

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química física



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE

**Estudio cinético de reacciones de interés biológico
con moléculas modelo del ADN**

Marina González Pérez

Salamanca 2013

Memoria presentada por la Licenciada con Grado
Marina González Pérez para optar al Grado de Doctor.

Fdo.: Marina González Pérez
Salamanca, a de 26 de Marzo de 2013



**UNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

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

**Plaza de los Caídos, s/n 37008
SALAMANCA
Tel . (34) 923 29 44 87
Fax . (34) 923 294574**

D. Julio Casado Linarejos, Catedrático Emérito de Química física, D. Emilio Calle Martín y Dña. María del Pilar García Santos, Profesores Titulares de Química física de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN que la investigación de doctorado **"Estudio cinético de reacciones de interés biológico con moléculas modelo del ADN"** ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química física por la Licenciada con Grado en Química Dña. Marina González Pérez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan la presentación del mismo, en los términos establecidos por la normativa reguladora de los Estudios de Tercer Ciclo y Doctorado de la Universidad de Salamanca.

Salamanca a 26 de Marzo de 2013

Fdo.: J. Casado Linarejos

Fdo.: E. Calle Martín

Fdo.: M. P. García Santos

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

Agradezco a la Junta de Castilla y León y Fondos FEDER la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (2007-2011) y de una ayuda para estancias breves en el grupo de investigación “*Kinetics and equilibria in Solution*” (Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale Università di Pisa) al que se agradece su colaboración y ayuda.

*“Yo no enseño a mis alumnos,
solo les proporciono las condiciones
en las que puedan aprender”*

Albert Einstein

A mis padres

*“Compañera, Usted sabe,
Puede contar Conmigo,
No basta dos, O hasta diez,
Sino contar Conmigo”*

M. Benedetti

Al cansautor pluscoamperfecto y la bella guitarra por brindarme el pentagrama de mi vida en un tiempo pretérito y enseñarme e impulsarme a incluir todo tipo de notas (de las negras a las semifusas, pasando por las de humor), por enseñarme a disfrutar los silencios y darme la oportunidad siempre de elegir una buena clave. A mis Uskys con M y P, gracias por escuchar la melodía creada pacientes y aparentemente serenos, ya sea esta armoniosa, disonante o el mismo tamborilero y, cómo no, por vuestras siempre bienvenidas aportaciones. Gracias por fomentar la creatividad y el descubrimiento de nuevos ritmos arrítmicos. Gracias por el apoyo, el impulso, el consuelo y las energías compartidas en estos 29 años de creación.

A Víctor, por su paciencia, serenidad, y el perfecto acompañamiento en la distancia e *in situ*. Muíto obligada por el ánimo y por el apoyo y la confianza incondicionales. Gracias por impulsarme y esperarme para la nueva fase.

A los habitantes, compañeros y excompañeros de C2, por toda la química y la física y la teoría de colisiones que hemos hecho experimental y ha culminado con reacciones de los más variopinto que nos han hecho aprender y mucho.

A mis amigos y referees particulares... A la metafórica Srta. Kleine, mil gracias por tu generosidad desde $t=0$ y tu paciencia exponencial hasta con los taponos de las cubetas. Al oído del Sr. Melo, Melis, Melus, a sus brazos antiestrés y

su humor refinado siempre en guardia tan bienvenido, gracias por tantas mediodías. Al curioso y práctico Sr. X por el apoyo y la confianza depositados y por todos los aprendizajes compartidos.

A Julio, gracias por las talas discriminadas de mis enmarañados bosques. Por la enseñanza renacentista sutil y profunda de lo científico y lo personal. Por la transmisión de la importancia de las formas de los fondos y los fondos de las formas.

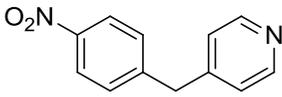
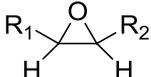
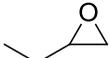
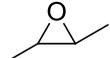
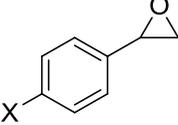
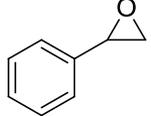
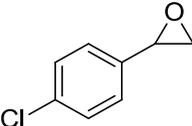
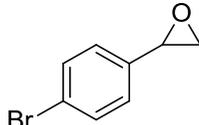
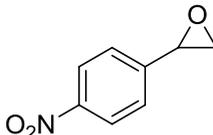
A Emilio por el apoyo logístico y burocrático, por estar ahí y por los consejos siempre bienvenidos.

A Pilar por el impulso, su dedicación y comprensión. Gracias por el cuestionamiento profundo de todo.

Vorrei riingraziare a Fernando, Marcella y Tarita per accogliermi nell loro grupo ed aiutarmi tanto. E a loro e ai miei compagni e amici, Sabriye, M. Rose, Clara e Jacopo, per tutto quello condiviso che è stato molto, intenso ed indimenticabile.

A todos aquellos que de un modo u otro habéis participado, colaborado o arrojado luz a este trabajo mil gracias. No tengo palabras para agradecer, sin embargo, a los muchos que hicieron suyo el poema de Mario Benedetti, algunos ya aparecís en estas líneas, deciros simplemente que os quiero.

Siglas de los compuestos y fórmulas

NBP	4-(<i>p</i> -nitrobencil)piridina	
EP	Epóxidos lineales	 $R_1 = \text{CH}_3 \text{ ó } \text{CH}_2\text{CH}_3;$ $R_2 = \text{H} \text{ ó } \text{CH}_3;$
PO	Óxido de propileno	
1,2-EB	1,2-epoxibutano	
<i>cis</i>-2,3-EB	<i>cis</i> -2,3-epoxibutano	
<i>trans</i>-2,3-EB	<i>trans</i> -2,3-epoxibutano	
<i>p</i>XSO	Óxidos de estireno <i>p</i> -sustituidos	
SO	Óxido de estireno	
<i>p</i>ClSO	Óxido de <i>p</i> -cloroestireno	
<i>p</i>BrSO	Óxido de <i>p</i> -bromoestireno	
<i>p</i>NSO	Óxido de <i>p</i> -nitroestireno	

Abreviaturas utilizadas

AA	Agente alquilante
AC	Aberraciones cromosómicas
AD	Aducto
AL	Vida del aducto
A_{AD}	Absorbancia del aducto a tiempo t
CBI	Índice de enlace covalente
f	Fracción alquilada
MF	Frecuencia de mutación
NaCac	Cacodilato sódico
PQ	Parámetros químicos
Poli	Poli(dGdC)·Poli(dGdC)
R	Respuesta mutágena
s	Constante de sustrato de Swain-Scott
SCE	Intercambio de cromátidas hermanas
SCEIP	Potencial para inducir intercambio de cromátidas hermanas
S_{NBP}	Selectividad hacia la NBP
σ^*	Constante de Taft
σ	Constante de Hammett
ρ	Constante de reacción de Hammett

Índice

1	Introducción	1
2	Estudio cinético de reacciones de alquilación de moléculas modelo del ADN por epóxidos	7
2.1	Informe bibliográfico	9
2.1.1	Agentes alquilantes	11
2.1.1.1	Generalidades	11
2.1.1.2	Usos y vías de exposición	12
2.1.1.3	Reactividad de los agentes alquilantes	13
2.1.1.4	Interacción de agentes alquilantes con macromoléculas	16
2.1.1.5	Actividad biológica de los agentes alquilantes	20
2.1.1.6	Ensayos biológicos utilizados para determinar la actividad biológica	24
2.1.1.7	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	25
2.1.2	Test de NBP	31
2.1.2.1	Desarrollo histórico del test de NBP	31
2.1.2.2	La NBP: modelo del ADN	33
2.1.2.3	Aplicaciones del test de NBP	37
2.1.2.4	Factores que pueden explicar la falta de correlaciones reactividad química-actividad biológica	47
2.1.3	Epóxidos	49
2.1.3.1	Generalidades	49
2.1.3.2	Usos y vías de exposición	49
2.1.3.3	Reactividad química	51
2.1.3.4	Parámetros químicos	61
2.1.3.5	Actividad biológica	61
2.1.3.6	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	63
2.2	Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por epóxidos lineales	65
2.2.1	Antecedentes	67
2.2.1.1	Epóxidos lineales estudiados	67
2.2.1.2	Usos y exposición	68
2.2.1.3	Reactividad química de epóxidos lineales	69
2.2.1.4	Parámetros químicos	74
2.2.1.5	Actividad biológica	75
2.2.1.6	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	77
2.2.2	Método y materiales	81
2.2.2.1	Método experimental	81
2.2.2.2	Materiales	83
2.2.3	Resultados y discusión	86
2.2.3.1	Mecanismo de reacción	86
2.2.3.2	Estudio cinético de las reacciones involucradas en la efectividad de la alquilación	92
2.2.3.3	Parámetros cinéticos que caracterizan la reactividad de los epóxidos lineales	104
2.2.3.4	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	108
2.2.4	Conclusiones	113
2.3	Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por óxidos de estireno	115
2.3.1	Antecedentes	117

2.3.1.1	Epóxidos aromáticos estudiados	117
2.3.1.2	Usos y exposición	117
2.3.1.3	Reactividad química	119
2.3.1.4	Parámetros químicos	128
2.3.1.5	Efectividad biológica	128
2.3.1.6	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	130
2.3.2	Óxido de <i>p</i>-nitroestireno	133
2.3.2.1	Método y materiales	133
2.3.2.2	Resultados y discusión	139
2.3.2.3	Conclusiones	161
2.3.3	Óxidos de estireno, <i>p</i>-cloroestireno y <i>p</i>-bromoestireno	163
2.3.3.1	Método y materiales	163
2.3.3.2	Resultados y discusión	169
2.3.3.3	Conclusiones	193
2.3.4	Estudio comparativo de la reactividad química y biológica de los epóxidos aromáticos	195
2.3.4.1	Reactividad química	195
2.3.4.2	Actividad biológica	202
2.3.4.3	Correlaciones reactividad química-actividad biológica	203
2.3.4.4	Conclusiones	207
2.4	Estudio comparativo de los epóxidos lineales y aromáticos	209
2.4.1	Reactividad química	211
2.4.2	Actividad biológica	215
2.4.3	Conclusiones generales	217
3	Otros estudios cinéticos mediante moléculas modelo del ADN	219
3.1	Estudio cinético del cambio conformacional del ADN	221
3.1.1	Antecedentes	223
3.1.1.1	Formas del ADN	224
3.1.1.2	ADN Z	227
3.1.2	Materiales y método	235
3.1.3	Resultados y discusión	237
3.1.3.1	Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC)-poli(dGdC) en presencia de NiCl ₂	237
3.1.3.2	Estudio del cambio conformacional del poli(dGdC) en presencia de EtOH	245
3.1.3.3	Efecto de la temperatura en la conformación Z* del poli(dGdC) en presencia de EtOH	247
3.1.3.4	Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC) en presencia de ZnCl ₂	248
3.1.3.5	Efecto de la temperatura en la conformación Z del poli(dGdC) en presencia de ZnCl ₂	253
3.1.4	Conclusiones	257
4	Bibliografía	259
5	Apéndices	277



1

Introducción

*“Aunque la verdad de los hechos resplandezca,
siempre se batirán los hombres en la trinchera
sutil de las interpretaciones”*

Gregorio Marañón

Los agentes alquilantes son carcinógenos primarios de acción directa.¹ La mayoría de los cancerígenos no alquilantes *per se* sólo son efectivos tras haberse metabolizado hasta especies alquilantes.²⁻⁴

La secuencia de bases heterocíclicas en el interior de la doble hélice del ADN configura el código genético que dirige el funcionamiento de los seres vivos. Para la expresión adecuada del ARN mensajero es necesaria la lectura correcta de la secuencia del ADN. Por eso las modificaciones producidas en el ADN pueden conducir a importantes consecuencias biológicas. Un ADN dañado puede provocar cambios en la expresión genética, inhibir la división celular o inducir la muerte celular.⁵⁻⁷ En consecuencia, la química del ADN es radicalmente importante en muy diversos campos como la biotecnología, toxicología y química médica.^{8,9} En nuestro grupo de trabajo se han investigado cinéticamente diversos mecanismos de reacciones de modificación del ADN que pueden conducir a importantes consecuencias biológicas.

Los primeros resultados en el ámbito de los mecanismos de alquilación se obtuvieron en la pasada década en el marco de una investigación sistemática de mecanismos de nitrosación. En ese contexto, nuestro trabajo se viene centrando sin solución de continuidad en tres objetivos:

1. Estudio de mecanismos de nitrosación de substratos lineales y cíclicos y búsqueda de correlaciones estructura/actividad en nitrosaminas. Al estudiar la nitrosación de 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 una migración intramolecular del grupo NO.

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

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

La nitrosación de aminoácidos con grupo $-NH_2$ es particularmente interesante. Se sabía que conduce a la formación de especies mutágenas, pero se desconocía su naturaleza. Ejemplo significativo es la nitrosación del dipéptido aspartamo, éster metílico de la L-aspartil-L-fenilalanina, edulcorante bajo en calorías de amplio uso.

Al investigar los mecanismos de nitrosación de aminoácidos primarios se ha demostrado que los productos resultantes son lactonas, algunas de las cuales son mutágenos/cancerígenos muy activos.^{1,10-13} Por eso se ha investigado también la reactividad de estas especies como agentes electrófilos, habiéndose encontrado correlación entre electrofilia y capacidad mutágena.¹⁴⁻¹⁶

El método de trabajo puesto a punto ha mostrado su aplicabilidad no sólo para estudiar la capacidad alquilante de electrófilos fuertes, sino también de moléculas de electrofilia débil, como los sorbatos.

Los resultados obtenidos con distintos agentes alquilantes han permitido alcanzar conclusiones de carácter general que han aconsejado abordar simultáneamente los mecanismos de alquilación tanto desde una perspectiva experimental de carácter cinético como con tratamientos *in silico* que han facilitado una mejor y más completa comprensión de esos mecanismos.¹⁷⁻⁴¹

En esa línea de trabajo se ha abordado el estudio de la capacidad alquilante de los epóxidos. Debido a su amplio uso en ciencia y tecnología, al grado de exposición del ser humano a los mismos y a su capacidad de reacción con centros nucleófilos presentes en el medio biológico, la reactividad y los efectos biológicos

de los epóxidos, son tema de notable interés interdisciplinar. En las páginas que siguen se da cuenta de los resultados obtenidos.

Como en nuestro grupo de trabajo se busca el mayor acercamiento posible a mecanismos de modificación del ADN potencialmente inductores de efectos biológicos, y como la adopción del ADN de conformación Z puede conducir a mutagénesis y carcinogénesis, se ha abordado el estudio del cambio conformacional B-Z del ADN mediado por distintos promotores en colaboración con el grupo “*Kinetics and equilibria in Solution*” (*Università di Pisa*). En las páginas finales de esta memoria se describen muy brevemente los primeros resultados obtenidos.

- (1) Lawley, P. D. En «*Chemical Carcinogens*», 2nd ed.; Searle, C. E., Ed ; ACS Monograph 182; Am. Chem. Soc: Washington, DC, 1984 ; Vol. 1, p 428.
- (2) González Mancebo, S.; Gaspar' J.; Calle, E.; Pereira, S.; Mariano, A.; Rueff, J.; Casado, J. *Mutat. Res.* **2004**, *558*, 45.
- (3) Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *243*, 30.
- (4) Flesher, J. W.; Horn, J.; Lehner, A. F. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1998**, *251*, 239.
- (5) Norbury, C. J.; Hickson, I. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 367.
- (6) Rouse, J.; Jackson, S. P. *Science* **2002**, *297*, 547.
- (7) Guengerich, F. P. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 420.
- (8) Wolkenberg, S. E.; Boger, D. L. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477.
- (9) Hurley, L. H. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 188.
- (10) Casado, J., ‘*Mecanismos de alquilación y potencial mutágeno*’, Conferencia Inaugural, XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, Segovia, 2004.
- (11) García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7506.
- (12) García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177.
- (13) García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Polyhedron* **2003**, *22*, 1059.
- (14) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Org. Chem.* **2005**, *70*, 420.
- (15) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
- (16) Casado, J. *Nitrosation of amino acids as a precursor of alkylation mechanisms. Reactivity of lactones*, SIMEC06, Sevilla, 2006.
- (17) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244.
- (18) 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.
- (19) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. J. *Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.
- (20) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Caballero, M. C.; Casado, J. J. *Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11824.

-
- (21) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 386.
 - (22) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; M. García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 418.
 - (23) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964.
 - (24) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 438.
 - (25) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 4943.
 - (26) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 1423.
 - (27) Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1320.
 - (28) Céspedes, 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.
 - (29) 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**, *37*, 451.
 - (30) Gómez-Bombarelli, R.; Palma, BB; Martins, C; Kranendonk, M; Rodrigues, AS; Calle, E; Rueff, J; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1275.
 - (31) Manso, J. A.; Céspedes-Camacho, I. F.; Calle, E.; Casado, J. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6226.
 - (32) 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.
 - (33) Gómez Bombarelli; González-Pérez, M.; Calle, E; Casado, J. *Water Res.* **2011**, *45*, 714.
 - (34) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Arenas-Valgañón, J.; Céspedes-Camacho, I.; Calle, E.; Casado, J. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45*, 9009.
 - (35) Céspedes-Camacho, I. F.; Manso, J. A.; González-Jiménez, M.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **2012**, *143*, 723.
 - (36) Gómez-Bombarelli, R., González-Pérez, M., Calle, E., Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1176 (Review).
 - (37) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2012**, *25*, 14.
 - (38) Arenas Valgañón, J.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; González-Jiménez, M.; Calle, E.; Casado, J. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 986.
 - (39) Gómez-Bombarelli, R.; Calle, E.; Casado, J; *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 13463.
 - (40) González Pérez, M.; Gómez-Bombarelli, R.; Arenas Valgañón, J; Pérez Prior, M. T.; García Santos, P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2755.
-

2

Estudio cinético de reacciones de alquilación de moléculas modelo del ADN por epóxidos

2.1	Informe bibliográfico.....	1
2.2	Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por epóxidos lineales.....	65
2.3	Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por óxidos de estireno.....	115
2.4	Estudio comparativo de los epóxidos lineales y aromáticos.....	207

2.1 Informe bibliográfico

2.1.1 Agentes alquilantes

- 2.1.1.1 Generalidades
- 2.1.1.2 Usos y vías de exposición
- 2.1.1.3 Reactividad de los agentes alquilantes
- 2.1.1.4 Interacción de agentes alquilantes con macromoléculas
- 2.1.1.5 Actividad biológica de los agentes alquilantes
- 2.1.1.6 Ensayos biológicos utilizados para determinar la actividad biológica
- 2.1.1.7 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.1.2 Test de NBP

- 2.1.2.1 Desarrollo histórico del test de NBP
- 2.1.2.2 La NBP: modelo del ADN
- 2.1.2.3 Aplicaciones del test de NBP
- 2.1.2.4 Factores que pueden explicar la falta de correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.1.3 Epóxidos

- 2.1.3.1 Generalidades
- 2.1.3.2 Usos y vías de exposición
- 2.1.3.3 Reactividad química
- 2.1.3.4 Parámetros químicos
- 2.1.3.5 Actividad biológica
- 2.1.3.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

*“If you have an apple and I have an apple and we exchange these apples
then you and I will still each have one apple.
But if you have an idea and I have an idea and we exchange these ideas,
then each of us will have two ideas.”*

George Bernard Shaw

2.1.1 Agentes alquilantes

2.1.1.1 Generalidades

El término agente alquilante (AA) fue definido por Ross desde un punto de vista biológico de la siguiente forma: “Compuesto capaz de reemplazar un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo en condiciones fisiológicas (pH = 7,4; T = 37,0 °C, en disolución acuosa)”^{1,2} Los agentes alquilantes son, por tanto, especies electrófilas capaces de reaccionar con nucleófilos transfiriendo su grupo alquilo. Su capacidad de unión con centros nucleófilos presentes en el medio biológico es motivo de que los agentes alquilantes hayan suscitado y susciten gran interés.¹⁻⁵ La unión con átomos de N, S y O de proteínas y ácidos nucleicos da lugar a la formación de aductos que pueden producir efectos nocivos (citotoxicidad, genotoxicidad...) entre los que cabe destacar la aparición de tumores y cáncer.⁶ Contrariamente, y debido también a su capacidad de unión al ADN, destaca su aplicación, desde 1950, con fines clínicos en quimioterapia.⁷

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

2.1.1.2 Usos y vías de exposición

Las primeras aplicaciones de agentes alquilantes –como el gas mostaza– fueron en el ámbito militar. Su utilización como armas químicas^{8,9} produjo una inversión sustancial, de tiempo y dinero, en la investigación de los mismos facilitando el desarrollo de nuevas aplicaciones.

Actualmente el empleo de agentes alquilantes se encuentra muy extendido. Es habitual su utilización como intermedios industriales en síntesis orgánica, en la producción de surfactantes, glicoles y polímeros,¹⁰ como disolventes orgánicos y como agentes de entrecruzamiento en procesos de manufactura. Destacan sus aplicaciones como agentes quimioterapéuticos,^{7,8,11,12} antibacterianos y antifúngicos y como esterilizantes de: alimentos, ropa, fármacos, material quirúrgico, libros, equipos médicos, farmacéuticos y científicos, etc.^{13,14}

Tabla 2.1.1. Vías de exposición a agentes alquilantes.

VÍAS DE EXPOSICIÓN A AGENTES ALQUILANTES			
EXÓGENA			ENDÓGENA
Ambiental	Ocupacional	Tratamiento quimioterápico	Se producen por vía metabólica
			<ul style="list-style-type: none"> - Nitrosación - Oxidación - ...

El uso generalizado de los agentes alquilantes hace que el ser humano se encuentre expuesto a este tipo de compuestos por vía exógena. Además, dado que se generan *in vivo* a partir de precursores, puede darse también exposición endógena a los mismos (tabla 2.1.1).

Como consecuencia de lo anterior, el estudio de la reactividad de los agentes alquilantes en general y frente a macromoléculas biológicas, en particular, es un tema de particular relevancia.

2.1.1.3 Reactividad de los agentes alquilantes

Los mecanismos de alquilación han sido descritos, entre otros, por Price⁴ y Ross.¹ En general, la efectividad de los agentes alquilantes transcurre a través de reacciones de sustitución nucleófila, S_N , que, según su curso cinético, se clasifican como unimoleculares, S_{N1} , o bimoleculares, S_{N2} . En las reacciones S_{N1} la etapa limitante de velocidad es la formación del intermedio reactivo –carbocatión– que reacciona posteriormente con el nucleófilo. Por eso la velocidad de reacción depende fundamentalmente de la concentración inicial de agente alquilante y es independiente de la de sustrato alquilable. Sin embargo, en las reacciones S_{N2} se produce una reacción concertada con desplazamiento de un grupo saliente, presente en el agente alquilante, por un nucleófilo más fuerte. La velocidad de las reacciones S_{N2} depende de la concentración de ambos reactivos, sustrato alquilable y agente alquilante. No existen reacciones puramente S_{N1} o S_{N2} , aunque suele prevalecer un tipo de reacción sobre la otra. El tipo de sustitución nucleofílica depende de factores como concentración de los reactivos, pH y naturaleza del disolvente, pero también de la naturaleza del propio nucleófilo.⁵ De hecho los agentes alquilantes pueden clasificarse, según el tipo de sustitución nucleofílica, como:

-Agentes alquilantes S_{N2} o agentes alquilantes tipo S_{N2} .

-Agente alquilantes S_{N1} o agentes alquilantes tipo S_{N1} .

No obstante, es más apropiado hablar de un agente alquilante con un mayor carácter S_{N1} o S_{N2} , pues existen también *agentes alquilantes denominados fronterizos S_{N1}/S_{N2}* .^{15,16} A pesar de no ser la recomendada por la IUPAC para

nombrar los mecanismos de alquilación,¹⁷ esta es la nomenclatura más habitual encontrada en bibliografía.

Otra clasificación se refiere al número de grupos electrófilos susceptibles de dar lugar a reacciones de alquilación. Con este criterio, los agentes alquilantes se clasifican como:

-*Monofuncionales*

-*Polifuncionales*

Los agentes alquilantes también han sido clasificados según su modo de actuación:

-*Agentes alquilantes directos*: son, *per se*, electrófilos capaces de producir la reacción de alquilación de forma directa. Pertenecen a este grupo especies tan dispares como epóxidos, nitrosoureas, sulfonatos, sultonas, haloéteres y algunas lactonas y mostazas.¹⁸⁻²⁰

-*Agentes alquilantes indirectos*: requieren metabolización previa para dar lugar a la especie alquilante; entre ellos se encuentran hidrocarburos, pigmentos azo, aminas aromáticas y dialquilnitrosaminas.²⁰



Figura 2.1.1. Clasificación de los agentes alquilantes de acuerdo con su reactividad.

La figura 2.1.2 muestra algunos agentes alquilantes típicos.

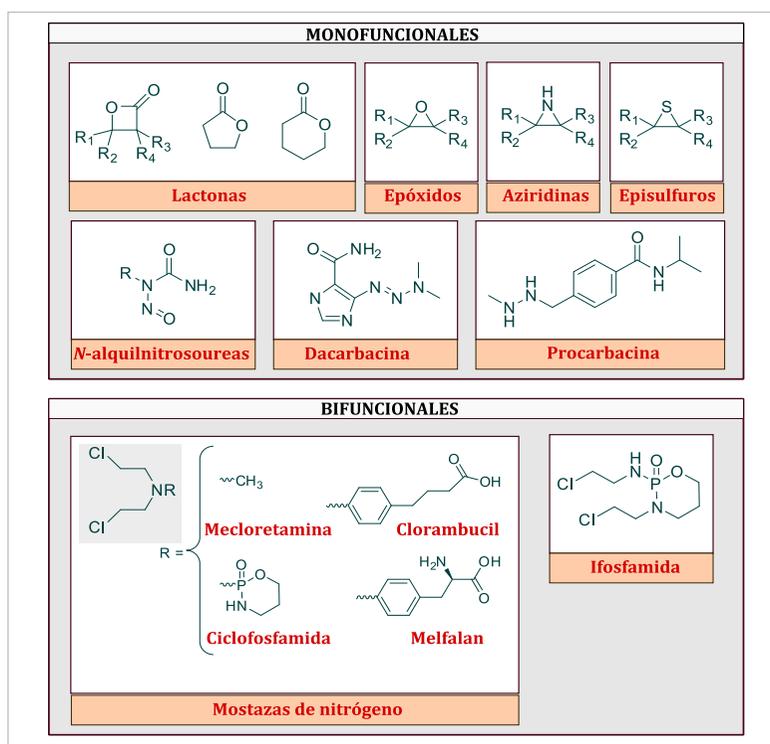


Figura 2.1.2. Agentes alquilantes típicos.

2.1.1.3.1 Ensayos químicos para investigar la reactividad de agentes alquilantes

Para estudiar la reactividad de los agentes alquilantes o simplemente detectarlos, se han desarrollado numerosos tests y métodos. Los reactivos más empleados se muestran en la figura 2.1.3.²¹⁻²⁵

Algunos métodos se han utilizado como modelos para estudiar la reactividad de especies bioactivas con macromoléculas y establecer correlaciones entre aquella y los efectos biológicos. Entre esos modelos destaca la NBP (4-(*p*-nitrobencil)piridina). El test de NBP es el método más generalizado; por ello se ha dedicado una sección exclusivamente a este test (Sección 2.1.2, pág. 31).²⁶ El ensayo colorimétrico o fluorimétrico con nicotinamida permite trabajar en condiciones más próximas a las biológicas que con el test de NBP, además de formar aductos más estables.^{27,28} Sin embargo su empleo no se ha generalizado tanto. El ensayo con *N*-mercaptoimidazol (MMI) se utiliza en la modelización de

la reactividad con los átomos de nitrógeno de las bases del ADN, para estudiar la capacidad alquilante S_N2 , como el test de NBP. Este ensayo tiene dos inconvenientes: la monitorización de la reacción es compleja, porque se hace con espectroscopia H-RMN, y presenta dos sitios reactivos, un átomo de azufre y otro de nitrógeno.²⁹ Para modelar la alquilación de los oxígenos o de la capacidad alquilante S_N1 se han utilizado de forma habitual las reacciones con el H_2O o con trifluoroacetato.²⁹⁻³¹

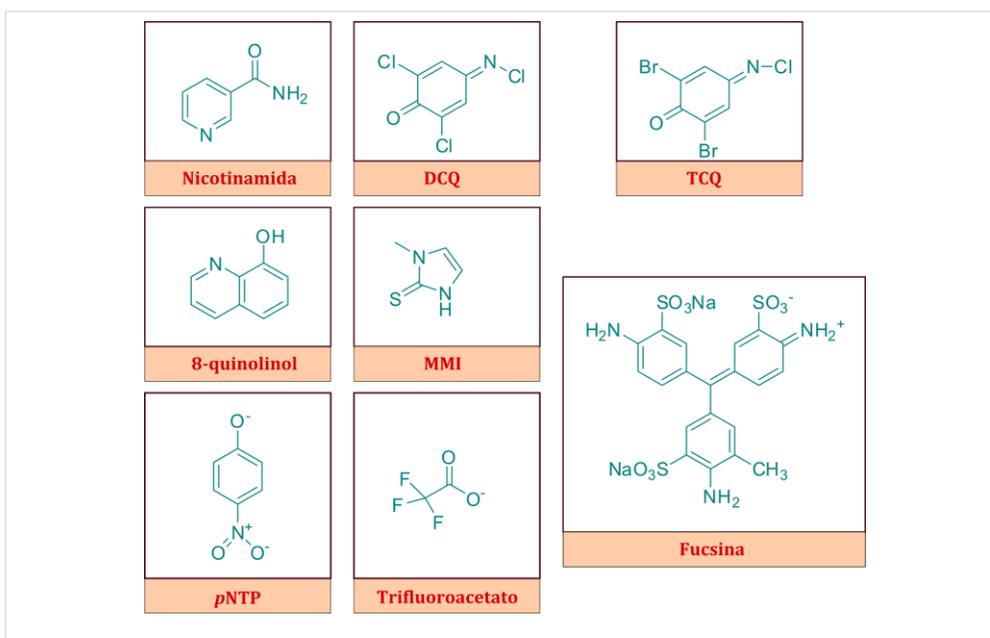


Figura 2.1.3. Moléculas utilizadas en la detección de agentes alquilantes.

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

2.1.1.4 Interacción de agentes alquilantes con macromoléculas

El primer artículo sobre interacción covalente de un carcinógeno químico con una macromolécula diana tisular fue el de Miller y Miller sobre aductos derivados del

N,N-dimetil-4-aminoazobenceno con proteínas en el hígado de ratas y ratones alimentados con este compuesto.⁵

2.1.1.4.1 Interacción de agentes alquilantes con proteínas

La reactividad de diferentes agentes alquilantes con las proteínas ha sido estudiada *in vivo* e *in vitro* por numerosos autores. Se sabe que a pH = 7,5 la práctica totalidad de los grupos carboxilo e imidazol sufren alquilación, haciéndolo entre el 11 y el 44% de los grupos α -amino. El resto de centros nucleófilos también pueden dar lugar a alquilación, aunque en pequeña proporción. Ross estudió la reactividad de algunos de esos centros.^{1,2}

Diversos estudios han establecido correlaciones cualitativas y cuantitativas entre reactividad de los agentes alquilantes con proteínas –generalmente proteínas nucleares asociadas al ADN– y su capacidad carcinógena.^{32,33}

2.1.1.4.2 Interacción de agentes alquilantes con ácidos nucleicos

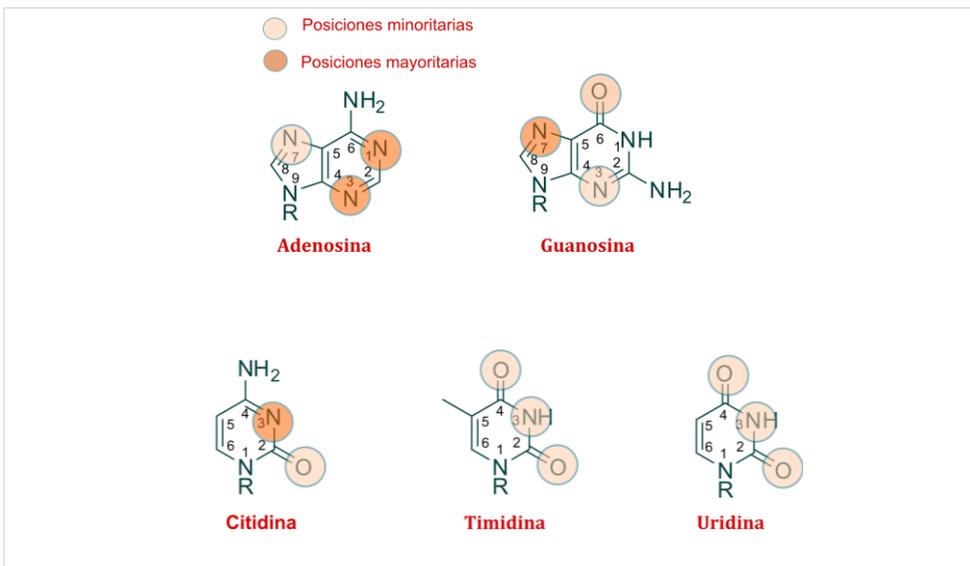


Figura 2.1.4. Sitios de unión de los nucleósidos con los agentes alquilantes (R=Ribosa).

Los agentes alquilantes reaccionan con los átomos de nitrógeno y oxígeno de las bases de los ácidos nucleicos, y con los grupos fosfato de ADN y ARN, para formar gran variedad de aductos covalentes (figura 2.1.4).^{6,34-36} Las características de los aductos formados dependen de diversos factores:³⁷

- *Reactividad química.* Se sabe que los agentes alquilantes tienen preferencia por algunas posiciones nucleófilas de los ácidos nucleicos:^{34,38,39} los agentes alquilantes tipo S_N1 muestran elevada afinidad por los átomos de oxígeno exocíclicos, y son agentes alquilantes mucho más reactivos que los S_N2, que reaccionan mayoritariamente con los átomos de nitrógeno de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.^{35,40} Sobre la base de su reactividad con los ácidos nucleicos, Loechler recomendó denominar a los agentes alquilantes S_N2 compuestos “low oxyphilic” y a los S_N1 “high oxyphilic”.³⁹ Los factores que dirigen la reactividad de los agentes alquilantes con los ácidos nucleicos son una combinación de factores estéricos y electrónicos. Algunas teorías han tratado de explicar el comportamiento observado (tabla 2.1.2):

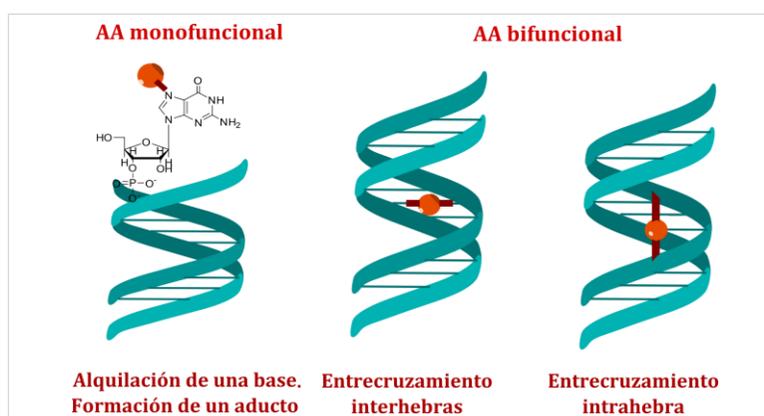
- En la escala Swain-Scott de nucleofilia/electrofilia, los nucleófilos con valores bajos de constante de sustrato, s , normalmente asociados a agentes alquilantes S_N1,⁴¹ tienen mayor afinidad por los centros menos nucleófilos del ADN, fosfatos y átomos de oxígeno. A valores más altos de s , mayor preferencia por los centros que poseen una mayor nucleofilia (átomos de nitrógeno) y particularmente por el N7 de la guanina.^{15,42-46}
- Según la teoría de los ácidos y bases duros y blandos, la reactividad observada se explica en términos de selectividad, los agentes alquilantes reaccionan con centros que poseen su misma naturaleza. La alquilación de los oxígenos fuertes se produce por agentes alquilantes fuertes y los centros débiles, átomos de nitrógeno, reaccionan con agentes alquilantes débiles.⁴⁷ Los agentes alquilantes pequeños y difundibles reaccionan con la posición N7.^{20,34,39}

Tabla 2.1.2. Reactividad entre agentes alquilantes y diferentes centros nucleófilos atendiendo a diferentes teorías.

Molecularidad	Fuerte/Débil	Swain-Scott	Principales posiciones reactivas	
	AA		Proteínas ³²	Ácidos nucleicos
S _N 1	Fuerte	s baja	ε- Lis ω-Arg	O
	Débil		-SH Cis 3 imidazol His	N
S _N 2	Pequeños y difundibles	s alta		N7

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

- *Número de centros reactivos que contenga el agente alquilante, es decir, si es mono o polifuncional.* Los agentes alquilantes monofuncionales contienen un único sitio reactivo, sólo pueden reaccionar con los ácidos nucleicos en una posición formando aducto covalente. Los agentes polifuncionales, después de formar aducto con una de las posiciones reactivas, pueden reaccionar con el ácido nucleico a través de otra posición, dando lugar a entrecruzamiento intrahebra o interhebras.

**Figura 2.1.5.** Efectos producidos por reacción de agentes alquilantes mono y bifuncionales con los ácidos nucleicos.

- *El tipo de grupo alquilo añadido.* El tamaño del grupo alquilo así como la presencia de grupos funcionales en el mismo, modifican los efectos causados por la alquilación.

- *El tipo de sustrato, ARN, ADN de hebra sencilla o doble hebra y la conformación de este último.* Hay que tener en cuenta que, en el caso del ADN doble hebra la reacción está también condicionada por efectos estéricos. Según sea la conformación en que se encuentre el ADN, las posiciones de ataque de los agentes alquilantes son más o menos accesibles. Cuando el ADN se encuentra en su configuración normal (ADN B), los átomos O⁶ y N⁷ de las guaninas son más accesibles que cuando el ADN se halla en conformación Z, levógira.⁴⁸

A continuación se describen los efectos biológicos derivados de la interacción de agentes alquilantes con el ADN u otras macromoléculas.

2.1.1.5 Actividad biológica de los agentes alquilantes

2.1.1.5.1 Actividad biológica de agentes alquilantes monofuncionales

Los agentes alquilantes monofuncionales al interactuar con las bases del ADN, pueden dar lugar a mutaciones puntuales, que pueden:

- Alterar el marco de lectura. Por inserción/delección: Uno o más pares de nucleótidos se insertan o se eliminan. Este tipo de mutaciones, salvo que se compensen entre sí, pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada y sus consecuencias suelen ser graves.
- No alterar el marco de lectura. Se produce cuando tiene lugar la sustitución de pares de bases. Las mutaciones se denominan en ese caso:
 - *Transiciones:* Las purinas y pirimidinas son reemplazadas por bases del mismo tipo.
 - *Transversiones:* Las purinas son reemplazadas por pirimidinas y viceversa.

Las sustituciones provocan la alteración de un único triplete y por tanto, salvo que indiquen un triplete de parada, o un aminoácido del centro activo de una enzima, pueden no ser perjudiciales.

En la tabla 2.1.3 se recogen las principales mutaciones asociadas a la alquilación del ADN. Puesto que las posiciones que sufren alquilación son mayoritariamente O^6 y $N7$ de la guanina, cabe destacar sus posibles consecuencias biológicas. Es necesario tener en cuenta que, en caso de producirse, desde que tiene lugar la mutación puntual hasta la aparición del efecto biológico, pueden transcurrir mecanismos muy complejos (reparación, recombinación, reordenamiento...) y que, por tanto, lo que a continuación se apunta es sólo un esbozo de las posibles consecuencias biológicas.

Tabla 2.1.3. Mutaciones asociadas a la alquilación en las principales posiciones en el ADN.^{37,49}

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

La estabilidad de los aductos con el ADN parece estar correlacionada con la aparición de tumores.^{6,50} Las lesiones producidas por alquilación en la posición O^6 tienen mayor capacidad mutágena que las generadas por la formación de aductos $N7$ -alquilguanina.³⁴ Mientras que la alquilación en la posición O^6 produce aductos estables que alteran los puentes de hidrógeno (lo que puede producir mutagenia y errores en la codificación), los aductos $N7$ -alquilguanina son inestables y no afectan a los puentes de hidrógeno.^{34,51} La transición G-A producida tanto por alquilación de $N7$ como de O^6 , si no es reparada, puede acarrear la producción de proteínas defectuosas y, según sea el papel de esa proteína, se producirán consecuencias biológicas o no.

Las mutaciones puntuales tienen un papel importante en diferentes procesos biológicos, como la activación de oncogenes. La mutagenia directa por mal apareamiento de las bases, atribuida a la alquilación de átomos de las bases que alteran la especificidad del apareamiento (ej: *O*⁶-alquilguanina), puede producir recombinaciones y, con ellas, la muerte celular, aberraciones cromosómicas o intercambio de cromátidas hermanas.⁵² La mutagenia indirecta no causa efectos *per se* sino que depende de otros procesos, como que se produzcan errores en los procesos enzimáticos de reparación.^{49,53} Por otro lado, la depurinación (escisión del residuo de guanina por alquilación *N*7), puede provocar ruptura de la cadena del ADN,¹¹ y con ella la muerte celular o el reordenamiento cromosómico que puede tener consecuencias nefastas.⁵⁴

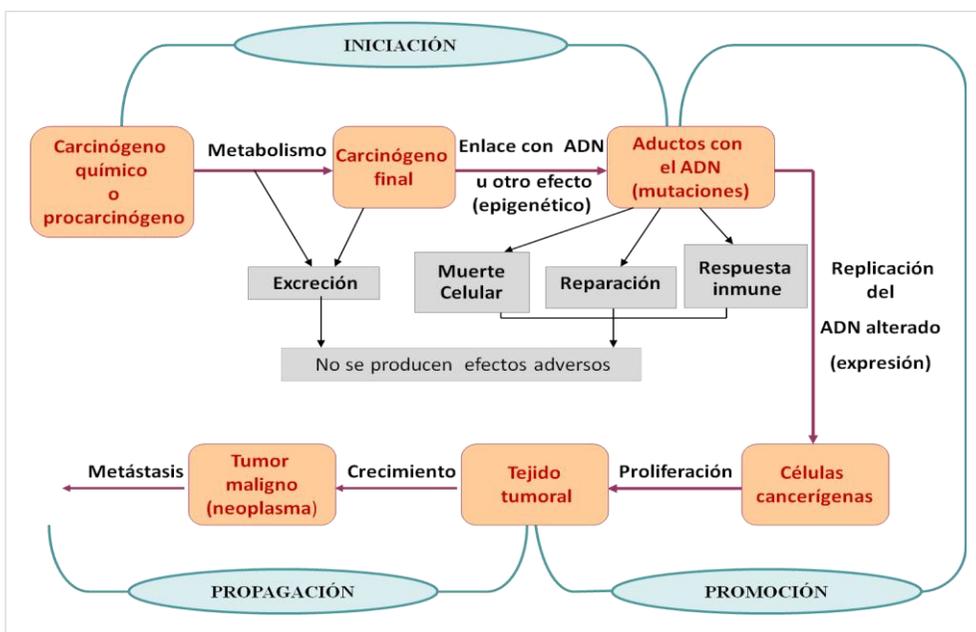


Figura 2.1.6. Etapas de la carcinogénesis.

Las lesiones del ADN debidas a exposición endógena ascienden a 20.000 por día y célula. Aunque no se sabe cuál es la contribución exacta de los procesos de alquilación, se conoce que existen numerosos mecanismos de reparación específicos para las lesiones producidas por alquilación directa o indirecta. Este hecho hace pensar que el número de lesiones generadas por ese mecanismo sea

muy elevado.³⁵ Numerosas lesiones en el ADN, susceptibles de producir mutaciones son reparadas y no producen ningún efecto. Sin embargo, cuando la lesión no consigue ser reparada, ni da lugar a muerte celular o generación de una respuesta inmune, se produce la replicación del ADN alterado, que puede causar aparición de tumores (figura 2.1.6).⁵⁵

Entre los efectos biológicos de los agentes alquilantes monofuncionales, destacan además de su capacidad mutágena, tumorigena y carcinógena, su toxicidad, citotoxicidad, clastogenia y teratogenia, entre otros.⁵²

2.1.1.5.2 Actividad biológica de agentes alquilantes bifuncionales

Los agentes moleculares bifuncionales reaccionan con dos centros nucleófilos situados en moléculas diferentes. En el medio biológico se forma inicialmente un aducto covalente que luego reacciona con otro nucleótido, proteína o macromolécula. Los entrecruzamientos intrahebra del ADN o entre el ADN y una proteína o el glutatión, no tienen efectos tan nocivos como los producidos por el entrecruzamiento entre hebras del ADN opuestas.⁵⁶ En este último caso el entrecruzamiento imposibilita la replicación del ADN al impedir que se separen las dos hebras. El efecto es muy citotóxico y produce una elevada muerte celular.⁵⁷ De hecho los aductos bifuncionales formados entre hebras opuestas son hasta cien veces más citotóxicos que los aductos monofuncionales.⁵⁶ Se han tratado de establecer correlaciones estructura-actividad para los agentes alquilantes bifuncionales y se ha comprobado que, aunque no existe correlación entre la constante del sustrato, σ , y potencial cancerígeno, sí la hay entre éste y su toxicidad aguda en roedores (expresada como LD₅₀).⁴⁶

A pesar de que los agentes alquilantes bifuncionales poseen capacidad citotóxica más alta que los monofuncionales, como todos los compuestos manejados en este trabajo son alquilantes monofuncionales, a partir de ahora centraremos nuestra atención exclusivamente en ellos.

2.1.1.6 Ensayos biológicos utilizados para determinar la actividad biológica

Hay gran variedad de ensayos para conocer los efectos biológicos (mutagenia y genotoxicidad) de diversas sustancias, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre bacterias y células de mamíferos.⁵⁴ En la figura 2.1.7 se muestran algunos de los más utilizados.⁵⁸

TESTS DE MUTAGENIA Y GENOTOXICIDAD			
		IN VITRO	IN VIVO
Efectos detectados	En bacterias	En células de mamíferos	
Mutaciones puntuales	S. Typhimurium E.Coli	Ensayo de mutación génica HPRT Ensayo de mutación génica Linfoma TK ratas	ADN modificado covalentemente
Daño cromosómico		Test de micronúcleos Análisis de metafase	Test de micronúcleo en células eritropoyéticas Análisis de metafase
Genotoxicidad			Modelos de animales transgénicos Ensayos de ruptura de hebra de ADN Síntesis de ADN no programada en hígado (UDS)

Figura 2.1.7. Principales tests utilizados para determinar la capacidad mutágena y genotóxica.

