995**, *45*, 291-311
- Black, K. A.; Finch, L.; Frederick, C. B. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1993**, *21*, 97-104
- Boettcher, M. I.; Bolt, H. M.; Drexler, H.; Angerer, J. *Arch. Toxicol.* **2005**, *80*, 55-61
- Bohnenstengel, F.; Eichelbaum, M.; Golbs, E.; Kroemer, H. K. *J. Chromatogr. B* **1997**, *692*, 163-168
- Bolt, H. M. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35*, 307-323
- Bolt, H. M.; Laib, H. P.; Ottenwälder, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1986**, *112*, 92-96

- Braun, C. E.; Seydel, P. V.; Sauer, C.; Dubin, I. M.; Chao, Y.; Lemiey, J. D. MIT-MR N° 177. MIT, Cambridge: MA. 1945
- Brazdil, J. F. Acrylonitrile. En: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 4ta ed., Vol. 1; Wiley-Interscience: New York, 1993
- Bull, R. J.; Robinson, M.; Laurie, R. D.; Stoner, G. D.; Greisiger, E.; Meier, J. R.; Stober, J. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 107-111
- Cadet, J.; Carvalho, V. M.; Onuki, J.; Douki, T.; Medeiros, M. G.; Di Mascio, P. *LARC Sci. Public.* **1999**, *150*, 103-113
- Calingasan, N.; Uchida, K.; Gibson, G. J. *Neurochem.* **1999**, *72*, 751-756
- Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; Mateos, F. J.; Tostado, M. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 987-991
- Calleman, C. J.; Bergmark, E.; Costa, L. G. *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 406-412
- Cameron, T. P.; Rogers-Back, A. M.; Lawlor, T. E.; Harabell, J. W.; Seifried, H. E.; Dunkel, V. C. *Environ. Molecul. Mutagen.* **1991**, *17*, 264-271
- Candy, H. J.; Lin, W. P. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9812-9818
- Carey, F.; Sundberg, R. *Advanced Organic Chemistry. Part A: Structure and Mechanisms*, 4ta ed.; Springer Science: Virginia, USA. 2007, 662-664
- Carmella, S. G.; Chen, M.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Hatsukami, D. K.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 986-990
- Carmines, E. L.; Gaworski, C. L. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1521-1539
- Casado, J. *Reactividad de agentes alquilantes y nitrosantes de interés biológico*. Conferencia Invitada: Universidad de la República, Montevideo, 2011.
- Casado, J. *Mecanismos de alquilación y potencial mutágeno*. Conferencia Inaugural, XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental: Segovia, 2004.
- Casado, J. *Chemistry of nitrosation reactions in solution*. Invited lecture. Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie: Alemania, 1997.
- Casado, J.; González-Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1996**, *28*, 301-313
- Casado, J.; López-Quintela, M. A.; Lorenzo-Barral, F. M. J. *Chem. Educ.* **1986**, *63*, 450-452
- Casado, J.; Castro, A.; Leis, J. R.; Mosquera, M.; Peña, M. E. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, 1859-1864
- Casella, I. G.; Pierri, M.; Contursi, M. J. *Chromatogr. A* **2006**, *1107*, 198-203
- Casella, I. G.; Contursi, M. J. *Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5816-5821
- Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6226-6233
- 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.
- Chattaraj, P. K. J. *Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 511-513
- Chatterjee, S.; Pathmasiri, W.; Plashkevych, O.; Honcharenko, D.; Varghese, O. P.; Maiti, M.; Chattopadhyaya, J. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1675-1686
- Cheng, G.; Wang, M.; Villalta, P. W.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1089-1096
- Chenna, A.; Iden, C. R. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 261-268
- Chiang, Y.; Kresge, A. J. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1090-1092
- Christensen, J. J.; Rytting, J. H.; Izatt, R. M. *Biochemistry* **1970**, *9*, 4907-4913
- Chung, F. L.; Nath, R. G.; Ocando, J.; Nishikawa, A.; Zhang, L. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1507-1511

- Chung, F. L.; Nath, R. G.; Nagao, M.; Nishikawa, A.; Zhou, G.; Randerath, K. *Mutat. Res.–Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *424*, 71-81
- Chung, F. L.; Roy, K. R.; Hecht, S. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 14-17
- Chung, F. L.; Young, R.; Hecht, S. S. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 990-995
- Chung, F. L.; Hecht, S. S. *Cancer Res.* **1983**, *43*, 1230-1235
- Cole, P.; Mandel, J. S.; Collins, J. J. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *52*, 342-351
- Connors, K. A. *Chemical Kinetics: The study of reaction rates in solution*. VCH Publishers, Inc.: New York, 1990
- Costa, L. G.; Deng, H.; Gregotti, C.; Faustman, E. M.; Bergmark, E.; Calleman, C. J. *Neurotoxicology* **1992**, *13*, 219-224
- Czeizel, A. E.; Szilvási, R.; Tímár, L.; Puho, E. *Mutat. Res.–Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *547*, 79-89
- Czerny, C.; Eder, E.; Runger, T. M. *DNA Repair* **1998**, *407*, 125-134
- D'Souza, R. W.; Francis, W. R. *Toxicologist* **1988**, *8*, 831-836
- Darral, K. G.; Figgins, J. A.; Brown, R. D.; Phillips, G. F. *Analyst* **1998**, *123*, 1095-1101
- De Bont, R.; van Larebeke, N. *Mutagenesis* **2004**, *19*, 169-185
- De Meester, C.; Poncelet, F.; Roberfroid, M.; Mercier, M. *Toxicology* **1978**, *11*, 19-27