Por su rapidez, sencillez, sensibilidad y bajo coste y porque evitan el uso de animales de experimentación, los más comúnmente utilizados son los tests *in vitro*:

- a) *Ensayo de mutagenia inversa en bacterias (Test de Ames).*

Permite detectar mutaciones estructurales o de sustitución de pares de bases, con distintas cepas (tabla 2.1.4). También permite trabajar con o sin fracción microsomal (activación metabólica), lo que posibilita no sólo la determinación de la actividad biológica de una sustancia, sino también de sus metabolitos. El test de Ames es normalmente el tomado como criterio, siendo el más usado en los laboratorios de todo el mundo.^{59,60-63}

- b) *Ensayos con células de mamíferos in vitro.*

Permiten la detección de mutaciones puntuales y de aberraciones cromosómicas.⁵⁸

Los ensayos biológicos permiten clasificar las sustancias según su actividad biológica, regular la exposición a las mismas y reducir los riesgos asociados. De hecho existen diversos organismos dedicados a estos fines, tales como la IARC, EPA, NIHS, etc.

Tabla 2.1.4. Mutaciones puntuales detectadas en distintas cepas de *Salmonella Typhimurium*.⁶³

Cepas <i>S. Typhimurium</i>	Efecto detectado
TA 1536	Inserción o deleción
TA 98	Deleción
TA 1538	Deleción
TA 97	Inserción
TA 1537	Inserción
TA 100	Sustitución pares de bases
TA1535	Sustitución pares de bases

2.1.1.7 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

Las etapas involucradas en el proceso cancerígeno sugieren la existencia de correlación entre la actividad biológica de los agentes alquilantes y su reactividad química. Fue en la década de los años sesenta cuando se establecieron las primeras correlaciones. Se utilizaron diferentes teorías para clasificar las reacciones de los agentes alquilantes con nucleófilos y macromoléculas biológicas (ácidos nucleicos y proteínas).¹ El análisis sistemático de los efectos biológicos producidos por agentes alquilantes monofuncionales permitió establecer con posterioridad correlaciones semicuantitativas entre estructura y propiedades fisicoquímicas y la mutagenia, clastogenia y actividad citotóxica.⁶⁴ Se observó que entre los principales factores involucrados en la efectividad biológica se encontraban la reactividad y la selectividad, aunque también existen otros que deben ser tenidos en cuenta, como: i) la distribución en los tejidos, determinada fundamentalmente por la constante de reparto; ii) factores estéricos; iii) reacciones secundarias de las moléculas alquiladas

y sus consecuencias. A partir de entonces se han establecido numerosas correlaciones entre parámetros que caracterizan la reactividad química (velocidad de alquilación, velocidad de hidrólisis, solubilidad en agua, variación de s , proporciones de aductos O^6 -/ N^7 -alquilguanina) y los efectos biológicos (mutagenia, carcinogenia, potencial tumorigeno, etc).^{1,18,46,65-67}

Tanto la existencia de una correlación entre factores químicos y biológicos como su ausencia aporta una valiosa información acerca del modo de acción de los compuestos químicos a la hora de producir los efectos biológicos.

Las correlaciones que suscitan actualmente un mayor interés son las cuantitativas entre la actividad química y la efectividad biológica. A continuación se profundiza en los modelos utilizados habitualmente en su establecimiento.

2.1.1.7.1 Correlaciones basadas en la concentración de sustancia bioactiva necesaria para observar un determinado efecto

Las correlaciones cuantitativas entre respuesta biológica a sustancias bioactivas y su reactividad se estudian con modelos basados en consideraciones cinéticas. La mayoría de ellos consideran dos fases: i) la llegada al lugar de acción en la célula (Fase I) y ii) reacción que inicia el desarrollo de la respuesta biológica (Fase II).

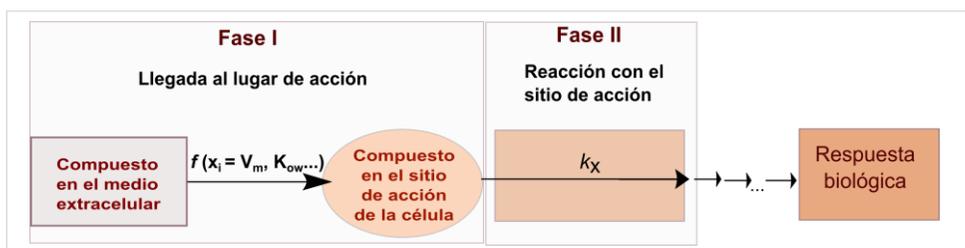


Figura 2.1.8. Respuesta biológica a especies bioactivas.⁶⁸

Inicialmente la especie bioactiva, que se encuentra en muy baja concentración en el exterior de la célula, se introduce en ésta y alcanza el sitio de acción dentro del orgánulo correspondiente. La velocidad de este proceso es lenta y depende sustancialmente de la estructura molecular y de las propiedades

físicoquímicas de la especie bioactiva. Una vez alcanzado el lugar de acción, se considera que existe una reacción limitante de velocidad que inicia el desarrollo de la respuesta biológica.

Según el modelo de Hansch, pionero de las correlaciones estructura/reactividad cuantitativas (QSAR), la velocidad de la respuesta biológica, R (Ec. (2.1.1)), es proporcional a la probabilidad, P , de que la molécula alcance el sitio de acción en un intervalo de tiempo dado. La probabilidad: i) depende de propiedades estructurales del compuesto, x_i , tales como su volumen molecular, V_m , y constante de reparto, K_{ow} , entre otros; y ii) sigue una distribución normal.⁶⁸

$$v_{\text{respuesta biológica}} = \frac{d(R)}{dt} = P[A]k_x \quad (2.1.1)$$

$[A]$ es la concentración extracelular de la especie bioactiva. El producto $P[A]$ representa su concentración efectiva en los sitios de acción y k_x es la constante de velocidad de la reacción entre el compuesto y el sitio de acción.

La expresión (2.1.2) correlaciona reactividad y propiedades físicoquímicas con C , concentración de compuesto necesaria para producir una determinada respuesta biológica (TD_{50} , LC_{50} , ED_{50} ...):

$$\log \frac{1}{C} = + \frac{2x_i x_{i0}}{b} - \frac{(x_i)^2}{b} - \frac{(x_{i0})^2}{b} + B + \log k \quad (2.1.2)$$

b y B son dos parámetros constantes, siendo x_{i0} el valor de las propiedades estructurales de un compuesto con sustituyentes tales que hace mínima la variación de energía libre en el proceso de penetración en la célula.⁶⁸

Cuando se estudia una serie de compuestos aromáticos derivados de un compuesto parental de referencia, se puede utilizar otra expresión, análoga a la (2.1.2), en la que se incluyen los efectos electrónicos de los sustituyentes:

$$\log \frac{1}{C} = + \frac{2x_i x_{i0}}{b} - \frac{(x_i)^2}{b} - \frac{(x_{i0})^2}{b} + \rho \sigma + \log B' \quad (2.1.3)$$

En la ecuación (2.1.3) B' es un parámetro constante, σ es la constante de Hammett –parámetro que caracteriza el carácter dador ($\sigma < 0$) o atractor ($\sigma > 0$) del sustituyente– y ρ es la constante de reacción que da cuenta de la sensibilidad de la constante de velocidad al cambio de sustituyente.

Hansch y colaboradores incluyeron variaciones en su modelo (figura 2.1.9), admitiendo que el proceso limitante de velocidad puede ser físico o químico.⁶⁹⁻⁷⁵

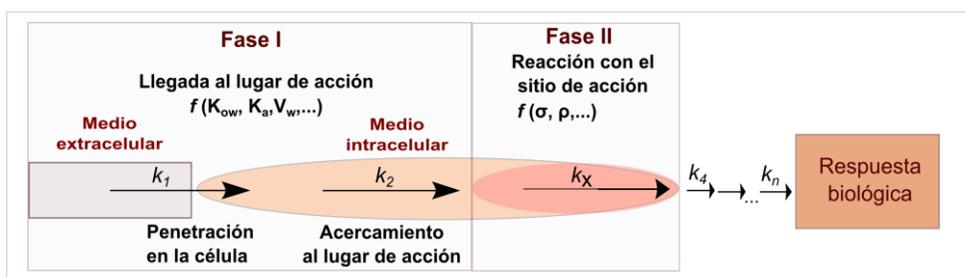


Figura 2.1.9. Respuesta biológica a especies químicas bioactivas. Modificado a partir de Hansch *et al.*⁷²

Estas modificaciones han conducido a otra correlación entre $\log 1/C$ y los parámetros físicoquímicos:

$$\log \frac{1}{C} = B'' + k_x (\log k_i) \quad (2.1.4)$$

donde B'' es un parámetro constante y k_i es la constante de velocidad de la etapa limitante (química o física). En el caso de que fuese uno de los procesos descritos (figura 2.1.9), se correspondería con k_1, k_2, k_x o k_4 .

Según esta correlación, las moléculas altamente hidrófilas no traspasan las barreras lipofílicas y su probabilidad de producir efectos biológicos es muy baja.

Analizando la influencia de cada uno de los factores en las diferentes correlaciones se puede establecer su contribución a la efectividad biológica.

Numerosos autores han utilizado el modelo de Hansch. Se han encontrado, entre otras, buenas correlaciones entre la toxicidad y la constante de reparto en el sistema agua/octanol.^{70,71,73}

2.1.1.7.2 Correlaciones basadas en la expresión de la respuesta biológica como frecuencia de mutación

Existen otros modelos que tratan de establecer correlaciones entre la reactividad y la respuesta biológica expresada como frecuencia de mutación. Destaca el modelo de Hakura⁷⁶ que relaciona la mutagenia con dos procesos que transcurren en la célula: la propia modificación química mutágena (en la que intervienen una serie de procesos químicos y fisicoquímicos) y la subsiguiente respuesta biológica. La frecuencia de mutación inducida por un mutágeno químico, MF , se atribuye a un proceso cinético químico.

La ecuación (2.1.5) se utiliza para definir la frecuencia de mutación, MF . En ella M es el número de revertientes en la muestra que contiene el mutágeno, M_o el de control y, N el número de células supervivientes; todos ellos referidos a 1 ml de mezcla de reacción. MF , depende de la constante de velocidad de la reacción que produce la \tilde{k} , mutación, y de la dosis, D . En la ecuación (2.1.5) m y n son dos parámetros constantes.

$$MF = (M - M_o) / N = m(\tilde{k}D)^n \quad (2.1.5)$$

Tomando logaritmos y despejando se obtiene la expresión (2.1.6) que, para $D = 1$ se convierte en la (2.1.7).

$$\ln MF = \ln m + n \ln \tilde{k} + n \ln D \quad (2.1.6)$$

$$\ln(MF)_{D=1} = \ln m + n \ln \tilde{k} \quad (2.1.7)$$

Las evidencias experimentales han permitido correlacionar, además de la frecuencia de mutación, otras muchas respuestas biológicas (R) con las constantes de velocidad o con otros parámetros asociados mediante expresiones similares a las anteriores.^{53,70,71,73,77-82}

2.1.2 Test de NBP

2.1.2.1 Desarrollo histórico del test de NBP

2.1.2.1.1 Primeras aplicaciones: Detección de agentes alquilantes

Los primeros pasos en el desarrollo del test de NBP se dieron a principios del siglo XX en el ámbito médico y militar en busca de un método de detección de agentes alquilantes. Ello es consecuencia lógica del importante papel de los agentes alquilantes, en ese momento, como armas químicas y como agentes quimioterapéuticos.^{7,8,83}

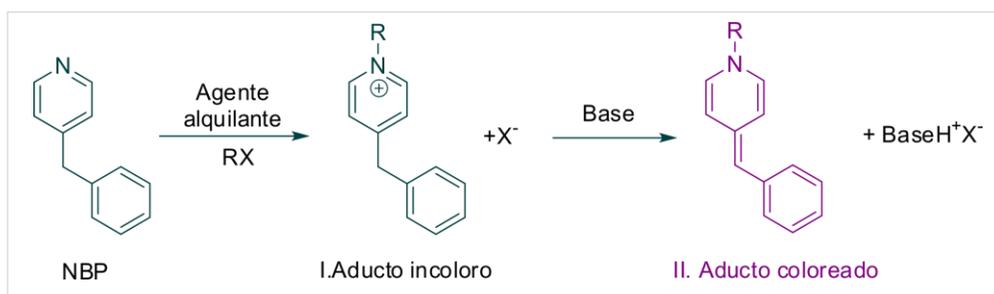


Figura 2.1.10. Reacción de alquilación de NBP por un agente alquilante RX.

Fue en 1925 cuando se utilizó por primera vez la molécula 4-(*p*-nitrobenzil) piridina (NBP), para detectar agentes alquilantes comprobándose que actuaba como los análogos bencílicos manejados anteriormente.⁸⁴ A partir de este momento los métodos de detección de agentes alquilantes alcanzaron un gran desarrollo, debido al descubrimiento de su papel como vesicantes, mutágenos, carcinógenos y cocarcinógenos, además del riesgo potencial asociado al uso de estos compuestos como armas químicas. El primero en descubrir que la reacción con NBP podía utilizarse para detectar gas mostaza fue Brown en 1941.⁸⁵ Gehauf y Braun utilizaron la reacción general para detectar algunos compuestos orgánicos alquilantes. El procedimiento consistía en adsorber los vapores de los haluros de alquilo en silica gel impregnada de NBP. Se comprobó así que la adición de una base inducía la aparición de colores que variaban del azul al violeta y al marrón.⁸⁵

El mecanismo de reacción fue propuesto en el año 1944 tras aislar los intermedios de reacción.⁸⁵

2.1.2.1.2 Aplicaciones cuantitativas del test de NBP

El grupo de Epstein fue pionero, en 1955, en la aplicación del método con objetivos cuantitativos e incluso cinéticos.⁸⁵ El procedimiento se basaba en la medida de la absorbancia del aducto formado entre la NBP y el agente alquilante AA tras la adición de una base. Se observó el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por parte del aducto NBP-AA formado. Estos autores fueron los primeros en encontrar las condiciones óptimas para el test de NBP. Advirtieron la importancia de hacer las medidas inmediatamente después de la adición de la base debido a la inestabilidad del aducto coloreado en medio básico.

Desarrollaron dos métodos diferentes, uno para compuestos solubles en agua y otro para los solubles en disolventes orgánicos. En numerosas investigaciones han sido utilizados ambos procedimientos con pequeñas modificaciones.^{18,19,27,28,86-127}

Como en realidad, son diferencias de matiz, a partir de 1955 muchos autores se refieren al test de NBP como test de Epstein. Lo mismo ocurrió con otra modificación posterior que en ocasiones se ha denominado test de Preussman.¹²⁸⁻¹³⁵

2.1.2.1.3 Aplicación del test de NBP en muestras biológicas

En 1960 la atención de los científicos se centró en la búsqueda de correlaciones entre carcinogenicidad, toxicidad o actividad inhibitoria del desarrollo de tumores de los compuestos investigados y algunas de sus propiedades químicas como la solubilidad en agua, constante de reparto y reactividad química frente a nucleófilos. El objetivo principal fue alertar y prevenir de los peligros de exposición a estos compuestos y también, en el caso de los utilizados en medicina, la mejora de los medicamentos y sus dosis.^{1,5,7,66,83,136-140}

Por esas razones el test de NBP experimentó gran desarrollo en el ámbito biológico. Se incluyeron modificaciones en el método para poder hacer frente a los problemas añadidos por el tratamiento de muestras biológicas. Aunque se han utilizado otras muchas modificaciones,^{86,126,127,141-148} la más conocida y más aplicada ha sido la de Friedman y Boger,¹⁴⁹ que utilizaban NaOH para desprotonar el aducto formado y una etapa de extracción del producto coloreado con acetato de etilo.¹⁵⁰⁻¹⁵⁹

2.1.2.2 La NBP: modelo del ADN

Los ácidos nucleicos son moléculas complejas con numerosos centros nucleófilos susceptibles de mecanismos de alquilación. Como investigar la reactividad de los agentes alquilantes con estas moléculas supone una inversión elevada de tiempo y dinero, esta dificultad se trata de soslayar con frecuencia trabajando con los distintos nucleótidos o nucleósidos por separado, lo que disminuye el número de centros reactivos. Aún así la solubilidad de las bases nitrogenadas en agua es baja y el seguimiento cinético de las reacciones sigue resultando complejo. Por eso se ha trabajado en numerosas ocasiones con moléculas modelo mucho más sencillas que facilitan sustancialmente el trabajo (piridina, anilina, nicotinamida, NBP...).

La NBP se emplea con frecuencia porque: i) permite modelar la reactividad del ADN y en particular del N7 de la guanina, de nucleofilia muy similar a la de la NBP; ii) presenta múltiples ventajas para estudiar la reactividad de agentes alquilantes:^{142,160,161}

- El seguimiento de la reacción es sencillo (espectroscopia UV-vis).
- Es un ensayo rápido¹⁵² y barato.^{151,162}
- Muestra alta reproducibilidad.¹⁶³
- Es versátil (aplicable a infinidad de agentes alquilantes).^{112,160,164-167}
- Posee una elevada sensibilidad, que permite realizar estudios con concentraciones muy bajas de agente alquilante.^{112,163,168,169}

- Permite estudiar la reactividad utilizando sistemas de activación y estudiar agentes alquilantes indirectos.^{152,170}

Por estas razones el test de NBP se utiliza ampliamente en el estudio mecanístico y cinético de la reactividad de agentes alquilantes y en el establecimiento de correlaciones reactividad/efectos biológicos, a pesar de los posibles inconvenientes que puede implicar su empleo:

- Los medios de trabajo son diferentes al biológico. La insolubilidad de la NBP en agua limita el medio de trabajo a mezclas acuorgánicas y las concentraciones salinas pueden ser diferentes a las biológicas.
- No es un método específico.
- Los aductos NBP-AA se hidrolizan en medio básico por lo que las medidas deben hacerse inmediatamente después de la adición de la base.¹⁶³
- Si se trabaja en medio ácido, es necesario considerar su pKa.
- La aplicación habitual del test, en ausencia de un sistema de activación, no permite la detección o el seguimiento de agentes alquilantes indirectos.
- El impedimento estérico puede ser muy diferente al de los centros reactivos de los ácidos nucleicos.

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

2.1.2.2.1 ¿La NBP modela realmente el ADN?

Estrictamente hablando, la NBP no sería plenamente idónea para modelar al ADN debido a las circunstancias apuntadas. Sin embargo, puede ser muy útil para modelar la reactividad de la posición más nucleófila del ADN, el N7 de la guanina.

2.1.2.2.1.1 Nucleofilia

La escala de nucleofilia/electrofilia más generalizada en los estudios con ADN es la de Swain-Scott.⁴¹ De acuerdo con la ecuación (2.1.8), la nucleofilia se obtiene a

partir de las constantes de velocidad de la reacción de diversos electrófilos en agua (k_o) y en presencia de un nucleófilo N, k_N . La nucleofilia, n_N , es una constante característica de cada centro nucleófilo en disolución acuosa. Es un valor relativo al del agua que se toma como referencia, $n_o = 0$. El valor de referencia de s ($s = 1$) es el del bromuro de metilo a 25,0 °C.⁴¹

$$\log \left(\frac{k_N}{k_o} \right) = s(n_N - n_o) \quad (2.1.8)$$

Tabla 2.1.5. Nucleofilia de Swain-Scott de algunos nucleófilos comunes.

Nucleófilo	Fórmula	n_N	Ref.
ADN ^a		2,5-2,6	171
ADN monohebra ^a		5,4	15,172
Guanina N7		3,5-3,6	171
Guanina O ⁶		0,5-1,5	171
Cisteína - RS y -RSH*		5	171
Fosfato ADN ^a		1	15,173
Fosfato inorgánico	H ₂ PO ₄ ⁻	2,5	64,174
Acetato	CH ₃ COO ⁻	2,72	41
Tiosulfato	S ₂ O ₃ ²⁻	6,36	41
Azida	N ₃ ⁻	4,00	41
Hidróxido	HO ⁻	4,20	41
Yoduro	I ⁻	5,04	41
Anilina	C ₆ H ₅ NH ₂	4,43-4,49	41
Piridina	C ₆ H ₅ N	4,27	175
NBP		3,5	172

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

Como muestran los valores reseñados en la tabla 2.1.5, la nucleofilia de la NBP es similar a la de la posición N7 de la guanina, aunque dista apreciablemente de la del ADN y de las de los restantes centros nucleófilos de los ácidos nucleicos (grupo fosfato y posición O⁶ de la guanina). Se observa también que las nucleofilias de otras moléculas utilizadas ocasionalmente como modelos del ADN, piridina y anilina, tienen nucleofilias similares entre ellas pero distintas de las del ADN y de las de sus principales centros nucleófilos.

2.1.2.2.1.2 La NBP como modelo de la posición N7 de la guanina

Aparte de la nucleofilia, la NBP y la posición N7 de la guanina, tienen otras similitudes entre sí: las configuraciones electrónicas de sus centros nucleófilos¹⁷⁶ y el impedimento estérico, considerando la guanina monómera. Las diferencias residen en la reactividad: mientras la NBP no es selectiva y reacciona tanto con nucleófilos S_N1 como S_N2 ,¹⁷⁷ la posición N7 de la guanina lo hace fundamentalmente con los S_N2 . Además, el impedimento estérico de la guanina, cuando forma parte del ADN, es mucho mayor que el de la NBP. Este hecho afecta a los agentes alquilantes de mayor tamaño que sí presentan reactividades diferentes frente a ambos nucleófilos, lo que puede dar lugar a la aparición de falsos positivos en el ensayo de NBP.

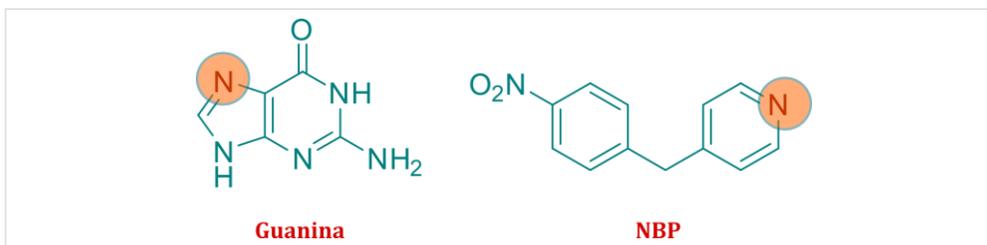


Figura 2.1.11. Estructura de la guanina y la NBP.

Puede, pues, considerarse a la molécula NBP como un buen modelo de la posición N7 de la guanina sólo para reactivos pequeños y con gran afinidad por esta posición. Para los agentes alquilantes S_N2 de pequeño tamaño, se puede considerar también que la NBP es un buen modelo del ADN para establecer correlaciones entre reactividad y efectos biológicos. Puesto que la mayoría de los aductos entre estos agentes alquilantes y el ADN se forman en la posición N7 de la guanina, su formación se considera evidencia del potencial genotóxico.³⁴

La NBP no es un buen modelo de reactividad para agentes alquilantes S_N1 que reaccionan preferentemente con los oxígenos de las bases. En estos casos sólo tiene sentido estudiar la reactividad con la NBP cuando paralelamente se produce la reacción de hidrólisis, dado que el valor de s estimado a partir de las constantes

de velocidad obtenidas en las dos reacciones se puede correlacionar con la proporción de aductos *O*⁶-/*N*⁷-alquilguanina y, a su vez, con la mutagenia y carcinogenia, como se verá más adelante (pág.43).

2.1.2.3 Aplicaciones del test de NBP

Las aplicaciones del test de NBP para la detección de agentes alquilantes han sido muy variadas y pueden clasificarse en atención a objetivos cinéticos y no cinéticos.

2.1.2.3.1 Aplicaciones no cinéticas

Las principales aplicaciones no cinéticas del test de NBP, además de la detección cualitativa o cuantitativa de agentes alquilantes, son las dedicadas a la búsqueda de correlaciones entre la actividad química y la actividad biológica (mutagenia, carcinogenia, toxicidad...). Los principales objetivos en este último caso son:

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

Para el establecimiento de correlaciones se consideran siempre aquellos efectos biológicos en los que el proceso químico involucrado en su aparición es, o puede ser, la reacción de alquilación. Como la NBP es un buen modelo de la reactividad del *N*⁷ de la guanina, hay que considerar las posibles consecuencias biológicas de la alquilación en esta posición.

2.1.2.3.1.1 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

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

2.1.2.3.1.2 Mutagenia-reactividad química (Ames-NBP)

Para establecer correlaciones entre reactividad química y potencial mutágeno frecuentemente se han combinado las respuestas obtenidas con el test NBP y con el de Ames.^{28,77,98,100,103,105,115,116,178-181} Debido al elevado grado de correlación entre las respuestas a ambos ensayos (figura 2.1.12), se ha considerado a la molécula de NBP como modelo en la búsqueda de correlaciones cuantitativas y semicuantitativas.

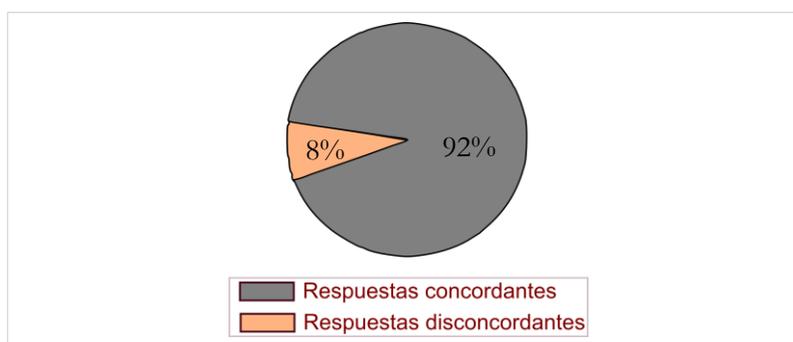


Figura 2.1.12. Grado de concordancia/discordancia entre los respuestas obtenidas en los test de Ames y NBP para 126 compuestos.

Es de interés hacer notar que la discordancia entre las respuestas a ambos test se observa con frecuencia en los casos en que el agente mutágeno es un metabolito y no la especie inicial (y no se ha trabajado en presencia de un sistema de activación metabólica) o con agentes alquilantes muy poco reactivos.^{90,96,98,100,105,120,121,160,170,182,183} En la tabla 2.1.6 se muestran las respuestas obtenidas en función de los compuestos analizados.

Se han podido establecer algunas correlaciones mutagenia-reactividad semicuantitativas y cuantitativas para series de agentes alquilantes, formadas generalmente por compuestos estructural o funcionalmente relacionados.^{28,77,99,103,115,121,178,184} No obstante, en algunas ocasiones, entre series de compuestos similares no se han observado correlaciones.^{18,103,133,179-181,185} Este hecho se ha atribuido a admitir un mismo coeficiente de absorción molar para

todos los compuestos. Entre mutagenia y reactividad de compuestos de diferente naturaleza no se obtienen correlaciones satisfactorias.

Tabla 2.1.6. Correlación cualitativa mutagenia-reactividad de los resultados obtenidos en los test de NBP y Ames.

Compuestos	Número de compuestos	Respuestas concordantes Ames-NBP	Respuestas discordantes Ames-NBP	Refs.
Haluros de alquilo	10	10	0	77,119
Epóxidos	16	15	1	96,99,105
Lactonas	2	2	0	183
Varios	40	37	3	18,90,115,170
Dibromoalcanos	6	5	1	121
Organofosfatos	4	0	4	133
Metilfeniltriacenos	4	4	0	95
N-alquilnitrosoureas	15	14	1	179,186
Alil- o alílicos	29	29	0	77,116
TOTAL	126	116	10	

2.1.2.3.1.3 Carcinogenia/genotoxicidad-reactividad química

La respuesta en el test de NBP suele utilizarse como parámetro indicador de la capacidad carcinógena de un compuesto. Se han encontrado buenas correlaciones cualitativas, particularmente cuando se utiliza un sistema de activación metabólica.¹⁷⁰ También se ha comprobado que compuestos reactivos en ese test de NBP muestran capacidad genotóxica, dan lugar a: aberraciones cromosómicas,¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ ruptura de las hebras del ADN,^{187,191} la síntesis incontrolada de ADN (ensayo UDS),¹⁹² intercambio de cromátidas hermanas (SCE).^{188,189,193} Incluso se han observado correlaciones cuantitativas entre algunos de estos parámetros y la reactividad con la NBP.^{191,192}

2.1.2.3.1.4 Reactividad química-capacidad antitumoral

Algunos agentes alquilantes, se utilizan en el tratamiento del cáncer debido a su capacidad antitumoral a través de mecanismos análogos a los inductores de mutaciones malignas. Por eso, al igual que la capacidad alquilante se ha considerado parámetro para predecir la capacidad mutágena, puede serlo también

para predecir la antitumoral. Así lo avalan resultados de diversas investigaciones.^{129,157,158,194,195}

2.1.2.3.2 Aplicaciones cinéticas

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

- La elucidación de los mecanismos por los que los agentes alquilantes ejercen su actividad biológica.
- El establecimiento de correlaciones cuantitativas entre la reactividad química y los efectos biológicos, de forma más completa que sin la realización de estudios cinéticos.

El mecanismo general de alquilación de NBP por un agente alquilante en un medio acuoso o acuoorgánico se esquematiza en la figura 2.1.13: la reacción de hidrólisis del agente alquilante compite con la reacción de alquilación de NBP que da lugar a la formación de un aducto inestable (AD) que, a su vez, se descompone. Aunque pueden intervenir otras reacciones, este esquema resume las reacciones que tienen lugar más frecuentemente.

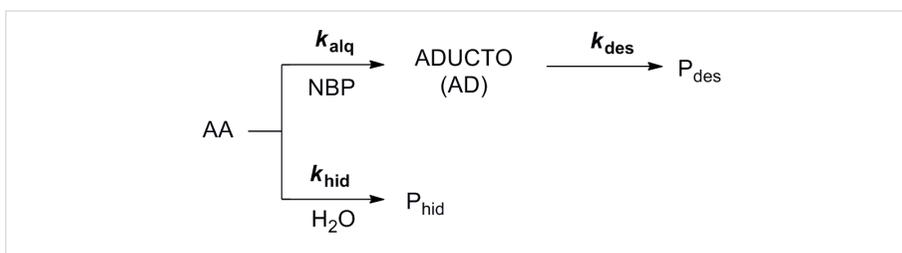


Figura 2.1.13. Esquema general de alquilación de NBP por un agente alquilante.

Como el seguimiento cinético de la reacción se hace espectrofotométricamente, se puede manejar la expresión integrada de velocidad en términos de la absorbancia A_{AD} del aducto formado al cabo de un tiempo t , (Ec. (2.1.9)). En esta ecuación ϵ_{AD} es el coeficiente de absorción molar del aducto coloreado, l el paso óptico de la cubeta, y $[NBP]_o$ y $[AA]_o$ las concentraciones iniciales de los reactivos. Las constantes k_{alq} y k_{hid} son las constantes de velocidad

de orden dos de las reacciones de alquilación de la NBP y de hidrólisis del agente alquilante, respectivamente, y k_{des} la pseudoconstante de velocidad de la reacción de descomposición del aducto.

$$A_{AD} = \frac{k_{alq} [NBP]_o [AA]_o \varepsilon_{AD} l}{\left(k_{alq} [NBP]_o + k_{hid} [H_2O]_o \right) - k_{des}} \left(e^{-k_{des} t} - e^{-\left(k_{alq} [NBP]_o + k_{hid} [H_2O]_o \right) t} \right) \quad (2.1.9)$$

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

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

En muchas ocasiones, para reducir el tiempo de experimentación, se investiga exclusivamente la reacción de alquilación por el método de velocidades iniciales (IRM).¹⁹⁶ Así, se sigue menos del 5% de reacción y la variación de la absorbancia viene dada por la expresión (2.1.10):

$$v_o = \frac{1}{\varepsilon_{AD} l} \frac{dA_{AD}}{dt} = k_{alq} [AA]_o [NBP]_o \quad (2.1.10)$$

Así, a través de los órdenes de reacción, se puede comprobar si el mecanismo por el que transcurre la reacción de alquilación es S_N2 . Como el método de IRM permite estudiar exclusivamente la reacción de alquilación, sólo es aplicable en busca de correlaciones cuando sea ésta la única reacción que tiene

lugar. En caso de existir otras reacciones es necesario completar el estudio con la investigación de las mismas.

Independientemente del uso de unas u otras aproximaciones, para poder obtener las constantes de velocidad se requiere conocer o calcular el coeficiente de absorción molar de los aductos AA-NBP. Aquí, en muchas ocasiones se realiza una nueva aproximación, admitir que todos los aductos formados tienen la misma absorptividad. Esta consideración no introduce errores significativos cuando los agentes alquilantes poseen grupos funcionales y estructuras muy similares, pero es fuente de error significativa cuando no es así.

En la bibliografía se encuentran numerosos trabajos publicados en los que el test de NBP se ha aplicado con éxito para elucidar mecanismos de reacción de agentes alquilantes, tan dispares como la sultona resultante de la nitrosación de taurina, las nitrosoureas, el ácido sórbico, lactonas y éteres, entre otros.^{154,164,166,167,176,197-201}

2.1.2.3.2.1 Parámetros cinéticos para caracterizar la reactividad

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

- ◆ **Alquilación exclusivamente:** El parámetro cinético más utilizado cuando sólo existen reacciones de alquilación es la constante de velocidad de alquilación, k_{alq} . Su valor se obtiene bien con el seguimiento de la reacción por velocidades iniciales (Ec. (2.1.10)) o bien siguiendo un grado elevado de avance de la reacción, mediante ajuste de los datos de absorbancia/tiempo a la ecuación (2.1.11):

$$A_{\text{AD}} = [\text{AA}]_0 \varepsilon_{\text{AD}} \left(1 - e^{-\left(k_{\text{alq}}[\text{NBP}]_0\right) t} \right) \quad (2.1.11)$$

- ♦ **Alquilación e hidrólisis competitiva:** Cuando alquilación de NBP e hidrólisis del agente alquilante compiten, es necesario obtener las constantes de velocidad para ambas reacciones. Para ello se ajustan los datos absorbancia/tiempo a la ecuación (2.1.12).

$$A_{AD} = \frac{k_{alq} [NBP]_o [AA]_o \varepsilon_{AD} l}{(k_{alq} [NBP]_o + k_{hid} [H_2O]_o)} \left(1 - e^{-(k_{alq} [NBP]_o + k_{hid} [H_2O]_o) t} \right) \quad (2.1.12)$$

Los parámetros utilizados para el establecimiento de correlaciones son:

- *La constante de sustrato de Swain-Scott, s*, que se ha definido anteriormente, (véase pág. 34) suministra información sobre la selectividad de un mismo agente alquilante con diferentes nucleófilos (Ec. (2.1.8)).⁴¹ Valores de $s < 0,7$ son propios de mecanismos S_N1 y $s > 0,7$ de mecanismos S_N2 . Se han obtenido buenas correlaciones lineales entre los valores de s de agentes alquilantes tanto S_N1 como S_N2 y sus capacidades carcinógenas y clastogénicas.^{46,202} Además el parámetro s , ha sido relacionado linealmente con la proporción de aductos $N7-/O^6$ -alquilguanina formados por agentes alquilantes monofuncionales en la reacción con ADN (figura 2.1.14).^{18,44}

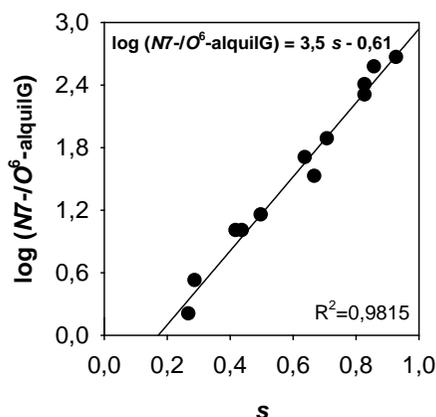


Figura 2.1.14. Correlación entre el parámetro s y la proporción de aductos $N7-/O^6$ -alquilguanina obtenida para una serie de agentes alquilantes (véase Apéndice 1 pág 279)

$$\log \frac{[N7\text{-alquilG}]}{[O^6\text{-alquilG}]} = 3,513s - 0,6109 \quad (2.1.13)$$

Valores de s elevados indican la preferencia del agente alquilante por la alquilación del N7 de la guanina (figura 2.1.14).^{18,171,172}

Como la diferencia de nucleofilias entre la NBP ($n_{\text{NBP}} = 3,5$) y el agua ($n_{\text{H}_2\text{O}} = 0$) es 3,5, la misma que entre las posiciones N7 y O⁶ de la guanina (pendiente de la ecuación (2.1.13)), la proporción de aductos N7-/O⁶-alquilguanina formados se puede relacionar con las constantes de alquilación de NBP e hidrólisis de los agentes alquilantes, k_{alq} y k_{hid} respectivamente (Ecs. (2.1.14) y (2.1.15)).

$$\log \frac{k_{\text{alq}}}{k_{\text{hid}}} = (n_{\text{NBP}} - n_{\text{H}_2\text{O}}) s \quad (2.1.14)$$

$$\log \frac{k_{\text{alq}}}{k_{\text{hid}}} = 3,5 \times s \quad (2.1.15)$$

Este hecho implica que, aunque la reactividad con la NBP modela exclusivamente la reactividad de agentes alquilantes S_N2 con el N7 de la guanina, la determinación de los valores de k_{alq} y k_{hid} permiten estimar el valor de s (Ec. (2.1.15)) de agentes alquilantes tanto S_N1 como S_N2. Conocer s , utilizando para ello el test de NBP, permite predecir tanto la proporción de aductos N7-/O⁶ como los efectos biológicos directamente relacionados con dicha proporción. El mecanismo por el que los agentes alquilantes producen la alquilación también influye directamente en el mecanismo por el que se produce la mutagenia y por tanto en la relevancia de sus efectos.

- *La selectividad hacia la NBP*, S_{NBP} , es la relación entre las constantes de orden dos de velocidad de alquilación e hidrólisis (Ec.(2.1.16)) que ilustra sobre el mecanismo por el que transcurre la alquilación. S_{NBP} también puede definirse considerando el cociente de las pseudoconstantes de velocidad de

primer orden de alquilación e hidrólisis, $k'_{alq} = k_{alq}[NBP]$ y $k'_{hid} = k_{hid}[H_2O]$ respectivamente (Ec.(2.1.16)). Valores altos de S_{NBP} se asocian a mecanismos S_{N2} , valores intermedios indican competencia de la reacción de hidrólisis con la de alquilación en un elevado grado, y valores muy bajos de S_{NBP} sugieren un mecanismo S_{N1} .^{203,204}

$$S_{NBP} = \frac{k_{alq}}{k_{hid}} = \frac{k'_{alq} [H_2O]}{k'_{hid} [NBP]} \quad (2.1.16)$$

- *La capacidad alquilante, f* , se define como fracción del agente alquilante inicial que forma aducto (Ec. (2.1.17)), de modo que sus valores se encuentran entre 0 (no hay alquilación) y 1 (todo el agente alquilante forma aducto).

$$f = \frac{[AD]}{[AA]_o} = \frac{k'_{alq}}{k'_{alq} + k'_{hid}} \quad (2.1.17)$$

- ♦ ***Alquilación, hidrólisis y descomposición del aducto:*** Cuando el aducto formado es inestable, la selectividad o la capacidad alquilante no reflejan plenamente todas las posibilidades, siendo conveniente utilizar un nuevo parámetro, la vida del aducto, AL, definida como área bajo la curva del perfil de reacción por unidad de agente alquilante. Aporta información sobre el efecto acumulativo del agente alquilante (Ecs. (2.1.18) y (2.1.19)).

$$AL = \frac{\int_0^{\infty} [AD] dt}{[AA]_o} = \int_0^{\infty} \frac{k'_{alq}}{k_{des} - (k'_{alq} + k'_{hid})} \left(e^{-(k'_{alq} + k'_{hid})t} - e^{-k_{des}t} \right) dt \quad (2.1.18)$$

$$AL = \frac{k'_{alq}}{(k'_{alq} + k'_{hid})k_{des}} = \frac{f}{k_{des}} \quad (2.1.19)$$

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

2.1.2.3.2.2 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.1.2.3.2.2.1 Alquilación exclusivamente

En este caso el potencial alquilante de la especie bioactiva se puede correlacionar directamente con la constante de velocidad de alquilación: a mayor valor de esta, menor será el tiempo del que dispone el organismo para excretar o desactivar el agente alquilante y mayores los efectos biológicos. Así se han obtenido buenas correlaciones con numerosos compuestos que no sufren hidrólisis y forman aductos estables. Muchos investigadores han publicado la existencia de buenas correlaciones cuantitativas entre parámetros cinéticos (constante de velocidad de alquilación), y efectos biológicos (capacidad para producir mutaciones puntuales,^{106,119,205,206} recombinación,⁹⁹ toxicidad (LC₅₀),⁸² carcinogénesis,²⁰⁷ mutagenia^{77,98,103,122,192,} y síntesis incontrolada de ADN¹⁹²) de numerosos compuestos.^{19,28,77,133,208,209} En algunos casos se ha puesto de manifiesto que existen otros parámetros como el carácter hidrófobo de los compuestos bioactivos que condicionan los efectos biológicos inducidos.⁸²

Cuando se utiliza el método de velocidades iniciales para estudiar la reacción de alquilación –normalmente con epóxidos– a veces surge una causa de error significativa: los coeficientes de absorción molar suelen considerarse iguales, sin ningún tipo de comprobación. Esta asunción puede conducir a resultados erróneos, aunque en algunos casos se han obtenido buenas correlaciones (probablemente cuando los aductos de los compuestos bioactivos con la NBP tengan coeficientes de absorción molar muy semejantes).^{103,98}

2.1.2.3.2.2.2 Alquilación e hidrólisis competitiva

Numerosos agentes alquilantes dan lugar simultáneamente a alquilación de NBP e hidrólisis del propio agente alquilante, con velocidades de reacción del mismo orden de magnitud. Para establecer correlaciones reactividad química-efectividad

biológica se han utilizado habitualmente la selectividad, S_{NBP} , la constante de sustrato, s , y la fracción alquilada o eficacia de alquilación, f .

S_{NBP} , se ha utilizado para predecir los efectos biológicos de mostazas de selenio en la búsqueda de medicamentos,²¹⁰ presenta una buena correlación con la carcinogenicidad y mutagenicidad de lactonas^{183,211} y con la capacidad tumoral de *N*-nitrosoureas en animales de ensayo.²¹² En cuanto a la constante de sustrato, a menor s , mayor afinidad del agente alquilante por los átomos de oxígeno de las bases, mayor proporción O^6/N^7 de aductos alquilguanina y mayor capacidad tumoral. La constante de sustrato, s , se ha correlacionado, obteniendo buenos resultados, con la capacidad carcinogénica ($1/TD_{50}$). Para agentes alquilantes monofuncionales^{171,212} y bifuncionales.⁴⁶

2.1.2.3.2.2.3 Alquilación, hidrólisis y descomposición del aducto

En los casos más complejos en los que los agentes alquilantes además de sufrir hidrólisis forman con la NBP aductos inestables, es necesario considerar la reacción de descomposición del aducto. Se ha conseguido establecer una buena correlación semicuantitativa entre la mutagenicidad y la capacidad alquilante, f , y la vida del aducto, AL, del ácido nítrico,^{200,201} que presenta una baja capacidad mutágena acorde a los pequeños valores de f y AL. La pequeña vida del aducto formado por la α -angelicalactona, explica que no se produzcan daños permanentes en el ADN, a pesar de su capacidad alquilante.²¹³ La ausencia de efectos biológicos mostrados por la dicetena, a pesar del elevado valor de f ($f = 1$), es acorde con el bajo valor de AL. Es decir, es un agente alquilante potente con una efectividad tan baja que no produce efecto.¹⁹⁹

2.1.2.4 Factores que pueden explicar la falta de correlaciones reactividad química-actividad biológica

La falta de correlaciones entre la reactividad química y los efectos biológicos producidos por los agentes alquilantes, tanto desde una consideración cinética como no cinética, pueden tener su explicación en diversos puntos:

- ◆ ***Los estudios de reactividad pueden ser inadecuados:*** i) En algunos estudios sólo se considera la reacción de alquilación y no todas las reacciones que pueden tener lugar en el medio de reacción.⁶⁴ Esto hace que se sobreestime la capacidad alquilante del compuesto. ii) Muchos estudios no tienen en cuenta la posible variación entre los coeficientes de absorción molar de distintos aductos y consideran que son iguales para todos ellos. iii) En ocasiones se trata de modelar la reactividad de agentes tanto S_N2 como S_N1 con el ADN utilizando la reactividad con la NBP. Para los agentes alquilantes S_N1 no sería el modelo adecuado de estudio, en términos de constante de velocidad, y por tanto los resultados de reactividad obtenidos no explicarían la mutagenia observada.
- ◆ ***Los estudios biológicos pueden ser inadecuados:*** A veces se emplean, en el establecimiento de correlaciones, resultados de mutagenia de estudios en placa para compuestos volátiles para los que convendría el uso de variantes líquidas o especialmente diseñadas con dicho fin.
- ◆ ***El factor fundamental para producir efectos biológicos del compuesto no es la capacidad alquilante.*** Existen otros procesos o propiedades del compuesto que determinan en mayor grado la capacidad mutágena (aromaticidad, lipofilia, carga, volumen molecular, impedimento estérico...),^{64,82,171}

2.1.3 Epóxidos

2.1.3.1 Generalidades

Los epóxidos son, según clasificación de la IUPAC, una subclase de compuestos epoxi (compuestos en los que un átomo de oxígeno está unido directamente a dos átomos de carbono adyacentes) que contienen un éter cíclico de tres miembros saturado. Los epóxidos, a diferencia de los éteres lineales (compuestos muy inertes), son muy reactivos debido a la elevada tensión del anillo.²¹⁴ Por este motivo son muy utilizados en síntesis orgánica y en procesos industriales.

2.1.3.2 Usos y vías de exposición

USOS DE LOS EPÓXIDOS					
FABRICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE:			COMO		
					
	Pinturas y recubrimientos	Polímeros y plásticos	Materiales de construcción	Agentes esterilizantes y desinfectantes	
					
Cosméticos y perfumes	Resinas epoxi y adhesivos	Intermedios sintéticos fármacos quirales	Plaguicidas		
Etc.					

Figura 2.1.15. Usos de los epóxidos.

Las aplicaciones de los epóxidos son muy variadas (figura 2.1.15) y cubren desde la utilización como precursores en reacciones orgánicas y producción de plásticos y polímeros hasta la fabricación de cosméticos. Sus enantiómeros puros se utilizan en la industria farmacéutica en la síntesis de fármacos quirales.²¹⁵ A causa de ese amplio uso el ser humano se encuentra muy expuesto a epóxidos

(figura 2.1.16), bien sea por exposición ocupacional –trabajadores de industrias en las que se emplean este tipo de compuestos– o bien por exposición ambiental, por contacto con productos que contienen estos compuestos. La exposición del ser humano no sólo ocurre por vía exógena sino también endógena. Ésta última se da cuando en el organismo hay compuestos insaturados, ya que el ser humano sólo puede eliminarlos por transformación enzimática en los epóxidos correspondientes.¹⁰

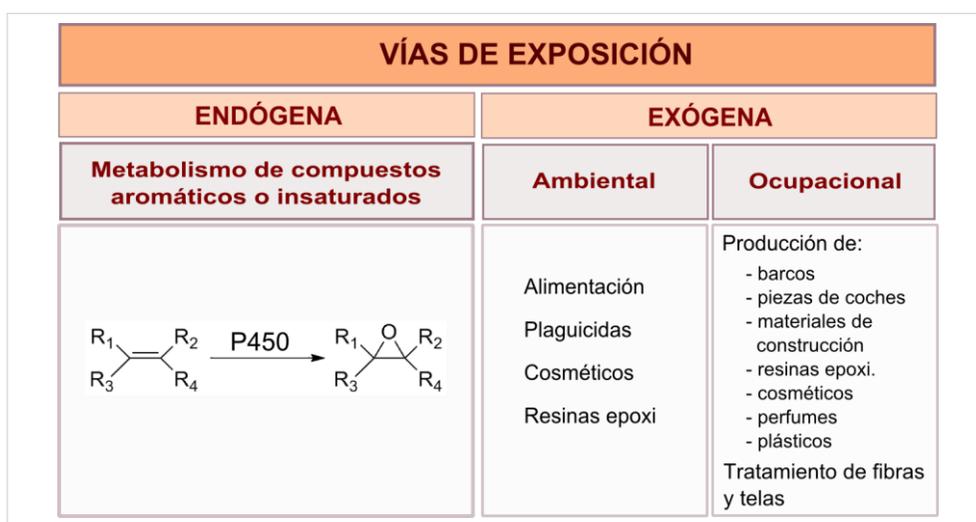


Figura 2.1.16. Vías de exposición a epóxidos.

Debido: i) al amplio uso de los epóxidos; ii) al grado de exposición del ser humano a los mismos; y iii) a la capacidad de estas moléculas para reaccionar con centros nucleófilos presentes en el medio biológico y producir efectos biológicos; la reactividad y los efectos biológicos de los epóxidos, así como la correlación entre ambos, han suscitado un notable interés entre los científicos desde mediados del siglo pasado.

En las líneas que siguen se abordan algunas características significativas de los epóxidos.

2.1.3.3 Reactividad química

La reactividad de los epóxidos está condicionada en términos generales por la basicidad del par de electrones libre del oxígeno y por la relajación de la tensión del anillo cuando se abre (105 kJ/mol).²¹⁶ El grado de sustitución del anillo, así como la distribución de los sustituyentes y la longitud de los mismos afectan enormemente a la reactividad de estas especies químicas.^{65,96,217} Los epóxidos son compuestos muy versátiles, que en disolución, pueden experimentar varios tipos de reacciones (figura 2.1.17):

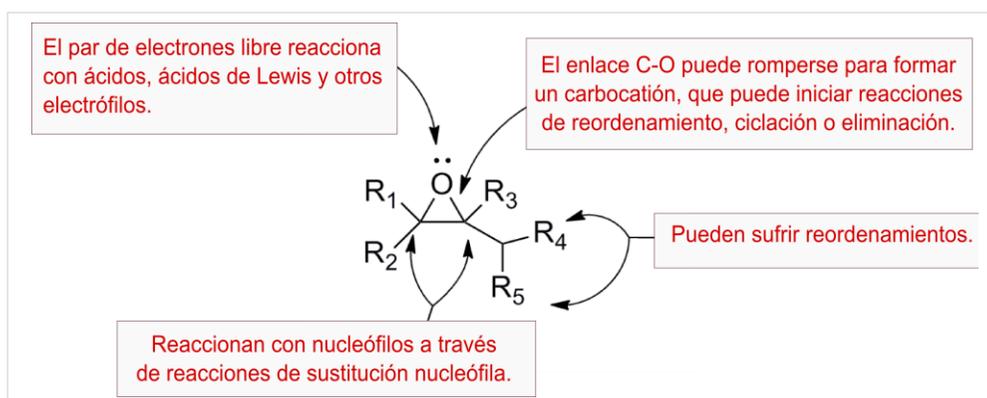


Figura 2.1.17. Reactividad de epóxidos.

- i) *Reacciones de reordenamiento.* Tienen lugar en presencia de ácidos de Lewis o de Brønsted que catalizan la reacción. El reordenamiento produce compuestos carbonilo, aldehídos o cetonas.²¹⁷⁻²¹⁹
- ii) *Reacciones de sustitución nucleófila.* La apertura del anillo por ataque de un nucleófilo sobre cualquiera de los dos carbonos del anillo oxiránico puede tener lugar tanto en medio ácido como en medios neutro o básico.²¹⁷⁻²²⁶ Centraremos nuestra atención en estas últimas.

2.1.3.3.1 Sustitución nucleófila en epóxidos

La sustitución nucleófila en los epóxidos puede tener lugar en cualquiera de los dos carbonos de su anillo. Para diferenciar dichos carbonos en epóxidos

asimétricos, se denomina carbono α al más impedido y β al que posee un menor número de sustituyentes. Que la reacción transcurra a través de uno u otro carbono, o de ambos, y los mecanismos por los que tengan lugar dichas reacciones, depende de varios factores que se reseñan a continuación.

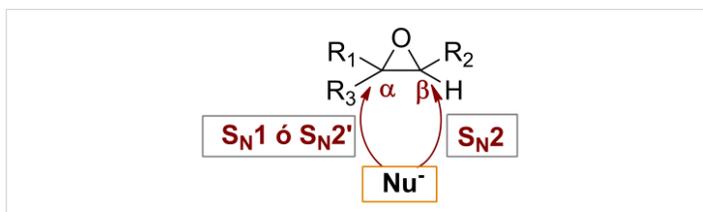
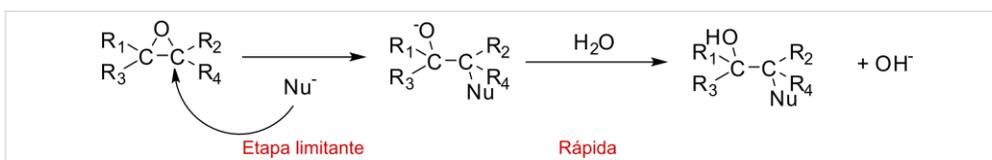


Figura 2.1.18. Reacción de un nucleófilo con un carbono asimétrico y mecanismos involucrados.

En los epóxidos se han observado dos tipos de sustitución nucleófila: unimolecular, S_N1 y bimolecular S_N2 . En medios neutro o básico predominan las reacciones S_N2 , mientras que en medio ácido lo hacen las de tipo S_N1 . Existe también un tipo de reacción denominado S_N2 frontera, modificada, o S_N2' , que ocurre sólo en aquellos epóxidos que poseen un grupo capaz de estabilizar la presencia de una carga positiva.^{10,65,221,222,224 217,220,223,225-229} Aunque es una reacción bimolecular, no posee todas las características propias de estas reacciones y será analizada al final de la sección.

En medio neutro las reacciones del anillo oxiránico se pueden describir en términos de una reacción general de sustitución nucleófila bimolecular, S_N2 . El esquema 2.1.1 ilustra la reacción S_N2 con un nucleófilo desprotonado en medio acuoso o en cualquier disolvente prótico. La reacción de un epóxido con un nucleófilo no protonado (Nu^-) da lugar a un aumento de pH, mientras que la que se produciría con uno protonado no lo modifica.¹⁰ La formación del enlace nucleófilo-epóxido y la ruptura del enlace C-O del anillo tienen lugar de forma concertada.



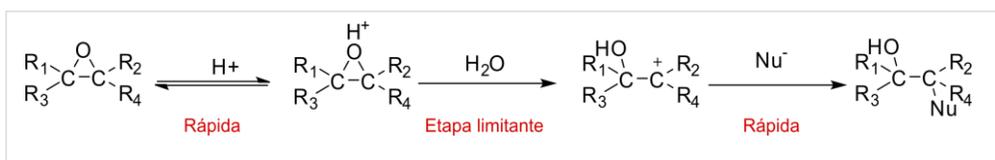
Esquema 2.1.1. Mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular, S_N2 .

La reacción S_N2 :

- Es una reacción bimolecular, de orden dos.
- El ataque del nucleófilo sobre el epóxido tiene lugar en la cara del plano opuesta a aquella en la que se encuentra el oxígeno. En el caso de epóxidos ópticamente activos, se produce inversión de configuración.
- Se ve favorecida por: i) una elevada concentración de nucleófilo; ii) nucleófilos fuertes; y iii) disolventes poco polares.
- No da lugar a reacciones de reordenamiento.

En general, en las reacciones S_N2 en epóxidos con diferentes sustituyentes el ataque del nucleófilo tiene lugar en el carbono menos impedido, C_β (figura 2.1.18).

En medio ácido las reacciones dominantes son S_N1 y transcurren en tres pasos: en el primero se produce la protonación del epóxido; en el segundo tiene lugar la apertura del anillo con formación de un carbocatión, el más estable posible. Esta es la etapa limitante de velocidad. Una vez formado el carbocatión, tiene lugar el ataque del nucleófilo sobre el carbono cargado positivamente.



Esquema 2.1.2. Mecanismo de sustitución nucleófila unimolecular, S_N1 .

Las características propias de esta reacción son:

- a) Es una reacción unimolecular. Como la formación del carbocatión es la etapa limitante, la velocidad de reacción depende exclusivamente de la concentración de epóxido presente en el medio.^{230,231} En caso de carbonos asimétricos, el carbocatión formado será el más estable entre los dos posibles, siendo el carbono más sustituido, C_{α} , el portador de la carga (figura 2.1.18).
- b) El ataque del nucleófilo sobre un epóxido ópticamente activo produce una racemización parcial de los productos. Los ligandos del carbocatión intermedio buscan una configuración plana de modo que el ataque del nucleófilo puede ocurrir por cualquiera de los lados.²³⁰
- c) Favorecen la reacción: nucleófilos débiles y disolventes polares.
- d) Puede dar lugar a reacciones de reordenamiento, cuando se pueden formar carbocationes más estables.

La reacción S_N2' denominada S_N2 fronteriza o modificada, tiene características típicas de una reacción S_N2 (regioquímica), pero también de una S_N1 (estereoquímica). El estado de transición posee la geometría propia de una reacción S_N2 pero tiene una carga parcial positiva sobre uno de los átomos de carbono del anillo –la formación del enlace con el nucleófilo ha avanzado más de lo que lo ha hecho la ruptura del enlace C-O–.²³² Esta carga positiva la soporta el átomo de carbono que conduce a la situación más estable (el α) en epóxidos asimétricos (figura 2.1.18). En estas condiciones –en las que los dos enlaces del estado de transición son más largos de lo habitual y uno de los carbonos del anillo soporta la carga parcial positiva– la reacción está más controlada por la transferencia electrónica del carbono al oxígeno que por la del nucleófilo al carbono.²³²

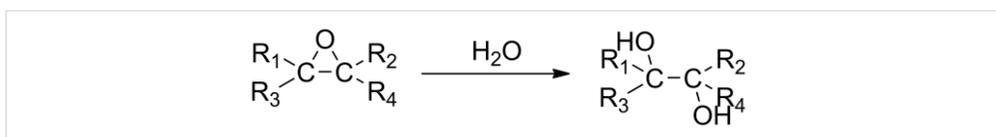
Las reacciones S_N2' pueden transcurrir en medios ácido, alcalino o neutro. Transcurren en medio neutro con los epóxidos en que el anillo oxiránico está unido directamente a un doble o triple enlace, a un grupo aromático o al oxígeno de un éter, capaces de estabilizar la carga positiva por conjugación.¹⁰ Cuando la

reacción tiene lugar en medio neutro con un epóxido asimétrico, se da un compromiso entre el efecto estérico (que favorece la reacción S_N2) y conjugativo (que favorece la reacción S_N2'). Resultado de este compromiso es la formación de una mezcla de productos cuya proporción depende de varios factores: i) el tamaño del nucleófilo (cuanto menor sea, mayor proporción del producto S_N2); ii) la distribución de las cargas;²³² iii) la temperatura;²³³ y iv) el disolvente.²³³

En la reacción S_N2' el ataque del nucleófilo no tiene lugar en la posición menos impedida, como ocurría en la S_N2 , sino que se produce sobre el átomo que más estabilice la carga positiva, *i.e.* el más sustituido. La reacción S_N2' tampoco es sensible al posible impedimento estérico del nucleófilo ya que en el estado de transición éste está aún alejado.

2.1.3.3.2 Reacción de hidrólisis

Los productos de la hidrólisis de epóxidos son generalmente glicoles, aunque algunas veces se obtienen también productos de reordenamiento. Es interesante destacar que, mientras la mayoría de hidrólisis de agentes alquilantes transcurren con disminución del pH, la hidrólisis de epóxidos transcurre sin cambio del mismo.



Esquema 2.1.3. Hidrólisis de epóxidos.

Muchos de los estudios cinéticos y mecanísticos sobre hidrólisis de epóxidos tienen como autores a los grupos de Brønsted,²³⁴ Long y Pritchard,^{230,231} Parker e Isaacs^{217,228} y Addy.^{221,222,224} Esos estudios han conducido a la conclusión de que la hidrólisis puede transcurrir a través de tres reacciones: espontánea o independiente del pH (k_{hid}^o) y catalizadas por iones hidróxido (k_{OH^-}) e hidronio (k_{H^+}) (Ec. (2.1.20)).²³¹

$$k_{\text{hid}} = k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{hid}}^{\circ} + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] \quad (2.1.20)$$

Dada la baja nucleofilia del agua, la hidrólisis de epóxidos es lenta.²³⁰ En medio neutro o básico sólo tiene lugar a través de mecanismos bimoleculares, S_N2 para los alquílicos y S_N2 y/o S_N2' para los vinílicos o aromáticos.²¹⁷ En medio ácido, a pesar de los numerosos estudios, experimentales o *in silico*,^{230-232,235,236} que han tratado de elucidar el mecanismo de reacción, la cuestión aún no se encuentra resuelta.

Son muchos los trabajos sobre hidrólisis de epóxidos enfocados desde muy diversas perspectivas^{217,230,231,237,238} y sobre la actividad de las epóxido hidrolasas.^{239,240} Ello se debe a que las reacciones de hidrólisis de oxiranos se utilizan en diversos procesos tanto en síntesis de laboratorio como a escala industrial, para convertir los epóxidos en intermedios de reacción o en productos quirales.

2.1.3.3.3 Reacción de alquilación

Las reacciones de alquilación por epóxidos transcurren a través de mecanismos de sustitución nucleófila, mediante catálisis con formación de complejos con metales o por mecanismos de Friedel-Crafts. Independientemente del mecanismo el producto es el correspondiente derivado β-hidroxialquilado.¹⁰ Estas reacciones son muy útiles en síntesis orgánica permitiendo obtener una amplia gama de productos (figura 2.1.19). Las reacciones de alquilación por epóxidos se han investigado para valorar su capacidad alquilante. Como sustrato frecuente se han empleado aminas –piridina, benzilamina, nicotinadida y NBP– para modelar la reactividad del N7 de la guanina, principal sitio de alquilación del ADN por epóxidos. Tanto en esa posición de la guanina como con las aminas, las reacciones de alquilación transcurren mediante sustitución nucleófila bimolecular, S_N2 o S_N2'.

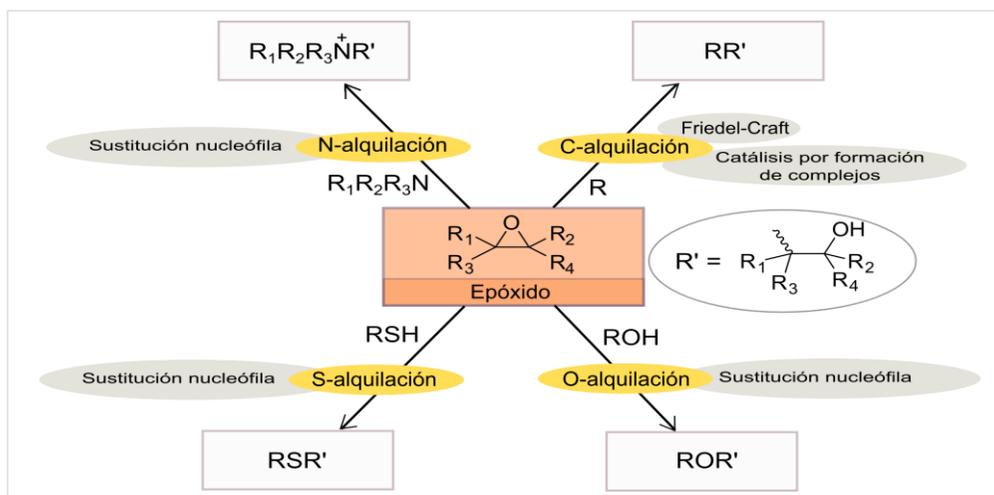


Figura 2.1.19. Reacciones de alquilación de distintos sustratos por epóxidos.

2.1.3.3.3.1 Interacción con macromoléculas biológicas

Como agentes alquilantes, los epóxidos reaccionan con los centros nucleófilos de las moléculas biológicas: átomos de azufre de grupos tiol y tioéter, átomos de nitrógeno de aminas y átomos de oxígeno. La velocidad de reacción depende de la nucleofilia y características del sustrato y de factores estéricos. En el medio biológico, además de reaccionar con macromoléculas y otros constituyentes específicos de las células, los epóxidos reaccionan generalmente con agua y cloruro generando glicoles y halohidrinás.

La interacción con macromoléculas biológicas forma parte del metabolismo de los epóxidos y de los alquenos, que se metabolizan vía epóxido. Algunas de las reacciones que intervienen en ese metabolismo están mediadas por enzimas (figura 2.1.20), cuya concentración depende de los órganos de actuación y cuya presencia es de vital importancia. Los citocromos 450 (P450) son fundamentales, por su papel en la fase oxidativa del metabolismo de alquenos. La metabolización de los compuestos insaturados a sus correspondientes epóxidos, generalmente más nocivos que los alquenos de partida, es la única vía de eliminación de los compuestos insaturados del organismo. Dos grupos de enzimas protegen a los

organismos superiores de los efectos genotóxicos de los oxiranos: las glutatión *S*-transferasas y las epóxido hidrolasas que catalizan la conjugación con glutatión y la hidrólisis de epóxidos, respectivamente. Los metabolitos obtenidos, conjugados con glutatión y glicoles, generalmente no son genotóxicos o lo son en menor medida que los epóxidos de partida.

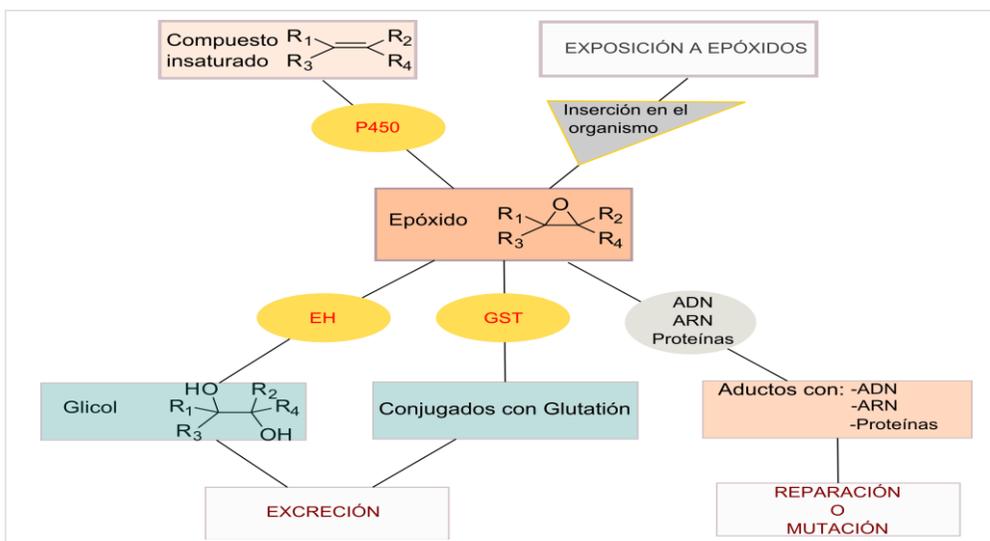


Figura 2.1.20. Entrada en el organismo y principales reacciones de los epóxidos en el medio biológico.

2.1.3.3.3.1.1 Interacción con proteínas

En disolución neutra muchos sitios nucleófilos de las proteínas son estéricamente accesibles a numerosos epóxidos. Su reactividad depende del agente alquilante y de la naturaleza del medio, especialmente del pH.

Las reacciones de alquilación más conocidas y estudiadas de proteínas y péptidos son las que tienen lugar con la hemoglobina y el glutatión como sustrato.

En pH neutro los centros nucleófilos de la hemoglobina susceptibles de alquilación son: SH- del residuo de cisteína, N1 y N3 de la histidina y el grupo N-terminal de la valina. Los aductos formados por los epóxidos con la hemoglobina se pueden determinar con tal sensibilidad y precisión que se utilizan habitualmente

como biomarcadores para monitorizar la exposición a epóxidos y a compuestos insaturados.^{10,241-247}



Esquema 2.1.4. Formación de conjugados con glutatión, GSH.

Aunque el glutatión no es una proteína sino un tripéptido se incluirá en esta sección. La conjugación de epóxidos con glutatión se produce entre el epóxido y el grupo SH del residuo de cisteína del glutatión (esquema 2.1.4). Puede ocurrir espontáneamente o catalizada por la enzima glutatión *S*-epóxidotransferasa (GST).^{248,249} La reacción es de gran interés porque, salvo raras excepciones,²⁵⁰ conduce a la formación de aductos de pequeño o nulo potencial genotóxico, que se degradan en riñones e hígado y son excretados por la orina como conjugados *N*-acetil-*S*-cisteína.²⁵¹

2.1.3.3.3.1.2 Interacción con ácidos nucleicos

Los sitios nucleófilos del ADN con los que reaccionan los epóxidos están determinados tanto por la accesibilidad de los mismos como por las propiedades del epóxido, su carácter iónico, tamaño, etc.^{251,252} El *N*7-guanina es el sitio más reactivo de los ácidos nucleicos.^{10,34,51,251-255}

La interacción de los epóxidos con los constituyentes de los ácidos nucleicos *in vitro*, y en condiciones fisiológicas, ha sido objeto de numerosas investigaciones.^{252-254,256-261} Los resultados han permitido determinar los átomos potencialmente reactivos y los mecanismos por los que transcurre la reacción de alquilación en cada posición (figura 2.1.21).

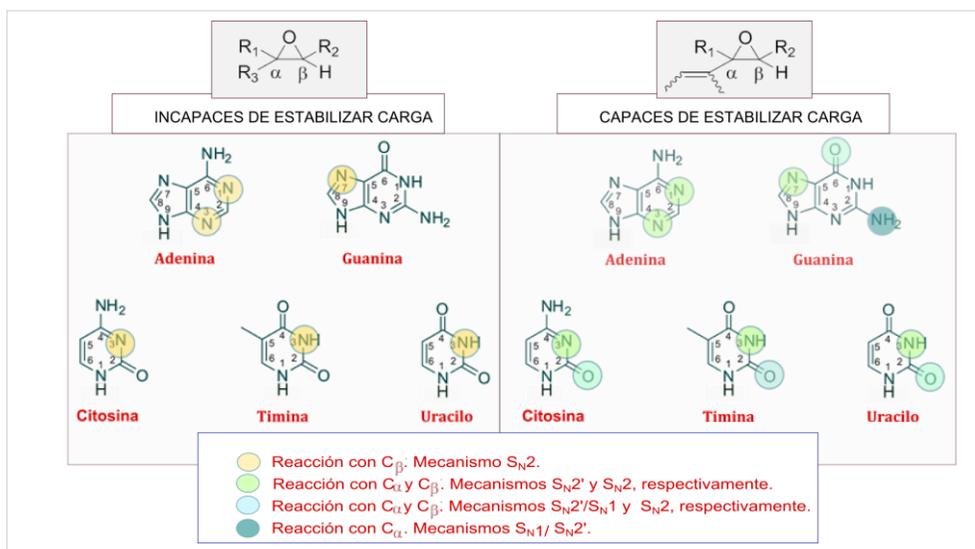


Figura 2.1.21. Posiciones de las bases nitrogenadas susceptibles de sufrir alquilación, por reacción de epóxidos con los constituyentes de los ácidos nucleicos en condiciones fisiológicas.

Los epóxidos que no son capaces de estabilizar una carga iónica, como los epóxidos de alquilo simples, reaccionan preferentemente con átomos de nitrógeno (7-guanina, 1- y 3-adenina, 3-timina y 3-citosina/uracilo) mediante un mecanismo S_N2. En los epóxidos asimétricos la reacción tiene lugar a través del carbono β del anillo oxiránico.^{251,252} Sin embargo, los epóxidos capaces de estabilizar carga positiva, como los óxidos de estireno, además de reaccionar con los citados átomos de nitrógeno mediante reacción S_N2 con el carbono β , reaccionan también con el carbono α mediante una reacción S_N2'. Con este tipo de epóxidos se produce también la reacción con átomos exocíclicos de las bases del ADN: con N²-guanina, O⁶-guanina y O²-citosina. Las reacciones que tienen lugar entre el carbono α del epóxido y átomos exocíclicos de los nucleótidos transcurren mediante mecanismos que requieren la ionización del sustrato, S_N1 o S_N2'.^{251,253}

Cuando, en lugar de la reacción con los constituyentes de los ácidos nucleicos, se investiga la reacción de epóxidos con el propio ADN doble hebra *in vitro* en condiciones fisiológicas, hay más factores que afectan a la alquilación.^{251,262} Aunque los mecanismos por los que transcurren las reacciones con cada uno de

los sitios son los mismos que los estudiados con los nucleótidos/nucleósidos, no todas las posiciones nucleófilas susceptibles de sufrir alquilación por los epóxidos son alquiladas en el ADN *in vitro*. La posición alquilada mayoritariamente por los epóxidos ionizables y no ionizables, es la N7 de la guanina. El orden de preferencia para la alquilación es N7-guanosina>N3 y N1-adenina>N3-citosina/uracilo. Con epóxidos ionizables se ha detectado también la formación del aducto minoritario resultante de la alquilación de la posición N² de la guanina.^{251,262}

2.1.3.4 Parámetros químicos

Para caracterizar la reactividad de epóxidos se han utilizado habitualmente las velocidades de hidrólisis y alquilación con sustratos como benzilamina,^{220,224-228} piridina,⁸⁰ nicotinamida,^{27,28,263} NBP,^{27,28,104,148} anilina e incluso con los propios ácidos nucleicos o con las bases nitrogenadas.^{10,96,104} En ocasiones se han utilizado también los valores de la constante de sustrato, s , y de la constante de alquilación para un sustrato con nucleofilia dos, $k_{n=2}$, para comparar la reactividad de los oxiranos y establecer correlaciones.¹⁰

2.1.3.5 Actividad biológica

La actividad biológica de los epóxidos es muy amplia. Se ha comprobado que son mutágenos directos en organismos como *Neurospora crassa*,^{264,265} *Escherichia coli* WP2,^{81,266,267} *Klebsiella pneumoniae*,^{53,268} en células de Hámster chino,¹⁹³ en linfocitos T de ratones²⁶⁹ e incluso en células de humanos. En el test de Ames, se han encontrado respuestas positivas en cepas de *Salmonella Typhimurium* TA100 y TA1535, capaces de detectar mutágenos que producen “sustitución de pares de bases”, mientras que no muestran actividad en cepas como TA98 o TA1537 que detectan “cambios en el marco de lectura”.^{80,100,103,105,180,181,267,270-277} La actividad mutágena de los epóxidos depende de su estructura química:^{10,278} la presencia de grupos atrectores de electrones en el anillo oxiránico, aumenta la capacidad

mutágena, observándose el efecto contrario con grupos electrodonadores.^{103,264,265,268,273,275,279} Los epóxidos monosustituidos poseen mayor efectividad mutágena que los disustituidos que, generalmente, son mutágenos débiles o no son mutágenos.²⁷³ Las mismas influencias estructurales se han observado tanto en la reactividad con nucleófilos modelo como en la inducción de intercambio de cromátidas hermanas (SCE).

La capacidad mutágena está íntimamente relacionada con la actividad tumoral y carcinógena. Un elevado número de epóxidos monofuncionales y bifuncionales muestran actividad cancerígena.^{66,137-140,280-283} La carcinogenia de los epóxidos monofuncionales se relaciona directamente con la alquilación de los ácidos nucleicos y las mutaciones generadas. Sin embargo, la carcinogenia por epóxidos bifuncionales transcurre por entrecruzamiento de las hebras que dan lugar a amplias deleciones.^{10,284} Los tipos de mutaciones detectadas en tumores inducidos por epóxidos monofuncionales son coherentes con el tipo de aductos formado por estos agentes alquilantes.²⁸⁵ En un estudio realizado en humanos y ratones expuestos a epóxidos o a compuestos que son metabolizados a epóxidos, se han detectado tanto los aductos con el ADN como una elevada incidencia de mutaciones (transiciones G→A, transversiones A→T) en genes involucrados en el desarrollo de cáncer (K-ras, p53 y H-ras). De este hecho se deduce que las lesiones del ADN son importantes en el proceso de inducción de cáncer.²⁸⁵

Un estudio de Van Duuren sobre correlación entre estructura y actividad carcinógena de los epóxidos reveló que, entre los epóxidos monofuncionales, las moléculas conjugadas con un doble enlace o con un anillo aromático muestran actividad carcinógena, mientras que sus análogos saturados son inactivos. Se encontró también que los monoepóxidos son carcinógenos menos efectivos y actúan con menor frecuencia que los correspondientes diepóxidos.¹⁴⁰

Ensayos cromosómicos en cultivos celulares han demostrado que los epóxidos son inductores eficientes de aberraciones cromosómicas

(CA).^{188,190,191,193,286,287} En algunos casos se ha comprobado la generación de CA en trabajadores expuestos a epóxidos.¹⁰

Se ha observado SCE en células de ratas, ratones y de humanos,^{10,189,191,193,246,279,287,288} encontrándose buena correlación entre potencial mutágeno y potencial para inducir SCE (SCEIP).^{193,279} Los epóxidos monosustituídos poseen mayor potencial genotóxico que los bi y tri-sustituídos.²⁷⁹

Además de los efectos genotóxicos directos generados por la exposición a epóxidos se sabe que se producen consecuencias biológicas indirectas en procesos como la reparación del ADN.²⁸⁹

2.1.3.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

Como se ha señalado antes, los epóxidos reaccionan mayoritariamente con el N7 de la guanina del ADN mediante un mecanismo de sustitución bimolecular S_N2 ó S_N2'. Por eso suelen obtenerse buenas correlaciones entre la mutagenia de los oxiranos *in vitro* y su capacidad alquilante con nucleófilos modelo que contienen un N-heteroátomo (con los que la reacción transcurre a través de los mismos mecanismos).^{27,290} El potencial mutágeno (test de Ames en cepas TA100 y TA1535) y la reactividad de los epóxidos con la NBP y la nicotinamida^{28,290} se han correlacionado semicuantitativa o cuantitativamente.^{28,290} En el caso de los óxidos de estireno hay cierta controversia en torno a las correlaciones con la reactividad que abordaremos más adelante.

De la correlación directa entre reactividad de los epóxidos con nucleófilos modelo y potencial mutágeno, y de éste con el potencial de inducción de SCE¹⁹³ se deduce la correlación entre la capacidad alquilante e inducción de SCE.²⁹⁰ Puesto que, tanto en la reactividad química como en los efectos biológicos,^{28,273,279} la estructura de los epóxidos tiene un papel fundamental se han encontrado buenas correlaciones de todos ellos con las constantes σ^* y Hammett, que dan cuenta de los efectos electrónicos de los sustituyentes.²⁷

A pesar de que la reactividad no es el único factor influyente en los efectos biológicos de los epóxidos son muchos los casos en los que se ha comprobado que tiene un papel importante. También se han obtenido buenas correlaciones entre la estabilidad de los epóxidos (velocidad de hidrólisis) y su mutagenia.²⁸

Existe dependencia lineal entre los valores de r y los potenciales carcinógeno y clastogénico de diversos agentes alquilantes entre los que se encuentran algunos epóxidos.⁴⁶ Los elevados valores de r asociados a estos últimos, implican un elevado grado de alquilación de los nitrógenos del ADN.²⁰² Este hecho está directamente ligado a un menor potencial genotóxico y por tanto carcinógeno que el de compuestos que reaccionan mayoritariamente con los oxígenos del ADN.^{44,46,202,291} La baja eficiencia genotóxica de los aductos formados parece estar relacionada con una elevada eficacia en la reparación de las lesiones que producen en el ADN.

2.2 Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por epóxidos lineales

2.2.1 Antecedentes

- 2.2.1.1 Epóxidos lineales estudiados
- 2.2.1.2 Usos y exposición
- 2.2.1.3 Reactividad química de epóxidos lineales
- 2.2.1.4 Parámetros químicos
- 2.2.1.5 Actividad biológica
- 2.2.1.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.2.2 Método y materiales

- 2.2.2.1 Método experimental
- 2.2.2.2 Materiales

2.2.3 Resultados y discusión

- 2.2.3.1 Mecanismo de reacción
- 2.2.3.2 Estudio cinético de las reacciones involucradas en la efectividad de la alquilación
- 2.2.3.3 Parámetros cinéticos que caracterizan la reactividad de los epóxidos lineales
- 2.2.3.4 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.2.4 Conclusiones



*"Quando avrai provato l'emozione del volo,
una volta a Terra camminerai con lo sguardo rivolto verso il cielo
perchè la sei stato e la agogni a ritornare".
"La scienza è il capitano e la pratica i suoi soldati".*

Leonardo da Vinci

2.2.1 Antecedentes

2.2.1.1 Epóxidos lineales estudiados

Los epóxidos lineales elegidos para realizar el estudio han sido el óxido de propileno (PO), 1,2-epoxibutano (1,2-EB), *cis*-2,3-epoxibutano (*cis*-2,3-EB) y *trans*-2,3-epoxibutano (*trans*-2,3-EB), que denominaremos de forma general, EP. Esta serie de epóxidos permite investigar la influencia en la reactividad tanto de la longitud como de la posición de los sustituyentes alquilo.

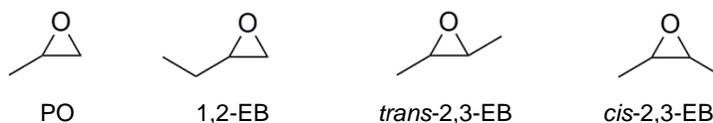


Figura 2.2.1. Estructuras de los epóxidos elegidos para el estudio.

Son compuestos similares tanto estructural como químicamente y reaccionan con el ADN formando aductos, mayoritariamente con la posición *N7* de la guanina. Son agentes alquilantes directos que reaccionan con la NBP²⁹² y el ADN sin necesidad de activación metabólica. Aunque son tóxicos y genotóxicos, habiéndose demostrado también que son mutágenos débiles, sólo PO y 1,2-EB han sido clasificados por la IARC como agentes 2B –posiblemente cancerígenos

para los humanos—.293,294 Ni el 2,3-epoxibutano ni sus regioisómeros, han sido clasificados hasta el momento.

2.2.1.2 Usos y exposición

Los epóxidos estudiados se utilizan generalmente en la producción de resinas epoxi, de agentes surfactantes y de los correspondientes glicoles y de sus derivados (poliglicoles, éteres y ésteres de glicol entre otros).293,295 El óxido de propileno se utiliza como aditivo alimentario, como fumigante para frutos secos y como esterilizante de envoltorios de alimentos y otros materiales.295,296 Se emplea también en la producción de plásticos y otros materiales sintéticos.296 El 1,2-EB tiene numerosas aplicaciones como estabilizante para algunos disolventes como los hidrocarburos clorados y como aditivo en las gasolinas.294

La exposición directa a PO, 1,2-EB y a los regioisómeros del 2,3-EB puede producirse en el lugar de trabajo, en las industrias dedicadas a la producción de estas especies o en aquellas que los emplean como materia prima. Puede producirse también en el almacenamiento y transporte del mismo. Se ha estimado que sólo en Estados Unidos más de 200.000 trabajadores se encuentran potencialmente expuestos al PO296 y alrededor de 47.900 al 1,2-EB.294

Asimismo la exposición puede producirse por contacto con productos que contienen estos compuestos o por exposición indirecta. Esta última tiene lugar por exposición a los correspondientes compuestos insaturados, propileno (PE), 1,2-buteno (1,2-BE) y 2,3-buteno (2,3-BE) que en el cuerpo humano son transformados por vía metabólica en los correspondientes epóxidos. El PE se encuentra en el medio ambiente de forma natural, generado por la vegetación, o como producto antropogénico, como producto del refinado de petróleo o de la combustión incompleta de tabaco o del combustible de los automóviles.293 Se sabe que en humanos tan sólo el 8% del PE inhalado puede ser metabolizado a PO, vía citocromos P450. La reacción de formación de PO a partir de PE es una reacción saturable.294 El *cis*- y el *trans*-2-buteno se utilizan como disolventes295 y el 1-buteno

es un intermedio químico en la producción de polímeros –polibutenos, butadieno, polietileno– lubricantes y aditivos de gasolinas. Es un intermedio utilizado para mejorar la biodegradabilidad de surfactantes, detergentes, productos de limpieza industriales agresivos y champús.²⁹⁴

2.2.1.3 Reactividad química de epóxidos lineales

La reactividad de los epóxidos lineales se ha investigado ampliamente y, a pesar de que se han estudiado las reacciones de reordenamiento utilizando ácidos de Lewis, las más estudiadas son las sustituciones nucleófilas. Estas últimas se han investigado con una gran diversidad de nucleófilos: amoníaco, tiosulfato, alcoholes, HCl, HBr y HI, entre otros.^{10,217} Centraremos nuestra atención en las reacciones de hidrólisis y alquilación con la NBP y con macromoléculas biológicas.

2.2.1.3.1 Reacción de hidrólisis

Sobre la reacción de hidrólisis de epóxidos lineales –que da lugar a la formación de los correspondientes glicoles– se sabe que: i) puede transcurrir a través de tres mecanismos diferentes en función del pH (figura 2.2.2); ii) se puede producir por el ataque de la molécula de agua sobre ambos carbonos del anillo oxiránico.

En medio neutro o básico los experimentos revelan que el mecanismo por el que tiene lugar la reacción de hidrólisis de epóxidos alquílicos es S_N2 . Cuando se trabaja con agua marcada isotópicamente, con epóxidos simétricos, por ej. *cis*- y *trans*-2,3-EB, los productos derivados de la reacción en ambos carbonos son indistinguibles. Sin embargo, en el caso de epóxidos asimétricos, como PO y 1,2-EB, el ataque del agua se produce mayoritariamente sobre el carbono que presenta menos impedimento estérico.²³²

La tabla 2.2.1 muestra los valores bibliográficos de las constantes de velocidad de hidrólisis para la reacción no catalizada, k_{hid}^0 , así como para las catalizadas por ácido, k_{H^+} , y por base, k_{OH^-} . Se observa que la constante de

velocidad para la reacción catalizada por ácido es mucho mayor que las correspondientes a las reacciones no catalizada o catalizada por base.

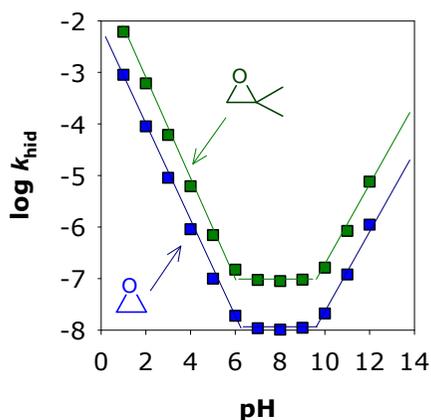


Figura 2.2.2. Dependencia de la constante de hidrólisis observada, k_{hid} , con el pH para el óxido de etileno (■) e isobutileno (■) $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.²³⁶

Tabla 2.2.1. Constantes de velocidad para la reacción de hidrólisis de diversos epóxidos lineales catalizada por ácido y base y no catalizada.

Estructura de los epóxidos	T ($^{\circ}\text{C}$)	k_{OH^-} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{hid}^0 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{H^+} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Ref.
	25,0	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-8}$	$9,0 \cdot 10^{-3}$	236
	37,0	–	$4,5 \cdot 10^{-8}$	$3,2 \cdot 10^{-2}$	10
	25,0	$\sim 10^{-4}$	$\sim 10^{-8}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$	236
	37,0	–	$4,0 \cdot 10^{-8}$	$1,24 \cdot 10^{-1}$	10
	24,0	–	–	8,7	297
	25,0	$8,7 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-8}$	6,8	236
	24,0	–	–	$2,0 \cdot 10^{-1}$	297
	37,0	–	baja	$2,48 \cdot 10^{-1}$	10,231
	37,0	–	baja	$4,96 \cdot 10^{-1}$	10,231
	24,0	–	–	9,0	297
	24,0	–	–	15,0	297
	24,0	–	–	$7,4 \cdot 10^{-2}$	297
	37,0	–	$3,1 \cdot 10^{-8}$	–	10
	24,0	–	–	$7,4 \cdot 10^{-2}$	297
	37,0	–	$3,4 \cdot 10^{-8}$	$12,5 \cdot 10^{-3}$	10
	37,0	–	$9,2 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	10

En medio ácido la hidrólisis de epóxidos transcurre preferentemente por ataque en la posición más impedida y puede tener lugar a través de dos posibles mecanismos, S_N1 o S_N2 .^{231,234,236} Existen diferencias sustanciales en la velocidad de hidrólisis de los epóxidos lineales en medio ácido, debidas a efectos estéricos y/o electrónicos. Los resultados de varios estudios revelan que la estabilización del carbocatión (S_N1) o del intermedio con carga parcial positiva sobre un carbono (S_N2), se encuentra directamente correlacionada con el valor de las constantes de velocidad de hidrólisis observadas. Los epóxidos que forman carbocationes o intermedios terciarios, presentan valores de k_{H^+} mayores que los que dan lugar a carbocationes/intermedios secundarios. Los que forman carbocationes /intermedios primarios son aún más lentos. De todos los epóxidos estudiados, el óxido de etileno es el que reacciona más lentamente (tabla 2.2.1).^{10,230,231,236,297} Las constantes de velocidad para la hidrólisis ácida, k_{eff} ($k_{obs} / [H_3O^+]$), obtenidas por Kirkovsky *et al.*, muestran la misma tendencia (tabla 2.2.2).²³⁵ Los factores catalíticos para la reacción de hidrólisis catalizada por ácido muestran también buena correlación con las constantes σ^* de Taft para una amplia serie de epóxidos, exceptuando los 1,1-diepóxidos.²³¹

Tabla 2.2.2. Constantes de velocidad para la reacción de hidrólisis de diversos epóxidos lineales catalizada por ácido, k_{eff} .²³⁵

Estructura de los epóxidos	[HClO ₄] (M)	T (°C)	10 ⁴ k _{eff} (M ⁻¹ s ⁻¹)
	7,08·10 ⁻³	36,3	0,027
	3,98·10 ⁻³	36,3	0,124
	7,08·10 ⁻⁵	35,3	11,0
	3,98·10 ⁻³	36,8	0,305
	3,98·10 ⁻³	36,3	0,635
	7,08·10 ⁻⁵	35,3	10,7
	7,08·10 ⁻⁵	37,0	8,7

2.2.1.3.2 Reacción de alquilación

La reacción de alquilación de diversos sustratos –nicotinamida y NBP generalmente– por epóxidos ha sido estudiada, generalmente, para modelar la reactividad con el ADN y establecer correlaciones entre ésta y los efectos biológicos.²⁶³ En cambio, son escasas las publicaciones sobre estudios cinéticos en profundidad.²⁹⁸ Habitualmente se aplica el método de velocidades iniciales para obtener la capacidad alquilante o reactividad con la NBP o nicotinamida, que suele hacer referencia a las absorbancias obtenidas a un determinado tiempo de reacción o a la variación de absorbancia en un determinado intervalo de tiempo.^{27,103,263,292}

Al utilizar una u otra medida de absorbancia para comparar la reactividad de epóxidos se están manejando indirectamente dos aproximaciones: i) que los coeficientes de absorción molar de todos los aductos son iguales;⁸² y ii) que sólo tiene lugar la reacción de alquilación. La primera aproximación puede ser aplicable a epóxidos con estructuras similares, pero no para los de estructura dispar. Para poder aplicar la segunda aproximación es necesario descartar la existencia de otras reacciones implicadas.⁸² Los estudios sobre la alquilación de diferentes nucleófilos por epóxidos lineales sugieren que la reacción de alquilación de moléculas como NBP o nicotinamida por un epóxido lineal transcurre mediante un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular.

2.2.1.3.2.1 Alquilación de moléculas biológicas

Se sabe que los epóxidos pueden: i) reaccionar con macromoléculas biológicas como la hemoglobina (Hb) o los ácidos nucleicos; ii) ser metabolizadas vía epóxido hidrolasa (EH), formando los correspondientes glicoles, o vía glutatión-S-transferasa (GST), para formar conjugados con glutatión.

En cuanto a la formación de aductos con ADN, su concentración varía dependiendo de los órganos y vías de exposición.^{242,243} Se sabe que epóxidos simples, como óxido de etileno (EO) y PO, al reaccionar con ADN alquilan mayoritariamente la posición N7 de la guanina, mediante un mecanismo S_N2,

produciendo aductos *N*7-(2-hidroxi-alkil)guanina.^{51,185,242} Aunque estos aductos no se consideran promutágenos, se sabe que su incremento produce aumento de la velocidad de depuración en el ADN y se ha planteado la posibilidad de que ello conduzca a la formación de sitios abásicos, que pueden ser mutágenos.²⁹⁹ *In vivo* con ADN, el PO produce una décima parte de la modificación que produce el EO, lo que explica, al menos parcialmente, las diferencias observadas en su efectividad como genotóxicos.²⁴⁴

La tabla 2.2.3 muestra la velocidad de reacción de los epóxidos lineales, EP, con guanosina y deoxiguanosina. La tendencia es acorde con los resultados obtenidos por Hemminki *et al.* en el estudio de la reactividad de una serie de 1,2-alkiloxiranos (de C3 a C8) con ADN y desoxiguanosina.^{103,292} La reactividad de los epóxidos lineales tanto con desoxiguanosina como con ADN sigue la cinética esperada: la velocidad de la reacción es inversamente proporcional a la longitud de la cadena hidrocarbonada.⁹⁶

Al estudiar la cinética de alquilación de guanosina por PO y *trans*-2,3-epoxibutano, queda patente que el mecanismo por el que transcurre es S_N2 y las constantes de segundo orden revelan que la reacción con PO se produce unas tres veces más rápido que con *trans*-2,3-EB.³⁰⁰

Tabla 2.2.3. Constantes de velocidad para las reacciones de alquilación de guanina y deoxiguanosina por EP.