- De Vleeschouwer, K.; Van der Plancken, I.; Van Loey, A.; Hendrickx, M. E. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 722-728
- Dearfield, K. L.; Abernathy, C. O.; Ottley, M. S.; Brantner, J. H.; Hayes, P. F. *Mutat. Res.* **1988**, *195*, 45-77
- Delaney, J. C.; Essigmann, J. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 232-252
- DePass, L. R.; Woodside, M. D.; Garman, R. H.; Weil, C. S. *Drug Chem. Toxicol.* **1983**, *6*, 1-20
- Dierickx, K. M. E.; Journé, F.; Gerbaux, P.; Morandini, R.; Kauffmann, J. M.; Ghanem, G. E. *Talanta* **2009**, *77*, 1370-1375
- Dittberner, U.; Schmetzer, B.; Eisenbrand, G.; Zankl, H. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1997**, *390*, 161-165
- Dittberner, U.; Eisenbrand, G.; Zankl, H. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1995**, *335*, 259-265
- Doerge, D. R.; Gamboa da Costa, G.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Beland, F. A. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 131-141
- Doroshenko, O.; Fuhr, U.; Kunz, D.; Frank, D.; Kinzig, M.; Jetter, A.; Reith, Y.; Lazar, A.; Taubert, D.; Kirchheiner, J.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Berger, F. I.; Bertow, D.; Berkessel, A.; Sorgel, F.; Schomig, E.; Tomalik-Scharte, D. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2009**, *18*, 433-443
- Drabløs, F.; Feyzi, M.; 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*, 1389-1407
- Draminski, W.; Eder, E.; Henschler, D. *Arch. Toxicol.* **1983**, *52*, 243-247
- Dybing, E.; Farmer, P. B.; Andersen, M.; Fennell, T. R.; Lallje, S. P.; Muller, D. J.; Olin, S.; Petersen, B. J.; Scholz, G.; Slimani, M.; Törnqvist, M.; Verger, P. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 365-410
- Eastmond, D. A.; Hartwig, A.; Anderson, D.; Anwar, W. A.; Cimino, M. C.; Dobrev, I.; Douglas, G. R.; Nohmi, T.; Phillips, D. H.; Vickers, C. *Mutagenesis* **2009**, *24*, 341-349
- Eckl, P. M.; Ortner, A.; Esterbauer, H. *Mutat. Res.–Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1993**, *290*, 183-192
- Eder, E.; Hoffman, C.; Deiningner, C.; Scheckenbach, S. *Toxic. In Vitro.* **1994**, *8*, 707-710
- Eder, E.; Hoffman, C. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 486-494
- Eder, E.; Scheckenbach, S.; Deiningner, C.; Hoffman, C. *Toxicol. Lett.* **1993**, *67*, 87-103
- Eder, E.; Hoffman, C. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 802-808

- Eder, E.; Hoffman, C.; Bastian, H.; Deininger, C. *Environ. Health Perspect.* **1991**, *88*, 99-106
- Eger, K.; Folkers, G.; Zimmerman, W.; Schmid, J.; Hiller, W. *J. Chem. Res.-S* **1987**, *9*, 277
- Ehrenberg, L.; Hussain, S. *Mutat. Res.* **1981**, *86*, 1-113
- Ehrenberg, L.; Osterman-Golkar, S. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1981**, *1*, 105-127
- Eisenbrand, G.; Schuhmacher, J.; Golzer, P. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 40-46
- Emami, A.; Dyba, M.; Cheema, A. K.; Pan, J.; Nath, R. G.; Chung, F. L. *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 163-172
- Emmert, B.; Bönger, J.; Keuch, K.; Müller, M.; Emmert, S.; Hallier, E.; Westphal, G. A. *Toxicology* **2006**, *228*, 66-76
- Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1435-1439
- Esterbauer, H.; Schaur, R.; Zollner, H. *Free Radic. Biol. Chem.* **1991**, *11*, 81-128
- Erkekoglu, P.; Baydar, T. *Nutr. Res. Rev.* **2010**, *23*, 323-333
- European Commission (EC), 2004. European Union risk assessment report: acrylonitrile. Volumen 32, EUR 20857EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia
- European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylaldehyde. Volumen 7, EUR 19728EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection. National of Public Health and the Environment: Bilthoven, Países Bajos
- European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylic acid. Volumen 28, EUR 19836EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia
- European Commission (EC), 2002. European Union risk assessment report: acrylamide. Volumen 24, EUR 19835EN. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection: Ispra, Italia
- Exner, O. *Correlation analysis of chemical data*. Plenum Press: New York, 1988
- Farmer, P. B.; Brown, K.; Tompkins, E.; Emms, V.; Jones, D.; Phillips, D. H. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *207*, 293-301
- Farmer, P. B. *Toxicol. Lett.* **2004**, *149*, 3-9
- Feng, Z.; Hu, W.; Hu, Y.; Tang, M. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 15404-15409
- Fennell, T. R.; Sumner, S. C.; Snyder, R. W.; Burgess, J.; Spicer, R.; Friedman, M. *Toxicol. Sci.* **2005**, *85*, 447-459
- Fennell, T. R.; MacNeela, J. P.; Morris, R. W.; Watson, M.; Thompson, C. L.; Bell, D. A. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2000**, *9*, 705-712
- Fennell, T. R.; MacNeela, J. P.; Turner, M. J.; Swenberg, J. A. *The Toxicologist* **1989**, *9*, 128-130
- Fernandes, P. H.; Kanuri, M.; Nechev, L. V.; Harris, T. M.; Lloyd, R. S. *Environ. Mol. Mutagen.* **2005**, *45*, 455-459
- Fernández-Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39*, 591-594
- Finch, L.; Frederick, C. B. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1992**, *19*, 498-505
- Fink, W. U. S. Patent 3,361,786, enero 2, 1968
- Fiz, N.; Usero, J. L.; Casado, J. *Int. J. Chem. Kinet.* **1993**, *25*, 341-351
- Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 30-35
- Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Brooks, D. D.; Fujimoto, K. *Biochem. Biophys. Acta* **1987**, *919*, 239-244
- Freccero, M.; Gandolfi, R.; Sarzi-Amadè, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6411-6423
- Frederick, C. B.; Reynolds, C. H. *Toxicol. Lett.* **1989**, *47*, 241-247

- Friedman, M.; Mottram, D. *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Springer Science: New York, 2005
- Friedman, M. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 4504-4526
- Friedman, M. A.; Dulak, L. H.; Stedham, M. A. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1995**, *27*, 95-105
- Fullana, A.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Sidhu, S. J. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5207-5214
- Gabriel, L.; Bonelli, G.; Dianzani, M. U. *Chem.-Biol. Interact.* **1977**, *19*, 101-109
- Galliani, G.; Pantarotto, C. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4491-4492
- Galloway, S. M.; Armstrong, M. J.; Reuben, C.; Colman, S.; Brown, B.; Cannon, C.; Bloom, A. D.; Nakamura, F.; Ahmed, M.; Duk, S.; Rimpou, J.; Margolin, B. H.; Resnick, M. A.; Anderson, B.; Zeiger, E. *Environ. Mol. Mutagen.* **1987**, *10*, 1-175
- Galtress, C. L.; Morrow, P. R.; Nag, S.; Smalley, T. L.; Tschantz, M. F.; Vaughn, J. S.; Wichems, D. N.; Ziglar, S. K.; Fishbein, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1406-1411
- Gamboa da Costa, G.; Churchwell, M. I.; Hamilton, L. P.; von Tungeln, L. S.; Beland, F. A.; Marques, M. M.; Doerge, D. R. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1328-1337
- Gao, Y. T.; Blot, W. J.; Zheng, W.; Ershow, A. G.; Cheng, W. H.; Levin, L. I.; Rong, Z.; Fraumeni, J. R. *Int. J. Cancer* **1987**, *40*, 604-609
- García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177-2182
- García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7506-7510
- García-Santos, M. P.; Calle, E.; González-Mancebo, S.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **1996**, *127*, 997-1003
- García-Prieto, J. C.; Mateos, R.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3517-3520
- Gargas, M. L.; Andersen, M. E.; Batra, R.; Fennell, T. R.; Kedderis, G. L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1995**, *134*, 185-194
- Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747-1760
- Getz, M. E.; Watts, R. R. *J. Assoc. Agric. Chem.* **1964**, *47*, 1094
- Ghanayem, B. I.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Snyder, R.; Fennell, T. R.; Doerge, D. R. *Toxicol. Sci.* **2005**, *88*, 311-318
- Ghanayem, B. I.; Witt, K. L.; Hoffler, U.; Kissling, G. E.; Shelby, M. D.; Bishop, J. B. *Biol. Reprod.* **2005**, *72*, 157-163
- Ghanayem, B. I.; Witt, K. L.; Kissling, G. E.; Recio, L. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *578*, 284-297
- Ghanayem, B. I.; Boor, P. J.; Ahmed, A. E. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *232*, 570-577
- Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1997**, *29*, 495-504
- Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1167-1178
- Glaze, W. H.; Koga, M.; Cancilla, D. *Environ. Sci. Technol.* **1989**, *23*, 838-847
- Gölzer, P.; Janzowski, C.; Pool-Zobel, B. L.; Eisenbrand, G. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1207-1213
- Gómez-Bombarelli, R.; Palma, B. B.; Martins, C.; Kranendonk, M.; Rodrigues, A. S.; Calle, E.; Rueff, J.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1275-1281
- Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964-1969
- González-Mancebo, S.; Gaspar, J.; Calle, E.; Pereira, S.; Mariano, A.; Rueff, J.; Casado, J. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2004**, *558*, 45-51
- González-Mancebo, S.; Lacadena, J.; García-Alonso, Y.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 157-166

- González-Mancebo, S.; García-Santos, M. P.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. J. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2235-2240
- González-Mancebo, S.; Calle, E.; García-Santos, M. P.; Casado, J. J. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 334-336
- 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*, 7016-7022
- Green, S.; Goldberg, A.; Zurlo, J. *Toxicol. Sci.* **2001**, *63*, 6-14
- Grootveld, M.; Atherton, M. D.; Sheerin, A.; Hawkes, J.; Blake, D. R.; Richens, T. E. *J. Clin. Nutr.* **1998**, *101*, 1210-1218
- Guengerich, F. P. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 420-452
- Guengerich, F. P.; Geiger, L. E.; Hogy, L. L.; Wright, P. L. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 4925-4933
- Gunther, M.; Wagner, E.; Ogris, M. J. *Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2704-2716
- Guy, A.; Molko, D.; Wagrez, L.; Teoule, R. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1034-1040
- Hall, M. E.; Stevens, J. W. *Anal. Chem.* **1977**, *49*, 2277-2280
- Hashimoto, K.; Aldridge, W. N. *Biochem. Pharmacol.* **1970**, *19*, 2591-2604
- Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W.; Zeiger, E. *Environ. Mol. Mutagen.* **1983**, *5*, 3-142
- Hecht, S. S.; Seow, A.; Wang, M. Y.; Wang, R. W.; Meng, L.; Koh, W. P.; Carmella, S. G.; Chen, M.; Han, S. M.; Yu, M. M.; Yuan, J. M. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2010**, *19*, 1185-1192