Sustrato	k ($M^{-1}s^{-1}$)	EP			
		EO	PO	<i>trans</i> -2,3-EB	1,2-EB
Guanina-ADN	k_{G-ADN}^a	$3,05 \cdot 10^{-5}$	$6,11 \cdot 10^{-5}$	-	$8,33 \cdot 10^{-6}$
Guanosina	k_{Guo}	-	x	$(0,33 \cdot x)^b$	$(0,8 \cdot x)^a$

T=37,0 °C; a: Ref. 10; b: Ref. 300; x es la constante de velocidad de segundo orden para la reacción de alquilación de desoxiguanosina por PO.

Los aductos formados con la hemoglobina (estables, en general) son útiles como biomarcadores, siendo una herramienta utilizada para monitorizar la exposición a agentes alquilantes como el PO.²⁴⁶ Los datos disponibles sobre los

niveles de aductos con hemoglobina en trabajadores expuestos a PO y EO sugieren que, para una misma dosis, el EO forma el cuadruple de aductos.

Las epóxido hidrolasas catalizan la reacción de hidrólisis de los epóxidos *in vivo* e *in vitro*, reduciendo considerablemente la vida media de los epóxidos en el cuerpo humano y, consecuentemente, su toxicidad. Como producen compuestos ópticamente activos, se utilizan también en síntesis orgánica. El mecanismo por el que se produce la apertura de los epóxidos por las EH de mamíferos fue descubierto por Armstrong *et al.* y Hammock *et al.* mediante experimentos con agua marcada isotópicamente.^{301,302}

2.2.1.4 Parámetros químicos

Los parámetros químicos encontrados en la bibliografía para correlacionar la actividad biológica con la reactividad química de los epóxidos lineales han sido los utilizados de forma clásica: constantes de velocidad de alquilación e hidrólisis, que ya se han recogido anteriormente (véanse tablas 2.2.1. y 2.2.3), $k_{n=2}$ y s . En la tabla 2.2.4 se resumen los valores encontrados para estos dos últimos parámetros para los epóxidos EO, PO, 1,2-EB, epíclorohidrina (ECH) y glicidol.

Tabla 2.2.4. Constantes de sustrato, s , y constantes de alquilación para $n=2$, $k_{n=2}$ para una serie de epóxidos lineales.

EP	Parámetros químicos	
	s	$k_{n=2}$ ($M^{-1} s^{-1}$)
EO	0,96 ^a	$3,89 \cdot 10^{-6 d}$
PO	0,88 ^b / 0,96 ^a	$2,78 \cdot 10^{-6 b}$ / $3,33 \cdot 10^{-6 d}$
1,2-EB	-	$3,11 \cdot 10^{-6 d}$
ECH	0,93 ^c	$1,38 \cdot 10^{-5 d}$
Glicidol	1,0 ^c	$2,78 \cdot 10^{-6 d}$

$T = 37,0 \text{ }^\circ\text{C}$; a: Ref. 46; b: Ref. 175; c: Ref. 41; d: Ref. 10;
Valores estimados a partir de constantes obtenidas en medio acuoso.

2.2.1.5 Actividad biológica

Los epóxidos lineales son genotóxicos y producen efectos biológicos muy variados. Mientras que PO y 1,2-EB han sido clasificados como posibles carcinógenos para humanos, ni el 2,3-EB ni sus isómeros han sido clasificados todavía. Todos ellos son, sin embargo, agentes alquilantes directos que no requieren activación enzimática para dar lugar a actividad biológica.

La capacidad mutágena de PO, 1,2-EB y *cis*- y *trans*-2,3-EB *in vitro* ha sido investigada en bacterias y hongos. Los resultados muestran que los epóxidos analizados producen más mutaciones por sustitución de pares de bases que por desplazamiento, lo que es consistente con las propiedades de los epóxidos como agentes alquilantes. Se han encontrado respuestas positivas en el test de *Ames* para las cepas de *Salmonella typhimurium* sensibles a la sustitución de pares de bases (TA1530, TA1535, TA100) (tabla 2.2.5) y respuestas negativas para cepas que no detectan este tipo de mutaciones. A pesar de que también se han encontrado respuestas positivas en los test de mutagenia con hongos como *Saccharomices*, *Schizosaccharomices* y *Neurospora*,^{264,303-305} ninguno de los epóxidos estudiados induce reparación SOS en *Scherichia Coli* PQ37. Este hecho se ha atribuido al bajo potencial mutágeno de los epóxidos porque en el test SOS generalmente se obtienen respuestas positivas frente al ataque químico al ADN.^{266,304}

Tabla 2.2.5. Mutagenia de epóxidos lineales en *Salmonella Typhimurium* para las cepas TA100 y TA1535 utilizando dos tipos de ensayo diferentes.

Epóxido	Mutagenia en <i>Salmonella Typhimurium</i> (revertientes/ μ mol)			
	Vaporización ^a		Plato ^c	
	TA1535	TA100	TA1535	TA100
PO	205,26	100,22	12,78 ^d	19,28 ^d
<i>trans</i> -2,3-EB	8,82	3,16	0,19	0,30
<i>cis</i> -2,3-EB	37,25	19,74	2,04	1,74
1,2-EB	–	120,65 ^b	1,42	3,90

a: Ref. 306; b: Ref. 263; c: Ref. 279; d: Ref.273

Estudios *in vitro* sobre mutagenia de epóxidos lineales han permitido concluir que los epóxidos terminales son, en general, mutágenos más potentes que aquellos en los que el anillo oxiránico no es terminal. En epóxidos terminales, el aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada del sustituyente produce disminución de la capacidad mutágena y la inclusión de sustituyentes atrectores de electrones la aumenta (tablas 2.2.5 y 2.2.6).^{10,273} Algunos autores sugieren que todos los epóxidos monosustituídos poseen, en general, capacidad mutágena, mientras que para los 1,2-disustituídos se ha comprobado que la mutagenia de los isómeros *cis* es, en general, mayor que la de los isómeros *trans*, que a veces son inactivos.^{10,273}

Tabla 2.2.6. Potencial mutágeno y de inducción de intercambio de cromátidas hermanas para una serie de epóxidos lineales en varios organismos.

Epóxido	<i>Schizosaccharomyces Pombe</i> ^a		<i>Neurospora</i> ^b	<i>Células V79 Hámster Chino</i> ^c
	MF	actividad específica	MF	SCEIP
	Mut./ 10 ⁴ Sup.mM	10 ⁴ locus ⁻¹ mM ⁻¹ h ⁻¹	Rev. mut./ 10 ⁶ Sup.	
EO	4,44	0,148	-	-
PO	1,12	0,037	80	3
1,2-EB	1,17	0,039	6,1	1,6
<i>cis</i>-2,3-EB	0,02	0,0004	0,25	0,3
<i>trans</i>-2,3-EB				0,3
ECH	6,53	0,218	135,2	28,8
Glicidol	2,9	0,097	128,5	4,1

a: Ref. 304; b: Ref. 264; c: Ref. 279

La tendencia general observada para los potenciales mutágenos de los epóxidos de estudio es: PO > 1,2-EB > *cis*-2,3-EB > *trans*-2,3-EB (tabla 2.2.5).²⁶⁶

Los resultados bibliográficos sobre el 2,3-epoxibutano e isómeros son a veces confusos (se ha investigado la mutagenia de la mezcla de los isómeros *cis* y *trans*, a pesar de que la mutagenia de los dos isómeros es muy diferente).^{272,279,306} Los resultados de algunos ensayos indican que ambos isómeros no poseen

capacidad mutágena, mientras que en otros se ha encontrado que son mutágenos débiles. Estos resultados se han atribuido a su volatilidad dado que en ensayos diseñados especialmente para compuestos volátiles (vaporización) *cis*- y *trans*-2,3-EB muestran capacidad mutágena.^{264,266,268,273,304} Los resultados obtenidos por Castelain *et al.* con compuestos volátiles muestran que la secuencia de mutagenia es: PO>*cis*-2,3-EB>*trans*-2,3-EB (tabla 2.2.5).³⁰⁶

Los epóxidos, PO, 1,2-EB, *cis*- y *trans*-2,3-EB, inducen SCE en células V79 de hámster chino *in vitro*. La tabla 2.2.6 ilustra la potencialidad de distintos epóxidos para inducir SCE en células de mamífero.

Los estudios sobre la actividad biológica de PO y 1,2-EB son más numerosos que los correspondientes al 2,3-EB y sus isómeros. En el ensayo de linfoma de ratones se ha descubierto que el 1,2-EB es mutágeno, y en *Klebsiella pneumoniae*,³⁰⁷ que produce aberraciones cromosómicas. También se ha comprobado que produce mutaciones en *Drosophila melanogaster in vivo* y que no induce la síntesis descontrolada de ADN.²⁹⁴

Estudios *in vitro* sobre la actividad biológica del PO han mostrado que es un mutágeno débil sobre una gran variedad de organismos, que es un agente clastogénico^{188,308} y tóxico. *In vivo* no se ha observado la aparición de tumores en roedores utilizando distintas vías de administración en concentraciones bajas; sin embargo, en concentraciones altas, produce tumores en la cavidad nasal de roedores.^{280,283,309,310} Se ha comprobado también que produce SCE en humanos.²⁴⁶

2.2.1.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

Son numerosos los trabajos centrados en el establecimiento de correlaciones cualitativas y semicuantitativas entre la actividad química y biológica de epóxidos. Como se apuntó anteriormente (págs. 46-47 y 63), existe un grado alto de correlación entre las respuestas cualitativas obtenidas en tests de mutagenia, genotoxicidad y carcinogenia y el test de NBP para agentes alquilantes,

entre los que se encuentran los epóxidos, algunos de ellos lineales. A nivel semicuantitativo, se han obtenido buenos resultados al establecer correlaciones entre la capacidad alquilante de EP, utilizando NBP, nicotinamida, o nitrotiofenolato sódico, y la mutagenia de varias series de epóxidos, en las que se incluyen epóxidos lineales.^{98,103,292} Sin embargo, diversos trabajos han reflejado la inexistencia de correlación cuando se utiliza la NBP.^{98,180,181,191,292} Al tratar de establecer correlaciones entre compuestos de diversa naturaleza, que dan lugar a aductos diferentes con el ADN, o con estructuras muy diferentes, aún perteneciendo a la misma familia, no se han obtenido, en general, buenos resultados al comparar la capacidad alquilante o reactividad con la NBP con el potencial mutágeno^{28,98,180,191,292} o genotóxico.¹⁹¹ Este hecho puede ser debido a la utilización de las aproximaciones antes mencionadas (pág.72), aunque a veces se han descrito buenas correlaciones.^{28,82}

Un modelo basado en la estabilidad de los epóxidos para predecir la mutagenia u oncogenia ha resultado ser válido con los epóxidos.³¹¹

Algunos autores han tratado de establecer correlaciones a nivel cuantitativo entre potencial mutágeno en el test de Ames u otros efectos biológicos y la capacidad alquilante, el volumen molecular, la constante de reparto y el efecto de los sustituyentes. Los resultados obtenidos por Rosman *et al.* con el test de Ames en TA100 y TA1535 para una serie de óxidos de propileno y butileno han revelado un bajo grado de correlación tanto con el volumen molecular como con la constante de reparto y la reactividad.¹⁸⁰ Tampoco, Hooberman *et al.* encontraron una buena correlación entre la reactividad con NBP y nicotinamida de óxidos de propileno y la mutagenia en la cepa TA1535. Sin embargo, obtuvieron correlaciones aceptables con la mutagenia en la cepa TA100 y con el valor de la constante de Taft, (excluyendo tres epóxidos que eran muy diferentes al resto estructuralmente) a pesar de que la reactividad frente a la NBP se determinó como valor medio de una serie de medidas de absorbancia realizadas en un tiempo determinado. No es de extrañar que se obtuviese esta última

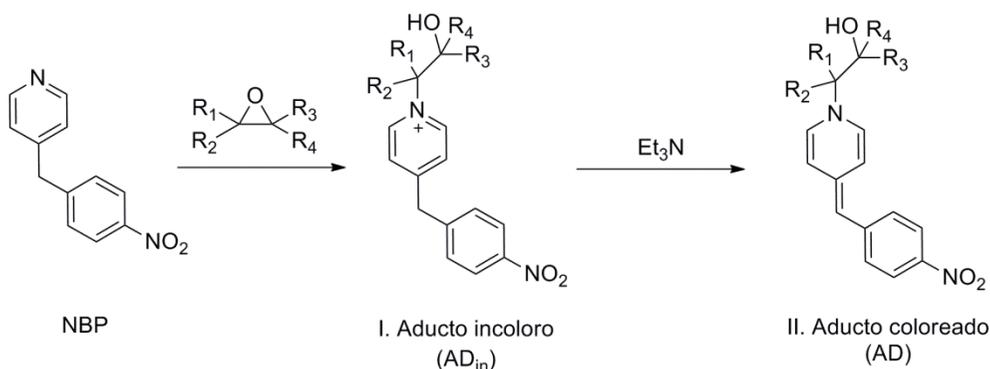
correlación entre la mutagenia y la constante σ^* de Taft, ya que anteriormente se habían puesto de manifiesto, para una serie de óxidos de propileno, las buenas correlaciones existentes entre la capacidad alquilante con la NBP, la nicotinamida y la reactividad con desoxinucleósidos en el ADN y el parámetro σ^* de Taft.^{27,278}

Deneer *et al.* investigaron las correlaciones entre la toxicidad de una serie de epóxidos manejando dos parámetros: la constante de velocidad de la alquilación con NBP y la constante de reparto octanol/agua. Las constantes de alquilación se obtuvieron utilizando el método de velocidades iniciales (habiendo comprobado que la reacción de hidrólisis podía despreciarse) y suponiendo el mismo coeficiente de absorción molar para todos los epóxidos.⁸² Los resultados mostraron que las correlaciones entre la toxicidad y cada uno de los parámetros considerados por separado eran muy pobres, pero considerados conjuntamente explicaban bien la toxicidad observada.

2.2.2 Método y materiales

2.2.2.1 Método experimental

La reacción de alquilación de NBP por EP (PO, 1,2-EB, *cis*-2,3-EB y *trans*-2,3-EB) se ha seguido espectrofotométricamente. Aunque el aducto NBP-EP (AD_{in}) formado es incoloro, la adición de una base (Et_3N) produce la desprotonación del carbono que se encuentra entre los dos anillos aromáticos, dando lugar a la formación del aducto coloreado (AD) (esquema 2.2.1).



Esquema 2.2.1. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por EP.

Se ha trabajado en exceso de NBP frente EP en medios de acidez constante. Como la NBP es poco soluble en agua, las mezclas de reacción son acuorgánicas, agua:dioxano 7:3 (v:v). Se prepararon semanalmente disoluciones madre de los epóxidos –EP en dioxano–.

Para preparar la mezcla de reacción (NBP + EP) en medio agua:dioxano se disuelve la NBP en 100 ml de mezcla 7:3 y se termostata a la temperatura de trabajo. A la mezcla se añade un pequeño volumen (25-1000 μ L) de disolución madre de EP. El momento en el que se produce la adición, se toma como tiempo inicial de la reacción, $t = 0$.

El seguimiento cinético de la reacción de alquilación se hace monitorizando la variación de la absorbancia del aducto coloreado, AD, a una

determinada longitud de onda. A distintos intervalos de tiempo se toman alícuotas de 2,4 cm³ de la mezcla de reacción (EP+NBP) que se añaden a una cubeta que contiene 0,6 cm³ de trietilamina. Se agita e inmediatamente se mide la absorbancia. La reacción de desprotonación del aducto es completa.

La figura 2.2.3 ilustra la evolución temporal de los espectros de absorción de los aductos NBP-EP en la reacción de la NBP con cada uno de los epóxidos. Se ha seguido la formación de dichos aductos en $\lambda = 560$ nm, donde sólo absorben los aductos coloreados.

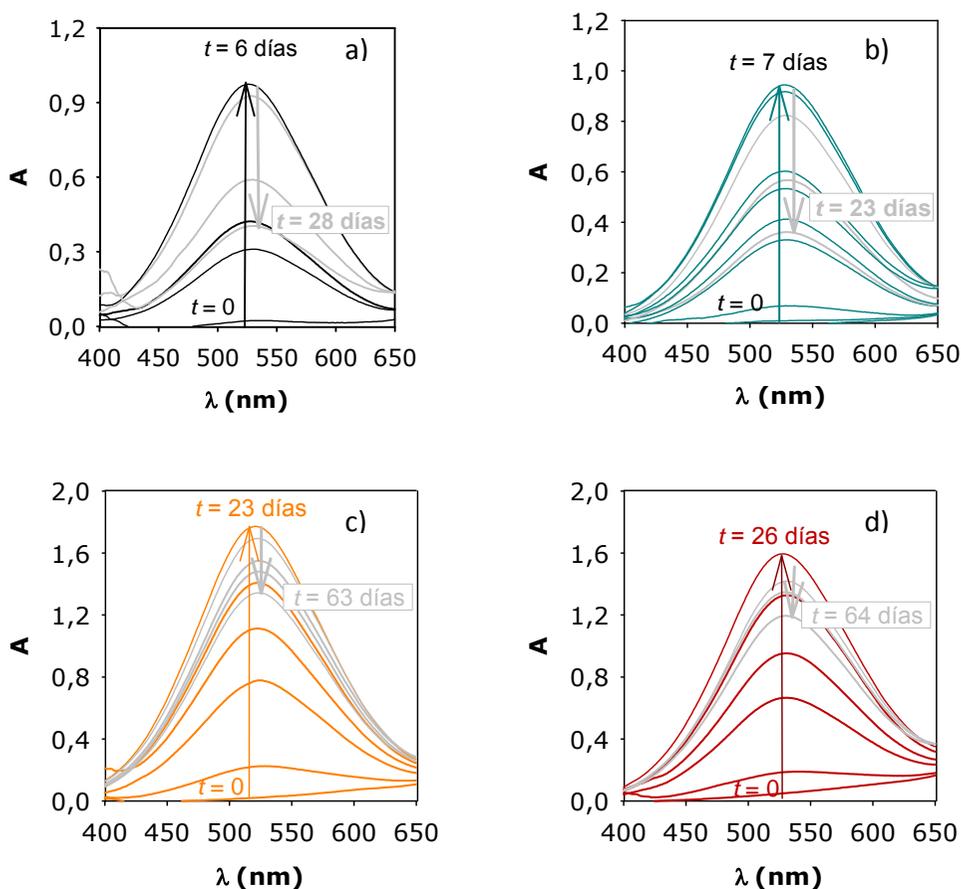


Figura 2.2.3. Espectrogramas obtenidos en el seguimiento de la formación de los aductos EP-NBP. $T = 37,5$ °C; pH = 6,96; $[NBP]_0 = 1,99 \cdot 10^{-2}$ M. a) $[PO]_0 = 5,59 \cdot 10^{-5}$ M; b) $[1,2-EB]_0 = 6,31 \cdot 10^{-5}$ M; c) $[cis-2,3-EB]_0 = 2,08 \cdot 10^{-4}$ M; d) $[trans-2,3-EB]_0 = 2,20 \cdot 10^{-4}$ M.

2.2.2.2 Materiales

2.2.2.2.1 Reactivos generales

Las especies químicas ácido acético glacial, hidróxido sódico (lentejas), ácido perclórico (60%) y 1,4-dioxano son Panreac (Barcelona, España).

Se ha utilizado agua desionizada en un equipo Wasserlab Ultramatic-ecomatic.



2.2.2.2.2 Reactivos específicos

Las especies *cis*-2,3-epoxibutano (98%), *trans*-2,3-epoxibutano (99%) y 1,2-óxido de propileno (99%) han sido Alfa Aesar (Kasrlruhe, Alemania). Los reactivos 1,2-epoxibutano (99%), 4-(*p*-nitrobenzil)piridina (98%) y trietilamina (99%) eran Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

2.2.2.2.3 Equipos de trabajo

Para el seguimiento cinético de la reacción de alquilación de NBP por los epóxidos, se ha utilizado un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401-PC de doble haz con portacubiertas CSP-240-A con seis celdas termostatadas mediante sistema Peltier. Se han manejado cubetas de cuarzo Hellma 110QS de 1 cm de paso óptico.



Las medidas de pH se han hecho con pH-metros *Crison Micro pH2000* y *Metrohm 827* pH lab.



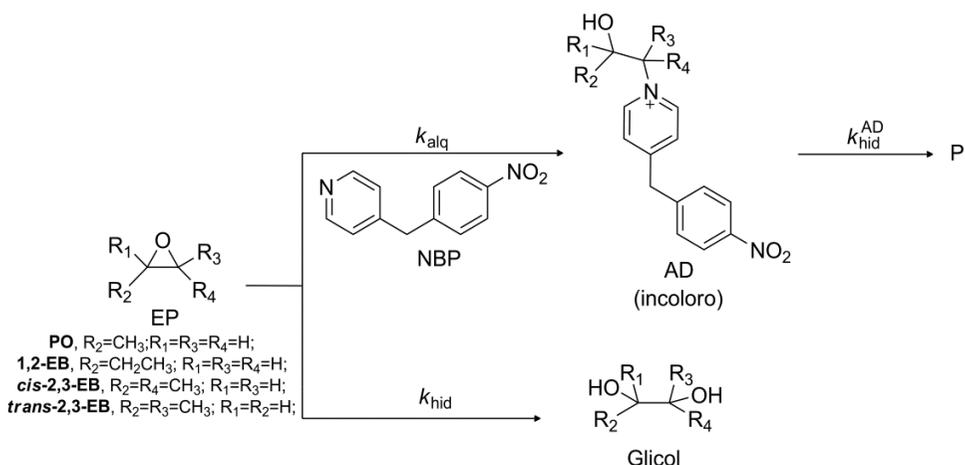
Para mantener constante la temperatura de las mezclas de reacción ($\pm 0,04$ °C) se han utilizado termostatos *Lauda Ecoline* Re 120.



2.2.3 Resultados y discusión

2.2.3.1 Mecanismo de reacción

El esquema 2.2.2 muestra el mecanismo propuesto para la alquilación de NBP por EP –PO, 1,2-EB y *cis*- y *trans*-2,3-EB–. Simultáneamente a la reacción de alquilación de NBP por el epóxido tiene lugar la de hidrólisis de este último que produce el glicol correspondiente.^{231,234,297} Como los aductos NBP-EP son inestables y se hidrolizan, también es necesario considerar ésta última reacción.



Esquema 2.2.2. Mecanismo propuesto para la reacción de alquilación de NBP por epóxidos lineales, EP.

Como los isómeros 2,3-EB presentan la misma sustitución en los dos carbonos del anillo oxiránico, el ataque de la NBP sobre tales carbonos transcurre indistinguiblemente. Por ello, cuando se haga referencia a la reacción de alquilación por los isómeros 2,3-EB, se referirá a la reacción de alquilación global, en ambos carbonos. Sin embargo el ataque de la NBP por PO y 1,2-EB tiene lugar en la posición más favorecida, *i.e.* en el carbono menos sustituido.

Los perfiles cinéticos obtenidos (variación temporal de la absorbancia en $\lambda = 560$ nm) son típicos de reacciones consecutivas, en concordancia con el mecanismo propuesto.

2.2.3.1.1 Perfiles cinéticos y ecuaciones de velocidad

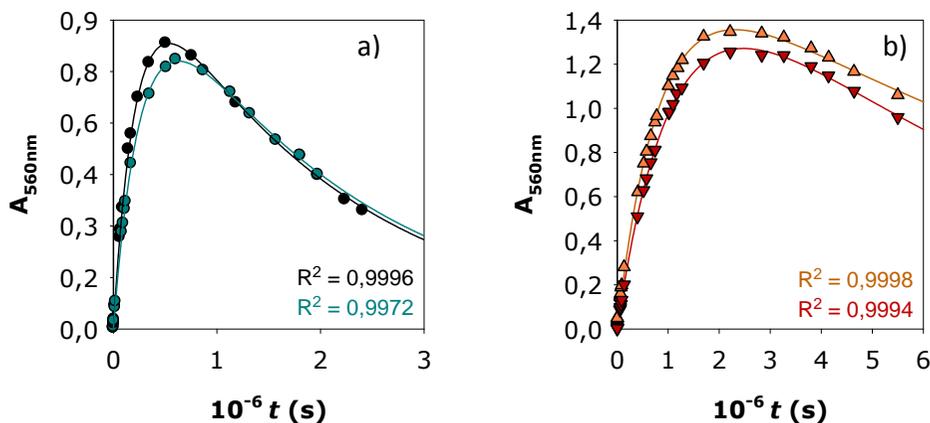


Figura 2.2.4. Perfiles cinéticos de la formación de los aductos NBP-EP. Ajustes (-) y valores experimentales; medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6,96$; $[\text{NBP}]_0 = 1,99 \cdot 10^{-2}\text{ M}$; a) $[\text{PO}]_0 = 5,59 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ (●); $[1,2\text{-EB}]_0 = 6,31 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ (●); b) $[\text{cis-2,3-EB}]_0 = 2,08 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ (▲); $[\text{trans-2,3-EB}]_0 = 2,21 \cdot 10^{-4}\text{ M}$ (▼).

Del mecanismo propuesto se deducen fácilmente las ecuaciones de velocidad (2.2.1) y (2.2.2) de desaparición del epóxido EP y de aparición del aducto, respectivamente.

$$\frac{-d[\text{EP}]}{dt} = (k_{\text{hid}} + k'_{\text{alq}})[\text{EP}] \quad (2.2.1)$$

$$\frac{d[\text{AD}]}{dt} = k'_{\text{alq}}[\text{EP}] - k_{\text{hid}}^{\text{AD}}[\text{AD}] \quad (2.2.2)$$

En estas ecuaciones $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ es la constante de velocidad observada para la hidrólisis del aducto, k_{hid} es la constante de velocidad observada para la hidrólisis del epóxido y k'_{alq} es la constante de velocidad de alquilación de NBP de pseudoprimer-orden:

$$k'_{\text{alq}} = k_{\text{alq}}[\text{NBP}] \quad (2.2.3)$$

La integración de la ecuación (2.2.1) conduce a:

$$[\text{EP}] = [\text{EP}]_o \left(e^{-\left(k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.2.4)$$

Con la ecuación anterior e integrando la (2.2.2) se obtiene la expresión (2.2.5), que permite conocer la concentración de aducto en un tiempo t .

$$[\text{AD}] = \frac{[\text{EP}]_o k'_{\text{alq}}}{\left(k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}}\right) - k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} \left(e^{-\left(k_{\text{hid}}^{\text{AD}}\right) t} - e^{-\left(k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.2.5)$$

Como el seguimiento del aducto se hace espectrofotométricamente, para obtener la ecuación integrada de velocidad en términos de absorbancia (Ec.(2.2.7)) se utiliza la ecuación de Lambert-Beer (Ec.(2.2.6)) donde A_{AD} es la absorbancia del aducto a tiempo t , ε es el coeficiente de absorción molar del aducto y l el paso óptico de la cubeta. Todos los experimentos se han realizados con una cubeta de paso óptico 1 cm.

$$A_{\text{AD}} = [\text{AD}] \varepsilon l \quad (2.2.6)$$

$$A_{\text{AD}} = \frac{\varepsilon l [\text{EP}]_o k'_{\text{alq}}}{\left(k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}}\right) - k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} \left(e^{-\left(k_{\text{hid}}^{\text{AD}}\right) t} - e^{-\left(k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.2.7)$$

Los valores A_{AD}/t se ajustan a una ecuación con tres parámetros:

$$A_{\text{AD}} = \frac{a}{b-c} \left(e^{-c t} - e^{-b t} \right) \quad (2.2.8)$$

en la que los parámetros a , b y c son:

$$a = \varepsilon l [\text{EP}]_o k'_{\text{alq}} \quad (2.2.9)$$

$$b = k'_{\text{alq}} + k_{\text{hid}} \quad (2.2.10)$$

$$c = k_{\text{hid}}^{\text{AD}} \quad (2.2.11)$$

Los perfiles cinéticos y los excelentes ajustes de los valores experimentales A_{AD}/t a la ecuación (2.2.8) (figura 2.2.4), apoyan el mecanismo propuesto.

2.2.3.1.2 Órdenes de reacción

Para verificar que la alquilación de NBP por los epóxidos transcurre por un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular, $S_{\text{N}2}$, se determinaron los órdenes de reacción respecto de las concentraciones de ambos reactivos. Se utilizó el método de velocidades iniciales.¹⁹⁶

La velocidad inicial de formación del aducto, v_o , en términos de concentración viene dada por la expresión (2.2.12) y en términos de absorbancia por la (2.2.13); n y m son los órdenes parciales respecto de las concentraciones de NBP y EP, respectivamente.

$$v_o = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{d[\text{AD}]}{dt} \approx \lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta[\text{AD}]}{\Delta t} = k_{\text{alq}} [\text{NBP}]_o^n [\text{EP}]_o^m \quad (2.2.12)$$

$$v_o = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{(\Delta A_{\text{AD}} / \epsilon l)}{\Delta t} = k_{\text{alq}} [\text{NBP}]_o^n [\text{EP}]_o^m \quad (2.2.13)$$

La ecuación (2.2.13) puede escribirse en forma logarítmica (2.2.14):

$$\log v_o \epsilon l = \log k_{\text{alq}} \epsilon l + n \log [\text{NBP}]_o + m \log [\text{EP}]_o \quad (2.2.14)$$

Con todos los epóxidos se encontraron órdenes de reacción unitarios respecto a las concentraciones de cada reactivo (figura 2.2.5) coherentemente con un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular, $S_{\text{N}2}$.

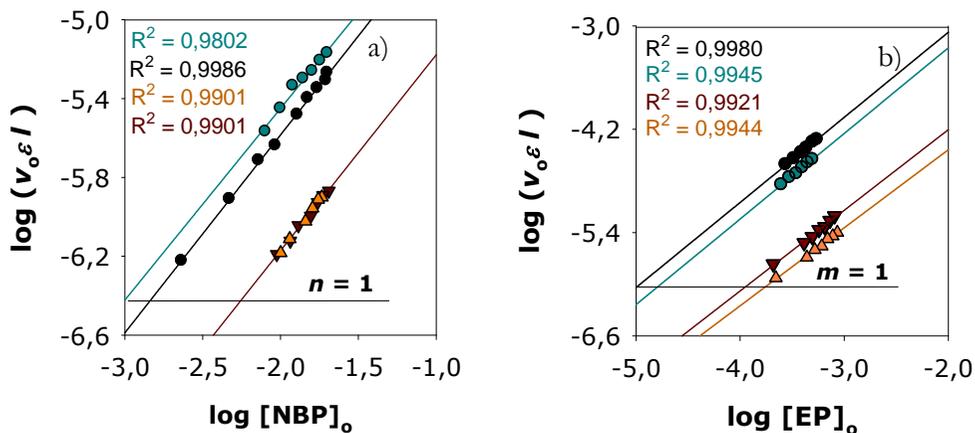


Figura 2.2.5. Órdenes parciales respecto a las concentraciones de: a) NBP, n ; b) EP, m ; para la reacción con PO (●); 1,2-EB(●); *cis*-2,3-EB (▲); *trans*-2,3-EB(▼); $T = 37,5$ °C; medio de reacción 7:3 agua: dioxano; pH = 6,96.

2.2.3.1.3 Identificación de los aductos NBP-EP mediante espectrometría de masas

Las evidencias experimentales descritas anteriormente, junto al estudio de los aductos por espectrometría de masas (figura 2.2.6), confirman la formación de aductos 1:1 NBP-EP (La relación m/z correspondiente a los picos de los iones moleculares resultó, 273,1 para NBP-PO, 287,1 para los aductos NBP-1,2-EB, y 287,2 para NBP-2,3-EB). No se observaron picos asignables a aductos de otro tipo, como los 2:1.

Aspecto esencial en el estudio de los mecanismos de alquilación investigados en este trabajo es averiguar el papel de reacciones concurrentes que pueden condicionar –de hecho lo hacen– la influencia de la alquilación propiamente dicha. Para ello se deben calcular previamente los valores de los coeficientes de absorción molar de los aductos NBP-EP formados. Así se podrán conocer los valores de la constante de velocidad de alquilación de forma directa mediante el método de velocidades iniciales o haciendo uso del parámetro a del ajuste (*vide infra*).

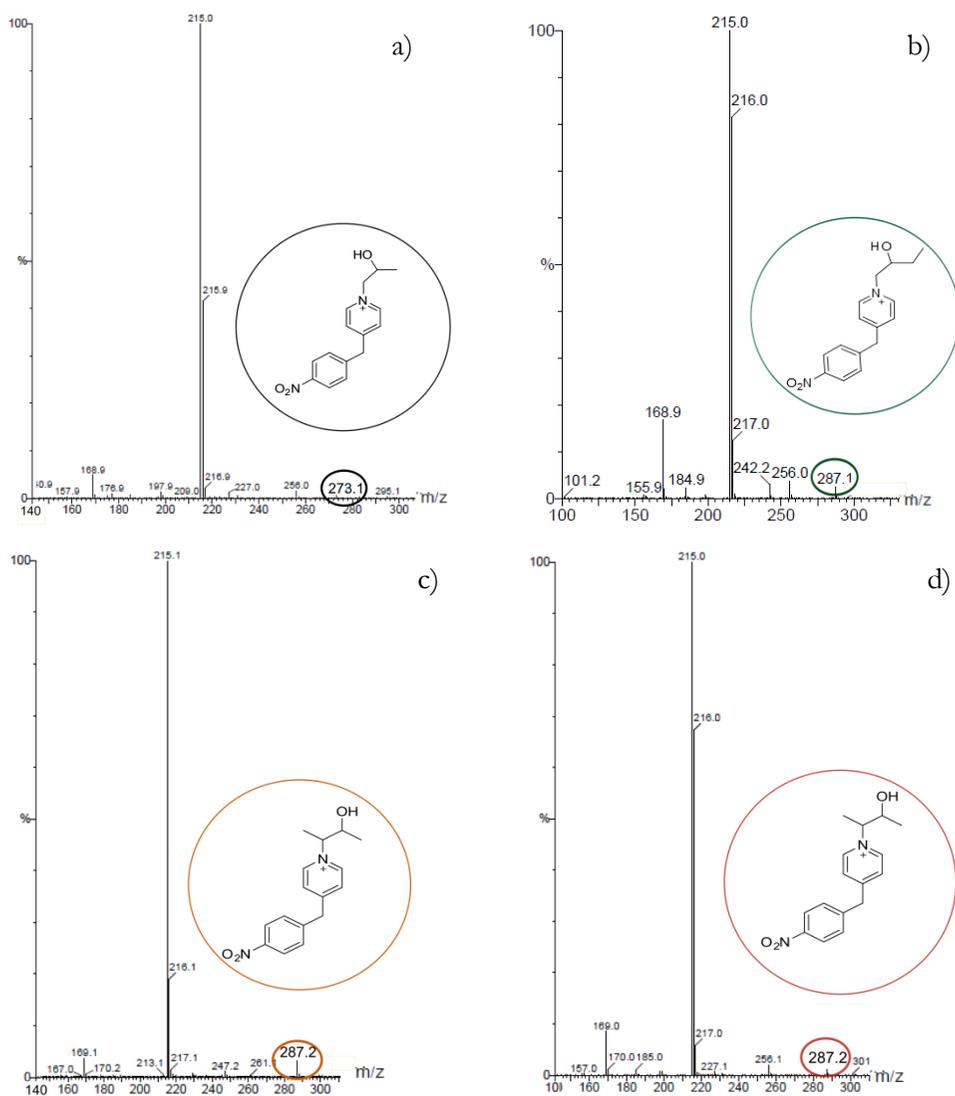


Figura 2.2.6. Espectros de masas de los aductos NBP-EP, obtenidos tras la separación de la mezcla de alquilación mediante HPLC: a) NBP-PO, $t_r = 2,11$ min.; b) NBP-1,2-EB $t_r = 2,23$ min.; c) NBP-*cis*-2,3-EB, $t_r = 2,14$ min.; d) NBP-*trans*-2,3-EB, $t_r = 2,14$ min.

2.2.3.2 Estudio cinético de las reacciones involucradas en la efectividad de la alquilación

2.2.3.2.1 Determinación del coeficiente de absorción molar de los aductos NBP-EP

Para determinar el coeficiente de absorción molar de los aductos NBP-EP, ϵ , se seleccionó la longitud de onda $\lambda = 560$ nm, para poder establecer comparaciones con otros compuestos estudiados previamente en nuestro laboratorio. En esta longitud de onda absorben exclusivamente los aductos NBP-EP.

Como se procede de manera distinta con los epóxidos que reaccionan rápidamente con la NBP (PO y 1,2-EB) que con los que reaccionan lentamente (*cis* y *trans* 2,3-EB), se considerarán de forma separada.

2.2.3.2.1.1 Coeficientes de absorción molar de NBP-PO y NBP-1,2-EB

Para conocer los coeficientes de absorción molar de los aductos NBP-PO y NBP-1,2-EB, se hicieron experimentos en los que se hacía variar la concentración de NBP, mantenidas constantes las demás magnitudes. Los experimentos se siguieron hasta un elevado porcentaje de reacción. El ajuste a la ecuación (2.2.8) de los pares de datos A_{AD}/t conduce a los valores de los parámetros a , b y c . La pendiente de la recta obtenida al representar los valores del parámetro b ($b = k_{alq} [NBP] + k_{hid}$) frente a los de $[NBP]$ conduce directamente al valor de la constante de velocidad de alquilación, k_{alq} .

Los ajustes de los resultados a pH neutro (figura 2.2.7) conducen a las expresiones (2.2.15) y (2.2.16).

$$b_{PO37,5} = \left((1,76 \pm 0,06) \cdot 10^{-4} [NBP] + (1,06 \pm 0,08) 10^{-6} \right) \text{ s}^{-1} \quad (2.2.15)$$

$$b_{EB45,0} = \left((2,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-4} [NBP] + (1 \pm 0,6) 10^{-5} \right) \text{ s}^{-1} \quad (2.2.16)$$

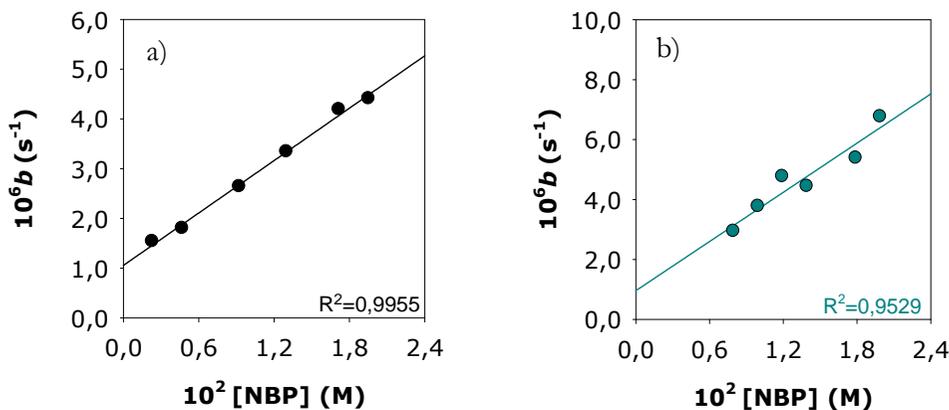


Figura 2.2.7. Cálculo de k_{alq} y k_{hid} . Medio de reacción 7:3 agua: dioxano; pH = 6,96; Valores experimentales (●) y ajuste (-); $[PO]_0 = 5,59 \cdot 10^{-5}$ M; $T = 37,5$ °C (●); $[1,2-EB]_0 = 6,31 \cdot 10^{-5}$ M; $T = 45,0$ °C (●).

Conocidos los valores de k_{alq} (Ecs. (2.2.15) y (2.2.16)) y del parámetro a para unas condiciones determinadas (tabla 2.2.7), el valor de ε se obtiene directamente (tabla 2.2.7 y ecuación (2.2.17)).

$$\varepsilon = \frac{a}{l[\text{EP}]_0 k'_{alq}} \quad (2.2.17)$$

Como valor de ε se ha tomado el valor medio de los reseñados en la tabla 2.2.7. Para el óxido de propileno, $\varepsilon_{PO} = (2,6 \pm 0,1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para el 1,2-epoxibutano, $\varepsilon_{1,2-EB} = (2,2 \pm 0,1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tabla 2.2.7. Parámetro a y coeficientes de absorción molar de los aductos NBP-PO y NBP-1,2-EB en función de [NBP].

PO			1,2-EB		
$10^6 a$ (s ⁻¹)	10^2 [NBP] (M)	$10^{-4} \varepsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$10^6 a$ (s ⁻¹)	10^2 [NBP] (M)	$10^{-4} \varepsilon$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
4,93	1,95	2,56	7,85	1,99	2,31
4,50	1,72	2,72	6,31	1,79	2,06
3,34	1,30	2,61	5,08	1,39	2,14
2,31	0,92	2,54	4,57	1,19	2,25
1,23	0,47	2,66	3,78	0,99	2,23
0,60	0,23	2,62	2,99	0,80	2,20

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96; $[PO]_0 = 5,59 \cdot 10^{-5}$ M; $T = 37,5$ °C; $[1,2-EB]_0 = 6,31 \cdot 10^{-5}$ M; $T = 45,0$ °C

2.2.3.2.1.2 Coeficientes de absorción molar de NBP-*cis*-2,3-EB y NBP-*trans*-2,3-EB

Para determinar los coeficientes de absorción molar de los isómeros *cis* y *trans*-2,3-EB se ha utilizado el método de Gillete, usado por Barbin *et al.* con el óxido de cloroetileno.²⁹⁸ La razón de no manejar el mismo método que para PO y 1,2-EB reside en que las reacciones de *cis* y *trans*-2,3-EB con NBP en medio neutro son muy lentas (es necesario prolongar el seguimiento hasta dos meses). La utilización del método de Gillete en medio ácido permite reducir el tiempo de seguimiento de dos meses a 23 días.

Como en medio ácido la reacción de hidrólisis del aducto NBP-EP es despreciable, $k_{\text{hid}}^{\text{AD}} = 0$ (figura 2.2.8), la ecuación integrada de velocidad en términos de absorbancia (Ec (2.2.7)) para la formación de aducto resulta:

$$A_{\text{AD}} = \frac{\varepsilon l [\text{EP}]_o k'_{\text{alq}}}{(k'_{\text{alq}} + k'_{\text{hid}})} \left(1 - e^{-(k'_{\text{alq}} + k'_{\text{hid}}) t} \right) \quad (2.2.18)$$

La figura 2.2.8 ilustra el excelente ajuste de los valores experimentales a la ecuación (2.2.18).

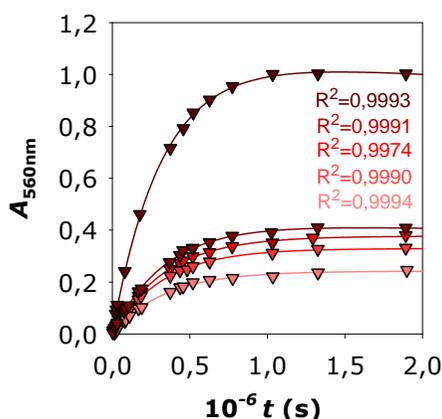


Figura 2.2.8. Determinación de A_{inf} para NBP-*trans*-2,3-EB. Valores experimentales (\blacktriangledown) y ajuste (-); medio 7:3 agua: dioxano; $T = 37,5$ °C; $\text{pH} = 5,06$; $[\text{trans-2,3-EB}]_o = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M.

A $t = \infty$ la expresión (2.2.18) conduce al valor de la absorbancia A_{inf} .

$$A_{\text{inf}} = \frac{\varepsilon l [\text{EP}]_o k'_{\text{alq}}}{(k'_{\text{alq}} + k'_{\text{hid}})} \quad (2.2.19)$$

La ecuación anterior puede escribirse en la forma (2.2.20), que permite obtener el coeficiente de absorción molar del aducto NBP-EP.

$$\frac{[\text{EP}]_o}{A_{\text{inf}}} = \frac{1}{\varepsilon l} + \frac{k'_{\text{hid}}}{k'_{\text{alq}}} \frac{1}{\varepsilon l [\text{NBP}]} \quad (2.2.20)$$

A $\text{pH} = 5$ se obtuvo del inverso del valor de la ordenada en el origen de la representación del cociente $[\text{EP}]_o/A_{\text{inf}}$ frente a $1/[\text{NBP}]$ (figura 2.2.9), ecuaciones (2.2.21) y (2.2.22)).

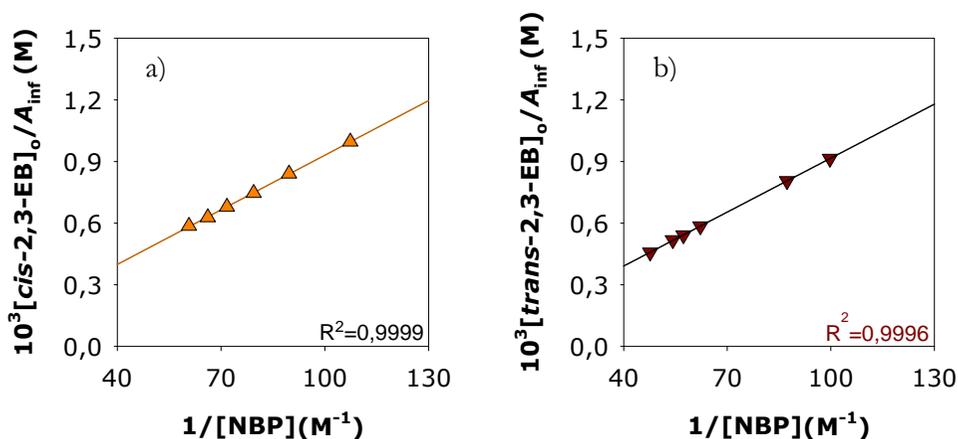


Figura 2.2.9. Obtención del coeficiente de absorción molar de los aductos NBP-EP. $\text{pH} = 5,06$; $T = 37,5$ °C; a) $[\text{cis-2,3-EB}]_o = 6,31 \cdot 10^{-5}$ M (\blacktriangle); b) $[\text{trans-2,3-EB}]_o = 2,25 \cdot 10^{-4}$ M (\blacktriangledown).

$$\frac{[\text{cis-2,3-EB}]_o}{A_{\text{inf}}} = (4,4 \pm 0,6) \cdot 10^{-5} + (8,86 \pm 0,07) \cdot 10^{-6} \frac{1}{[\text{NBP}]} \text{ (M)} \quad (2.2.21)$$

$$\frac{[\text{trans-2,3-EB}]_o}{A_{\text{inf}}} = (4 \pm 1) \cdot 10^{-5} + (8,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-6} \frac{1}{[\text{NBP}]} \text{ (M)} \quad (2.2.22)$$

Los valores de los coeficientes de absorción molar obtenidos para los aductos NBP-*cis*-2,3-EB y NBP-*trans*-2,3-EB son: $\varepsilon = (2,27 \pm 0,03) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\varepsilon = (2,5 \pm 0,1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

La tabla 2.2.8 muestra los valores calculados para los coeficientes de absorción molar de los diferentes aductos EP-NBP y permite observar que esos valores dependen del epóxido que forma parte del aducto. Se observan variaciones de hasta un 20%. Puede concluirse así que los valores de los coeficientes de absorción molar dependen de la estructura del aducto, como han sugerido previamente diversos autores.^{85,93,107,112,168} Este resultado es interesante porque en numerosos estudios se ha utilizado para calcular las constantes de alquilación un mismo coeficiente de absorción para todos los aductos.⁸² Probablemente ésta sea la causa de algunos errores y discrepancias encontrados en la bibliografía.^{18,82,103,133,179-181,185}

Tabla 2.2.8. Coeficientes de absorción molar de los aductos EP-NBP.