- Hecht, S. S. *Mutat. Res.—Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *424*, 127-142
- Hedegaard, R. V.; Frandsen, H.; Skibsted, K. H. *Food Chem.* **2008**, *108*, 917-925
- Hellwig, J.; Gembardt, C.; Murphy, S. R. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 859-868
- Hemminki, K. *Arch. Toxicol.* **1983**, *52*, 249-285
- Hemminki, K.; Falck, K.; Vainio, H. *Arch. Toxicol.* **1980**, *46*, 277-285
- Hemminki, K.; Falck, K. *Toxicol. Lett.* **1979**, *4*, 103-106
- Hertzog-Ronen, C.; Borzin, E.; Gerchikov, Y.; Tessler, N.; Eichen, Y. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 10380-10386
- Hogervorst, J. G. F.; Baars, B. J.; Schouten, L. J.; Konings, E. J. M.; Goldbohm, R. A.; van der Brandt, P. A. *Crit. Rev. Toxicol.* **2010**, *40*, 485-512
- Huber, W. W.; McDaniel, L. P.; Kaderlik, K. R.; Teitel, C. H.; Lang, N. P.; Kadlubar, F. F. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, *376*, 115-122
- Hurley, L. H. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188-200
- Husain, S.; Sastry, G. S. R.; Prasad, P. R.; Sarma V. R. *Electroanalysis* **1991**, *3*, 71-72
- Ichihashi, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Uchida, K. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23903-23913
- Il'yasova, D.; McCarthy, B. J.; Erdal, S.; Shimek, J.; Goldstein, J.; Doerge, D. R.; Myers, S. R.; Vineis, P.; Wishnok, J.; Swenberg, J.; Bigner, D.; Davis, F. G. *J. Toxicol. Env. Health—Pt b—Crit. Rev.* **2009**, *12*, 175-187
- Inagaki, S.; Hirashima, H.; Esaka, Y.; Higashi, T.; Min, J. Z.; Toyooka, T. *Chromatographia* **2010**, *72*, 1043-1048
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1999. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 71. IARC: Lyon, Francia
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1995. Dry cleaning some chlorinated solvents and other industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Volumen 63. IARC: Lyon, Francia

- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1994. Some industrial chemicals. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volumen 60. IARC: Lyon, Francia
- International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1997. Environmental health criteria 191: Acrylic acid. United Nations Environment Program: World Health Organization: Ginebra
- Izatt, R. M.; Christensen, J. J.; Rytting, J. H. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439-481
- Jakab, G. J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1993**, *121*, 167-175
- Janzowski, C.; Glaab, V.; Mueller, C.; Straesser, U.; Kamp, H. G.; Eisenbrand, G. *Mutagenesis* **2003**, *18*, 465-470
- Johnson, K. S.; Gorzinski, K.; Bodner, R.; Campbell, C.; Friedman, M.; Mast, R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1986**, *85*, 154-168
- Jungers, J. J.; Sajus, L. *L'analyse cinétique de la transformation chimique*. Ed. Technip: Paris, 1968
- Kawamura, S. Seventy years of the Maillard reaction. En: Walker, G. R.; Feather, M. S. *The Maillard reaction in foods and nutrition*. American Chemical Society: Washington, US. 1983
- Kedderis, G. L.; Teo, S. K.; Batra, R.; Held, S. D.; Gargas, M. L. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *140*, 422-435
- Kedderis, G. L.; Batra, R.; Koop, D. R. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 866-871
- Kedderis, G. L.; Batra, R. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 685-689
- Kehrer, J. P.; Biswal, S. S. *Toxicol. Sci.* **2000**, *57*, 6-15
- Khullar, S.; Varaprasad, C. V.; Johnson, F. J. *Med. Chem.* **1999**, *42*, 947-950
- Kim, J. H.; Thomas, J. J. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 879-885
- Kim, S.; Pfeifer, G. P.; Besaratinia, A. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 11640-11647
- Knol, J. J.; Van Loon, W. A. M.; Linssen, J. P. H.; Ruck, A. L.; Van Boekel, M. A. J. S.; Voragen, A. G. J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6133-6139
- Koenigs, E.; Kohler, K.; Blindow, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, *58*, 933-940
- Koleva, Y. K.; Madden, J. C.; Cronin, M. T. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2300-2312
- Kozekov, I. D.; Turesky, R. J.; Alas, G. R.; Harris, C. M.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1701-1713
- Kozekov, I. D.; Nechev, L.; Moseley, S.; Harris, C.; Rizzo, C.; Stone, M.; Harris, T. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 50-61
- Lambotte-Vandepaer, M.; Duverger van Bogaert, M.; Rollmann, B. *Environ. Mutagenesis* **1985**, *7*, 655-662
- Lambotte-Vandepaer, M.; Duverger van Bogaert, M. *Mutat. Res.* **1984**, *134*, 49-54
- Lawley, P. D. From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA-reactive compounds. En Hemminki, K.; Dipple, A.; Kadlubar, F. F.; Segerbäck, D.; Bartsch, H. *DNA Adducts: Identification and biological significance*, IARC Scientific Publications N° 125. IARC: Lyon, Francia. 1994
- Lawrence, R. M.; Sweetman, G. M.; Tavares, R.; Farmer, P. B. *Teratog. Carcinog. Mutag.* **1996**, *16*, 139-148
- Leffler, J. E.; Grunwald, E. *Rate and equilibria of organic reactions as treated by statistical, thermodynamic and extra-thermodynamic methods*. Dover Publications Inc.: New York, 1989
- Lehning, E. J.; Balaban, C. D.; Ross, J. F.; LoPachin, R. M. *Neurotoxicology* **2003**, *24*, 109-123
- Léonard, A.; Gerber, G. B.; Stecca, C.; Rueff, J.; Borba, H.; Farmer, P. B.; Sram, R. J.; Czeizel, A. E.; Kalina, I. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **1999**, *436*, 263-283
- Lewis, R. S.; Tannenbaum, S. R.; Deen, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3933-3939
- Li, R.; Schork, F. J. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 3001-3008
- Lijinsky, W. *Chemistry and biology of N-nitrosocompounds*. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1992

- Lijinsky, W.; Reuber, M. *Toxicol. Ind. Health* **1987**, *3*, 337-345
- Lijinsky, W. Andrews, A. W. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* **1980**, *1*, 259-267
- Lin, M. M. *Appl. Catal. A: Gen.* **2001**, *207*, 1-16
- Lilga, M. A.; Todd, E.; Holladay, J. E. U. S. Patent 6,992,209, enero 31, 2006
- Loeb, L. A.; Harris, C. C. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6863-6872
- Loeb, L. A.; Preston, B. D. *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201-230
- Loechler, E. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 277-280
- LoPachin, R. M.; Gavin, T.; Petersen, D. R.; Barber, D. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1499-1508
- LoPachin, R. M.; Barber, D. S.; Geohagen, B. C.; Gavin, T.; He, D.; Das, S. *Toxicol. Sci.* **2007**, *95*, 136-146
- LoPachin, R. M. *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 617-630
- LoPachin, R. M.; Balaban, C. D.; Ross, J. F. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, *188*, 135-153
- LoPachin, R. M.; Ross, J. F.; Lehning, E. J. *Neurotoxicology* **2002**, *23*, 43-59
- Lu, X.; Heilman, J.; Blans, P.; Fishbein, J. C. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1462-1470
- Lyle, T. A.; Royer, R. E.; Daub, G. H.; Vander Jagt, D. L. *Chem.-Biol. Interact.* **1980**, *29*, 197-207
- Mackay, D.; Shiu, W. Y.; Ma, K. C. *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*. Volumen 4. Lewis Publishers: Boca Raton, Florida. 1995
- Mag, M.; Engels, J. W. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3525-3543
- Magee, P. N.; Hultin, T. *Biochem. J.* **1962**, *83*, 106-114
- Magee, P. N.; Farber, E. *Biochem. J.* **1962**, *83*, 114-124
- Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932-938
- Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161-1168
- March, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. 6ta ed., John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2007
- Marnett, L. *Toxicology* **2002**, *181*, 219-222
- Marnett, L. J.; Hurd, H. K.; Hollstein, M. C.; Levin, D. E.; Esterbauer, H.; Ames, B. N. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1985**, *148*, 25-34
- Marsh, G. M.; Lucas, L. J.; Youk, A. O.; Schall, L. C. *Occup. Environ. Med.* **1999**, *56*, 181-190
- Martins, S. I. F.; Van Boekel, M. A. J. *Food Chem.* **2005**, *90*, 257-269
- Mayr, H.; Ofial, A. R. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 584-595
- McCarthy, K. L.; Thomas, W. C.; Aardema, M. J.; Seymour, J. L.; Putman, D. L.; Yang, L. L.; Curren, R. D.; Valencia, R. *Food Chem. Toxicol.* **1992**, *30*, 505-515
- McKinney, J. D.; Richard, A.; Waller, C.; Newman, M. C.; Gerberick, F. *Toxicol. Sci.* **2000**, *56*, 8-17
- Meacher, D. M.; Menzel, D. B. *Cell Biol. Toxicol.* **1999**, *15*, 163-171
- Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 193-201
- Miller, S. L.; Branoff, S.; Nazaroff, W. J. *Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* **1998**, *8*, 287-311
- Minetti, C. A. S.; Remeta, D. P.; Johnson, F.; Iden, C. R.; Bresslauer, K. J. *Biopolymers* **2010**, *93*, 370-382
- Mishina, Y.; He, C. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 670-678

- Moschel, R. C.; Hudgins, W. R.; Dipple, A. J. *Org. Chem.* **1979**, *44*, 3324-3328
- Mottram, D. S.; Friedman, M. J. *Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5983-6184
- Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L.; Dodson, A. T. *Nature* **2002**, *419*, 448-449
- Mucci, L. A.; Wilson, K. A. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6013-6019
- Mucci, L. A.; Sandin, S.; Adami, H. O.; Magnusson, C.; Weiderpass, E. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **2005**, *293*, 1326-1327
- Munter, T.; Cottrell, L.; Hill, S.; Kronberg, L.; Watson, W. P.; Golding, B. T. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1549-1560
- Münzner, R.; Guigas, C.; Renner, H. W. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 397-401
- Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3433-3438
- National Toxicology Program (NTP), 2003. Final report: toxicology and carcinogenesis studies of 2,4-hexadienal in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical Report Series 509. US Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences. Carolina del Norte
- National Toxicology Program (NTP), 2001. Draft report: toxicology and carcinogenesis studies of citral in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). Technical Report Series 505. US Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences. Carolina del Norte
- Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Guttenplan, J. B.; Chung, F. L. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 581-584
- Nath, R. G.; Ocando, J. E.; Chung, F. L. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 452-456