	PO		1,2-EB		<i>cis</i> -2,3-EB		<i>trans</i> -2,3-EB	
$10^{-4} \varepsilon_{560\text{nm}}$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	2,6	± 0,1	2,2	± 0,1	2,27	± 0,03	2,5	± 0,1

Medio de reacción 7:3 aguadioxano.

2.2.3.2.2 Estudio de la reacción de alquilación de NBP por epóxidos lineales

Conocido el valor de ε , cada experimento cinético permite conocer el de k_{alq} a partir del parámetro a del ajuste A_{AD}/t (Ec (2.2.23)), o mediante el método de velocidades iniciales, a partir de la variación inicial de absorbancia (Ec (2.2.24)).

$$k_{\text{alq}} = \frac{a}{\varepsilon l [\text{EP}]_0 [\text{NBP}]_0} \quad (2.2.23)$$

$$k_{\text{alq}} = \frac{\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta A_{\text{AD}}}{\Delta t}}{\varepsilon l [\text{EP}]_0 [\text{NBP}]_0} \quad (2.2.24)$$

a) Influencia del pH

Para conocer la influencia del pH sobre la constante de velocidad de la alquilación de NBP por EP se ha trabajado en el intervalo $\text{pH} = 5-7$. Como la NBP puede encontrarse disociada en medio ácido, su concentración inicial efectiva se ha calculado teniendo en cuenta el pK_a en el medio de reacción (7:3 agua:dioxano; $\text{pK}_a = 4,4$).

Los valores encontrados de las constantes de velocidad (tabla 2.2.9) muestran que el pH no ejerce influencia apreciable sobre la constante de velocidad de alquilación de NBP para ninguno de los epóxidos investigados.

Tabla 2.2.9. Influencia del pH sobre k_{alq} .

Compuesto	pH	$10^4 k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
PO	5,12	1,75
	5,95	1,76
	6,96	1,70
1,2-EB	5,12	1,32
	5,95	1,41
	6,96	1,42
<i>cis</i> -2,3-EB	5,06	0,14
	5,20	0,16
	6,69	0,15
<i>trans</i> -2,3-EB	5,06	0,15
	5,20	0,12
	6,69	0,15

Medio de reacción 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C.

Los valores de k_{alq} para PO y 1,2-EB son aproximadamente diez veces mayores que las de los isómeros 2,3-EB. La tendencia de reactividad encontrada es acorde con la encontrada en la bibliografía para las reacciones de epóxidos con otros sustratos (tabla 2.2.3, pág. 73).¹⁰

La comparación de nuestros resultados con los obtenidos por Hemminki *et al.* en su estudio de la reactividad de epóxidos con la NBP, revela notables discrepancias.⁹⁶ Estos autores no observan diferencias apreciables en la reactividad de epóxidos monosustituídos con sustituyentes alquílicos de diferente longitud. La razón puede ser doble: i) Hemminki *et al.* consideran que la reacción de alquilación

con la NBP es la única reacción significativa en un porcentaje de reacción corto, despreciando las posibles reacciones concurrentes de hidrólisis de los epóxidos; y ii) no tienen en cuenta la variación entre los diferentes coeficientes de absorción molar de los aductos que, como hemos visto, puede alcanzar el 20% (tabla 2.2.8 pág 96).

b) Influencia de la temperatura

La influencia de la temperatura sobre las constantes de velocidad de alquilación se estudió para los cuatro epóxidos en el intervalo 30,0-45,0 °C. La tabla 2.2.10 muestra los resultados. Los valores obtenidos muestran un buen ajuste (figura 2.2.10) a las ecuaciones de Arrhenius y Eyring–Wynne-Jones ((2.2.25) y (2.2.26), respectivamente). Con ellas se han calculado en cada caso los parámetros de activación reflejados en la tabla 2.2.11.

Tabla 2.2.10. Influencia de la temperatura en la constante de velocidad de alquilación de NBP por epóxidos.

	T (°C)	EP			
		PO	1,2-EB	cis-2,3-EB	trans-2,3-EB
$10^4 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	30,0	0,80 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,062 ± 0,005	0,05 ± 0,01
	32,5	1,18 ± 0,08	1,0 ± 0,2	0,083 ± 0,007	0,07 ± 0,02
	35,0	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,105 ± 0,008	0,09 ± 0,02
	37,5	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,04
	40,0	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,3	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,05
	42,5	2,6 ± 0,2	2,3 ± 0,4	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,05
	45,0	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,5	0,33 ± 0,02	0,26 ± 0,06

Medio de reacción 7:3 aguacidosano; pH = 6,96

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \frac{1}{T} \quad (2.2.25)$$

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{k}{h} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad (2.2.26)$$

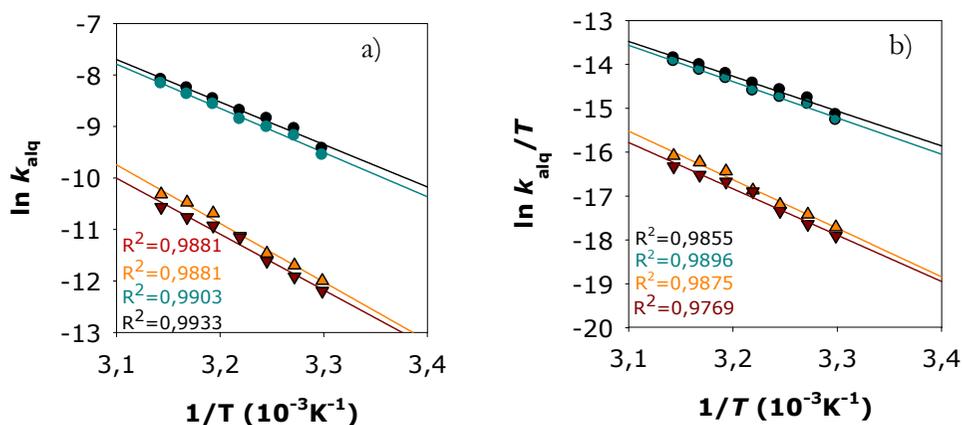


Figura 2.2.10. Representación de: a) Arrhenius y b) Eyring-Wynne-Jones para la reacción de alquilación de NBP por PO (●), 1,2-EB (●), *cis*-2,3-EB (▲) y *trans*-2,3-EB (▼); pH = 6,96.

Como puede observarse, tanto las constantes de velocidad de orden dos para la alquilación como las correspondientes energías y energías libres de activación muestran que el potencial alquilante de los epóxidos disminuye en el orden: PO > 1,2-EB > *cis*-2,3-EB ~ *trans*-2,3-EB. Este resultado es consistente con investigaciones de otros autores sobre la reactividad de epóxidos con nucleófilos que han mostrado que las reacciones S_N2 se encuentran más favorecidas por los epóxidos monosustituidos que por los disustituidos, debido a factores estéricos.¹⁰

Tabla 2.2.11. Parámetros de activación de las reacciones de alquilación de NBP por epóxidos.

Parámetros de activación	EP			
	PO	1,2-EB	<i>cis</i> -2,3-EB	<i>trans</i> -2,3-EB
E_a alq (kJ·mol ⁻¹)	68 ± 4	67 ± 3	95 ± 5	90 ± 6
ΔG^\ddagger alq (25,0 °C) (kJ·mol ⁻¹)	97 ± 5	98 ± 3	104 ± 5	105 ± 8

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96.

2.2.3.2.3 Estudio de la reacción de hidrólisis de epóxidos lineales

La constante de hidrólisis de los epóxidos, k_{hid} , se ha obtenido con los valores del parámetro b del ajuste y de la pseudoconstante de alquilación, k'_{alq} :

$$k_{\text{hid}} = b - k'_{\text{alq}} \quad (2.2.27)$$

a) Influencia del pH

Estudios sobre la hidrólisis de epóxidos han mostrado la existencia de tres mecanismos distinguibles cinéticamente por los que puede transcurrir la reacción: reacción espontánea o no catalizada, k_{hid}° , y reacciones catalizadas por ácido, k_{H^+} , y por base, k_{OH^-} ,^{10,234,238} de modo que la constante de velocidad de hidrólisis observada, k_{hid} , puede escribirse así:

$$k_{\text{hid}} = k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{hid}}^{\circ} + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] \quad (2.1.20)$$

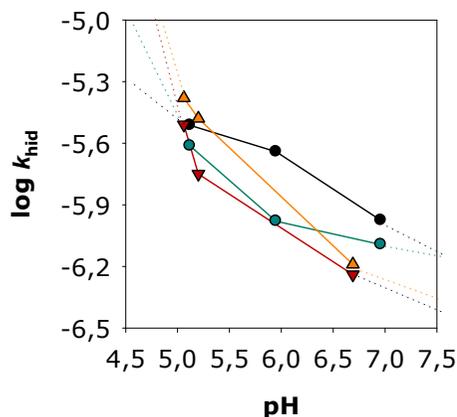


Figura 2.2.11. Influencia del pH en la hidrólisis de epóxidos. Medio de reacción 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C. PO (●), 1,2-EB (●), cis-2,3-EB (▲) y trans-2,3-EB (▼);

Tabla 2.2.12. Influencia del pH sobre las constantes de velocidad de hidrólisis observadas de los epóxidos estudiados.

Compuesto	pH	$10^6 k_{\text{hid}}$ (s ⁻¹)
PO	5,12	3,07
	5,95	2,28
	6,96	1,06
1,2-EB	5,12	2,44
	5,95	1,05
	6,96	0,81
cis-2,3-EB	5,06	4,18
	5,20	3,33
	6,69	0,65
trans-2,3-EB	5,06	3,11
	5,20	1,76
	6,69	0,57

Medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C.

En nuestro caso, en el intervalo $\text{pH} = 5-7$ se observa que el aumento de la acidez del medio hace aumentar k_{hid} (figura 2.2.11 y tabla 2.2.12), lo que indica que la reacción de hidrólisis de EP presenta catálisis ácida.

b) Influencia de la temperatura

A título comparativo con la influencia de la temperatura en la alquilación propiamente dicha, se ha estudiado la influencia de la temperatura sobre k_{hid} en el intervalo $T = 32,5-45,0$ °C para PO y 1,2-EB (tabla 2.2.13). Para los regioisómeros de 2,3-EB se ha trabajado solamente a $T \geq 37,5$ °C. Esto se debe a que las reacciones para estos últimos son muy lentas y a temperaturas inferiores, el seguimiento se tendría que prolongar durante varios meses.

Tabla 2.2.13. Influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de hidrólisis de EP.

	<i>T</i> (°C)	EP			
		PO	1,2-EB	<i>cis</i> -2,3-EB	<i>trans</i> -2,3-EB
$10^6 k_{\text{hid}}$ (s ⁻¹)	32,5	0,53 ± 0,01	0,66 ± 0,07	-	-
	35,0	0,93 ± 0,02	0,66 ± 0,08	-	-
	37,5	1,06 ± 0,02	0,80 ± 0,08	0,65 ± 0,03	0,57 ± 0,14
	40,0	1,60 ± 0,03	0,70 ± 0,07	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,42
	42,5	2,03 ± 0,04	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,44
	45,0	2,50 ± 0,05	1,1 ± 0,1	2,6 ± 0,4	-
E_a^{hid} (kJ·mol ⁻¹)		97 ± 8	76 ± 6	184 ± 99	135 ± 31

Medio de reacción 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96.

La tabla 2.2.13 recoge los valores de las constantes de hidrólisis y de la energía de activación para las reacciones de hidrólisis de los epóxidos aquí investigados (figura (2.2.13)).

Se observa que, a diferencia de las constantes de velocidad de las reacciones de alquilación, las de hidrólisis de los epóxidos son del mismo orden para todos los aquí estudiados. Ello se puede interpretar pensando que, cuando la molécula que reacciona con el epóxido es pequeña (caso del agua) la estructura del

epóxido (y, por tanto, el impedimento estérico) no condiciona la reactividad de forma drástica, mientras que sí lo hace frente a moléculas de tamaño considerable como la NBP.

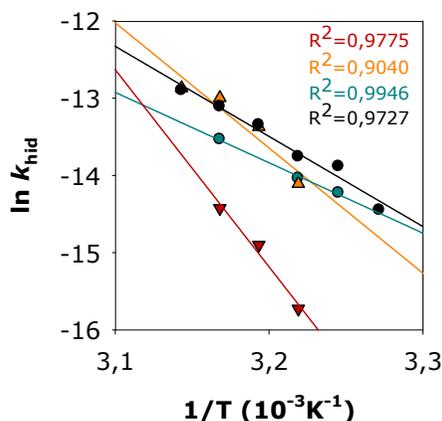


Figura 2.2.12. Diagramas de Arrhenius para las reacciones de hidrólisis de epóxidos. Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96; PO (●), 1,2-EB (●), *cis*-2,3-EB (▲) y *trans*-2,3-EB (▼).

2.2.3.2.4 Estudio de las reacciones de hidrólisis del aducto NBP-EP

Como se ha indicado antes (apartado 2.2.3.1, pág. 86), una de las reacciones concurrentes con la de alquilación propiamente dicha es la de hidrólisis de los aductos NBP-EP formados. Por eso en este trabajo se ha estudiado cinéticamente esa reacción para cada uno de los epóxidos con que se ha trabajado.

La constante de hidrólisis de cada aducto, $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$, se ha calculado de forma directa a partir del ajuste A_{AD}/t . Su valor viene dado por el parámetro ϵ del ajuste (Ec (2.2.11)).

a) Influencia del pH

Al estudiar la influencia del pH en la constante de velocidad de hidrólisis del aducto NBP-EP se comprueba que la reacción está catalizada por base (tabla

2.2.14). En medio ácido, $\text{pH} < 5,3$, la reacción transcurre tan lentamente que no se detecta y puede despreciarse.

Tabla 2.2.14. Influencia del pH sobre las constantes de hidrólisis de los aductos NBP-EP.

Compuesto	pH	$10^7 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s^{-1})
PO	5,12	n.d.
	5,95	1,39
	6,96	5,31
1,2-EB	5,12	n.d.
	5,95	3,66
	6,96	5,13
cis-2,3-EB	5,06	n.d.
	5,20	n.d.
	6,69	1,19
trans-2,3-EB	5,06	n.d.
	5,20	n.d.
	6,69	1,49

Medio de reacción 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C; n.d. : no detectado.

b) Influencia de la temperatura

La tabla 2.2.15 muestra los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la temperatura sobre las reacciones de hidrólisis de los aductos NBP-EP en el intervalo $T = 32,5\text{-}45,0$ °C.

Se observa que los aductos formados por los epóxidos monosustituídos, 1,2-EB y PO, reaccionan hasta cuatro veces más rápidamente que los formados por los isómeros 2,3-EB. Una posible explicación a este hecho podría ser que la reacción de hidrólisis se vea iniciada por el ataque de una molécula de agua sobre el carbono directamente unido al átomo de nitrógeno. Ese carbono se encuentra menos sustituido en el caso del PO y el 1,2-EB que en el de los isómeros 2,3-EB.

Tabla 2.2.15. Influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de hidrólisis de los aductos EP-NBP.

	<i>T</i> (°C)	EP					
		PO	1,2-EB		<i>cis</i> -2,3-EB	<i>trans</i> -2,3-EB	
$10^7 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s ⁻¹)	32,5	-	2,8 ± 0,3		-	-	
	35,0	2,99 ± 0,09	2,9 ± 0,09		-	-	
	37,5	5,35 ± 0,09	5,1 ± 0,1		1,19 ± 0,04	1,48 ± 0,13	
	40,0	8,53 ± 0,2	10,8 ± 0,9		4,0 ± 0,9	3,38 ± 0,37	
	42,5	11,72 ± 0,2	10,2 ± 1,5		4,9 ± 1,0	5,44 ± 0,34	
	45,0	13,86 ± 0,20	15,7 ± 2		9,2 ± 0,2	-	
$E_a^{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (kJ·mol ⁻¹)		126 ± 15	110 ± 6		209 ± 43	212 ± 32	

Medio de reacción 7:3 aguadioxano; pH=6,96.

2.2.3.3 Parámetros cinéticos que caracterizan la reactividad de los epóxidos lineales

Es de interés señalar que: i) la NBP modela la posición *N7* de la guanina; ii) la capacidad alquilante de muchas sustancias, junto con otros parámetros químicos de naturaleza cinética ha demostrado ser factor determinante de su actividad biológica; iii) hasta la fecha no se han descrito correlaciones cuantitativas claras entre la actividad química de los oxiranos como agentes alquilantes y su actividad biológica.

Por esas razones nos vamos a fijar a continuación en algunos parámetros cinéticos que se utilizarán después para tratar de establecer correlaciones entre la reactividad química y la actividad biológica de los oxiranos estudiados.

Además de k_{alq} , $E_{a\text{alq}}$ y k_{hid} , hemos manejado dos parámetros selectivos: i) la quimioselectividad de los epóxidos frente a la NBP, S_{NBP} (véase apartado 2.1.2.3.2.1, pág.45), que en términos cinéticos es el cociente entre las constantes de velocidad de alquilación de la NBP e hidrólisis de los epóxidos; ii) la constante de sustrato de Swain-Scott, s , que aporta información básica sobre la selectividad de los oxiranos por la alquilación y la hidrólisis (véase apartado 2.1.2.3.2.1, pág.44).

La tabla 2.2.16 muestra los valores obtenidos de S_{NBP} y s a diferentes temperaturas. Los altos valores de S_{NBP} ($2,6 < \log S_{\text{NBP}} < 4,0$) y de las constantes s ($s > 0,7$) son típicos de mecanismos $S_{\text{N}}2$,^{15,46,64,148,312} lo que apoya el mecanismo propuesto para la reacción de alquilación. También indican la preferencia de los agentes alquilantes por reaccionar con centros nitrogenados del ADN, (e. g. centros altamente nucleófilos $N7\text{-G}$, $N3\text{-A}$) que está relacionada con una baja genotoxicidad y una proporción elevada de aductos $N7\text{-}/O6\text{-alquilguanina}$.^{46,175,303,313,314} Los valores de s son acordes con los obtenidos previamente para los óxidos de propileno y etileno (véase tabla 2.2.4 pág.74). Para *cis*- y *trans*-2,3-EB los valores de s son notablemente inferiores debido a que los carbonos secundarios causan impedimento a la reacción de alquilación.⁴⁰

Se observa que, al disminuir la temperatura, aumentan los valores de s y S_{NBP} . Este comportamiento ha sido observado también por otros autores.⁶⁴ La tendencia encontrada se puede atribuir, utilizando la teoría del estado de transición y la formación de un complejo activo, a una diferencia sustancial entre los parámetros de activación asociados a la reacción con los dos nucleófilos estudiados, agua y NBP. A la reacción con el nucleófilo más potente, NBP ($n = 3,5$), le debe corresponder una energía libre de activación muy inferior a la del agua ($n = 0$). Se ha comprobado que esta condición se cumple para el PO y que la variación entre las energías libres de Gibbs para la hidrólisis del PO y la alquilación de la NBP por PO es debida fundamentalmente al factor entálpico. Esto significa que el aumento de s y S_{NBP} con la disminución de la temperatura es debida al mayor incremento de la entalpía de activación de la reacción de hidrólisis de EP frente a la de la reacción de alquilación de la NBP por EP (véanse págs. 99 y 101).

La gran variación de los parámetros con la temperatura indica la necesidad de considerar este factor a la hora de utilizarlos en el establecimiento de correlaciones.

Tabla 2.2.16. Dependencia de algunos parámetros químicos con la temperatura: Quimioselectividad, constante de Swain-Scott, capacidad alquilante y efectividad.

	<i>T</i> (°C)	EP			
		PO	1,2-EB	<i>cis</i> -2,3-EB	<i>trans</i> -2,3-EB
S_{NBP}	32,5	8644	6079	-	-
	35,0	5982	7125	-	-
	37,5	6177	6890	762	971
	40,0	5124	1058	570	411
	42,5	4989	6765	484	467
	45,0	4755	9969	499	-
s	32,5	1,12	1,08	-	-
	35,0	1,08	1,10	-	-
	37,5	1,08	1,10	0,82	0,85
	40,0	1,06	1,15	0,79	0,75
	42,5	1,06	1,09	0,77	0,76
	45,0	1,05	1,14	0,77	-
f	32,5	0,82 ± 0,06	0,7 ± 0,1	-	-
	35,0	0,75 ± 0,06	0,8 ± 0,1	-	-
	37,5	0,76 ± 0,06	0,8 ± 0,1	0,28 ± 0,02	0,33 ± 0,08
	40,0	0,72 ± 0,06	0,8 ± 0,1	0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,04
	42,5	0,72 ± 0,05	0,8 ± 0,1	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,05
	45,0	0,71 ± 0,05	0,8 ± 0,1	0,20 ± 0,02	-
10⁻⁴AL (min)	32,5	3,2 ± 0,2	4,5 ± 0,7	-	-
	35,0	4,2 ± 0,3	4,5 ± 0,7	-	-
	37,5	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,4	4,00 ± 0,035	3,7 ± 0,9
	40,0	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,00 ± 0,028	0,9 ± 0,2
	42,5	1,0 ± 0,08	1,3 ± 0,2	0,70 ± 0,01	0,6 ± 0,1
	45,0	0,85 ± 0,07	0,9 ± 0,2	0,40 ± 0,01	-

Medio de reacción : agua:dioxano 7:3 ; pH=6,96.

Desde hace más de cincuenta años se admite que el riesgo de mutación por exposición a un compuesto es proporcional a la constante de velocidad de alquilación, $k_{n=2}$, para un sustrato con $n = 2$ (centros poco reactivos del ADN como *O*⁶-guanina).¹⁷⁵ A 37,5 °C los valores estimados de este parámetro, utilizando la ecuación de Swain-Scott, para PO, 1,2-EB, *cis*-2,3-EB y *trans*-2,3-EB fueron: 3,99, 3,21, 0,85 y 0,75 · 10⁻⁶ M⁻¹s⁻¹, respectivamente. Estos resultados concuerdan satisfactoriamente con los encontrados en la bibliografía para PO y 1,2-EB (3.33 y 3.11·10⁻⁶ M⁻¹s⁻¹ a 37,0 °C, respectivamente determinados con otra metodología (véase tabla 2.2.4 pág. 74)).

Entre los parámetros más útiles sobre la reactividad química de agentes alquilantes se encuentran la fracción de agente alquilante que forma aducto, f , y la vida del aducto, AL (*véase* apartado 2.1.2.3.2.1, págs. 45 y 46). Como estos factores se han correlacionado con éxito con el potencial mutágeno de diferentes compuestos,^{201,313,315,316} se han obtenido sus valores a diferentes temperaturas y en medios de diferente acidez.

Los valores de f recogidos en las tablas 2.2.16 y 2.2.17 indican que, para el PO y el 1,2-EB en medio neutro, el 70-80% de la concentración inicial de agente alquilante da lugar a la formación de aducto mientras que el 20-30% restante es hidrolizado. Sin embargo, para los isómeros del 2,3-EB, se observa el comportamiento contrario, los epóxidos son mayoritariamente hidrolizados. En general, f disminuye al aumentar la temperatura debido a la mayor influencia de la ésta sobre la constante de hidrólisis.

Tabla 2.2.17. Influencia del pH sobre las eficacias y eficiencias de alquilación, f y AL.

Compuesto	pH	f	AL (min)
PO	5,12	0,48	-
	5,95	0,51	72685
	6,96	0,76	23700
1,2-EB	5,12	0,50	-
	5,95	0,73	33227
	6,96	0,78	25305
<i>cis</i> -2,3-EB	5,06	0,06	-
	5,20	0,09	-
	6,69	0,28	38971
<i>trans</i> -2,3-EB	5,06	0,09	-
	5,20	0,12	-
	6,69	0,33	37507

Medio 7:3 agua:dioxano; T = 37,5°C.

Se observa que el parámetro AL también se ve afectado por la temperatura y el pH, aumentando con la disminución de éstos últimos (tablas 2.2.16 y 2.2.17). La reacción de hidrólisis del aducto es el factor responsable del aumento de AL con la disminución del pH (ni la variación de k_{alq} –independiente del pH– ni de

k_{hid} –aumenta al disminuir el pH– con la acidez del medio justifican la tendencia encontrada). La relación directa de AL con la temperatura explicada tanto por el aumento de f como $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$.

2.2.3.4 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

Concluido el estudio cinético de la reacción de alquilación de NBP por EP y determinados los parámetros químicos que caracterizan la reactividad de estos compuestos, se ha tratado de establecer correlaciones: i) cualitativas entre las respuestas del test de *Ames* y el test de NBP; ii) semicuantitativas entre k_{alq} , f y AL calculadas en este trabajo y los datos bibliográficos de mutagenia en *Salmonella Typhimurium*, *Neurospora* y *Schizosaccharomizès Pombe* (véase apartado 2.2.1.5, págs. 75-76); iii) cuantitativas entre algunos de los parámetros calculados por nosotros (k_{alq} , $E_{a \text{ alq}}$, k_{hid} , $k_{n=2}$, s y S_{NBP}) y datos bibliográficos de actividad biológica (potencia de inducción de intercambio de cromátidas hermanas (SCEIP) en células V79 de Hámster Chino y la frecuencia de mutación en *Schizosaccharomizès Pombe* (tabla 2.2.6, pág.76)).

Es evidente la existencia de correlaciones cualitativas y semicuantitativas entre reactividad química y actividad biológica de PO, 1,2-EB y *cis*- y *trans*-2,3-EB. Todos los epóxidos aquí estudiados son alquilantes directos, activos biológicamente, que responden positivamente al ensayo de NBP. Los compuestos que reaccionan más rápidamente con la NBP son los que presentan una mayor actividad biológica. PO y 1,2-EB muestran mayor potencial mutágeno que *cis*-2,3-EB y *trans*-2,3-EB, tanto en *Salmonella Typhimurium* –independientemente del ensayo escogido y de la cepa– como en *Neurospora* y *Schizosaccharomizès Pombe* (véanse tablas 2.2.5 y 2.2.6, págs.75 y 76). En algunos casos se ponen de manifiesto las pequeñas diferencias existentes entre PO y 1,2-EB y entre los isómeros de 2,3-EB entre sí, la tendencia observada es, en esos casos, también acorde con la reactividad: PO>1,2-EB>*cis*-2,3-EB>*trans*-2,3-EB.

Si centramos la atención en la eficacia y eficiencia de la alquilación, f y AL, respectivamente, se observa que: i) los aductos NBP-EP formados por los cuatro epóxidos poseen valores de AL muy elevados (tablas 2.2.16 y 2.2.17), en consonancia con su gran estabilidad; ii) los valores de AL son mucho mayores que los observados para otros agentes alquilantes;^{201,315,316} iii) los regioisómeros 2,3-EB son preferentemente hidrolizados, mientras que los epóxidos, PO y 1,2-EB forman aducto en mayor proporción; iv) cuanto mayor es la proporción de aducto formado y su estabilidad, la posibilidad de que los aductos se acumulen *in vivo* durante un largo periodo, y consecuentemente, ejerzan actividad biológica, puede ser significativa. Así, cabe esperar que, como los aductos NBP-EP presentan una elevada estabilidad, los agentes alquilantes más potentes, PO y 1,2-EB, deben mostrar mayor potencial para producir efectos biológicos que los isómeros 2,3-EB. Para epóxidos que forman aductos muy estables, como es el caso, el parámetro f parece ser más influyente que AL a la hora de evaluar la efectividad biológica.

Aunque son abundantes las correlaciones cualitativas y semicuantitativas de la reactividad de los epóxidos con su actividad biológica, apenas existen correlaciones cuantitativas y las que hay son pobres, particularmente desde el punto de vista cinético. Por eso se ha investigado esta posibilidad utilizando el modelo de Hakura (véase apartado 2.1.1.7.2, págs.29-29), que atribuye la frecuencia de mutación observada, MF , a un proceso cinético como es la modificación del sitio de acción que ocurre a una velocidad proporcional a \tilde{k} .

La ecuación fundamental que establece correlación entre los dos parámetros es:

$$\ln MF = n \ln \tilde{k} + \ln m - n \ln D \quad (2.1.6)$$

Consideraremos k_{alk} (medida frente a NBP, nucleófilo modelo de la posición N7 de la guanina) o $k_{n=2}$, que describe la velocidad de reacción entre los

agentes alquilantes y los oxígenos del ADN, como constantes de velocidad de la modificación del sitio específico de acción en el ADN, \tilde{k} .

En la tabla 2.2.18 se recogen las constantes de sustrato de Swain-Scott, s , y los valores de la constante de velocidad equivalente al riesgo genético, $k_{n=2}$, junto con la potencia de inducción de intercambio de cromátidas hermanas (SCEIP) y la frecuencia de mutación para los epóxidos estudiados. Para facilitar la discusión de los resultados se han incluido, además de los valores asociados a los epóxidos estudiados, los de otros epóxidos lineales sencillos.

Tabla 2.2.18. Constante de sustrato, s , constante de velocidad equivalente al riesgo genético, $k_{n=2}$, y efectividad biológica de epóxidos.

Epóxido	s	$\log k_{n=2}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	<i>Schizosaccharomices</i>	Células V79 de
			<i>pombe</i> ^e MF	Hámster Chino ^f SCEIP
EO	0,93 ^a	-5,41 ^d	4,44	-
PO	1,08 ^b	-5,40 ^b	1,12	3
1,2-EB	1,10 ^b	-5,49 ^b	1,17	1,6
<i>trans</i> -2,3-	0,85 ^b	-6,13 ^b		0,3
<i>cis</i> -2,3-EB	0,88 ^b	-6,07 ^b	0,02	0,3
ECH	0,93 ^c	-5,04 ^d	6,53	28,8
Glicidol	1,00 ^c	-5,56 ^d	2,9	4,1

a: Ref.³¹⁷; b: *This work*; c: Ref 41; d: Ref. 10; e: Ref.³⁰⁴

MF: Frecuencia de mutación, mutantes por 104 supervivientes por mM. f: Ref.²⁷⁹

En primer lugar se centró nuestra atención en las correlaciones entre los parámetros químicos y la respuesta mutágena observada en *Schizosaccharomices Pombe*. Las buenas correlaciones MF/k_{alq} y $MF/E_{a,alq}$ (tabla 2.2.19 y figura 2.2.13 a y b) pueden atribuirse a un papel importante de la formación de aductos N7-alquilguanina en la respuesta biológica inducida por exposición a epóxidos (compuestos que forman mayoritariamente estos aductos). Estos resultados son acordes con los obtenidos por Hooberman *et al.*²⁸ quienes encontraron una buena correlación entre la mutagenia observada en la cepa TA100 y la reactividad química frente a la NBP. Aunque aductos pequeños como N7-metilguanina y N7-etilguanina se han considerado como compuestos bien tolerados por las células, aductos N7-alquilguanina mayores podrían poseer actividades biológicas potentes incluyendo citotoxicidad y mutagenia.³¹⁸

Tabla 2.2.19. Coeficiente de correlación, R^2 , entre parámetros químicos y la eficacia biológica. Entre paréntesis se muestra el número de pares de datos considerados para hacer el ajuste por mínimos cuadrados.

Parámetros químicos	<i>Schizosaccharomyces Pombe</i>	<i>Células V79 de Hámster Chino</i>
	<i>MF</i>	<i>SCEIP</i>
$\log k_{alq}$	0,992 (3)	0,963(4)
$\log k_{hid}$	0,683 (3)	0,924 (4)
E_a^{alq} (kJ/mol)	0,999 (3)	0,922 (4)
<i>s</i>	0,959 (5*)	0,963(6)
<i>S</i> _{NBP}	0,991 (5*)	0,924 (4)
$\log k_{n=2}$	0,816 (6)	0,928 (6)

*Los isómeros *cis* y *trans* 2,3-EB no han sido considerados a la hora de establecer las correlaciones.

Como la formación de aductos *N*7-alquilguanina no se puede utilizar de forma aislada como biomarcador cuantitativo de respuesta mutágena u otros procesos biológicos,⁵¹ hemos tratado de establecer otras correlaciones:

- 1) Se ha observado que existe correlación $MF/k_{n=2}$ (figura 2.2.13 f). Aunque es pobre, su existencia revela la importancia de la formación de *O*-aductos sobre los efectos biológicos de los epóxidos estudiados en este trabajo (aunque los *O*-aductos son productos minoritarios en la alquilación del ADN o sus bases por oxiranos, son lesiones promutágenas, con mayor potencial mutágeno que los aductos *N*7-alquilguanina).⁵¹
- 2) Dadas las fuertes correlaciones existentes MF/s and MF/S_{NBP} (figura 2.2.13 c y d), la proporción de aductos *N*7-/*O*⁶-alquilguanina también debe ser considerada como factor significativo.
- 3) El bajo grado de correlación MF/k_{hid} apoya la validez del modelo de Hakura, ya que la reacción de hidrólisis no se encuentra involucrada en la modificación del sitio reactivo del ADN.
- 4) Finalmente, se han obtenido buenas correlaciones entre todos los parámetros químicos, incluida $k_{n=2}$ (figura 2.2.13 y tabla 2.2.19) y SCEIP en células V79 de hámster Chino, organismo más cercano al ser humano. Este hecho no hace más que apoyar las conclusiones extraídas utilizando *MF* en *Schizosaccharomyces pombe*.

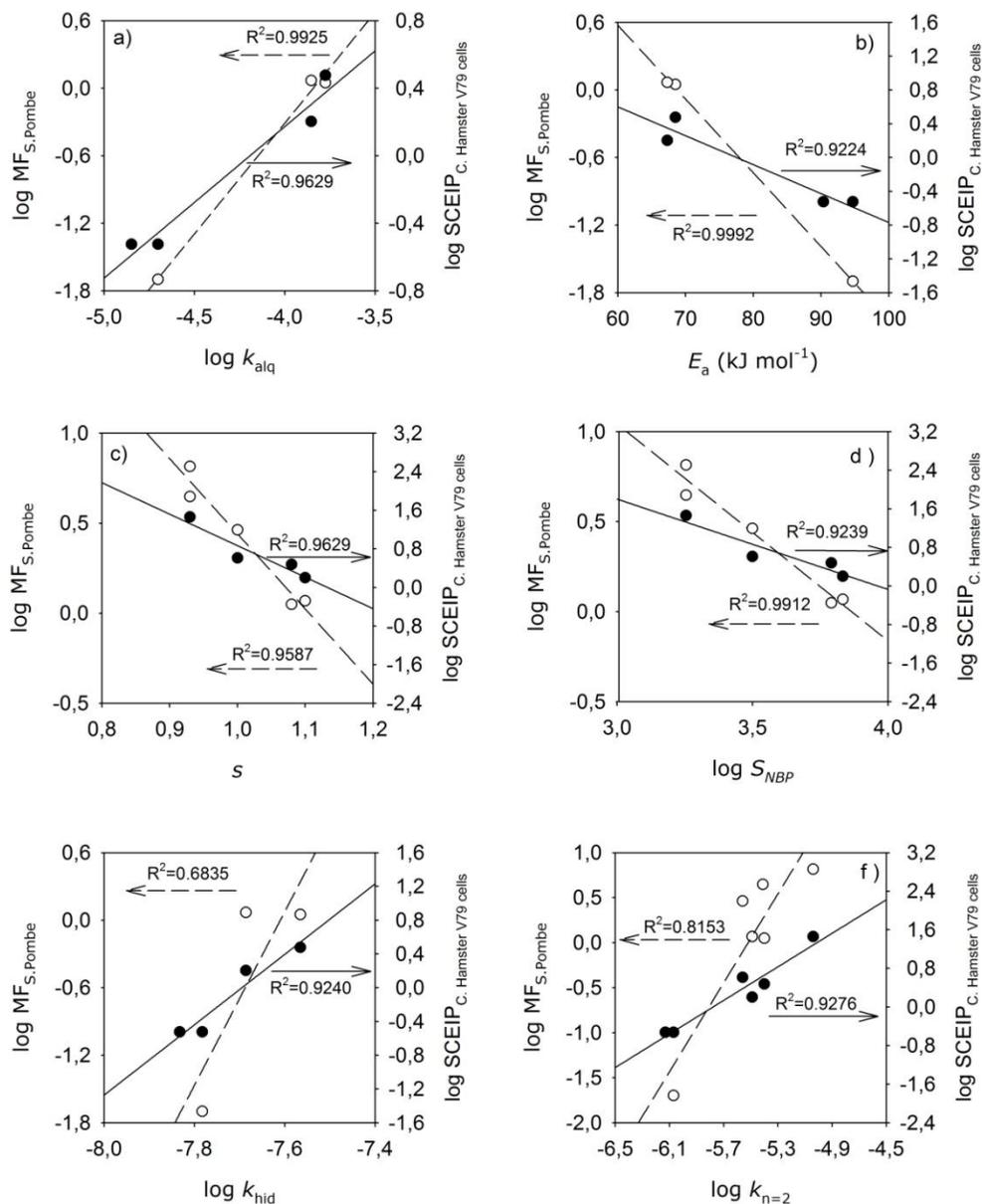


Figura 2.2.13. Correlaciones entre parámetros químicos a) k_{alq} , b) k_{hid} , c) E_a alq, d) $k_{n=2}$, e) s y f) S_{NBP} y la Frecuencia de Mutación (MF) en *Schizosacharomices pombe* (○, - -) y la potencia de inducción de SCE (SCEIP) en células V79 de hámster Chino (●, ---).

2.2.4 Conclusiones

1. La reacción de alquilación de 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP) por los epóxidos (EP) óxido de propileno (PO), 1,2-epoxibutano (1,2-EB), *cis*-2,3-epoxibutano (*cis*-2,3-EB) y *trans*-2,3-epoxibutano (*trans*-2,3-EB) da lugar a la formación de los correspondientes aductos NBP-EP a través de un mecanismo S_N2.
2. En el mecanismo global intervienen otras dos reacciones concurrentes: i) las hidrólisis de EP y de los aductos NBP-EP. La reacción más favorecida es la de alquilación y la de hidrólisis de aductos la menos significativa.
3. El potencial alquilante disminuye en el siguiente orden: PO>1,2-EB>>*cis*-2,3-EB~*trans*-2,3-EB.
4. La reacción de hidrólisis de los epóxidos también debe ser tenida en cuenta para la comprensión de la actividad biológica de estas especies químicas.
5. La fracción de agente alquilante que forma aducto, *f*, y la vida del aducto, AL, permiten una buena comprensión, incluso en términos semicuantitativos, de la reactividad de los epóxidos y de su actividad biológica.
6. Las buenas correlaciones encontradas entre la reactividad química (parámetros cinéticos) de los epóxidos y su actividad biológica sugieren que la reacción de alquilación del ADN por epóxidos y la relación de aductos N7-/O⁶- alquilguanina están directamente relacionados con su mutagenia *in vitro*.

2.3 Estudio cinético de la alquilación de moléculas modelo del ADN por óxidos de estireno

2.3.1 Antecedentes

- 2.3.1.1 Epóxidos aromáticos estudiados
- 2.3.1.2 Usos y exposición
- 2.3.1.3 Reactividad química
- 2.3.1.4 Parámetros químicos
- 2.3.1.5 Efectividad biológica
- 2.3.1.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

2.3.2 Óxido de *p*-nitroestireno

- 2.3.2.1 Método y materiales
- 2.3.2.2 Resultados y discusión
- 2.3.2.3 Conclusiones

2.3.3 Óxidos de estireno, *p*-cloroestireno y *p*-bromoestireno

- 2.3.3.1 Método y materiales
- 2.3.3.2 Resultados y discusión
- 2.3.3.3 Conclusiones

2.3.4 Estudio comparativo de la reactividad química y biológica de los epóxidos aromáticos

- 2.3.4.1 Reactividad química
- 2.3.4.2 Actividad biológica
- 2.3.4.3 Correlaciones reactividad química-actividad biológica
- 2.3.4.4 Conclusiones



“Tutte le verità sono facili da capire una volta che sono state rivelate.

Il difficile è scoprirle”

Galileo Galilei

2.3.1 Antecedentes

2.3.1.1 Epóxidos aromáticos estudiados

Los epóxidos aromáticos elegidos para su estudio, son derivados *para*-sustituídos del óxido de estireno: óxido de estireno (SO), óxido de *p*-nitroestireno (*p*NSO), óxido de *p*-cloroestireno (*p*ClSO), y óxido de *p*-bromoestireno, (*p*BrSO) (figura 2.3.1).

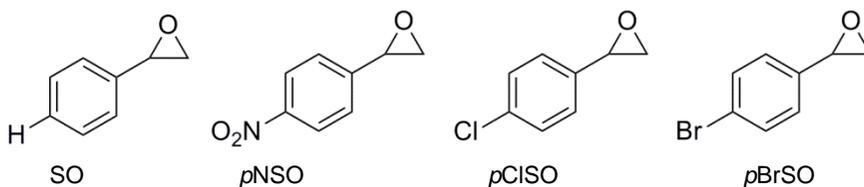


Figura 2.3.1. Estructuras de los epóxidos aromáticos objeto de estudio.

2.3.1.2 Usos y exposición

Los óxidos de estireno son utilizados en la producción de los correspondientes glicoles y derivados. Se emplean como intermedios químicos en la fabricación de polímeros, cosméticos y compuestos de uso agrícola y biológico. Son también intermedios sintéticos en la preparación de moléculas bioactivas,³¹⁹ entre las que se encuentran fármacos antiarrítmicos, antianginosos, antibacterianos y antileucémicos.³¹⁹⁻³²¹ Los siguientes óxidos de estireno se han propuesto como

intermedios en la síntesis de fármacos: *p*ClSO, para la síntesis de eliprodil –con propiedades neuroprotectoras–³²² y *p*NSO, para obtener Nifenalol® –antianginoso y antiarrítmico–.^{239,323} En su síntesis se utilizan generalmente epóxido hidrolasas, tanto por su acción catalítica como por su capacidad para producir altos excesos enantioméricos.^{215,302,324-328} El *p*NSO se utiliza mayoritariamente para investigar el mecanismo de acción de estas enzimas ya que en ausencia de las mismas, aquél se hidroliza muy lentamente.^{301,302,329,330}

El óxido de estireno es uno de los epóxidos más utilizados. Se emplea en perfumería como material de partida para la producción de 2-feniletanol (agua de rosas). También se utilizan pequeñas cantidades para mejorar la estabilidad de fluidos hidráulicos, en el tratamiento de fibras y tejidos, productos de limpieza clorados, destilados de petróleo y fluidos dieléctricos.³³¹

El amplio uso de los óxidos de estireno, particularmente del SO, hace que la exposición del ser humano a los mismos sea considerable.

La exposición ambiental a SO transcurre generalmente por contacto con agua o aire contaminado. Aunque en menor medida, también puede ocurrir por ingesta de alimentos envueltos con polímeros fabricados con SO. Las concentraciones de SO resultantes de la migración a alimentos se encuentran en torno a 0,02-0,15 µg/kg. La exposición ocupacional a SO ocurre, más frecuentemente, en las industrias de producción de caucho, pinturas y productos afines.³³²

La exposición indirecta a los óxidos de estireno, tiene lugar por exposición a los correspondientes estirenos, utilizados de forma habitual en la fabricación de resinas, polímeros y copolímeros.³³³ El estireno se encuentra presente en numerosas bebidas y alimentos. La mayor concentración se ha encontrado en canela natural.³³¹ Es significativa la exposición al estireno por contaminación medioambiental. En un estudio comparativo sobre las vías de contacto del estireno en adultos se estimó que la vía minoritaria es la ingestión de agua potable

contaminada mientras que las mayoritarias son la inhalación de humo de tabaco (400-960 $\mu\text{g}/\text{día}$), aire urbano contaminado y aire interior de espacios cerrados e industrias (6-1000 $\mu\text{g}/\text{día}$) (figura 2.3.2).³³⁴

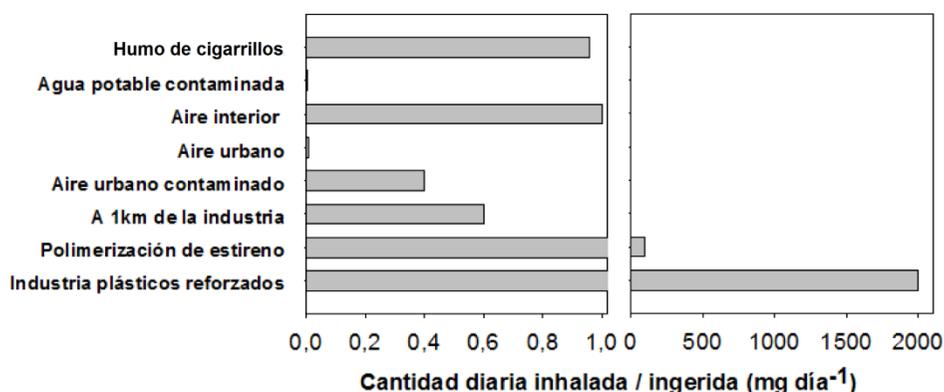


Figura 2.3.2. Importancia relativa de las diferentes vías de exposición al estireno.³³⁴

La exposición ocupacional a SO se produce fundamentalmente por vía indirecta por exposición al estireno.³³¹

2.3.1.3 Reactividad química

La reactividad química del óxido de estireno y sus derivados se ha investigado con frecuencia a partir de mediados del siglo pasado con fines cinético-mecanísticos. Muchos mecanismos –no elucidados completamente– se siguen investigando en la actualidad.^{220,224-226,228,335,336} A partir de los años 60-70 el interés por la reactividad se amplió a los estudios que trataban de establecer correlaciones entre la estructura o la actividad biológica y la reactividad.^{53,66,80,81,86,137,139,161,189,337} En las dos últimas décadas los estudios sobre los óxidos de estireno se han centrado especialmente en su reactividad con las epóxido hidrolasas, para conocer la reactividad de éstas o para investigar su uso en la obtención de intermedios quirales.^{25,215,302,324-328} Tanto el óxido de estireno como sus derivados muestran una reactividad particular respecto a los epóxidos que no poseen un anillo aromático o un doble enlace

conjugado con el anillo. El ataque de los nucleófilos sobre epóxidos aromáticos en medio neutro puede transcurrir mediante un mecanismo S_N2 sobre la posición menos impedida, carbono β del anillo oxiránico, o mediante un mecanismo S_N2' sobre la posición más impedida, carbono α (figura 2.3.3).