- Nath, R. G.; Chung, F. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 7491-7495
- Nair, U.; Bartsch, H.; Nair, J. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 1109-1120
- Nardini, M.; Finkelstein, E. I.; Reddy, S.; Valacchi, G.; Traber, M.; van der Vliet, A. *Toxicology* **2002**, *170*, 173-185
- Neeper-Bradley, T. L. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 152
- Nechev, L. V.; Harris, C. H.; Harris, T. M. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 421-429
- Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 1326-133
- Norbury, C. J.; Hickson, I. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 367-401
- O'Connor, C. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1970**, *24*, 553-564
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2007. The 2007 OECD list of High Production Volume Chemicals. Environment, Health and Safety Division. Paris
- Osterman-Golkar, S.; MacNeela, J. P.; Turner, M. J.; Walker, V. E.; Swenberg, J. A.; Sumner, S. J.; Youtsey, S.; Fennell, T. R. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 2701-2707
- Pande, P.; Shearer, J.; Yang, J.; Greenberg, W. A.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6773-6779
- Parent, R. A.; Caravello, H. E.; San, R. H. C. *J. Appl. Toxicol.* **1996**, *16*, 103-108
- Patel, J. M.; Wood, J. C.; Leibman, K. C. *Drug Metab. Dispos.* **1980**, *8*, 305-308
- Pawłowicz, A. J.; Munter, T.; Klika, K. D.; Kronberg, L. *Bioorganic Chem.* **2006**, *34*, 39-48
- Pearson, R. G. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 267-275
- Pearson, R. G. *Coord. Chem. Rev.* **1990**, *100*, 403-425
- Pelillo, M.; Cuvelier, M. E.; Biguzzi, B.; Gallina-Toschi, T.; Berset, C.; Lercker, G. J. *Chromatogr. A* **2004**, *1023*, 225-229
- Pelucchi, C.; Galeone, C.; Dal Mas, L.; Talamini, R.; Montella, M.; Ramazzotti, V.; Negri, E.; Franceschi, S.; La Vecchia, C. *Int. J. Cancer* **2007**, *120*, 1376-1377
- Pérez, H. L.; Segerbäck, D.; Osterman-Golkar, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 869-873

- Pérez, H. L.; Cheong, H. K.; Yang, J. S.; Osterman-Golkar, S. *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 59-68
- 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*, 1444-1449
- 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*, 1320-1324
- Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Solution Chem.* **2007**, *37*, 459-466
- Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244-10247
- Perocco, P.; Pane, G.; Bolongnei, S.; Zannotti, M. *Scan. J. Work. Environ. Health* **1984**, *8*, 290-293
- Perrino, F. W.; Blans, P.; Harvey, S.; Gelhaus, S. L.; McGrath, C.; Akman, S. A.; Jenkins, S.; LaCourse, W. R.; Fishbein, J. *C. Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1616-1623
- Peter, H.; Bolt, H. M. *Xenobiotica* **1981**, *11*, 51-56
- Peters, W. H.; Roelofs, H. M. *Biochem. J.* **1989**, *264*, 613-616
- Plumb, J. A.; Milray, R.; Kaye, S. B. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4435-4440
- Qu, M.; Bhattacharya, S. K. *J. Environ. Eng.* **1996**, *122*, 749-756
- Rao, C. N. *Espectroscopía ultravioleta y visible*. Ed. Alhambra: Madrid. 1970
- Rice, J. M. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 3-20
- Roberts, A. E.; Lacy, S. A.; Pilon, D.; Turner, M. J.; Rickert, D. E. *Drug Metab. Dispos.* **1989**, *17*, 481-486
- Rothman, K. J. *Scand. J. Work. Environ. Health* **1994**, *20*, 313-321
- Rouse, J.; Jackson, S. P. *Science* **2002**, *297*, 547-551
- Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, L.; Ehrenberg, M.; Törnqvist, M. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7012-7018
- Saenger, W. *Principles of nucleic acids structure*. Springer: New York, 1984
- Sakurai, H. *Ind. Health* **2000**, *38*, 165-180
- Saroja, N.; Gowda, L. R.; Tharanathan, R. N. *Chromatographia* **2000**, *51*, 345-348
- Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Chem.-Eur. J.* **2008**, *14*, 864-870
- Saxena, A. K.; Singh, G. *Biomed. Res.* **2009**, *20*, 89-93
- Schettgen, T.; Muller, J.; Fromme, H.; Angerer, J. J. *Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2467-2473
- Schuldt, P. H.; Priddle, W. E.; Klein, S.; Burchfield, H. P.; Stallard, D. E. *Contr. Boyce Thomson Inst.* **1961**, *21*, 163
- Schuler, D.; Eder, E. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1345-1350
- Schultz, T. W.; Netzeva, T. I.; Roberts, D. W.; Cronin, M. T. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 330-341
- Schwöbel, J. A.; Koleva, Y.; Enoch, S. J.; Bajot, F.; Hewitt, M.; Madden, J. C.; Roberts, D. W.; Schultz, T. W.; Cronin, M. T. D. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2562-2596
- Schwöbel, J. A.; Wondrousch, D.; Koleva, Y.; Madden, J. C.; Cronin, M. T. D.; Schüürmann, G. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1576-1585
- Segal, A.; Fedyk, J.; Melchionne, S.; Seidman, I. *Chem.-Biol. Interact.* **1987**, *61*, 189-197
- Senent, S. *Química física II*. UNED: Madrid. 1984
- Shepard, S. E.; Lutz, W. K. *Cancer Surv.* **1989**, *8*, 401-421
- Shrivastav, N.; Li, D.; Essigmann, J. M. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 59-70

- Sierra, L. M.; Barros, A. R.; García, M.; Ferreira, J. A.; Comendador, M. A. *Mutat. Res.* **1991**, *260*, 247-256
- Singer, B.; Bartsch, H. *Exocyclic DNA adducts in mutagenesis and carcinogenesis*. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, Francia. 1999
- Singer, B.; Grunberger, D. *Molecular biology of mutagens and carcinogens*. Plenum Press: Nueva York, 1983
- Skog, K.; Alexander, J. Risk assessment techniques for acrylamide. En: *Acrylamide and other hazardous compounds in heated-treated foods*. Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK. 2006
- Smith, M. B. *Organic chemistry: an acid-base approach*. 1ra ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida. 2010
- Smyth, H. F.; Weil, C. S.; West, J. S.; Carpenter, C. P. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1970**, *17*, 498-503
- Snyder, J. K.; Stock, L. M. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 886-891
- Sobol, Z.; Engel, M. E.; Rubitski, E.; Ku, W. W.; Aubrecht, J.; Schiestl, R. H. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2007**, *633*, 80-94
- Solis, B. H.; Hammes-Schiffer, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19036-19039
- Solomon, J. J. *IARC Sci. Publ.* **1994**, *125*, 179-198
- Solomon, J. J.; Segal, A. *Environ. Health Persp.* **1985**, *62*, 227-230
- Solomon, J. J.; Fedyk, J.; Mukai, F.; Segal, A. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3465-3470
- Solomon, J. J.; Cote, I. L.; Wortman, M.; Decker, K.; Segal, A. *Chem.-Biol. Interact.* **1984**, *51*, 167-190
- Spencer, P. S.; Schaumburg, H. H. *Neurotoxicology* **1974**, *1*, 143-169
- Springall, D.; Edginton, J.; Price, P.; Swanston, J.; Noel, C.; Bloom, S.; Polak, J. *Environ. Health Perspect.* **1990**, *85*, 51-157
- Stadler, R. H.; Robert, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davidek, T.; Devaud, S.; Goldmann, T.; Hau, J.; Blank, I. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5550-5558
- Stadler, R. H.; Verzegnassi, L.; Varga, N.; Grigorov, M.; Studer, A.; Riediker, S. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1242-1250
- Stadler, R. H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P. A.; Riediker, S. *Nature* **2002**, *419*, 449-450
- Stevens, J. F.; Maier, C. S. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1275-1276
- Stevens, J. F.; Maier, C. S. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 7-25
- Stone, M. P.; Cho, Y.; Huang, H.; Kim, H. Y.; Kozekov, I. D.; Kozekova, A.; Minko, I. G.; Lloyd, R. S.; Harris, T. M.; Rizzo, C. J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 793-804
- Straathof, A. J. J.; Sie, S.; Franco, T. T.; van der Wielen, L. A. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 727-734
- Sumner, S. C.; Fennell, T.; Moore, T. A.; Chanas, B.; Ghanayem, B. I. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 1110-1116
- Swift, E. H.; Gould, C. W.; Sease, J. W.; Niemann, C. Chemical warfare service. CWS Field Lab., Memo 1-2-16, 1943
- Talhout, R.; Opperhuizen, A.; van Amsterdam, J. G. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1789-1798
- Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4998-5006
- Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 517-522
- Taverna, P.; Sedgwick, B. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5105-5111
- Tezcan, H.; Şenöz, H.; Tokay, N. *Monatsch. Chem.* **2011**. DOI: 10.1007/s00706-011-0661-9
- Thier, R.; Lewalter, J.; Selinski, S.; Bolt, H. M. *Arch. Toxicol.* **2001**, *75*, 270-273
- Tilson, H. A. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **1981**, *3*, 445-461
- Törnqvist, M.; Mowrer, J.; Jensen, S.; Ehrenberg, L. *Anal. Biochem.* **1986**, *154*, 255-266

- Twaddle, N. C.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Beland, F. A.; Doerge, D. R. *Cancer Lett.* **2004**, *207*, 9-17
- Tyl, R. W.; Friedman, M. A. *Reprod. Toxicol.* **2003**, *17*, 1-13
- Tyl, R. W.; Marr, M. C.; Myers, C. B.; Ross, W. P.; Friedman, M. A. *Reprod. Toxicol.* **2000**, *14*, 147-157
- Uchida, K. *Free Radic. Biol. Chem.* **2000**, *28*, 1685-1696
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 2000. Health effects assessment for acrylonitrile. EPA/600/8-88/014. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment. Office of Research and Development: Cincinnati, OH
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA), 1994. Chemical summary for acrylic acid. EPA 749F-94-006a. Office of Pollution, Prevention and Toxics: Cincinnati, OH
- Van Duuren, B. L.; Goldschmidt, B. M.; Kats, C.; Seidman, I.; Paul, J. S. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 695-700
- Van Duuren, B. L.; Sivak, A.; Katz, C.; Melchionne, S. *Cancer Res.* **1969**, *29*, 947-952
- Van Duuren, B. L.; Langseth, L.; Goldschmidt, B. M.; Orris, L. *J. Natl. Cancer Inst.* **1967**, *39*, 1217-1228
- Van Iersel, M. L. P.; Jan-Peter, H. T.; Ploemen, M.; Federici, G.; van Bladeren, P. J. *Chem.-Biol. Interact.* **1997**, *108*, 67-78
- VanderVeen, L. A.; Nechev, L. V.; Harris, T. M.; Harris, C. M.; Marnett, L. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9066-9070
- Vassilaros, D. L.; Bzik, T. J.; Cara, C. A. *Environ. Sci. Technol.* **1991**, *25*, 878-883
- Veldhuyzen, W. F.; Lam, Y.; Rokita, S. E. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1345-1351
- Veldhuyzen, W. F.; Shallop, A. J.; Jones, R. A.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11126-11132