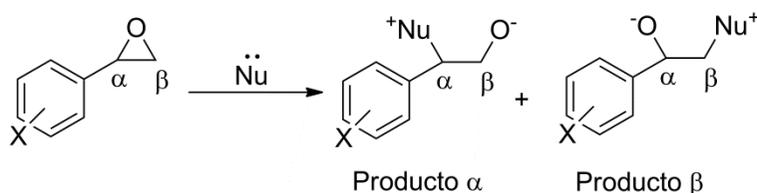


Figura 2.3.3. Productos α y β obtenidos en la reacción de alquilación de un nucleófilo (Nu) por óxidos de estireno.

De la consideración de los estados de transición correspondientes a la reacción entre un óxido de estireno *p*-sustituido y un nucleófilo, mediante los dos mecanismos de sustitución nucleófila bimolecular posibles, se desprende que la naturaleza, dadora o atractora de electrones, del sustituyente en *para* orienta la reacción hacia un determinado mecanismo (figura 2.3.4).²²⁰ Un sustituyente atractor de electrones retira densidad electrónica del anillo aromático mientras que un dador produce el efecto contrario. La des-/estabilización de las cargas parciales en el estado de transición por la presencia de los sustituyentes en *para* determina la proporción de aductos α/β que se forma. En el estado de transición correspondiente al mecanismo S_N2 , de las tres cargas parciales que aparecen, sólo es necesario considerar las dos localizadas sobre los átomos del anillo oxiránico pues se encuentran más cerca del sustituyente (y del anillo aromático). Puesto que la carga neta es 0, la carga parcial positiva que aparece sobre el carbono será menor, en términos absolutos, que la de signo contrario que aparece sobre el oxígeno. Ambas cargas son equidistantes del sustituyente y si éste es atractor de electrones estabilizará la carga negativa más de lo que desestabiliza la positiva y, por tanto, el estado de transición se verá favorecido por este tipo de sustituyentes. Sin embargo, en el estado de transición del mecanismo S_N2' la única carga a considerar es la positiva sobre el carbono bencílico y se verá estabilizada por grupos dadores de electrones. Por tanto, cuanto más atractor de electrones sea un

sustituyente, más favorecerá el mecanismo S_N2 frente al S_N2' y cuanto más aceptor sea, más favorecido se verá el S_N2' .

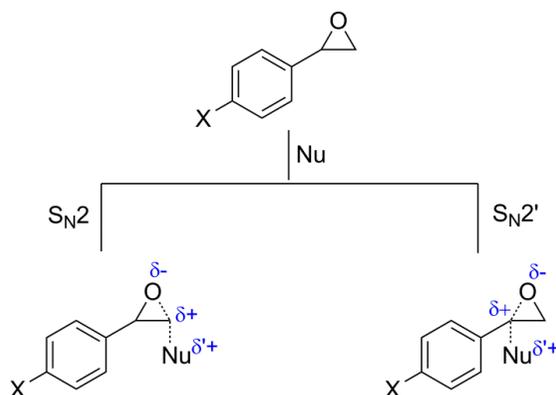


Figura 2.3.4. Estados de transición correspondientes a la reacción de $pXSO$ con un nucleófilo mediante mecanismos S_N2 y S_N2' .

Los halógenos y el grupo nitro son atractores de electrones y sus efectos inductivos en el óxido de estireno producen una disminución de la densidad electrónica en el sistema π . La sustitución en *para* del óxido de estireno por grupos dadores de electrones estabiliza la carga parcial positiva cuando ésta se encuentra sobre el carbono más impedido, $C\alpha$.^{229,338} La secuencia de electrofilia observada para una serie de óxidos de estireno *p*-sustituidos ha sido: $pBrSO > pClSO > pFSO \sim SO$.³³⁸

La ecuación de Hammett para constantes de velocidad describe el comportamiento de un gran número de compuestos aromáticos *meta* o *para* sustituidos en función de los efectos electrónicos producidos por sus sustituyentes. En esta ecuación k_x es la constante de velocidad del compuesto aromático con un sustituyente X en posición *meta* o *para* y k_H , la del compuesto aromático no sustituido³³⁹ que se toma como referencia; σ es un parámetro característico de cada sustituyente como dador ($\sigma < 0$) o atractor ($\sigma > 0$) de carga. Por definición, $\sigma = 0$ para $X = H$, siendo su valor máximo la unidad. El parámetro ρ es característico de una reacción, siendo índice de la sensibilidad de la constante de velocidad a los cambios de sustituyente. Depende de la naturaleza de la reacción, disolvente y

temperatura. Por definición, $\rho = 1$ para la ionización de los ácidos benzoicos en agua a 25,0 °C.³⁴⁰

$$\log k_x = \log k_H + \rho\sigma \quad (2.3.1)$$

Se han establecido otras constantes que se utilizan cuando la presencia de *p*-sustituyentes induce la aparición de una carga en el carbono bencílico o en el anillo aromático debido a efectos resonantes. Para los sustituyentes que generan cargas positivas, se han definido σ^+ y ρ^+ , y para los que dan lugar a la aparición de cargas negativas, σ^- y ρ^- .^{340,341}

Al representar los valores de $\log (k_x/k_H)$ para las reacciones de una serie de compuestos aromáticos *meta* o *para* sustituidos con un nucleófilo, frente a los de la constante σ de Hammett, la pendiente ρ , como consecuencia de su propia definición, aporta información muy útil sobre el mecanismo de reacción: el signo positivo de ρ indica que los grupos atractores de electrones aceleran la reacción y, si es negativo, que la reacción es favorecida por grupos dadores de electrones.

La pendiente ρ encontrada al estudiar la reactividad de óxidos de estireno *p*-sustituidos con distintos nucleófilos (agua,²³⁸ alcoholes,^{229,238} iones hidróxido,²³⁸ iones metóxido,²³⁸ bencilamina,²²⁰ piridina⁸⁰ y posición *N7* de la guanosina⁵³) presenta signos contrarios para las reacciones en los carbonos α y β . Generalmente es positiva cuando la reacción se produce en la posición β , y negativa cuando tiene lugar en la posición α . Ello indica que el ataque del nucleófilo en β se ve favorecido por grupos atractores de electrones que estabilizan la aparición de carga negativa en el átomo de oxígeno situado sobre el carbono bencílico en el estado de transición. Lo contrario sucede cuando la reacción transcurre en la posición α : son grupos dadores de electrones los que estabilizan la aparición de una carga positiva significativa sobre el carbono bencílico en el estado de transición.²³⁸

2.3.1.3.1 Reacción de hidrólisis

Como ocurre con los epóxidos en general, la hidrólisis de los óxidos de estireno *p*-sustituídos, transcurre a través de tres mecanismos en función del pH (véase apartado 2.1.3.3.2 pág. 56). La tabla 2.3.1 resume los valores de las constantes de velocidad de hidrólisis encontrados por Blumenstein *et al.*²³⁸ para los tres mecanismos.

Tabla 2.3.1. Constantes de velocidad para las reacciones de hidrólisis de óxidos de estireno *p*-sustituídos en disolución acuosa a 25,0 °C.²³⁸

<i>p</i> -sustituyente	k_{H^+} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{hid}^0 (s^{-1})	$10^4 k_{OH^-}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
-OCH ₃	$(1,10 \pm 0,04) \cdot 10^4$	$(3,00 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	-
-CH ₃	$(4,89 \pm 0,09) \cdot 10^2$	$(2,07 \pm 0,04) \cdot 10^{-5}$	$1,62 \pm 0,05$
-H	$26,6 \pm 0,9$	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$1,22 \pm 0,09$
-Cl	$8,4 \pm 0,2$	$(3,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	$1,14 \pm 0,05$
-NO ₂	$(3,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	$(6,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-7}$	$1,0 \pm 0,1$

Los productos mayoritarios de la reacción de hidrólisis para la mayoría de los óxidos de estireno *p*-sustituídos son los correspondientes glicoles.²³⁸ El ataque del agua sobre los óxidos de estireno puede producirse en cualquiera de las dos posiciones del anillo oxiránico, siendo indistinguibles los dos productos formados salvo que se utilice alguna técnica específica. Utilizando marcaje isotópico, se ha comprobado que la reacción de hidrólisis en medio básico se produce a través de los dos carbonos en diferentes proporciones. Los resultados obtenidos en el trabajo de Blumenstein *et al.* a este respecto se recogen en la tabla 2.3.2.

Tabla 2.3.2. Rendimientos relativos de los dioles formados por adición de hidróxido, H¹⁸O⁻, a los carbonos α y β de varios óxidos de estireno y las correspondientes constantes de hidrólisis para estas reacciones, $k_{\alpha OH^-}$ y $k_{\beta OH^-}$.²³⁸

<i>p</i> -sustituyente	% adición α	% adición β	$10^4 k_{\alpha OH^-}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^4 k_{\beta OH^-}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
-CH ₃	67	33	1,09	0,53
-H	51	49	0,62	0,60
-Cl	39	61	0,44	0,70

Resultados determinados por análisis de los espectros de masas con KOH en agua marcada isotópicamente.

2.3.1.3.2 Reacciones de alquilación

En las reacciones entre diversos óxidos de estireno sustituidos y nucleófilos, los productos de reacción y sus propiedades, así como las velocidades de reacción, varían notablemente con los sustituyentes.²²⁶ Laird y Parker estudiaron la reacción entre diferentes óxidos de estireno *p*-sustituidos y bencilamina en etanol encontrando que la reacción transcurre mediante un proceso bimolecular, tanto para la reacción en la posición α como en la β del anillo oxiránico.²²⁰ Los elevados valores (de signo negativo) encontrados para las entropías de activación, son acordes con un mecanismo de ese tipo (tabla 2.3.3). Al comparar las constantes de velocidad encontradas para la serie de óxidos de estireno concluyeron que la constante de velocidad del ataque en posición α es mayor para óxidos de estireno *p*-sustituidos con sustituyentes dadores de electrones que para los que poseen grupos atractores de electrones. La constante de reacción de Hammett asociada a la reacción a través de C_α es negativa ($\rho_\alpha = -1,15$). Contrariamente, la constante de velocidad correspondiente al ataque en el carbono β es mayor para los óxidos de estireno que poseen sustituyentes atractores de electrones y menor para dadores de electrones. La constante de reacción de Hammett asociada es positiva ($\rho_\beta = +0,87$).²²⁰ Esta misma tendencia fue encontrada por Rosman *et al.* al estudiar las reacciones de alquilación de NBP por una serie de óxidos de α -metilestireno *p*-sustituidos, que reaccionaban exclusivamente a través de la posición β ¹⁰⁵ y por Tamura *et al.* para la reacción entre óxidos de estireno *p*-sustituidos y piridina.⁸⁰

Al estudiar la influencia del disolvente en la reacción de alquilación de SO por bencilamina, Parker *et al.* observaron que las constantes de velocidad de alquilación en los carbonos α y β del anillo oxiránico difieren sustancialmente al utilizar diferentes disolventes, particularmente entre disolventes apróticos (hay que tener en cuenta que en este tipo de disolventes, con la apertura del anillo aparece una carga negativa sobre el átomo de oxígeno que, en ausencia de protones, no es estabilizada, por lo que la polaridad del disolvente debe ser crucial). Tanto para

disolventes próticos como apróticos las constantes de velocidad aumentaban con la constante dieléctrica del medio. Sin embargo, en disolventes próticos, la relación $k_{al\alpha} / k_{al\beta}$ es independiente de la constante dieléctrica.²²⁵

Tabla 2.3.3. Proporción de aductos α/β formados por alquilación de diferentes sustratos por óxidos de estireno *p*-sustituídos. Constantes de velocidad y parámetros de activación obtenidos con bencilamina como sustrato.

<i>p</i> -sustituyente	σ Hammett	Sustrato alquilable									
		α/β	piridina ^a						bencilamina ^b		
			α/β	$10^5 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)				$\Delta^{\#}H^{\circ}_{alq}$ ($kJ \cdot mol^{-1}$)		$-\Delta^{\#}S^{\circ}_{alq}$ ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)	
				β	α	β	α	β	α	β	α
-CH ₃	-0,17	46:54	55:45	2,74	3,37	54,8	54,8	157,4	156,2		
-C ₄ H ₉	-0,16	46:54	-	-	-	-	-	-	-		
-C ₆ H ₆	-0,01	40:60	-	-	-	-	-	-	-		
-H	0,00	39:61	22:78	4,90	1,38	54,0	65,3	156,2	129,4		
-Cl	0,227	23:77	20:80	4,74	1,21	-	-	-	-		
-Br	0,232	-	19:81	7	1,66	42,3	53,6	190,5	165,8		
-NO ₂	0,78	9:91	-	-	-	-	-	-	-		

a : Ref.80 ;Técnica espectroscopía RMN. Acetona/ tampón fosfato; pH = 6; T = 60,0 °C; *b* : Ref. 220 ; T = 40,0 °C.

2.3.1.3.3 Alquilación de moléculas biológicas

Debido a la gran reactividad del anillo oxiránico, los óxidos de estireno forman aductos con centros nucleófilos de macromoléculas presentes en las células (glutación, proteínas -hemoglobina y albúmina- y ácidos nucleicos, entre otros), lo que puede dar lugar a efectos biológicos. La reacción de los óxidos de estireno con macromoléculas biológicas forma parte del metabolismo tanto de los estirenos como de los correspondientes epóxidos (figura 2.3.5).

La presencia de grupos atractores en posición *para* facilita la activación biológica de los estirenos para formar los epóxidos correspondientes aumentando la probabilidad de reacción de estos últimos con macromoléculas biológicas.³³⁸ En una serie de estirenos *p*-sustituídos se ha encontrado que el índice de bioactivación para producir los óxidos de estireno disminuye en el siguiente orden: *p*BrSO >

$p\text{ClSO} > p\text{FSO} > \text{SO}$. Las constantes de velocidad de reacción de los epóxidos con proteínas, determinadas a partir de la reacción con cisteamina, siguen la misma secuencia.³³⁸

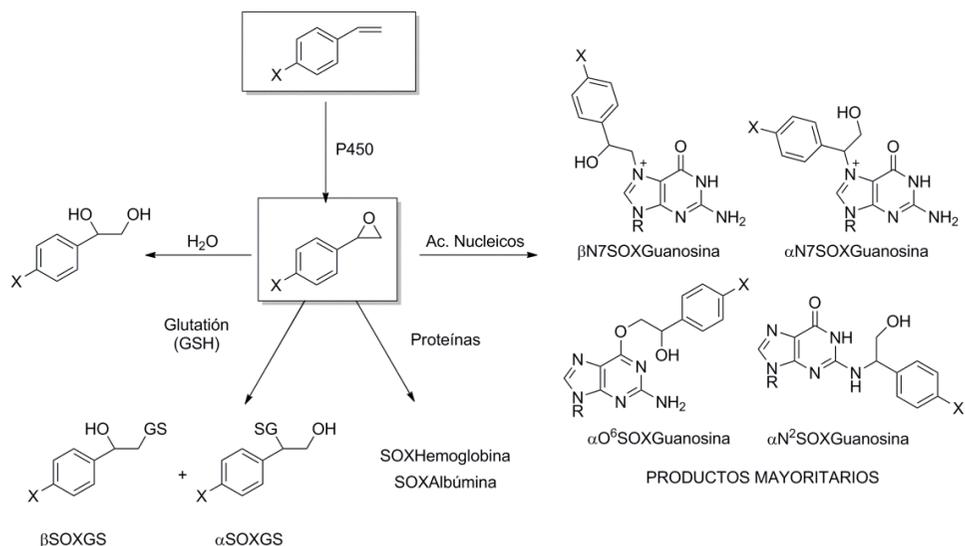


Figura 2.3.5. Metabolismo de los óxidos de estireno p -sustituidos, $p\text{XSO}$.^{253,338}

Sobre la reacción de los óxidos de estireno con ácidos nucleicos, particularmente con el SO, hay abundante bibliografía,^{255,270,342} destacando el trabajo realizado por Hemminki *et al.* sobre la reactividad del óxido de estireno frente a distintos nucleófilos entre los que se encuentran el agua, NBP y proteínas, además de los ácidos nucleicos y sus bases.^{38,104,185,251,262,343} Al estudiar la reacción de SO con ADN *in vitro* se comprobó que, a pesar de que la reacción tiene lugar en diferentes posiciones de las bases citosina, adenina y guanina, la reacción mayoritaria es la de formación de aductos $N7$ -alquilguanina.^{251,343} La tabla 2.3.4 recoge los valores de las constantes de alquilación de ADN por diferentes epóxidos y el índice de enlace covalente (CBI) con la posición $N7$, indicador del nivel de aductos $N7$ -alquilguanina por unidad de dosis de exposición (utilizado en numerosas ocasiones para comparar la capacidad alquilante de diferentes carcinógenos químicos sobre macromoléculas *in vivo*). Las constantes de velocidad de reacción, son similares para SO y ECH. Sin embargo, PO y EO muestran un

valor de CBI mucho mayor, lo que se ha tratado de explicar admitiendo una mayor velocidad de detoxificación del SO.²⁵¹

Tabla 2.3.4. Reactividad química de los epóxidos con la posición N7 de la guanina de ADN y los correspondientes CBI para el ADN del hígado de ratas y ratones tras exposición intraperitoneal.²⁵¹

Epóxido	$10^4 k_{ADN}$ (7-guanina) (l/g ADN h ⁻¹)	CBI*
EO	0,96	11
PO	0,25	0,6
ECH ^a	0,6	0,2
SO	0,18	0,2

a: ECH, epíclorohidrina.* nmol 7-guanina/mol nucleótido por μ mol compuesto / kg peso corporal

Al investigar los productos de alquilación de guanosina con óxidos de estireno *p*-sustituídos (*p*BrSO, *p*CH₃SO y SO) en disolución acuosa se ha comprobado que la reacción transcurre en tres centros nucleófilos, N7, N² y O⁶, y que los productos formados dependen del sustituyente. Al reaccionar en la posición N7 forman aductos α y β , a través de un proceso bimolecular. La apertura del anillo, cuando la reacción se produce en las posiciones N² y O⁶, ocurre a través del ataque en la posición α (cuando se forma el aducto en la posición O⁶ se produce posteriormente el reordenamiento que da lugar a la formación del aducto β) y los mecanismos involucrados tienen un mayor carácter iónico. El carácter iónico del sustrato (*p*BrSO < SO < *p*CH₃SO) determina consecuentemente la proporción de aductos α/β y las posiciones preferentes de reacción en la guanosina (tabla 2.3.5). El *p*BrSO alquila mayoritariamente la posición N7 (83% de los productos totales) y el *p*CH₃SO la posición N² (66%).²⁵³

En el estudio de la reacción de alquilación de una serie de óxidos de estireno con desoxiguanosina en etanol se ha comprobado que los óxidos de estireno reaccionan a través de los carbonos α y β mayoritariamente con N7 de la desoxiguanosina. El análisis de los productos se realizó transcurridas 22 horas de reacción a 37,0 °C. La proporción de aductos N7-alkildesoxiguanosina α/β obtenida para el óxido de estireno resultó ser 33:67,⁵³ mientras que con la

guanósina en medio acuoso se ha obtenido una proporción de 40:60.²⁵³ La diferencia en las proporciones encontradas podría deberse, entre otros factores, a la utilización de distintos disolventes.²²⁵ En la reacción del óxido de estireno con ADN doble hebra aunque también se detectaron otros aductos minoritarios, el principal producto resultó ser el aducto 7-alquilguanina, con una proporción entre las constantes de segundo orden de formación de aductos *N*7-alquilguanina α/β de 42:58.²⁶² La proporción de aductos obtenida es muy similar a la obtenida con guanósina en medio acuoso.

Tabla 2.3.5. Proporción de aductos α/β *N*7-alquilguanina y porcentaje de aductos formados respecto al total de aductos en la reacción de óxidos de estireno *p*-sustituídos, *p*XSO con guanósina y desoxiguanósina.

<i>p</i> -sustituyente	Guanosina ^a					Desoxiguanosina ^b
	α/β <i>N</i> 7	β <i>N</i> 7 <i>p</i> XSO	α <i>N</i> 7 <i>p</i> XSO	α <i>N</i> 2 <i>p</i> XSO	$\alpha+\beta$ 06 <i>p</i> XSO	α/β <i>N</i> 7
-OCH ₃	-	-	-	-	-	-
-CH ₃	59:4	11	16	66	7	-
-H	40:6	49	32	13	6	33:67
-Br	26:7	66	17	13	4	15:85*
-Cl	-	-	-	-	-	14:86*
-NO ₂	-	-	-	-	-	2:98*

a: Ref.²⁵³; *pH* = 7; *Tampón* Tris-HCl; *T* = 37,0 °C; *t* = 24 hrs. *b*: Ref.⁵³; 50% etanol; *T* = 37,0 °C; *t* = 22hrs.

*Valores interpolados/extrapolados utilizando la ecuación de Hammett.

2.3.1.4 Parámetros químicos

Los únicos parámetros químicos encontrados en la bibliografía con vistas a correlacionar actividad química y biológica de los óxidos de estireno, son las constantes de alquilación e hidrólisis, recopiladas en los apartados anteriores. Sólo se han encontrado para el SO valores de $k_{n=2} = 1,7 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $s = 0,81$ para la reacción global y no para las reacciones en los carbonos α y β .¹⁰

2.3.1.5 Efectividad biológica

La principal consecuencia de la alquilación de la posición *N*7 de la guanina es la apertura del anillo y depurinación de los isómeros α y β 7-alquilguanina, lo que

genera un centroapurínico en el ADN. Cuando la ADN polimerasa encuentra este tipo de lesiones generalmente añade adenina, produciéndose transversiones GC-TA, aunque puede añadir otras bases y producir otras mutaciones por sustitución de pares de bases.^{51,251} Tanto el óxido de estireno como sus derivados *p*-sustituidos son compuestos mutágenos para cepas de bacterias que detectan la sustitución de pares de bases, pero no para aquellas que detectan desplazamientos del marco de lectura.³⁴⁴

Tabla 2.3.6. Efectos biológicos observados tras la exposición a óxidos de estireno *p*-sustituidos.

<i>p</i> -sustituyente	Mutagenia			SCE ^a	CA ^a	Micronúcleos ^a	UDS	Ref.
	<i>S. Typh.</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. Pneu.</i>					
-OCH ₃		+						53,344
-CH ₃	+	+	+	+				53,80,81
-H	+	+	+	+	+	+	+	103,270
-Cl	+							80,270
-Br	+	+	+					53,81,271
-NO ₂	+			+				80

a: Ref.189. Los test se han realizado con cultivos de linfocitos en sangre.

El SO es un mutágeno mucho más potente (unas 17 veces mayor) que PO en *Salmonella Typhimurium* y *E. Coli*,¹⁰³ siendo aproximadamente la mitad que *p*ClSO y *p*BrSO (la presencia de grupos atractores de electrones ha demostrado aumentar el potencial mutágeno en otros epóxidos).^{80,270,271,273} Los óxidos de estireno son, por tanto, mutágenos más potentes que el PO. Algunos óxidos de estireno han demostrado ser mutágenos para otras bacterias como *Klebsiella Pneumoniae*, (*K. Pneu.* tabla 2.3.6) y para la cepa V79 de células de pulmón de Hámster Chino.³³⁷ También se ha comprobado que algunos óxidos de estireno y éteres glicídicos *p*-sustituidos pueden producir intercambio de cromátidas hermanas.¹⁸⁹ Se sabe que la capacidad de inducción depende del sustituyente, disminuyendo para los grupos dadores de electrones: -NO₂ > -Cl > -H.²⁷⁹

El óxido de estireno produce mutaciones puntuales en levaduras, daño cromosómico en plantas y mutaciones recesivas letales en *Drosophila melanogaster*. En estudios con células de mamíferos se ha observado que induce mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y síntesis incontrolada de ADN (tabla 2.3.6).³⁴⁴

2.3.1.6 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

En 1979 Hemminki y Falck estudiaron la reactividad de una serie de epóxidos (SO incluido) con 4-(*p*-nitrobencil)piridina, y su mutagenia en *Salmonella Typhimurium* TA100 y *E. Coli*, encontrando una correlación semicuantitativa entre ellas.¹⁰³ En 1981 se investigó la posibilidad de una correlación entre las velocidades de alquilación de NBP y guanosina.¹⁰⁴ Además de la velocidad de alquilación, se midió la velocidad de hidrólisis del óxido de estireno y de tres compuestos análogos: 3,5-dimetilestireno (DMSO), *p*CH₃SO y *p*-nitroestireno (*p*NSO). Se encontró una buena correlación semicuantitativa entre las velocidades de hidrólisis de los compuestos y de alquilación de NBP. La reactividad disminuía en el siguiente orden: *p*CH₃SO > DMSO > SO > *p*NSO. Sin embargo, las secuencias de reactividad de los epóxidos con guanosina resultaron ser muy diferentes: SO > *p*CH₃SO > DMSO. Para el *p*NSO no se observó reacción con la guanosina. De este modo no se encontró correlación entre reactividad con la NBP, con el agua y con la guanosina. Es necesario tomar con cautela las conclusiones de este estudio porque no tiene en cuenta ni los coeficientes de absorción molar de cada uno de los aductos ni posibles reacciones concurrentes.

Aunque diversos trabajos han tratado de establecer los factores que determinan la mutagenia de los óxidos de estireno aún no se han conseguido discernir con claridad. Sugiura *et al.* determinaron la mutagenia de algunos derivados del óxido de estireno en *Salmonella typhimurium* TA100 y en *E. coli* WP2uvrA, encontrando una aceptable correlación lineal de la mutagenia con los valores de la constante σ de Hammett. También estudiaron la correlación

mutagenia /reactividad utilizando como reacción de referencia la de bencilamina en etanol (50% vol.). Los resultados sugirieron que la mutagenia estaba relacionada con la constante de velocidad de formación de los aductos α , pero no con la constante de alquilación global o con la de la posición β . Aunque encontraron correlación de la mutagenia con las constantes de reparto, parecía que la llegada al sitio de reacción en la célula no era una etapa limitante que determinase la mutagenia de los compuestos.^{81,270} En 1981 Sugiura y Goto ampliaron el estudio investigando la correlación entre mutagenia y reactividad con desoxiguanosina.⁵³ Los resultados reforzaron la conclusión de que la capacidad mutágena no depende exclusivamente de la cantidad de aductos formados, sino que varía con la estructura de los mismos. No se encontraron correlaciones entre mutagenia y constantes de alquilación globales pero sí con las constante de velocidad de formación de los aductos α . Los resultados apoyaban los estudios precedentes. Tamura *et al.* en 1982 realizaron un estudio similar con piridina como sustrato y la mutagenia sobre *Salmonella Typhimurium* TA100.⁸⁰ Los resultados confirmaron que la mutagenia dependía de la reactividad del carbono α , pero también sugirieron que la reactividad no parecía ser un factor tan importante como el volumen molecular o el carácter hidrófobo. En 1986 Rosman *et al.* centraron su atención en la reactividad y capacidad mutágena de óxidos de α -metil estireno con diferentes sustituyentes en la posición *para* del anillo bencénico.¹⁰⁵ Estos compuestos sólo reaccionaban con piridina a través del carbono β del anillo oxiránico, lo que permitía profundizar en el papel de la reacción en la posición β en la mutagenia de los óxidos de estireno. El volumen molecular mostró ser el factor más importante. Todos los α -metil óxidos de estireno salvo el *p*-bromo, mostraron mutagenia mayor o comparable a la del óxido de estireno, lo que induce a pensar que la reactividad en la posición β , sí que tenga algún papel en la mutagenia de los óxidos de estireno, en contradicción parcial con los resultados obtenidos previamente.

Las contradicciones apuntadas podrían deberse a que en trabajos en los que se ha obtenido correlación entre mutagenia y reactividad en la posición α , se han

utilizado compuestos con caracteres hidrófobos muy dispares. Como este factor ha demostrado ser el más influyente sobre la mutagenia, tratar de establecer correlaciones directamente con la reactividad, ofrece escaso crédito, siendo necesario tomar con cautela las conclusiones obtenidas.

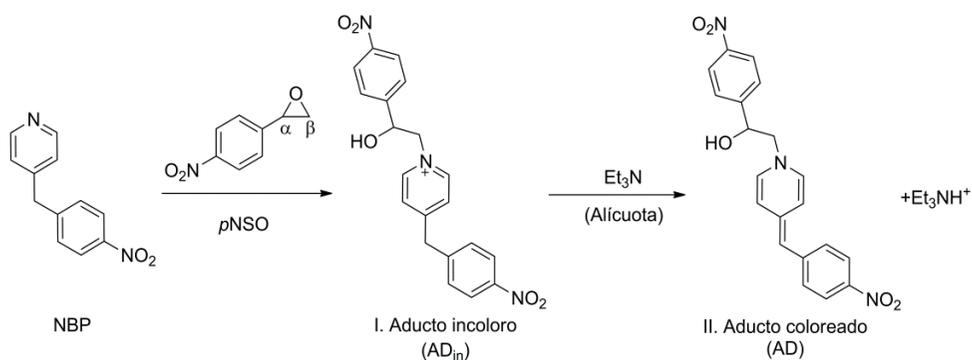
2.3.2 Óxido de *p*-nitroestireno

Se ha incluido en este punto la reacción de alquilación de la NBP por óxido de *p*-nitroestireno, después de investigar la reactividad de los epóxidos lineales y antes de iniciar el estudio de otros óxidos de estireno, por ser un compuesto que puede servir como puente en el estudio realizado para ambas series. Aunque el *p*NNSO es similar estructuralmente al resto de óxidos de estireno objetos de estudio, su reactividad cabe esperar que sea semejante a la de los epóxidos lineales. A diferencia del resto de óxidos de estireno, que reaccionan con nucleófilos a través de los dos carbonos del anillo oxiránico, se sabe que el *p*NNSO reacciona mayoritariamente (>90%) con nucleófilos similares a la NBP a través del carbono β del anillo oxiránico.^{53,80,337}

2.3.2.1 Método y materiales

2.3.2.1.1 Método experimental

2.3.2.1.1.1 Estudio de la reacción de alquilación de NBP por *p*NNSO



Esquema 2.3.1. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por *p*NNSO.

El seguimiento cinético de la alquilación de NBP por *p*NNSO –que conduce a la formación del aducto NBP-*p*NNSO– se ha hecho mediante medidas de la absorbancia en $\lambda = 560$ nm, longitud de onda del máximo de absorbancia de AD y donde no absorben ni los reactivos ni el glicol (figura 2.3.6). Como los aductos

NBP-EP (véase pág. 81), el aducto NBP-*p*NSO es incoloro (AD_{in}). La adición de trietilamina da lugar a la desprotonación de AD_{in} y aparición del aducto coloreado AD (esquema 2.3.1).

El método experimental es análogo al realizado para estudiar las reacciones de alquilación de NBP por EP (véase apartado 2.2.2.1 pág. 81).

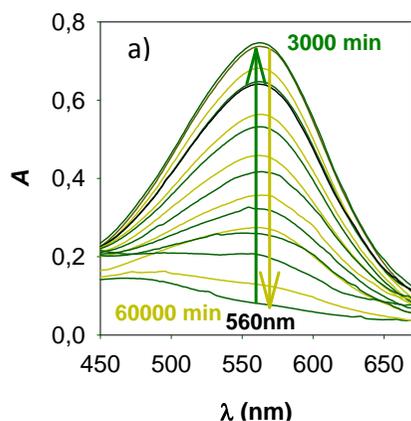


Figura 2.3.6. Espectrogramas obtenidos en el seguimiento de la formación del aducto *p*NSO-NBP.

- Seguimiento de la alquilación mediante HPLC

El estudio espectrofotométrico de la reacción de alquilación se complementó con su estudio cromatográfico por separación mediante HPLC con detector de red de diodos. La separación de los componentes de la mezcla de reacción –NBP, *p*NSO, *p*-nitroestirenglicol (*p*NSG) y el aducto NBP-*p*NSO– se hizo con una columna Mediterranean Sea C18 (25 mm \ 1 mm, 5 mm) utilizando como fases móviles A (tampón acetato pH = 4,75 y 0,10 M) y B (acetonitrilo). El gradiente utilizado fue 10% B durante 5 minutos, con aumento durante 8 minutos hasta 16% B, un posterior aumento hasta 80% B durante 1 minuto, mantenido durante 14 minutos. La velocidad de flujo fue 1 ml·min⁻¹. El volumen de la mezcla de alquilación inyectado fue 200 μl.

2.3.2.1.1.2 Estudio de la reacción de hidrólisis de *p*NSO

Para estudiar la hidrólisis del *p*NSO se procedió de la forma siguiente: a una cubeta con 3 ml del medio de reacción ($\text{H}_2\text{O} + \text{HClO}_4 + \text{dioxano}$) termostatada a la temperatura deseada, se le añaden 20 μl de la disolución madre del epóxido ($4,4\text{-}4,8 \cdot 10^{-3}$ M en dioxano). El instante de la adición se considera tiempo cero, $t = 0$. La velocidad de hidrólisis se siguió espectrofotométricamente hasta no observar variación de absorbancia (figura 2.3.7).

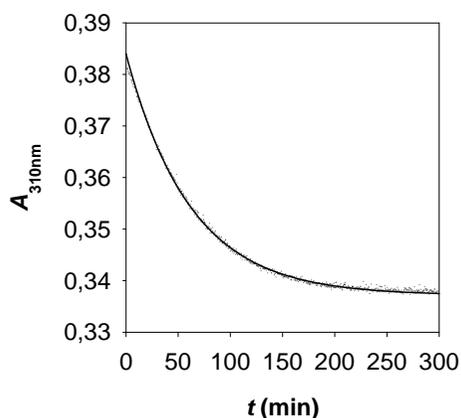


Figura 2.3.7. Perfil cinético de la reacción de hidrólisis de *p*NSO en agua. $T = 37,5$ °C; $[\text{pNSO}]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5}$ M; $\text{pH} = 2,96$; $\lambda = 310$ nm.

No se encontró una longitud de onda a la que absorbieran exclusivamente el epóxido o el glicol. Por eso se monitorizó la variación de absorbancia a $\lambda = 310$ nm, donde la diferencia de los coeficientes de absorción molar era suficiente para realizar el seguimiento de la reacción.

El estudio espectrofotométrico de la reacción de hidrólisis se complementó con los resultados obtenidos por separación de *p*NSO y *p*NSG mediante HPLC con detector de red de diodos. La separación se llevó a cabo con una columna Mediterranean Sea C18 (25 mm \ 1 mm, 5 mm) utilizando como fases móviles A (tampón acetato $\text{pH} = 4,75$ y $0,10$ M) y B (acetonitrilo). El

gradiente utilizado fue 35% B durante 5 minutos, con aumento durante 10 minutos hasta 90% B y que fue mantenido durante 20 min. La velocidad del flujo fue fijada a $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. El volumen de la mezcla de hidrólisis inyectado fue 200 μl .

2.3.2.1.1.3 Estudio de la formación del aducto guanosina-*p*NSO

Para estudiar la formación del aducto guanosina-*p*NSO se preparó la siguiente mezcla de reacción: guanosina ($9,6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) y *p*NSO (1,1 mM) en agua:dioxano 4:1 (v:v). Se utilizó tampón acético/acetato para mantener constante el pH (0,02 M; pH 3,99). La reacción se llevó a cabo a 45,0 °C y se siguió durante 5 días. Se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción a diferentes tiempos. Sus componentes se separaron mediante HPLC. Se utilizaron dos eluyentes: eluyente A (formiato de amonio 20 mM, pH 4,6) y B (acetonitrilo) con una velocidad de flujo de $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. El gradiente utilizado fue: inicialmente 100% de A, seguido por un aumento en la proporción de B hasta alcanzar el 50%, este gradiente se mantuvo durante 5 minutos y se aumentó posteriormente la concentración hasta 100% de B durante 1 minuto. La detección se llevó a cabo mediante detector de red de diodos, monitorizando la variación de absorbancia en la región UV.

2.3.2.1.1.4 Materiales

2.3.2.1.1.4.1 Reactivos generales

Ácido acético glacial, hidróxido sódico (lentejas), ácido perclórico (60%) y 1,4-dioxano son Panreac (Barcelona).

Se ha utilizado agua desionizada en un equipo Wasserlab Ultramatic-ecomatic.

2.3.2.1.1.4.2 Reactivos específicos

Los reactivos guanosina (98%), (R)-*p*NSO y (S)-*p*NSO (99%), 4-(*p*-nitrobencil)piridina (98%) y trietilamina (99%) eran Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

2.3.2.1.1.5 Equipos de trabajo

Para llevar a cabo el seguimiento cinético de la alquilación de NBP, se ha utilizado un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401-PC de doble haz con portacubiertas CSP-240-A y seis celdas termostatadas mediante sistema Peltier. Para realizar las medidas de absorbancia se han manejado cubetas de cuarzo Hellma 110QS de 1 cm de paso óptico.

Las medidas de pH se han realizado con pH-metros Crison Micro pH2000 y Metrohm 827 pH lab.

El equipo de HPLC, Waters Alliance 2795, estaba equipado con una columna C-18 (Atlantis 100 \ 2,1 mm, 3,5 mm).

Para mantener constante la temperatura de las mezclas ($\pm 0,04$ °C) se han utilizado termostatos Lauda Ecoline Re 120.

Los cálculos computacionales se llevaron a cabo utilizando Gaussian03W. Las barreras de energía se obtuvieron por optimización de las geometrías de los reactivos y de los estados de transición con nivel de teoría DFT, funcional híbrido B3LYP y base 6-31++G(d,p) y las estructura por análisis de armónicos. La implementación IEFPCM se utilizó para modelar los efectos de la solvatación.

Los espectros de masas de iniciación por electrospray tanto en modo positivo como negativo fueron obtenidos mediante inyección directa en un espectrómetro Waters ZQ400.

2.3.2.2 Resultados y discusión

2.3.2.2.1 Formación del aducto guanósina-*p*NSO

No se ha encontrado en la bibliografía información sobre la reacción de alquilación del ADN por *p*NSO y aunque la reacción de alquilación utilizando guanósina como sustrato ha sido investigada previamente,¹⁰⁴ no se observó formación del aducto guanósina-*p*NSO. Por eso, antes de investigar la reacción entre *p*NSO y NBP, se ha estudiado la formación del aducto con guanósina. Se analizó la mezcla de reacción preparada como se ha descrito en 2.3.2.1.1.3. Tras la separación mediante HPLC, el espectro de masas obtenido para el compuesto correspondiente a un tiempo de retención $t_R = 8,83$ min, reveló la formación del aducto *p*NSO-guanósina. El pico con relación $m/z = 431.2$ se corresponde con el fragmento del aducto con pérdida de una molécula de agua ($[M-H^+]-H_2O$).

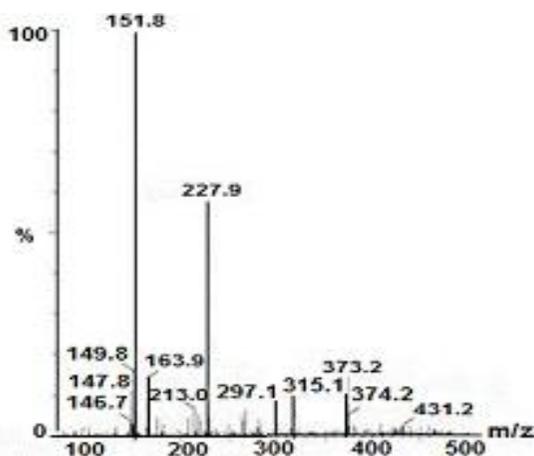
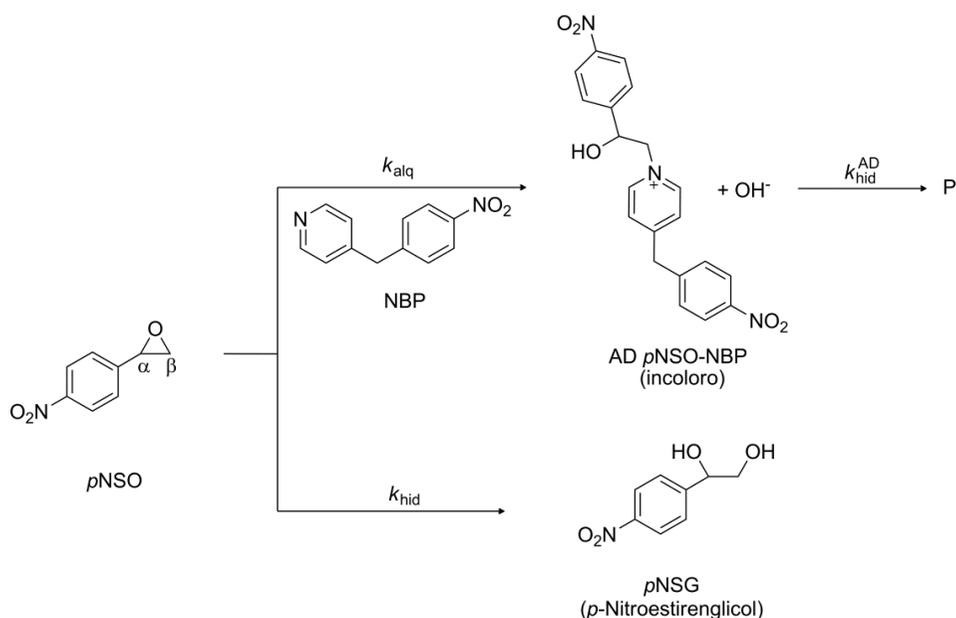


Figura 2.3.8. Espectro de masas en modo positivo para el pico obtenido del cromatograma de la mezcla de reacción *p*NSO+guanósina, con $t_R=8,83$ min.

Considerando el carácter electrófilo del *p*NSO, la formación de aductos con la guanósina, su reactividad con NBP y piridina y la reactividad de epóxidos similares con el ADN (tablas 2.3.4 y 2.3.5), es previsible que el *p*NSO reaccione con el ADN y alquile mayoritariamente la posición N7 de la guanósina.

2.3.2.2.2 Mecanismo de reacción

En general, la reacción de un nucleófilo con epóxidos de arilo puede tener lugar en los dos carbonos del anillo oxiránico, α y β . Con distintos nucleófilos se ha comprobado que el *p*NSO produce mayor proporción de aducto β que de aducto α .^{238,345} Esta proporción alcanza 91% con piridina como nucleófilo (60,0 °C)⁷⁹ y 98% con desoxiguanosina a 37,0 °C, manejando el valor extrapolado del trabajo de Sugiura *et al.*^{53,270} Puede preverse pues, que la NBP reaccione mayoritariamente a través del carbono menos impedido del anillo oxiránico, C_β . Por ello, se propone un mecanismo análogo al de alquilación por epóxidos lineales (esquema 2.3.2).



Esquema 2.3.2. Mecanismo propuesto para la reacción de alquilación de NBP por *p*NSO.

Al estudiar la reacción de alquilación de NBP por óxido de *p*-nitroestireno es necesario tener en cuenta además de la reacción de alquilación propiamente dicha, las reacciones de hidrólisis del epóxido y del aducto formado. Los perfiles cinéticos obtenidos son típicos de reacciones consecutivas, acordes con el mecanismo propuesto.

De acuerdo con el mecanismo propuesto, la ecuación de velocidad de formación del aducto NBP-*p*NSO en términos de absorbancia, es análoga a la ecuación (2.2.7):

$$A_{AD} = \frac{\varepsilon l [pNSO]_o k'_{alq}}{(k'_{alq} + k_{hid}) - k_{hid}^{AD}} \left(e^{-\left(k_{hid}^{AD}\right) t} - e^{-\left(k'_{alq} + k_{hid}\right) t} \right) \quad (2.3.2)$$

Se trabaja siempre con exceso de NBP (pseudoprimer orden). Como puede observarse (figura 2.3.9), los perfiles cinéticos obtenidos para la reacción de alquilación de NBP por *p*NSO muestran un excelente ajuste a la ecuación de velocidad (Ec.(2.3.2)), lo que apoya el mecanismo propuesto.

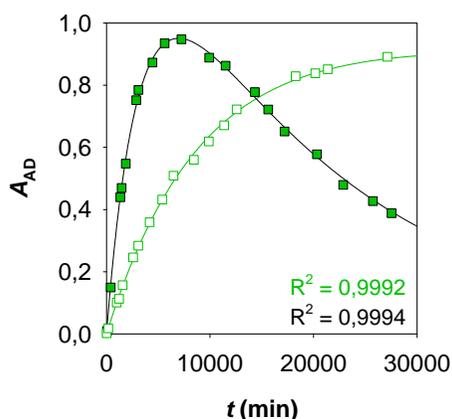


Figura 2.3.9. Perfiles cinéticos de la formación del aducto NBP-*p*NSO en medios de diferente acidez. Ajustes (-) y valores experimentales. 7:3 medio agua:dioxano; $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[pNSO]_o = 4,93 \cdot 10^{-5}\text{ M}$; $\text{pH} = 4,43$ y $[NBP]_o = 1,29 \cdot 10^{-2}\text{ M}$ (\square); $\text{pH} = 6,14$ y $[NBP]_o = 1,56 \cdot 10^{-2}\text{ M}$ (\blacksquare).

2.3.2.2.2.1 Órdenes de reacción

La expresión utilizada para obtener los órdenes parciales de reacción respecto de la concentración de NBP y *p*NSO es la expresión logarítmica de la velocidad inicial de formación del aducto, v_o , en términos de absorbancia (Ec. (2.3.3)) equivalente a la ecuación (2.2.14).

$$\log(v_o \varepsilon l) = \log\left(\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta A_{AD}}{\Delta t}\right) = \log k_{alq} \varepsilon l + n \log[\text{NBP}]_o + m \log[\text{pNSO}]_o \quad (2.3.3)$$

En la figura 2.3.10 se muestran los valores experimentales obtenidos al variar la concentración de uno y otro reactivo junto con el ajuste a la ecuación anterior.

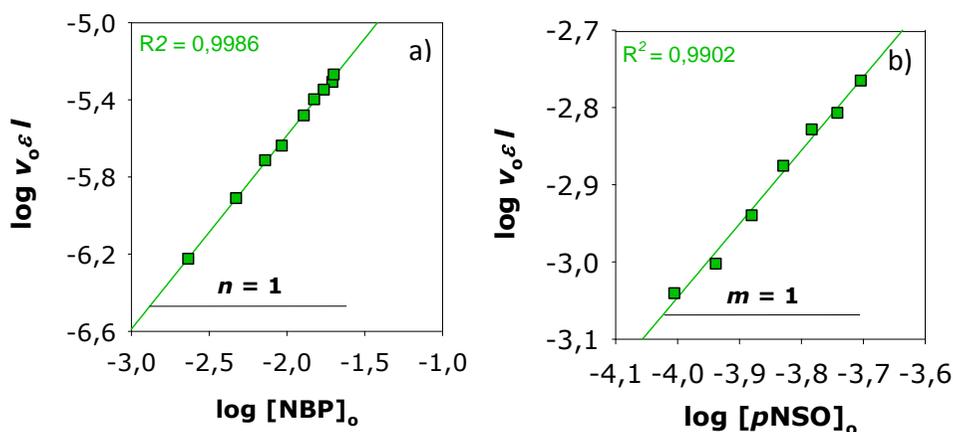


Figura 2.3.10. Orden de reacción parcial respecto de la concentración de: a) NBP, n ($[\text{pNSO}]_o = 3,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$); y b) pNSO, m ($[\text{NBP}]_o = 1,54 \cdot 10^{-2} \text{ M}$); para la reacción de alquilación de NBP por pNSO. Medio 7 : 3 agua/dioxano; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 6,97$.

Se ha comprobado que los órdenes parciales de reacción respecto de la concentración de ambos reactivos, NBP y pNSO, son la unidad. Este hecho confirma que, al igual que ocurría con los epóxidos lineales, la reacción de alquilación de NBP por el pNSO tiene lugar mediante una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$.

2.3.2.2.2 Identificación de los aductos NBP-EP mediante espectrometría de masas

El aducto NBP-pNSO se ha identificado mediante HPLC-MS. En el espectro de masas en modo positivo se ha obtenido el pico correspondiente, $m/z = 380,2$.

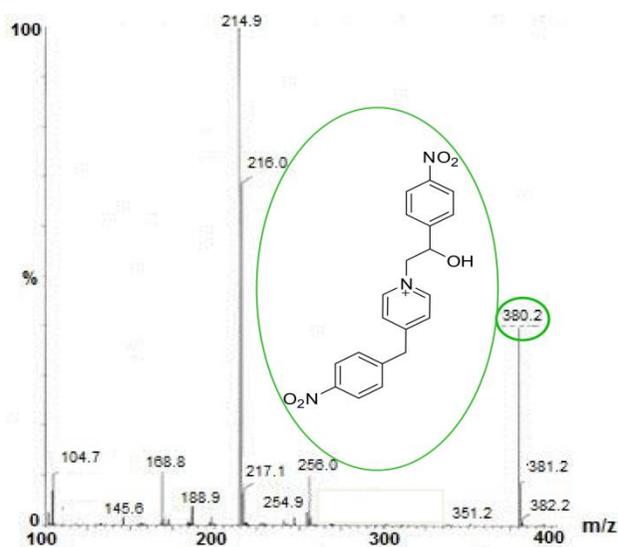


Figura 2.3.11. Espectros de masas en el modo positivo obtenido para la reacción de alquilación transcurridos 10 días del inicio de la reacción; $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6,78$; $[\text{NBP}]_0 = 1,56 \cdot 10^{-2}\text{ M}$; $[\text{pNSO}]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

2.3.2.2.2.3 Seguimiento de la reacción mediante HPLC con detección en diode array

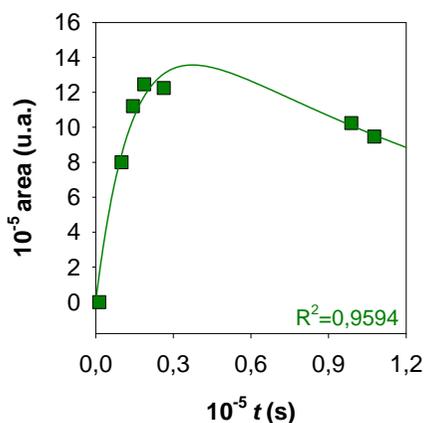


Figura 2.3.12. Perfil cinético obtenido al realizar el seguimiento de la variación temporal del área de pico del aducto NBP-*p*NSO; $t_R = 11,0\text{ min}$; $\lambda = 254\text{ nm}$; $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6,98$.

Se realizó el seguimiento de una cinética por HPLC y se comprobó que en el transcurso de la reacción aparecía un pico con un tiempo de retención $t_R = 11,0$

min, cuya área aumentaba hasta alcanzar un máximo y posteriormente disminuía. El perfil cinético observado se recoge en la figura 2.3.12. Puesto que no se observó la aparición de ningún otro pico en el cromatograma a excepción del correspondiente al glicol, los resultados obtenidos mediante separación por HPLC y detección a $\lambda = 254$ nm apoyan el mecanismo de reacción propuesto.

2.3.2.2.2.4 Resultados *in silico* utilizando la piridina como nucleófilo

Se calculó la barrera de energía entre reactivos y estados de transición para la reacción de alquilación de piridina con una serie de epóxidos, entre ellos algunos de los epóxidos lineales estudiados anteriormente (tabla 2.3.7).

Tabla 2.3.7. Barreras de energía obtenidas *in silico* para la reacción de la piridina con una serie de epóxidos.

Epóxido	Ataque	ΔE (kJ·mol ⁻¹)
SO	β	91,4
	α	93,5
pNSO	β	86,9
	α	97,7
PO	β	89,9
	α	104,7
1,2-EB	β	105,1
	α	n.d.

Medio agua. n.d.: no detectado

La presencia del grupo nitro gobierna la reactividad del pNSO. Para la reacción entre el óxido de estireno y la piridina *in silico* sólo se ha encontrado una pequeña diferencia para las barreras de los ataques en las posiciones α y β , coherente con la evidencia experimental de la formación de ambos aductos en proporciones elevadas.⁸⁰ En el caso del pNSO la diferencia entre ambos estados de transición es muy grande y la formación del correspondiente aducto β se encuentra más favorecida. Esa diferencia es similar a la encontrada para la reacción con PO y el caso más extremo es el del 1,2-EB, ya que la formación del estado de transición correspondiente a la formación del aducto α , en este caso no llega siquiera a observarse *in silico*. La diferencia de ~ 10 kJ mol⁻¹ encontrada entre el ataque en el carbono β y el α para el pNSO (que se traduce en una disminución en la velocidad

de reacción de unas 100 veces) sugiere que el ataque de la piridina en el carbono β está más favorecida. Las diferencias de energías encontradas explican que el óxido de estireno, SO, forme una mezcla de los aductos α y β , mientras que el óxido de propileno y el óxido de butileno produzcan sólo aductos β . Por otro lado los resultados sugieren la formación mayoritaria del aducto β en la reacción del *p*NSO y la piridina, pudiéndose considerar despreciable la formación del aducto α . Puesto que la piridina es un nucleófilo semejante a la NBP, la conclusión se puede considerar válida también para la NBP.

2.3.2.2.3 Estudio cinético de las reacciones involucradas

2.3.2.2.3.1 Determinación del coeficiente de absorción molar del aducto NBP-*p*NSO

El coeficiente de absorción molar del aducto NBP-*p*NSO se determinó en $\lambda = 560$ nm (máximo de absorbancia), donde se calcularon previamente los coeficientes de absorción molar de los epóxidos lineales. En esa longitud de onda absorbe sólo el aducto NBP-*p*NSO.

Para calcular el valor de ϵ se utilizaron los dos métodos previamente descritos para los epóxidos lineales (véanse págs.92-96).

a) *Método de Gillette*

El método de Gillette (pág.94) permite obtener el coeficiente de absorción molar de un aducto cuando tiene lugar la reacción de alquilación exclusivamente o dos reacciones paralelas, como son la reacción de hidrólisis del *p*NSO y la reacción de alquilación de NBP.

Se realizó una serie de experimentos cinéticos variando la concentración de NBP en medio 7:3 agua:dioxano y pH = 4,43.

La figura 2.3.13.a) muestra los perfiles de las cinéticas programadas para determinar el coeficiente de absorción molar. Se observa en todas una meseta bien

definida que revela que, en las condiciones de trabajo, la reacción de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO puede considerarse despreciable, es decir, $k_{\text{hid}}^{\text{AD}} \sim 0$.

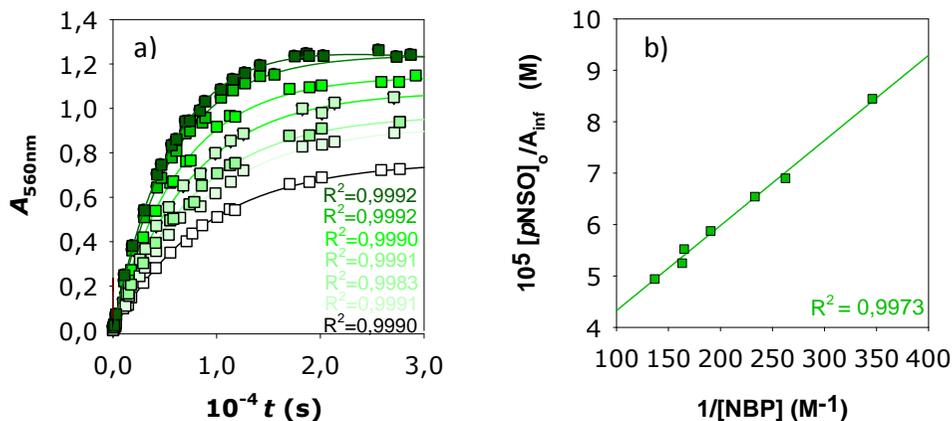


Figura 2.3.13. a) Cinéticas realizadas a pH ácido, variando la concentración de NBP. Valores experimentales (■) y ajuste (-); $[\text{NBP}]_o = (2,8-7,2) \cdot 10^{-3} \text{ M}$; b) Obtención del coeficiente de absorción molar del aducto NBP-*p*NSO, ϵ . Medio 7:3 agua: dioxano; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{pNSO}]_o = 4,93 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\text{pH} = 4,43$.

Para $t = \infty$ se obtiene la siguiente expresión, equivalente a la ecuación (2.2.20):

$$\frac{[\text{pNSO}]_o}{A_{\text{inf}}} = \frac{1}{\epsilon l} + \frac{k_{\text{hid}}}{k_{\text{alq}}} \frac{1}{\epsilon l [\text{NBP}]} \quad (2.3.4)$$

$$\frac{[\text{pNSO}]_o}{A_{\text{inf}}} = (2,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} + (0,0166 \pm 0,0005) \frac{1}{[\text{NBP}]} \quad (2.3.5)$$

El valor de ϵ se obtiene con el inverso de la ordenada en el origen en la ecuación (2.3.5). Para el aducto NBP-*p*NSO $\epsilon = (3,7 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

b) A partir de los parámetros del ajuste

El valor del coeficiente de absorción molar se puede calcular también sustituyendo k_{alq} en el parámetro a del ajuste A_{AD}/t ($a = \epsilon l k_{\text{alq}} [\text{NBP}][\text{pNSO}]_o$). Para obtener k_{alq} en unas determinadas condiciones, se ajustan los valores de b frente a los de

[NBP] ($b = k_{\text{alq}}[\text{NBP}] + k_{\text{hid}}$). La pendiente de la representación se corresponde con k_{alq} (figura 2.3.14).

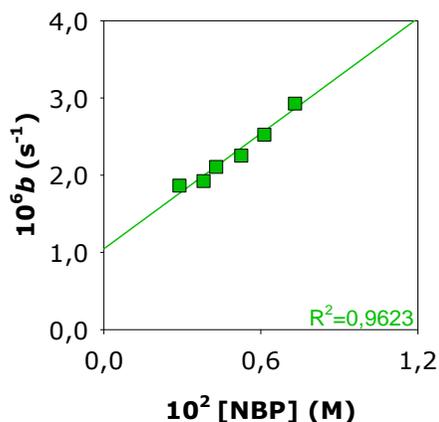


Figura 2.3.14. Cálculo de ε a partir de los parámetros de ajuste. Valores experimentales (■) y ajuste (-). Medio 7:3 agua: dioxano; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\rho\text{NSO}]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $\text{pH} = 4,43$.

En las condiciones de trabajo se obtiene la siguiente ecuación de ajuste:

$$b = (1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} + (2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} [\text{NBP}] \text{ s}^{-1} \quad (2.3.6)$$

A $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $k_{\text{alq}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, de modo que:

$$\varepsilon = \frac{a}{k_{\text{alq}} I [\rho\text{NSO}]_0 [\text{NBP}]} \quad (2.3.7)$$

La tabla 2.3.8 recoge los valores de a para distintas concentraciones de NBP y el valor de ε obtenido para cada experimento.

El valor medio es $\varepsilon = 38.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que concuerda perfectamente con el obtenido con el método de Gillette.

Tabla 2.3.8. Parámetro a y coeficientes de absorción molar en función de [NBP].

$10^6 a$ (s^{-1})	10^2 [NBP] (M)	$10^{-4} \epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
3,48	0,731	3,9
2,90	0,613	3,9
2,31	0,525	3,6
1,71	0,381	3,7
1,36	0,289	3,8
1,96	0,429	3,7
2,99	0,606	4,0

Medio 7:3 agua:dioxano; $[pNSO]_0 = 4,91 \cdot 10^{-5} M$;
 $pH = 4,43$; $T = 37,5^\circ C$.

2.3.2.2.3.2 Reacción de alquilación de NBP por pNSO

Conocido ϵ , de cada experimento cinético puede obtenerse k_{alq} a partir de la ecuación (2.3.8), bien utilizando el parámetro a del ajuste A_{AD}/t o mediante el método de velocidades iniciales.

$$k_{alq} = \frac{a}{\epsilon l [NBP] [pNSO]_0} = \frac{\left(\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta A_{AD}}{\Delta t} \right)}{\epsilon l [NBP] [pNSO]_0} \quad (2.3.8)$$

a) Influencia del pH

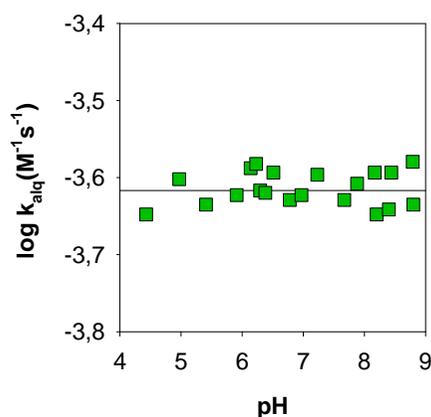


Figura 2.3.15. Influencia del pH. Valores experimentales (■) y valor medio obtenido (-). Medio 7:3 agua: dioxano; $T = 37,5^\circ C$; $[pNSO]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5} M$.

Para estudiar si el pH ejerce alguna influencia sobre la constante de alquilación se ha empleado el método de velocidades iniciales. Como puede observarse (figura 2.3.15), la reacción de alquilación de NBP por *p*NSO es independiente del pH.

b) Influencia de la temperatura

Las constantes de velocidad de alquilación obtenidas al estudiar la influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de NBP por *p*NSO se recogen en la tabla 2.3.9.

Tabla 2.3.9. Influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de alquilación.

T (°C)	$10^4 k_{\text{alq}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
30,0	1,402 ± 0,008
32,5	1,73 ± 0,01
35,0	2,13 ± 0,01
37,5	2,49 ± 0,02
40,0	3,07 ± 0,02
42,5	3,45 ± 0,02
45,0	4,06 ± 0,02

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96.

La tabla 2.3.10 muestra los valores de los parámetros de activación. El valor de la entropía de activación, negativo y elevado, es coherente con un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular.²²⁰

Tabla 2.3.10. Parámetros de activación de la reacción de alquilación de NBP por *p*NSO.

Parámetros de activación	
$E_{\text{a alq}}$ (kJ·mol ⁻¹)	57 ± 4
$\Delta^{\#}H^{\circ}_{\text{alq}}$ (kJ·mol ⁻¹)	55 ± 4
$\Delta^{\#}S^{\circ}_{\text{alq}}$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	-139 ± 11
$\Delta G^{\#}_{\text{alq}}(25,0^{\circ}\text{C})$ (kJ·mol ⁻¹)	96 ± 5

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96.

c) Influencia de la fuerza iónica

Para investigar la influencia de la fuerza iónica, I , se realizó una serie de experimentos en los que la fuerza iónica se ajustó con NaClO_4 . Las constantes de velocidad de alquilación obtenidas se muestran en la tabla 2.3.11.

Tabla 2.3.11. Influencia de la fuerza iónica sobre k_{alq} .

I (M)	$10^4 k_{\text{alq}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
0,00	2,5 ± 0,1
0,04	2,5 ± 0,1
0,06	2,5 ± 0,1
0,14	2,6 ± 0,1
0,17	2,6 ± 0,1
0,24	2,5 ± 0,1

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96. $T = 37,5^\circ\text{C}$.

Como era de esperar, la fuerza iónica no produjo variación significativa sobre la constante de velocidad de alquilación a pH neutro, pues la reacción se produce entre dos especies neutras, $p\text{NSO}$ y NBP .^{340,346}

2.3.2.2.3.3 Estudio de la reacción de hidrólisis de $p\text{NSO}$

El interés de la reacción de hidrólisis reside en su papel en el estudio global de la reacción de alquilación y en su uso como herramienta para calcular el valor de k_{alq} a partir de los parámetros obtenidos del ajuste A_{AD}/t . A tal fin se ha estudiado la reacción de hidrólisis del $p\text{NSO}$ en el mismo medio en el que se ha investigado la reacción de alquilación de NBP por el epóxido (7:3 agua:dioxano).

a) Influencia del pH

Como estudios previos en medio acuoso han mostrado que la reacción de hidrólisis del $p\text{NSO}$ presenta catálisis ácida y básica (en medio acuoso para $\text{pH} < 4$ y $\text{pH} > 12$),²³⁸ la constante de hidrólisis observada, k_{hid} puede expresarse así:

$$k_{\text{hid}} = k_{\text{H}^+} [\text{H}^+] + k_{\text{hid}}^{\circ} + k_{\text{OH}^-} [\text{OH}^-] \quad (2.1.20)$$

Se ha efectuado el estudio de la reacción de forma directa, mediante seguimiento espectrofotométrico en continuo, y de forma indirecta, utilizando el parámetro *b* del ajuste (véase pág. 146).

- *Hidrolisis catalizada por ácido*

La reacción de hidrólisis en medio 7:3 agua:dioxano (pH = 3,0) se siguió mediante separación con HPLC y detección UV, para comprobar que el glicol es el único producto de reacción. La evolución de los cromatogramas con el tiempo y los perfiles cinéticos se corresponden con la formación del glicol (figura 2.3.16). La reacción fue monitorizada en $\lambda = 254$ nm. La disminución del área del pico correspondiente al *p*NSO a un tiempo de retención $t_R = 28$ min y el aumento en el del *p*NSG, $t_R = 20$ min, en función del tiempo vienen dados por:

$$\text{Area}_{p\text{NSO}} = \text{Area}_{p\text{NSO}_0} e^{-k_{\text{hid}}t} \quad (2.3.9)$$

$$\text{Area}_{p\text{NSG}} = \text{Area}_{p\text{NSG}_0} (1 - e^{-k_{\text{hid}}t}) \quad (2.3.10)$$

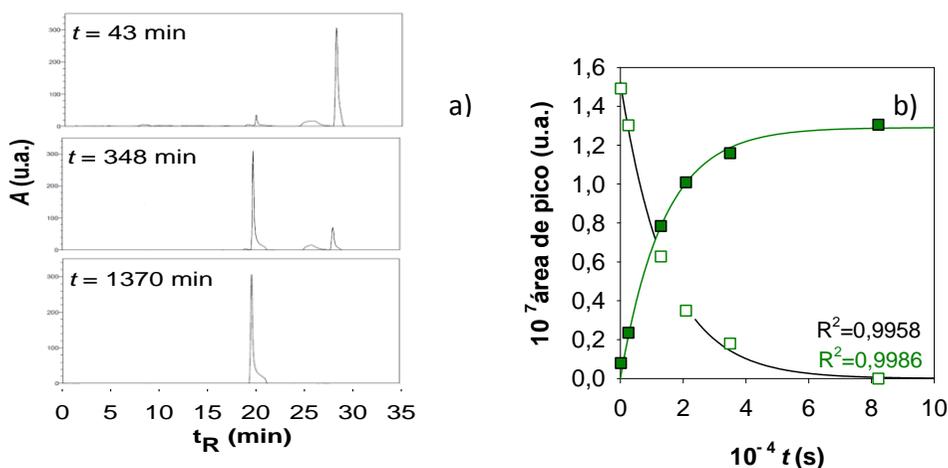


Figura 2.3.16. a) Cromatograma de la evolución temporal de la hidrólisis de *p*NSO catalizada por ácido; b) Perfiles cinéticos obtenidos al realizar el seguimiento de la variación temporal del área de pico del *p*NSO y del producto de hidrólisis, *p*NSG; $T = 25,0$ °C; pH = 2,99; $[p\text{NSO}]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5}$ M; $\lambda = 254$ nm.

En medio ácido: i) la concentración de dioxano es tan elevada que interfiere con la medida de absorbancia en el UV e imposibilita realizar el

seguimiento espectrofotométrico directo y ii) la velocidad de reacción a $T = 37,5$ °C es demasiado rápida para poderla seguir mediante HPLC-UV. Por eso, la determinación de la velocidad de reacción de hidrólisis se llevó a cabo por extrapolación a partir de los valores calculados en medios con mayor proporción de agua.

Los valores de las constantes de hidrólisis en medios con diferente proporción agua:dioxano se obtuvieron directamente mediante seguimiento espectrofotométrico en continuo de la reacción en $\lambda = 310$ nm (figura 2.3.17). La absorbancia es la suma de las contribuciones de glicol y epóxido:

$$A = l[\rho\text{NSO}]_0 \left[(\varepsilon_{\rho\text{NSO}} - \varepsilon_{\rho\text{NSG}}) e^{-k_{\text{hid}}t} \right] \quad (2.3.11)$$

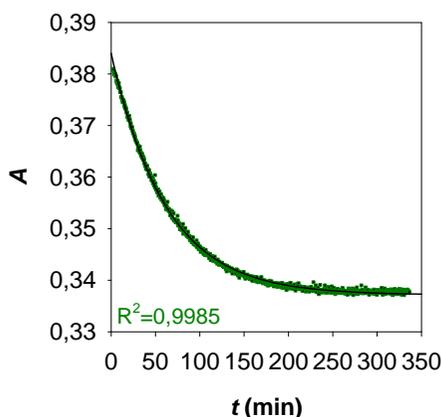


Figura 2.3.17. Perfil cinético de la reacción de hidrólisis en medio ácido; $\lambda = 310$ nm; $T = 37,5$ °C; $[\rho\text{NSO}]_0 = 4,93 \cdot 10^{-5}$ M; pH = 2,96.

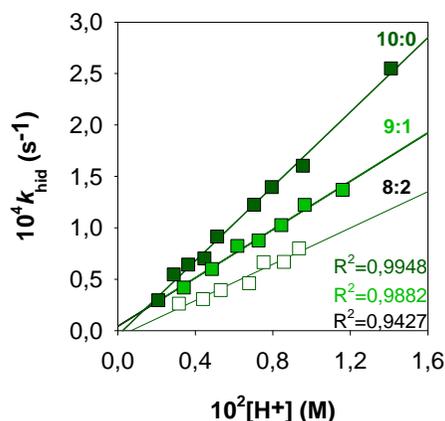
En medio ácido fuerte ($\text{pH} < 3$), $k_{\text{hid}} = k_{\text{H}^+} [\text{H}^+]$, el factor catalítico viene dado por la pendiente de la recta $k_{\text{hid}} / [\text{H}^+]$.

Los valores de los coeficientes catalíticos obtenidos para los diferentes medios se recogen en la tabla 2.3.12. Por extrapolación a partir de estos valores se estimó el coeficiente catalítico en medio 7:3 agua:dioxano ($D = 48,5$), $k_{\text{H}^+} = (5,3 \pm 1,6) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($T = 37,5$ °C).

Tabla 2.3.12. Constante de velocidad de la reacción de hidrólisis catalizada en función de la composición del medio.

Agua:dioxano (v:v)	Constante dieléctrica (D) ^a	$10^2 k_{\text{H}^+}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
10:0	74,0	1,8 ± 0,1
9:1	65,5	1,2 ± 0,1
8:2	57,1	0,92 ± 0,07

a: Ref. 347; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

**Figura 2.3.18.** Coeficientes catalíticos, k_{H^+} , de hidrólisis del *p*NSO en medios con distinta composición agua:dioxano. $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Hidrólisis no catalizada

En el intervalo de pH 4,4-7,0 la constante de velocidad para la reacción de hidrólisis no catalizada es $k_{\text{hid}} = k_{\text{hid}}^0$. Su valor se ha calculado de forma indirecta a partir del parámetro b del ajuste; k_{hid}^0 se corresponde con la ordenada en el origen de la representación $b/[\text{NBP}]$ (figura 2.3.14 y Ec.(2.3.6)). Los valores obtenidos para las constantes fueron $k_{\text{hid}}^0 = (1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$) de modo que $k_{\text{H}_2\text{O}} = (2,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{H}_2\text{O}] = 38,9 \text{ M}$).

b) Influencia de la temperatura

Los parámetros de activación se determinaron a partir del ajuste de la constante de hidrólisis no catalizada a distintas temperaturas (32,5-42,5 °C) a las ecuaciones de Arrhenius y de Eyring.

El valor de la entropía de activación, negativo y elevado, es coherente con un mecanismo de sustitución nucleófila bimolecular.²²⁰ Es del orden de las obtenidas en este trabajo para la alquilación del propio *p*NSO.

Tabla 2.3.13. Parámetros de activación de la reacción de hidrólisis de *p*NSO.

Parámetros de activación	
$E_{a \text{ hid}}$ (kJ·mol ⁻¹)	79 ± 10
$\Delta^{\#}H^{\circ}_{\text{hid}}$ (kJ·mol ⁻¹)	77 ± 10
$\Delta^{\#}S^{\circ}_{\text{hid}}$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	-146 ± 33
$\Delta G^{\#}_{\text{hid}}$ (25,0 °C) (kJ·mol ⁻¹)	120 ± 20

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 6,96; [NBP]₀ = 1,49·10⁻² M.

2.3.2.2.3.4 Estudio de la reacción de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO

Las constantes de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO se han calculado a partir del valor del parámetro c del ajuste A_{AD}/t ($c = k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$).

a) Influencia del pH

La reacción de descomposición del aducto *p*NSO-NBP presenta catálisis básica como queda patente al observar la representación $k_{\text{hid}}^{\text{AD}} / [\text{OH}^-]$ (figura 2.3.19).

En medio 7:3 agua:dioxano y para $T = 37,5$ °C $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ viene dada por la siguiente recta:

$$k_{\text{hid}}^{\text{AD}} = (2,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} [\text{OH}^-] + (3,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1} \quad (2.3.12)$$

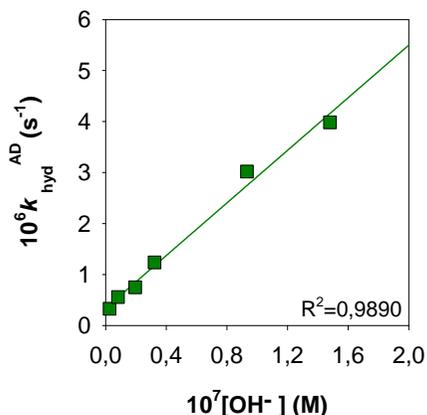


Figura 2.3.19. Determinación del coeficiente catalítico de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO; Medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

El coeficiente catalítico se corresponde con la pendiente y la constante de velocidad de hidrólisis del aducto no catalizada, es la ordenada en el origen.

b) Influencia de la temperatura

Tabla 2.3.14. Influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO.

T ($^\circ\text{C}$)	$10^6 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s^{-1})
30,0	0,51 \pm 0,05
32,5	0,8 \pm 0,1
35,0	0,96 \pm 0,07
37,5	1,02 \pm 0,05
40,0	1,32 \pm 0,06
42,5	2,0 \pm 0,2
45,0	4,1 \pm 0,8
$E_a^{\text{hid AD}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	77 \pm 8

Medio 7:3 agua:dioxano; pH = 7

Se ha investigado la influencia de la temperatura en la reacción de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO. El buen ajuste de las constantes de velocidad obtenidas en el intervalo a la ecuación de Arrhenius ha permitido obtener el valor de la energía de activación (tabla 2.3.14).

2.3.2.2.4 Parámetros cinéticos para caracterizar la reactividad

Se han obtenido los valores para los diversos parámetros (S_{NBP} , s , f , ALy $k_{n=2}$, véanse págs. 35 y 43-45) necesarios para el establecimiento de correlaciones mutagenia-reactividad. Mediante la ecuación de Swain-Scott se ha estimado el valor $k_{n=2} = 4,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ($T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7$).

La tabla 2.3.15 permite observar la gran influencia de la temperatura, lo que pone de manifiesto la necesidad de estandarizar las mismas condiciones para establecer comparaciones entre compuestos diferentes. Los valores del logaritmo de la quimioselectividad, $4,44 > \log S_{\text{NBP}} > 4,07$ y los de la constante de sustrato de Swain-Scott (muy superiores a 0,7) apoyan que la reacción de alquilación de NBP por $p\text{NSO}$ transcurre por un mecanismo $S_{\text{N}}2^{15,46,64,148,312}$ y sugieren que el $p\text{NSO}$ será más reactivo con los centros nitrogenados del ADN.^{46,175,303,313,314}

Tabla 2.3.15. Quimioselectividad, constante de Swain-Scott, capacidad alquilante y efectividad en función de la temperatura.

T ($^\circ\text{C}$)	Parámetros químicos			
	$S_{\text{NBP}} / \log (S_{\text{NBP}})$	s	f	AL (min)
30,0	27581 / 4,44	1,27	0,92	30334
32,5	16329 / 4,21	1,20	0,87	19214
35,0	13430 / 4,13	1,18	0,85	15239
37,5	15363 / 4,19	1,20	0,87	14570
40,0	12647 / 4,10	1,17	0,84	10933
42,5	11722 / 4,07	1,16	0,83	7193

Medio agua:dioxano 7:3. pH = 7. Los errores relativos se encuentran entre el 5 y el 10%.

El aumento de S_{NBP} y s con la disminución de la temperatura se observó también con los epóxidos lineales. Los valores de la energía libre de activación (tabla 2.3.10 y tabla 2.3.13 págs. 149 y 154) son, en general, más bajos con nucleófilos más fuertes,⁶⁴ como ocurre en este caso con el agua ($n = 0$) y la NBP ($n = 3,5$). La reacción de alquilación está más favorecida que la reacción de hidrólisis.

En cambio el pH (tabla 2.3.16) no produce variación sustancial en s y S_{NBP} puesto que en el intervalo de estudio predomina la reacción de hidrólisis no catalizada y la reacción de alquilación no se ve afectada por el pH. Por el mismo motivo no se observa ningún efecto sobre f .

Al analizar los valores de f y su variación con la temperatura y el pH, se concluye que el *p*NNSO es un agente alquilante potente. En cualquier condición, alrededor del 80-90% de la cantidad inicial de epóxido reacciona para formar el aducto NBP-*p*NNSO. Por otro lado, los valores de AL, sugieren que es un agente alquilante con una efectividad moderada; el aducto, a pesar de ser inestable, se acumula (a pH 7 y $T = 37,5$ °C la vida del aducto es 10 días). La efectividad del agente alquilante disminuye notablemente con el aumento de la temperatura (tabla 2.3.15) y el pH (tabla 2.3.16). Esta disminución se debe fundamentalmente a que la efectividad está fuertemente influida por la inestabilidad del aducto (determinada por la constante de hidrólisis del aducto). Si se comparan la capacidad alquilante y la efectividad del óxido de *p*-nitroestireno con la de los epóxidos lineales (tabla 2.3.17), se puede concluir que el *p*NNSO es un alquilante más potente pero con menor efectividad.

Tabla 2.3.16. Influencia del pH sobre las eficacias y eficiencias de alquilación, f y AL.

pH	f	AL (min)	S_{NBP}	s
4,50	0,85	251963	10835	1,15
4,97	0,84	79124	9860	1,14
5,42	0,81	41170	8172	1,12
5,91	0,79	23665	7401	1,11
6,11	0,78	16436	7059	1,10
6,29	0,89	19728	15232	1,20
7,00	0,87	14570	15363	1,20
7,17	0,87	3628	12575	1,17
8,40	0,86	2450	12036	1,17

[NBP] = 0,02 M ; medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C. Los errores relativos se encuentran entre el 5 y el 10%.

2.3.2.2.5 Correlaciones reactividad química-actividad biológica.

En la tabla 2.3.17 se recogen datos de parámetros químicos y actividades biológicas para una serie de especies alquilantes.^{80,103,270,271}

Tabla 2.3.17. Estudio comparativo de parámetros químicos y biológicos de varios agentes alquilantes estudiados en el grupo de investigación, incluidos los epóxidos lineales y *p*NSO.

Agente alquilante	<i>f</i>	AL (min)	S _{NBP}	<i>s</i>	Mutagenia <i>S. Typh.</i> (Rev/nmol) ^a	10 ⁶ MF para 1mM ^b	Mutagenia ^c
BPL	0,71 ^d	aducto estable ^d	4220 ^d	1,05 ^d	1,2	-	4,5
dicetena	1 ^e	0,65 ^e	363013 ^e	1,61 ^e	~0	-	0
PO	0,76 ^f	24000 ^f	6177 ^f	1,08 ^f	0,02	-	-
1,2-EB	0,78 ^f	25000 ^f	6890 ^f	1,10 ^f	0,003/0,004	-	-
cis-2,3-EB	0,28 ^f	40000 ^f	762 ^f	0,82 ^f	0,002	-	-
trans-2,3-EB	0,33 ^f	37000 ^f	971 ^f	0,85 ^f	0,0003	-	-
<i>p</i>NSO	0,87 ^f	14570 ^f	1536 ^f	1,20 ^f		4,7	-
SO	-	-	-	-	0,06/0,07	1,2	0,22

[NBP] = 0,02 M; medio 7:3 agua:dioxano; T = 37,5°C. pH = 7; a: Ref. 266,271,348 Mutagenia en *Salmonella Typhimurium* TA100; b: Ref. 80 c: Ref. 193; Valores expresados como el aumento en el número de mutantes resistentes a 6-tioguanina por 10⁶ células viables sobre los valores de control por mg ml⁻¹.d: Ref. 165; *Valores extrapolados; e:Ref: 199; f: este trabajo.

Los valores de *s* y S_{NBP} sugieren que todos los compuestos reaccionan a través de mecanismos S_N2 dando lugar preferentemente a alquilación del ADN en los átomos de nitrógeno. El valor de *f* obtenido para *p*NSO es mayor que el encontrado para la β-propiolactona (BPL) (*f* = 0,71 valor extrapolado para pH = 7,0 y T = 37,5 °C),¹⁶⁵ la lactona más carcinógena y mutágena estudiada en nuestro laboratorio. A diferencia del *p*NSO, PO y 1,2-EB (que presentan valores de *f* similares e incluso mayores que los de la BPL (tabla 2.3.17)), la lactona forma un aducto estable con la NBP. Por ello cabe esperar que su potencial mutágeno¹⁶⁵ sea mayor que el de los epóxidos citados, como de hecho ocurre (tabla 2.3.17). Cuanto mayor es la permanencia del aducto en el tiempo, mayor es la probabilidad de que se produzcan efectos biológicos. Por eso, al comparar agentes alquilantes que forman aductos estables con otros que producen aductos inestables, cuando presentan valores de *f* similares, es la estabilidad de los aductos formados el factor más influyente en la mutagenia observada *in vitro* (tabla 2.3.17).

Aunque los parámetros *f* y *AL* permiten entender la mutagenia observada *in vitro* de agentes alquilantes que producen alquilación a través de los mismos mecanismos, no hay que olvidar que existen otros factores que pueden influir en la actividad biológica de esos agentes (tamaño de las moléculas y velocidad de transporte hasta el sitio de acción en la célula).

Algunos trabajos centrados en la búsqueda de correlaciones entre capacidad alquilante y reactividad química de los óxidos de estireno han sugerido que la mutagenia depende de la estructura de los aductos; y algunos de ellos concluyen que la mutagenia está correlacionada con la reactividad del carbono bencílico y, por tanto, con la formación del aducto α . Puesto que óxidos de estireno como el *p*NSO y los óxidos de α -metilestireno,¹⁰⁵ que forman sólo aductos β , poseen actividad mutágena, la conclusión anterior no parece satisfactoria.

Para tratar de entender la correlación existente entre la estructura de los aductos y sus efectos mutágenos se ha investigado una serie de óxidos de estireno *p*-sustituídos. En las páginas que siguen se da cuenta de los resultados y conclusiones obtenidos.

2.3.2.3 Conclusiones

1. El *p*NSO reacciona con la guanosina formando un aducto.
2. La reacción de alquilación de 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP) por el *p*NSO da lugar a la formación del aducto correspondiente al ataque sobre el carbono β del anillo oxiránico. La reacción transcurre a través de un mecanismo S_N2 .
3. Para valorar la eficacia de alquilación es necesario considerar tres reacciones: i) la propia reacción de alquilación; ii) la reacción de hidrólisis del *p*NSO, y iii) la reacción de hidrólisis del aducto NBP-*p*NSO.
4. La hidrólisis de *p*NSO presenta catálisis ácida y la del aducto *p*NSO-NBP catálisis básica. La reacción de alquilación no se ve influida por el pH.
5. Los valores de la quimioselectividad y la constante de sustrato de Swain-Scott sugieren que el *p*NSO en su reacción con el ADN debe tener mayor afinidad por los centros nitrogenados de las bases susceptibles de alquilación.
6. La molécula de *p*NSO es un agente alquilante potente, pero de efectividad moderada.
7. La capacidad alquilante del *p*NSO (f) es muy similar a la de agentes mutágenos tan efectivos como la β -propiolactona. La inestabilidad del aducto *p*NSO-NBP que reduce la efectividad del *p*NSO como agente alquilante explica la baja mutagenia del *p*NSO comparada con la de esa lactona.
8. Las diferentes estabildades de los aductos α y β formados en la reacción de alquilación de NBP por los óxidos de estireno, y los parámetros f y AL pueden ser parámetros útiles para entender e interpretar la mutagenia de los óxidos de estireno.

2.3.3 Óxidos de estireno, *p*-cloroestireno y *p*-bromoestireno

Se ha llevado a cabo el estudio de las reactividades de tres óxidos de arilo: óxidos de estireno, *p*-bromoestireno y *p*-cloroestireno (SO, *p*BrSO y *p*ClSO, respectivamente). Además del interés que posee *per se*, completa el estudio de la reactividad del óxido de *p*-nitroestireno realizado previamente. La investigación permite racionalizar la reactividad de los óxidos de estireno *p*-sustituidos y establecer correlaciones estructura-reactividad y reactividad química-actividad biológica como agentes alquilantes.

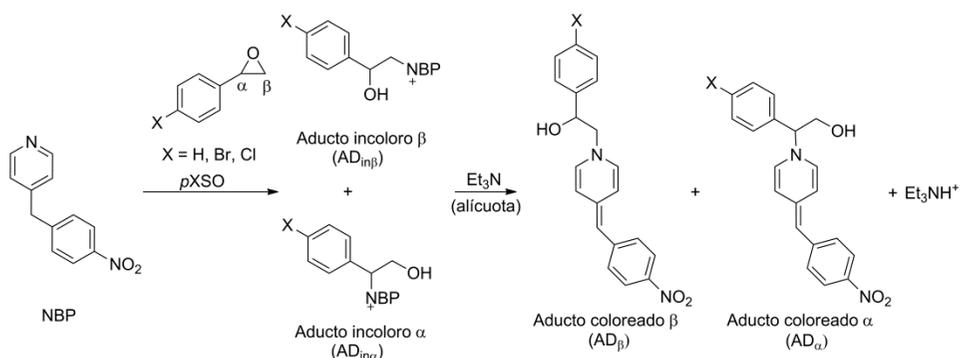
Algunos estudios se han realizado exclusivamente para SO, porque: i) es uno de los epóxidos de uso más extendido y el óxido de arilo más utilizado; ii) dentro de los epóxidos aromáticos, es el que produce concentraciones de aductos α y β más similares y, consecuentemente, el que mejor permite estudiar las reacciones de formación de estos aductos.

2.3.3.1 Método y materiales

2.3.3.1.1 Método experimental

2.3.3.1.1.1 Estudio cinético de la reacción de alquilación de NBP por epóxidos aromáticos

La reacción de alquilación de NBP por SO, *p*ClSO y *p*BrSO, que designaremos de forma general como *p*XSO, se ha seguido espectrofotométricamente. En la reacción de estos epóxidos con NBP se forman dos aductos NBP-*p*XSO: i) el correspondiente al ataque en el carbono menos impedido del anillo oxiránico, C_β , aducto β -NBP-*p*XSO; y ii) el del ataque en el carbono bencílico, más impedido estéricamente, C_α , aducto α -NBP-*p*XSO. Los aductos NBP-*p*XSO α y β son incoloros ($AD_{in\alpha}$ y $AD_{in\beta}$, respectivamente). La adición de una base (trietilamina, Et_3N) produce la desprotonación del carbono que se encuentra entre los dos anillos aromáticos que da lugar a la formación de los aductos coloreados (AD_β y AD_α) (esquema 2.3.3).



Esquema 2.3.3. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por *p*XSO.

En el estudio de la reacción de alquilación de NBP por *p*XSO tanto las condiciones de trabajo como el método utilizado son idénticos a los utilizados con *p*NSO y con EP (véase apartado 2.2.2.1 pág. 81). Se ha trabajado en mezclas acuoorgánicas, agua:dioxano en proporción 7:3 (v:v) de acidez constante y con exceso de NBP (para evitar la formación de aductos 1:2 NBP-*p*XSO).

La figura 2.3.20 muestra los espectrogramas obtenidos en el seguimiento de la formación de los aductos NBP-*p*XSO.

El análisis espectrofotométrico en la región UV-vis, mostró que: i) ni los reactivos ni el glicol resultante de la hidrólisis interfieren en el margen de longitudes de onda de trabajo. Sin embargo, en el intervalo $\lambda = 200-700$ nm no hay una longitud de onda dónde sólo absorban el aducto α - o el β -NBP-*p*XSO. Por eso el seguimiento espectrofotométrico de la reacción de alquilación se monitorizó con la variación de absorbancia en $\lambda = 560$ nm (suma de las de AD_{α} y AD_{β}).

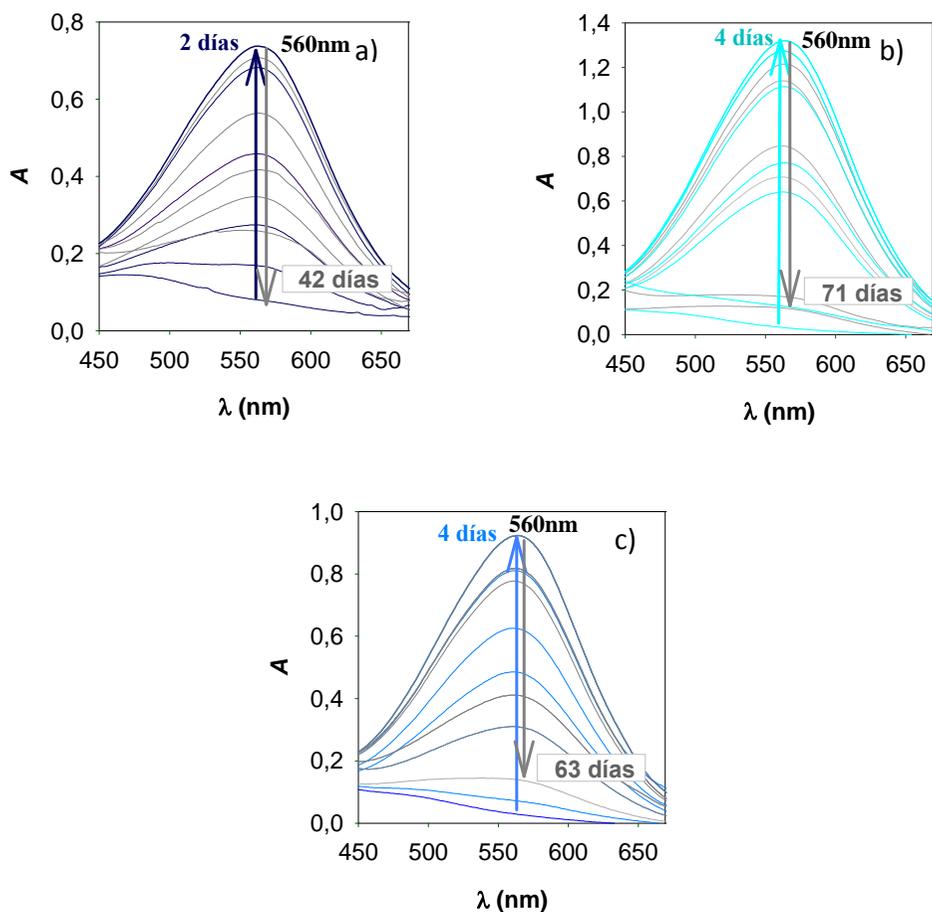


Figura 2.3.20. Espectrogramas obtenidos en el seguimiento de la formación de aductos *p*XSO-NBP. $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 6,94$; $[\text{NBP}]_0 = 1,99 \cdot 10^{-2}\text{ M}$. a) $[\text{SO}]_0 = 7,69 \cdot 10^{-5}\text{ M}$; b) $[\text{pClSO}]_0 = 6,99 \cdot 10^{-5}\text{ M}$; c) $[\text{pBrSO}]_0 = 7,46 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

2.3.3.1.1.2 Estudio cinético de la reacción de hidrólisis de epóxidos aromáticos

El estudio cinético de la reacción de hidrólisis de *p*XSO se hizo indirectamente. Los valores de las constantes de hidrólisis observados para *p*XSO se han obtenido a partir del estudio cinético de la reacción de alquilación, utilizando los parámetros del ajuste A_{AD}/t .

Para comprobar la calidad de los resultados obtenidos de forma indirecta, se investigó directamente la reacción de hidrólisis de uno de los epóxidos

aromáticos, SO, mediante seguimiento espectrofotométrico en continuo. Se obtuvieron previamente los espectros de óxido de estireno (figura 2.3.21) y estirenglicol, comprobándose que ambas especies absorben en esa región del espectro y que no existe una longitud de onda a la que absorban uno u otro exclusivamente. Como en $\lambda = 226$ nm se observaba una variación sustancial de absorbancia, se hizo el seguimiento espectrofotométrico de la hidrólisis monitorizando en continuo la variación de absorbancia en esa longitud de onda. La figura 2.3.22 muestra una cinética modelo.

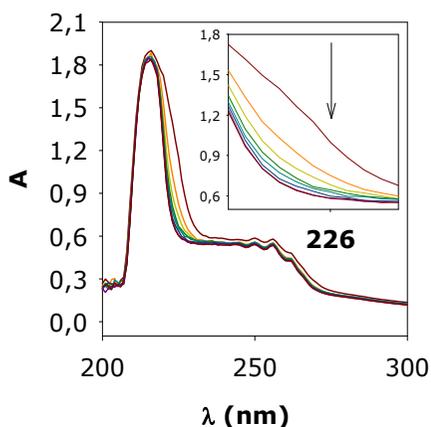


Figura 2.3.21. Espectro de absorción de SO en medio 7:3 agua:dioxano (v:v) a diferentes concentraciones; pH = 3,74 (HClO₄); [SO]_o = 1,4·10⁻³ M.