- Venitt, S. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1978**, *57*, 107-113
- Venitt, S.; Bushell, C. T.; Osborne, M. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1977**, *45*, 283-288
- Vera, A.; Montes, M.; Usero, J. L.; Casado, J. J. *Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 791-796
- Verschuere, K. *Handbook of environmental data on organic chemicals*. 4th ed.; Wiley-Interscience: Nueva York, 1991
- Wang, H.; Huang, P.; Lie, T.; Li, J.; Hutz, R. J.; Li, K.; Shi, F. X. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *29*, 225-230
- Wang, H. T.; Tang, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 753
- Wang, H. T.; Zhang, S.; Hu, Y.; Tang, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 511-517
- Wang, R. S.; McDaniel, L. P.; Manjanatha, M. G.; Shelton, S. D.; Doerge, D. R.; Mei, N. *Toxicol. Sci.* **2010**, *117*, 72-80
- Wang, S. H.; Lu, R. Z.; Xu, W. R.; Xing, G. W.; Zhao, X. W.; Wang, S. Z.; Zhang, Y.; Han, F. A.; Aschner, M. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 461-469
- Wang, Q.; Ji, F.; Sun, Y. A.; Wang, W.; Miao, W. B.; Brandt-Rauf, P. W.; Xia, Z. L. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 1068-1073
- Walker, S. L.; Deeter, G. A.; Stuart, G. U. S. Patent 5,830,957, noviembre 3, 1998
- Ward, C. E.; Starr, T. B. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1993**, *18*, 214-232
- Wawra, E.; Zollner, H.; Schaur, R. J.; Tillian, H. M. Schauenstein, E. *Cell. Biochem. Funct.* **1986**, *4*, 31-36
- Weinert, E. E.; Dondi, R.; Colloredo-Melz, S.; Frankenfield, K. N.; Mitchell, C. H.; Freccero, M.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11940-11947
- Weinert, E. E.; Frankenfield, K. N.; Rokita, S. E. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1364-1370
- Whittaker, S. G.; Zimmermann, F. K.; Dicus, B.; Piegorsch, W.; Resnick, M. A.; Fogel, S. *Mutat. Res.* **1990**, *241*, 225-241
- White, J. S.; Rees, K. R. *Chem.-Biol. Interact.* **1984**, *52*, 233-241
- Whysner, J.; Conaway, C. C.; Verna, L. K.; Rosen, J. E.; Prahalad, A. K.; Rihies, J. P.; Ali, N.; Williams, G. M. *Fundamen. Appl. Toxicol.* **1996**, *30*, 67-71

- Widmark, E. M. *Nature* **1939**, *143*, 984
- Wiegand, H. J.; Schiffmann, D.; Henschler, D. *Arch. Toxicol.* **1989**, *63*, 250-251
- Wild, D.; King, M. T.; Gocke, E.; Eckhardt, K. *Food Chem. Toxicol.* **1983**, *21*, 707-719
- Wilmer, J. L.; Erexson, G. L.; Kligerman, A. D. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 4635-4638
- Winter, S. M.; Sipes, I. G. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, *31*, 615-621
- Witz, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 333-349
- Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477-2495
- Wong, J. L.; Liu, D. Z.; Zheng, Y. T. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 171-174
- World Health Organization (WHO), 2005. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA/64/SC: Roma, Italia
- World Health Organization (WHO), 2002. Acrolein. Concise International Chemical Assessment Document 43. International Programme on Chemical Safety, WHO: Ginebra, Suiza
- World Health Organization (WHO), 2002. Health implications of acrylamide in food: Report of a joint FAO/WHO consultation. WHO Headquarters: Ginebra, Suiza
- Wrabetz, E.; Peter, G.; Hohorst, H. J. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1980**, *98*, 119-126
- Würgler, F. E.; Schlatter, J.; Maier, P. *Mutat. Res.* **1992**, *283*, 107-111
- Yamagata, Y.; Fukumoto, S.; Hamada, K.; Fujiwara, T.; Tomita, K. *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 6475-6486
- Yang, I.; Johnson, F.; Grollman, A. P.; Moriya, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 160-164
- Yang, I.; Chan, G.; Miller, H.; Huang, Y.; Torres, M. C.; Johnson, F.; Moriya, M. *Biochemistry* **2002**, *41*, 13826-13832
- Yarbrough, J. W.; Schultz, T. W. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 558-562
- Yates, J. M.; Fennell, T. R.; Turner, M. J.; Recio, L.; Sumner, S. C. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 277-283
- Yu, C.; Hui-min, T. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 887-896
- Zaliznyak, T.; Lukin, M.; El-khateeb, M.; Bonala, R.; Johnson, F.; de los Santos, C. *Biopolymers* **2009**, *93*, 391-401
- Zaliznyak, T.; Bonala, R.; Attaluri, S.; Johnson, F.; de los Santos, C. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 2153-2163
- Zanella, R.; Schilling, M.; Klockow, D. *J. Environ. Monitor.* **1999**, *1*, 441-443
- Zhang, S.; Balbo, S.; Wang, M.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 119-124
- Zhang, S.; Villalta, P. W.; Wang, M.; Hecht, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 565-571
- Zhou, L.; Haorah, J.; Chen, S. C.; Wang, X.; Kolar, C.; Lawson, T. A.; Mirvish, S. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 416-423
- Zhurkov, V. S.; Sram, R. J.; Dugan, A. M. *Gig. Sanit.* **1983**, *1*, 71-72
- Zödl, B.; Schmid, D.; Wassler, G.; Gundacker, C.; Thalhammer, T.; Ekmekcioglu, C. *Toxicology* **2007**, *232*, 99-108
- Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 1193-1197
- Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F.; Sharpless, T. W.; Grahe, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 1741-1750