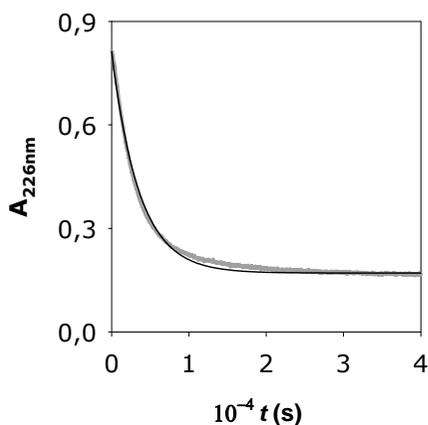


Figura 2.3.22. Hidrólisis del SO en medio 7:3. Valores experimentales (-) y ajuste (-); pH = 4,4 (HClO₄).

Se preparaban mezclas de reacción agua:dioxano 7:3 con pH constante (3,0 ml). A una cubeta que contenía 2,1 ml de disolución reguladora o ácida con HClO₄, –para mantener constante el pH– se añadían 0,9 ml de dioxano. Una vez termostatada la mezcla se añadía un pequeño volumen de disolución madre, 50-200 μ L (SO+dioxano; [SO]_o = 0,0854 M). El instante de adición del reactivo se tomaba como el tiempo inicial de reacción, $t = 0$.

2.3.3.1.2 Materiales

2.3.3.1.2.1 Reactivos generales

Los reactivos generales utilizados son los mismos que ya se han descrito en el estudio de los demás epóxidos (véase apartado 2.2.2.2.1, pág. 83).

2.3.3.1.2.2 Reactivos específicos

Óxido de *p*-bromoestireno (96%), óxido de *p*-cloroestireno (96%), óxido de estireno (99%), 4-(*p*-nitrobencil)piridina (98%) y trietilamina (99%) eran Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

2.3.3.1.2.3 Equipos de trabajo

Los equipos de trabajo utilizados ya han sido descritos previamente (veánse págs. 84 y siguientes).

2.3.3.2 Resultados y discusión

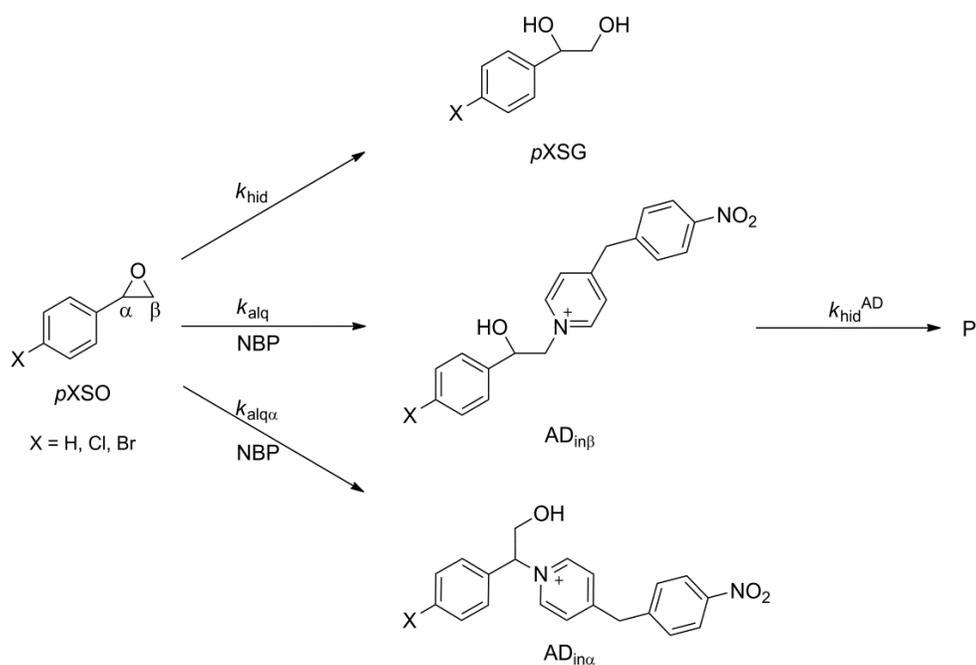
2.3.3.2.1 Mecanismo de reacción

Los epóxidos $pXSO$, pueden reaccionar con nucleófilos a través de ambos carbonos del anillo oxiránico, para formar los correspondientes aductos α y β (véase figura 2.3.3 pág. 120). Diferentes estudios con nucleófilos que modelan la reactividad con el ADN (piridina, bencilamina, guanósina y desoxiguanósina)^{80,81,220,270} e incluso con el propio ADN *in vitro*²⁵¹ han evidenciado la formación de ambos aductos en concentraciones significativas. La estabilidad de ambos aductos se espera que sea diferente. A pH 7,0 y 37,0 °C la vida media del aducto α (440 minutos) formado entre 7-alkil-3'-desoxiguanósina y SO es mayor que la del aducto β (275 minutos).³⁴⁹

Los perfiles cinéticos de la alquilación de NBP por $pXSO$ muestran que la absorbancia aumenta inicialmente para disminuir hasta un determinado valor a partir del cual permanece constante. La aparición de una meseta a un elevado tiempo de reacción se ha atribuido a la formación de un aducto ($AD_{in\alpha}$) que permanece estable durante el tiempo de estudio.

Sobre una base bibliográfica y por analogía con el mecanismo de la reacción de alquilación de NBP por $pNSO$, se ha propuesto el mecanismo que se muestra en el esquema 2.3.4 para la alquilación de NBP por $pXSO$ en medio acuorgánico.

Las reacciones implicadas en este mecanismo son: i) reacción de hidrólisis del $pXSO$ para formar el correspondiente estirenglicol, $pXSG$; ii) reacciones de alquilación de NBP por $pXSO$ en C_α y C_β , para formar los aductos $AD_{in\alpha}$ y $AD_{in\beta}$, respectivamente; y iii) reacción de hidrólisis del aducto β . Se admite que el aducto α , es estable a lo largo de la reacción.



Esquema 2.3.4. Mecanismo propuesto para la reacción de alquilación de NBP por $pXSO$ en medio acuorgánico.

2.3.3.2.1.1 Përfiles cinéticos y ecuaciones de velocidad

De acuerdo con el mecanismo propuesto, la ecuación diferencial de velocidad de desaparición del epóxido es:

$$\frac{-d[pXSO]}{dt} = [pXSO] \left((k_{alq\alpha} + k_{alq}) [NBP] + k_{hid} \right) \quad (2.3.13)$$

La constante de velocidad para la reacción de alquilación global de orden dos, k_{ALQ} , es suma de las constantes de alquilación en posición α , $k_{alq\alpha}$, y β , que designamos como k_{alq} para mantener la notación utilizada con los epóxidos estudiados previamente.

$$k_{ALQ} = k_{alq\alpha} + k_{alq} \quad (2.3.14)$$

Las ecuaciones de velocidad de formación de los aductos α y β son:

$$\frac{d[\text{AD}_\alpha]}{dt} = k_{\text{alq}\alpha} [\text{NBP}][p\text{XSO}] \quad (2.3.15)$$

$$\frac{d[\text{AD}_\beta]}{dt} = k_{\text{alq}} [\text{NBP}][p\text{XSO}] - k_{\text{hid}}^{\text{AD}} \quad (2.3.16)$$

Cuando se trabaja con exceso de NBP, se pueden definir las constantes de alquilación de pseudoprimer orden (k'_{ALQ}) como suma de las correspondientes a los ataques en los carbonos α ($k'_{\text{alq}\alpha}$) y β (k'_{alq}).

$$k'_{\text{ALQ}} = k_{\text{ALQ}} [\text{NBP}] \quad (2.3.17)$$

$$k'_{\text{ALQ}} = k'_{\text{alq}\alpha} + k'_{\text{alq}} \quad (2.3.18)$$

Las ecuaciones de velocidad integradas para la desaparición de $p\text{XSO}$ y formación de AD_α y AD_β son:

$$[p\text{XSO}] = [p\text{XSO}]_0 \left(e^{-\left(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.3.19)$$

$$[\text{AD}_\beta] = \frac{k'_{\text{alq}} [p\text{XSO}]_0}{\left(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}\right) - k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} \left(e^{-\left(k_{\text{hid}}^{\text{AD}}\right) t} - e^{-\left(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.3.20)$$

$$[\text{AD}_\alpha] = \frac{k'_{\text{alq}\alpha} [p\text{XSO}]_0}{k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}} \left(1 - e^{-\left(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}\right) t} \right) \quad (2.3.21)$$

Como el seguimiento de la formación de AD_β y AD_α , se hace en $\lambda = 560$ nm, donde absorben los dos aductos, la absorbancia a tiempo t (A_{AD}) es la suma de las contribuciones de los dos aductos β y α , $A_{\text{AD}\beta}$ (Ec. (2.3.23)) y $A_{\text{AD}\alpha}$ (Ec.(2.3.24)), respectivamente:

$$A_{\text{AD}} = A_{\text{AD}\beta} + A_{\text{AD}\alpha} \quad (2.3.22)$$

$$A_{AD\beta} = \frac{k'_{\text{alq}} [p\text{XSO}]_o \varepsilon l}{(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}) - k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} \left(e^{-k_{\text{hid}}^{\text{AD}} t} - e^{-(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}) t} \right) \quad (2.3.23)$$

$$A_{AD\alpha} = \frac{k'_{\text{alq}\alpha} \varepsilon_{\alpha} l [p\text{XSO}]_o}{k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}} \left(1 - e^{-(k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}) t} \right) \quad (2.3.24)$$

donde ε y ε_{α} son los respectivos coeficientes de absorción molar.

Los datos A_{AD}/t se pueden ajustar a una ecuación de la siguiente forma:

$$A_{AD} = \frac{a}{b-c} \left(e^{-ct} - e^{-bt} \right) + \frac{d}{b} \left(1 - e^{-bt} \right) \quad (2.3.25)$$

donde los cuatro parámetros se definen como sigue:

$$a = k'_{\text{alq}} [p\text{XSO}]_o \varepsilon l \quad (2.3.26)$$

$$b = k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}} \quad (2.3.27)$$

$$c = k_{\text{hid}}^{\text{AD}} \quad (2.3.28)$$

$$d = k'_{\text{alq}\alpha} \varepsilon_{\alpha} l [p\text{XSO}]_o \quad (2.3.29)$$

La figura 2.3.23 muestra los perfiles cinéticos experimentales obtenidos y los ajustes correspondientes (Ec. (2.3.25)) junto con los perfiles para cada uno de los aductos $A_{AD\alpha}/t$ y $A_{AD\beta}/t$ (calculados a partir de los parámetros del ajuste). El excelente ajuste de los valores experimentales A_{AD}/t a la ecuación (2.3.25) apoya el mecanismo propuesto.

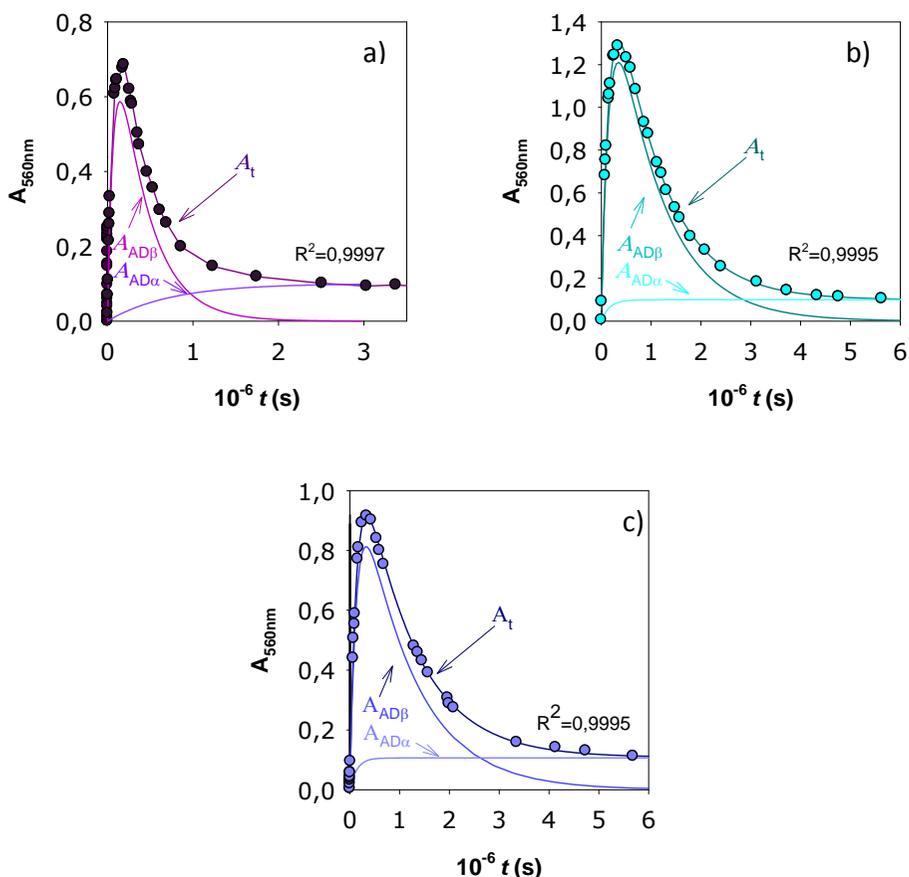


Figura 2.3.23. Perfiles cinéticos de formación de los aductos NBP-*p*XSO. Valores experimentales (●) y ajustes A_{AD}/t , $A_{AD\alpha}/t$ y $A_{AD\beta}/t$. $\lambda = 560$ nm; medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C; pH = 6,95; $[NBP]_0 = 1,99 \cdot 10^{-2}$ M. a) (●) $[SO]_0 = 7,69 \cdot 10^{-5}$ M; b) (●) $[pClSO]_0 = 6,99 \cdot 10^{-5}$ M; c) (●) $[pBrSO]_0 = 7,05 \cdot 10^{-5}$ M.

2.3.3.2.1.2 Órdenes de reacción

Los órdenes parciales de reacción respecto a la concentración de cada reactivo se han determinado a partir de los parámetros a y d del ajuste A_{AD}/t (Ecs.(2.3.26) y (2.3.29)). Se realizó una serie de experimentos variando las concentraciones de uno y otro reactivo. Los órdenes parciales respecto a las concentraciones de *p*XSO y NBP para la alquilación en β (m y n respectivamente) se han determinado a partir del parámetro a (Ec.(2.3.30)). Los órdenes de reacción p y q respecto de las concentraciones de *p*XSO y NBP para la reacción en C_α se obtuvieron con el parámetro d (Ec.(2.3.31)).

$$\log a = \log(k_{\text{alq}\alpha} \varepsilon l) + m \log[p\text{XSO}]_o + n \log[\text{NBP}] \quad (2.3.30)$$

$$\log d = \log(k_{\text{alq}\beta} \varepsilon l) + p \log[p\text{XSO}]_o + q \log[\text{NBP}] \quad (2.3.31)$$

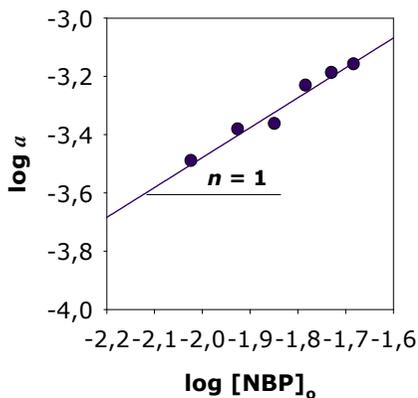


Figura 2.3.24. Orden respecto a la concentración de NBP para la alquilación en posición β , n . $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{SO}]_o = 8,12 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

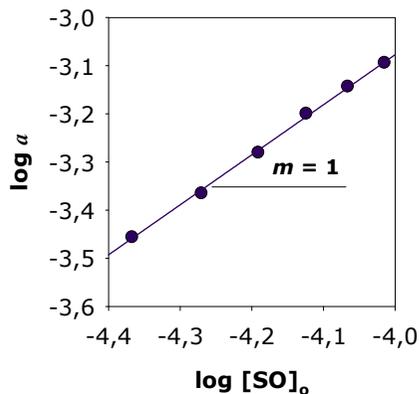


Figura 2.3.25. Orden respecto a la concentración de SO para la alquilación en posición β , m . $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{NBP}]_o = 2,00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

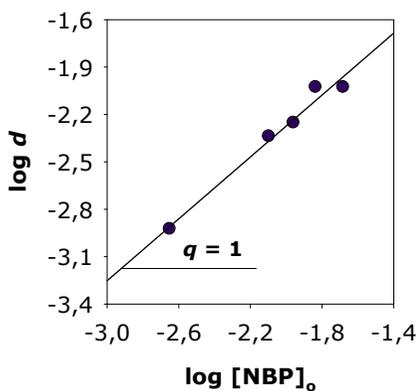


Figura 2.3.26. Orden respecto a la concentración de NBP para la alquilación en posición α , q . $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{SO}]_o = 7,69 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

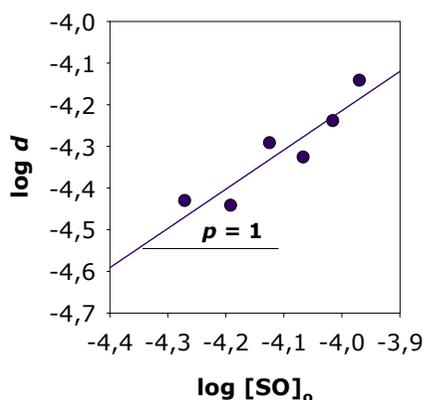


Figura 2.3.27. Orden respecto a la concentración de SO para la alquilación en posición α , p . $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{NBP}]_o = 1,98 \cdot 10^{-2} \text{ M}$.

A modo de ejemplo las figuras 2.3.24-2.3.27 muestran los órdenes obtenidos para el SO.

Con todos los *p*XSO se ha comprobado que el orden de reacción respecto a cada uno de los reactivos para la formación de los aductos α y β , es la unidad, en concordancia con mecanismos S_N2' para la formación del aducto α y S_N2 para la del aducto β .

2.3.3.2.1.3 Identificación de los aductos NBP-EP mediante espectrometría de masas

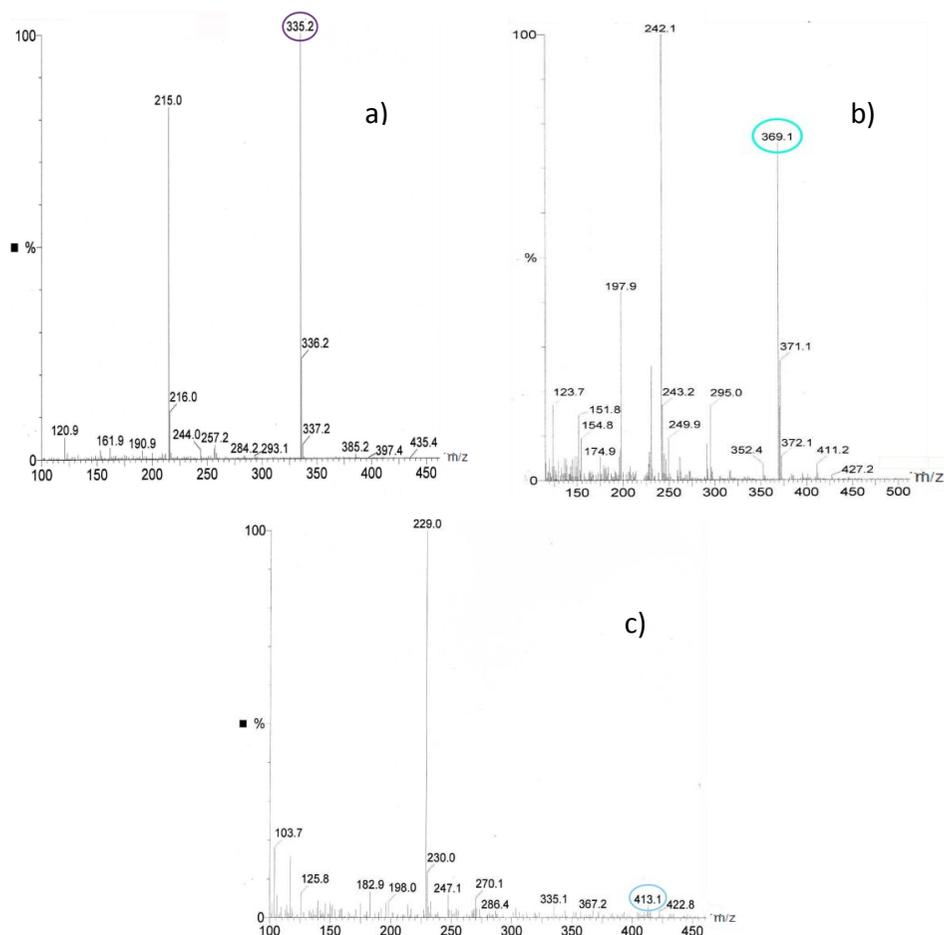


Figura 2.3.28. Espectros de masas en el modo positivo obtenidos para la reacción de alquilación. pH = 6,95; $T = 37,5$ °C; $[NBP]_0 = 1,99 \cdot 10^{-2}$ M. a) (●) $[SO]_0 = 7,69 \cdot 10^{-5}$ M; b) (●) $[pClSO]_0 = 6,99 \cdot 10^{-5}$ M; c) (●) $[pBrSO]_0 = 7,05 \cdot 10^{-5}$ M.

El estudio por espectrometría de masas, junto a las evidencias anteriores, confirma la formación de los aductos 1:1 NBP-EP. Se obtuvieron picos de los iones moleculares con m/z : 335,2 para NBP-SO, 369,1 para los aductos NBP-

p ClSO y 413,1 para NBP- p BrSO. No se observaron picos asignables a otro tipo de aductos en las condiciones de trabajo. Sin embargo, en condiciones equimolares p XSO:NBP sí que se obtuvieron picos asignables a los diaductos.

2.3.3.2.1.4 Seguimiento de la reacción mediante HPLC

Para una confirmación adicional del mecanismo propuesto, se programó el seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por SO mediante cromatografía HPLC con detector de red de diodos. Los cromatogramas muestran la formación de dos aductos con distintos tiempos de retención, $t_R = 8,5$ min y $t_R = 11,0$ min. En la figura 2.3.29 se observan los perfiles de reacción obtenidos del seguimiento de la evolución temporal de las áreas de los picos de ambos aductos.

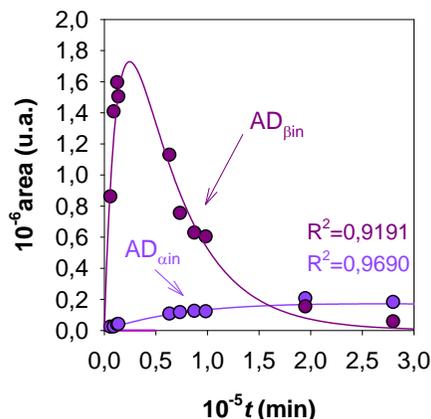


Figura 2.3.29. Perfiles cinéticos obtenidos al realizar el seguimiento de la variación temporal de las áreas de pico de los aductos NBP-SO: β ($t_R = 8,5$ min) y α ($t_R = 11,0$ min); valores experimentales (\bullet) y ajuste (-); $\lambda = 254$ nm. $T = 37,5$ °C; pH = 6,98.

El pico detectado a $t_R = 11,0$ min corresponde al aducto β (presenta el mismo tiempo de retención que el del aducto NBP- p NSO, véase pág. 143) y la evolución temporal de su área es propia de un aducto inestable. El aducto α se corresponde con el pico que aparece a $t_R = 8,5$ min. Su evolución temporal indica que es estable.

La concordancia de los resultados obtenidos mediante HPLC y mediante espectrofotometría UV-vis apoya el mecanismo propuesto.

2.3.3.2.2 Estudio cinético de las reacciones involucradas

2.3.3.2.2.1 Determinación del coeficiente de absorción molar de los aductos NBP-*p*XSO

Debido a la imposibilidad de: i) conocer los coeficientes de absorción molar de ambos aductos a partir de los parámetros resultantes del ajuste (el número de incógnitas supera el número de ecuaciones); y ii) de calcular los valores de las constantes de alquilación para las reacciones individuales sobre cada carbono del anillo oxiránico; se utilizaron las proporciones de aductos α/β , en términos de relación de constantes de alquilación ($k_{alq\alpha}/k_{alq}$) procedentes de la bibliografía.⁵³

Los resultados encontrados al estudiar la reacción del óxido de estireno con bencilamina en distintos medios, revelan que las velocidades de alquilación aumentan con la constante dieléctrica del medio,²²⁵ mientras que la relación $k_{alq\alpha}/k_{alq}$ se mantiene constante entre disolventes próticos. Esa constancia se pone de manifiesto al comparar las proporciones de aductos que se obtienen en las reacciones de óxidos de estireno *p*-sustituídos con distintos sustratos (guanosina,²⁵³ desoxiguanosina⁵³ y piridina⁸⁰) en disolventes próticos. En tales disolventes el puente de hidrógeno entre el grupo hidróxilo de la molécula de disolvente y el átomo de oxígeno del epóxido facilita la ruptura del enlace C-O del anillo oxiránico. Los cambios de disolvente pueden afectar a la magnitud de esta interacción y por tanto, a la velocidad de reacción, pero no a la proporción de aductos, que viene determinada por factores electrónicos y estéricos en el centro reactivo, que no son dependientes del disolvente.²²⁵ La relación $k_{alq\alpha}/k_{alq}$ encontrada por nosotros para la alquilación de NBP por *p*NSO (0:100) es significativamente análoga a la de la reacción con la desoxiguanosina en etanol (50% vol. a 37,0 °C) obtenida por extrapolación mediante la ecuación de Hammett a partir del trabajo de Sugiura *et al.* (2:98).⁵³ Se ha admitido que las proporciones α/β ($k_{alq\alpha}/k_{alq}$) en la reacción de alquilación de NBP por *p*XSO son las mismas que

en la alquilación de desoxiguanosina con SO, *p*BrSO y *p*ClSO en medio etanol:agua (50:50 v:v) (véase tabla 2.3.5 pág. 128),⁵³ 33:67, 15:85, 14:86 para SO, *p*BrSO y *p*ClSO, respectivamente (el valor con *p*ClSO se obtuvo por interpolación mediante la ecuación de Hammett).

Operando de esta forma, conocidas la constante de alquilación global, k_{ALQ} ($k_{ALQ} = k_{alq} + k_{alq\alpha}$) y las proporciones entre las constantes, x (k_{alq}/k_{ALQ}) e y ($k_{alq\alpha}/k_{ALQ}$), para la formación de los aductos β y α , respectivamente, se han obtenido los valores de k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ (Ecs. (2.3.32) y (2.3.33)).

$$k_{alq} = k_{ALQ} \cdot x \quad (2.3.32)$$

$$k_{alq\alpha} = k_{ALQ} \cdot y \quad (2.3.33)$$

Con k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ pueden estimarse los valores de los coeficientes de absorción molar de los dos aductos a partir de los parámetros a ($a = k_{alq} \varepsilon l [NBP]_o [pXSO]_o$) y d ($d = k_{alq\alpha} \varepsilon_\alpha l [NBP]_o [pXSO]_o$) del ajuste A_{AD}/t .

Para obtener k_{ALQ} basta representar el parámetro b del ajuste ($k_{ALQ}[NBP] + k_{hid}$) para distintas concentraciones de NBP (figura 2.3.30).

Los valores obtenidos para las constantes de alquilación global, k_{ALQ} , y las correspondientes al ataque sobre cada uno de los carbonos, k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ se recogen en la tabla 2.3.18. En ella se muestran también los coeficientes de absorción molar de los aductos AD_α y AD_β calculados con las siguientes ecuaciones:

$$\varepsilon = \frac{a}{k_{alq} l [pXSO]_o [NBP]_o} \quad (2.3.34)$$

$$\varepsilon_\alpha = \frac{d}{k_{alq\alpha} l [pXSO]_o [NBP]_o} \quad (2.3.35)$$

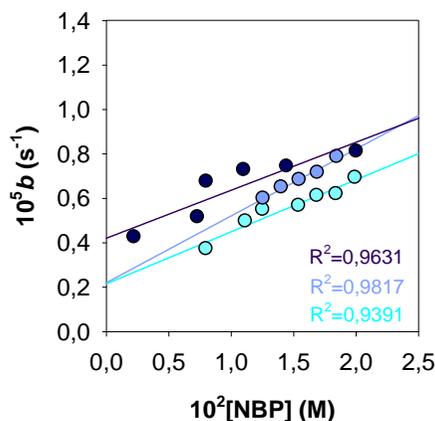


Figura 2.3.30. Obtención de la constante de alquilación global, k_{ALQ} , a partir del parámetro b del ajuste A_{AD}/t para SO (●), *p*ClSO (●) y *p*BrSO (●). pH = 6,95; $T = 37,5$ °C; medio 7:3 agua:dioxano.

Tabla 2.3.18. Constantes de alquilación global y de los ataques en posiciones α y β . Coeficientes de absorción molar de AD_α y AD_β .

<i>p</i> XSO	$10^4 k_{ALQ}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^4 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^4 k_{alq\alpha}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^{-3} \epsilon$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	$10^{-3} \epsilon_\alpha$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
SO	3,1 ± 0,4	2,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	40 ± 8	8 ± 1
<i>p</i> ClSO	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	0,35 ± 0,03	41 ± 4	11 ± 1
<i>p</i> BrSO	3,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2	0,42 ± 0,03	21 ± 2	18 ± 1

$T = 37,5$ °C; pH = 6,95; medio de reacción 7:3 agua:dioxano; $l = 1$ cm.

2.3.3.2.2.2 Estudio de la reacción de alquilación de NBP

Conocidos los valores de los coeficientes de absorción molar, se pueden calcular fácilmente los de k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ para cualquier experimento cinético a partir de los parámetros a y d del ajuste, respectivamente.

$$k_{alq} = \frac{a}{\epsilon l [pXSO]_o [NBP]_o} \quad (2.3.36)$$

$$k_{alq\alpha} = \frac{d}{\epsilon_\alpha l [pXSO]_o [NBP]_o} \quad (2.3.37)$$

Por otro lado, el valor de k_{alq} puede conocerse mediante las velocidades iniciales.

$$v_o = \lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta[\text{AD}]_\alpha + \Delta[\text{AD}]_\beta}{\Delta t} = k_{\text{ALQ}} [\text{NBP}]_o [\text{pXSO}]_o \quad (2.3.38)$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta A_{\text{AD}}}{\Delta t} = (k_{\text{alq}} \varepsilon + k_{\text{alq}\alpha} \varepsilon_\alpha) l [\text{NBP}]_o [\text{pXSO}]_o \quad (2.3.39)$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} \frac{\Delta A_{\text{AD}}}{\Delta t} = a + d \quad (2.3.40)$$

Al comparar las aportaciones de los parámetros a y d del ajuste a la variación inicial de la absorbancia, se ha comprobado que, para pXSO , la aportación del aducto β a la absorbancia inicial es mucho mayor que la del aducto α . Al calcular k_{alq} con el método de velocidades iniciales, considerando despreciable la aportación del aducto α , el valor de k_{alq} obtenido difiere del obtenido a partir del parámetro a como máximo un 10 %. Por esta razón, cuando la lentitud de las reacciones exija un largo tiempo de seguimiento o no exista método alternativo para calcular k_{alq} se utilizará el método de velocidades iniciales en lugar del parámetro a del ajuste A_{AD}/t (Ecs.(2.3.25) y (2.3.26)).

a) Influencia del pH en la reacción de alquilación

Se ha investigado el papel del pH en la reacción de alquilación de NBP por pXSO en las posiciones β y α (tabla 2.3.19).

Puede admitirse que el valor de la constante de velocidad k_{alq} no se ve afectado por la acidez del medio, como se ha observado en el estudio de los epóxidos investigados anteriormente. Sin embargo, $k_{\text{alq}\alpha}$ aumenta con la acidez del medio, ya que el aumento de la concentración de protones favorece la formación del estado de transición de la reacción $\text{S}_{\text{N}}2'$. En medio neutro para SO , k_{alq} duplica a $k_{\text{alq}\alpha}$ (con ADN *in vitro* la proporción $k_{\text{alq}}/k_{\text{alq}\alpha}$ es 1,4).²⁶²

Tabla 2.3.19. Influencia del pH sobre las constantes de alquilación k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ para la alquilación de NBP por p XSO.

pH	37,5 °C						25,0 °C		
	$10^4 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)			$10^5 k_{alq\alpha}$ ($M^{-1}s^{-1}$)			$10^5 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^5 k_{alq\alpha}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	SO	
5,00	-	2,4	3,0	-	-	-	-	-	
5,12	1,9	-	2,9	-	-	-	-	-	
5,24	2,0	2,5	2,8	-	-	19,8	7,2	-	
5,77	1,9	-	-	-	-	-	7,1	4,0	
5,96	2,1	2,1	2,4	-	7,4	4,6	-	-	
6,57	-	-	-	-	-	-	7,1	2,0	
6,95	2,1	2,0	2,6	10	3,5	4,2	7,0	1,8	

Medio de reacción 7:3 aguadioxano.

b) Influencia de la temperatura

Los valores obtenidos para las constantes de alquilación a diferentes temperaturas y pH neutro se recogen en la tabla 2.3.20. Para la reacción de formación del aducto β son válidos en todo el intervalo de pH objeto de estudio.

Tabla 2.3.20. Influencia de la temperatura sobre las constantes de alquilación k_{alq} y $k_{alq\alpha}$ para la alquilación de NBP por p XSO.

T (°C)	$10^4 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)			$10^5 k_{alq\alpha}$ ($M^{-1}s^{-1}$)			Proporción (%) $k_{alq}/k_{alq\alpha}$		
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
25,0	0,70	0,7 ^a	1,0 ^a	2,0	-	0,8 ^a	78:22	-	92:8
27,5	0,91	0,9 ^a	1,2 ^a	2,9	-	1,1 ^a	76:24	-	92:8
30,0	1,1	1,1	1,5	4,8	-	1,3	69:31	-	92:8
32,5	1,3	1,3	1,9	4,1	-	2,5*	76:24	-	88:12
35,0	1,5	1,6	2,2	7,1	-	1,9	68:32	-	92:8
37,5	2,1	2,0	2,6	10	3,5	4,2	67:33	85:15	86:14
40,0	2,4 ^a	2,3	3,2	13	4,1	4,0	65:35	85:15	89:11
42,5	2,9 ^a	2,8	3,8	17	6,4	5,1	63:37	81:19	88:12
45,0	3,6 ^a	3,0	4,7	23 _a	13	5,4	61:39	70:30	90:10

*Medio de reacción 7:3 aguadioxano; pH = 6,95; *Valor excluido para determinar los parámetros de activación.*

a) Valores extrapolados.

Los parámetros de activación (tabla 2.3.21) son coherentes con la proporción de constantes $k_{alq}/k_{alq\alpha}$ obtenida (tabla 2.3.20).

Tabla 2.3.21. Parámetros de activación para la alquilación de NBP por *p*XSO a través de los carbonos α y β .

Parámetros de activación	β			α		
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
$E_{a\text{ alq}}$ (kJ·mol ⁻¹)	64 ± 4	58 ± 3	60 ± 1	95 ± 12	-	80 ± 14
$\Delta G^{\#}_{\text{alq}}$ (25,0°C) (kJ·mol ⁻¹)	96 ± 8	97 ± 4	95 ± 2	99 ± 19	-	102 ± 38

Medio 7:3 agua:dioxano.

Los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la temperatura y la composición del medio en la reacción de alquilación de NBP por SO (Apéndice 2) sugieren que el mecanismo de reacción para la alquilación en β es independiente del medio de reacción.

2.3.3.2.2.3 Estudio de la reacción de hidrólisis de *p*XSO

Las reacciones de hidrólisis de *p*XSO dan lugar a la formación de los correspondientes glicoles.²³⁸ La hidrólisis de los epóxidos aromáticos, como la de cualquier epóxido, además de la reacción no catalizada, puede presentar catálisis ácida y básica (véase Ec.(2.1.20) pág. 56).

El valor de k_{hid} se obtiene de forma indirecta con el parámetro b del ajuste A_{AD}/t y el valor de la pseudoconstante de alquilación global, k'_{ALQ} :

$$k_{\text{hid}} = b - k'_{\text{ALQ}} \quad (2.3.41)$$

a) Influencia del pH

La figura 2.3.31 muestra la influencia de la acidez del medio sobre k_{hid} . En el intervalo de trabajo además de la reacción de hidrólisis en medio neutro interviene la de catálisis ácida. Las constantes de velocidad para ambas reacciones se recogen en la tabla 2.3.22.

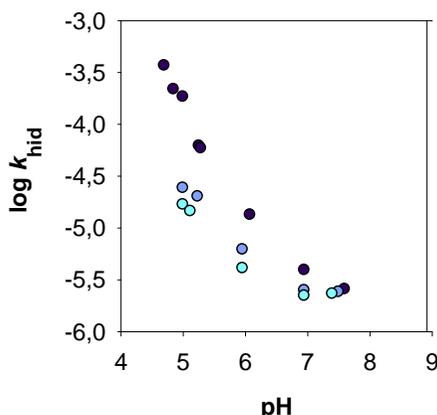


Figura 2.3.31. Variación de k_{hid} de *p*XSO con el pH del medio. Valores obtenidos para SO (●), *p*ClISO (●) y *p*BrSO (●); $T = 25,0$ °C.

La tendencia de nuestros resultados, obtenidos de forma indirecta a partir del estudio de alquilación de NBP por *p*XSO en un medio acuorgánico es acorde, cualitativamente, con los obtenidos por Blumenstein *et al.* en el estudio directo de la reacción de hidrólisis de *p*XSO a 25,0 °C en medio acuoso.²³⁸ En ambos estudios tanto k_{hid}° como k_{H^+} disminuyen con la presencia de grupos atractores de electrones: $\text{SO} > \text{pClISO} > \text{pBrSO} > \text{pNSO}$.

Tabla 2.3.22. Constantes de velocidad de hidrólisis de *p*XSO en medios neutro y ácido.

<i>p</i> XSO	k_{H^+} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$10^6 k_{\text{hid}}^{\circ}$ (s^{-1})
SO	18 ± 1	2,5 ± 0,8
<i>p</i> ClISO	3,1 ± 0,2	2,2 ± 0,5
<i>p</i> BrSO	1,63 ± 0,03	2,1 ± 0,1
<i>p</i> NSO	0,005 ± 0,002	1,0 ± 0,1

Medio de reacción 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C.

Para verificar la adecuación del método indirecto utilizado para calcular la constante de velocidad de hidrólisis obtenida a partir del parámetro b del ajuste A_{AD}/t ; e investigar el grado de acuerdo, a nivel cuantitativo, de nuestros resultados con los de Blumenstein *et al.*, se estudió la hidrólisis de SO A 25,0 °C en medio acuorgánico 7:3 agua:dioxano tanto de forma directa (seguimiento de la reacción

de hidrólisis por espectrofotometría) como indirectamente a partir del estudio de la alquilación. Los valores de k_{hid} obtenidos por ambas vías presentan una buena concordancia (figura 2.3.32).

A 25,0 °C y en medio 7:3 agua:dioxano el factor catalítico y la constante de velocidad de hidrólisis espontánea son $k_{\text{H}^+} = (6,5 \pm 0,5) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{hid}}^{\circ} = (1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Teniendo en cuenta que a medida que aumenta el porcentaje de agua en el medio de reacción, lo hace la constante dieléctrica y con ella la constante de velocidad, los valores obtenidos en este trabajo son acordes con los de Blumenstein *et al.* en medio acuoso (a $T = 25,0 \text{ °C}$ $k_{\text{H}^+} = (26,6 \pm 0,9) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{hid}}^{\circ} = (4,18 \pm 0,18) \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$).

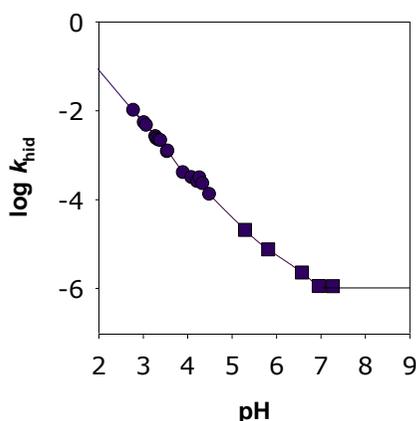


Figura 2.3.32. Variación de k_{hid} de SO con el pH del medio. Valores obtenidos (●) de forma directa e (■) indirecta. $T = 25,0 \text{ °C}$.

b) Influencia de la temperatura

En la tabla 2.3.23 se muestran los valores de la constante de hidrólisis obtenidos de forma indirecta.

Tabla 2.3.23. Influencia de la temperatura sobre las constantes de hidrólisis de *p*XSO.

T (°C)	$10^6 k_{\text{hid}}^{\circ}$ (s ⁻¹)		
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
25,0	1,0	-	-
27,5	0,8*	-	-
30,0	0,8*	1,1	0,5
32,5	0,8*	1,2	1,2
35,0	2,8	1,7	0,9
37,5	4,2	2,2	2,2
40,0	-	4,6*	2,0
42,5	-	3,3	2,5
45,0	-	4,3	1,9

Medio 7:3 agua:dioxano; pH neutro;

*Valor excluido para determinar los parámetros de activación.

La tabla 2.3.24 muestra los valores obtenidos para los parámetros de activación. Se observa que las reacciones de alquilación están más favorecidas que las de hidrólisis.

Tabla 2.3.24. Parámetros de activación de la reacción de hidrólisis de *p*XSO.

Parámetros de activación	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
E_a^{hid} (kJ·mol ⁻¹)	85 ± 8	75 ± 3	99 ± 23
$\Delta G^{\#}_{\text{hid}}(25,0^{\circ}\text{C})$ (kJ·mol ⁻¹)	116 ± 15	117 ± 6	-

Medio 7:3 agua:dioxano; pH neutro.

2.3.3.2.2.4 Estudio de la reacción de hidrólisis del aducto β -*p*XSO-NBP

La constante de hidrólisis del aducto se obtiene directamente con el ajuste A_{AD}/t ($c = k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$).

a) Influencia del pH

La reacción de hidrólisis del aducto β experimenta catálisis básica. La tabla 2.3.25 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 2.3.25. Influencia del pH en la hidrólisis de los aductos β -NBP-*p*XSO.

pH	37,5 °C			25,0 °C
	$10^6 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s ⁻¹)			$10^6 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s ⁻¹)
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO
5,00	n.d.	0,2	0,25	n.d
5,12	n.d.	-	0,24	n.d
5,24	n.d.	-	-	n.d
5,77	-	-	-	0,08
5,96	-	0,7	0,86	-
6,57	-	-	-	0,26
6,95	3,1	2,1	0,55	0,56
7,95	-	-	-	0,96
8,74	-	10,4	21,1	8,88

Medio 7:3 agua:dioxano; n.d: no detectado.

b) Influencia de la temperatura

En la tabla 2.3.26 se recogen los valores de la constante de hidrólisis del aducto β en el intervalo de temperaturas 25,0-45,0 °C.

Tabla 2.3.26. Influencia de la temperatura en la hidrólisis de los aductos β -NBP-*p*XSO.

<i>T</i> (°C)	$10^6 k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ (s ⁻¹)		
	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
25,0	0,48	-	-
27,5	0,62	-	-
30,0	1,1	0,3	0,33
32,5	1,5	0,5	0,60
35,0	1,9	0,5	0,76
37,5	3,1	2,1	0,55
40,0	-	2,1	1,20
42,5	-	2,0	1,42
45,0	-	1,4	1,90

Medio de reacción 7:3 agua:dioxano;

La estabilidad de los aductos a pH neutro sigue la siguiente tendencia $\text{SO} < \text{pClSO} < \text{pBrSO}$. La presencia de grupos atractores de electrones estabiliza el aducto β formado.

2.3.3.2.3 Parámetros cinéticos para caracterizar la reactividad

Objeto de este estudio ha sido conocer la eficacia y la eficiencia de los óxidos de estireno *p*-sustituídos como agentes alquilantes. La eficacia de estos compuestos se define a través de tres parámetros de alquilación:

f_α , fracción inicial del agente alquilante que da lugar a la formación de aducto α .

$$f_\alpha = \frac{k'_{\text{alq}\alpha}}{k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}} = \frac{d}{\varepsilon_\alpha l [p\text{XSO}]_0 b} \quad (2.3.42)$$

f , fracción inicial del agente alquilante que da lugar a la formación de aducto β .

$$f = \frac{k'_{\text{alq}}}{k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}} = \frac{a}{\varepsilon l [p\text{XSO}]_0 b} \quad (2.3.43)$$

f_{total} , fracción del agente alquilante inicial que da lugar a la formación de aducto, independientemente de que éste sea α o β . Se define como suma de las anteriores.

$$f_{\text{total}} = \frac{k'_{\text{ALQ}}}{k'_{\text{ALQ}} + k_{\text{hid}}} = f_\alpha + f \quad (2.3.44)$$

Estos parámetros son muy útiles para establecer correlaciones mutagenia/reactividad cuando los aductos formados son estables. Cuando son inestables se utiliza también la eficiencia de alquilación o vida del aducto, AL. En este caso –para los *p*XSO– como se ha comprobado que el aducto α es estable durante el curso de la reacción, sólo tiene sentido definir la vida o eficiencia correspondiente al aducto β .

$$AL = \frac{\int_0^{\infty} [AD] dt}{[pXSO]_0} = \frac{k'_{alq}}{k'_{ALQ} + k_{hid} - k_{hid}^{AD}} \int_0^{\infty} \left(e^{-(k'_{ALQ} + k_{hid})t} - e^{-k_{hid}^{AD}t} \right) dt = \frac{k'_{alk}}{(k'_{ALQ} + k_{hid})k_{hid}^{AD}} = \frac{f}{k_{hid}^{AD}} \quad (2.3.45)$$

El parámetro AL hace referencia a la durabilidad o permanencia del aducto en el tiempo: cuanto mayor sea el valor de AL, mayor será la acumulación de los aductos y, por tanto, mayores efectos biológicos.

a) Influencia del pH en los parámetros químicos

Los valores obtenidos para las fracciones alquiladas, y para la vida del aducto β en dos medios de diferente acidez se recogen en la tabla 2.3.27.

Tabla 2.3.27. Dependencia de los parámetros químicos con el pH. Quimioselectividad, constante de Swain-Scott, capacidad alquilante y efectividad.

	pH	β			α		
		SO	pClSO	pBrSO	SO	pClSO	pBrSO
$S_{NBP} / \log S_{NBP}$	5,96	-	1330 / 3,1	2311 / 3,4	-	465 / 2,7	442 / 2,6
	6,95	1945 / 3,3	3595 / 3,6	4561 / 3,7	954 / 3,0	635 / 2,8	742 / 2,9
s	5,96	-	0,89	0,96	-	0,76	0,76
	6,95	0,94	1,01	1,05	0,85	0,80	0,82
f	5,96	-	0,36	0,49	-	0,12	0,094
	6,95	0,40	0,58	0,62	0,20	0,10	0,10
$10^{-4}AL$ (min)	5,96	-	0,82	0,95	-	-	-
	6,95	0,22	0,45	1,9	-	-	-

Medio agua:dioxano 7:3. T = 37,5 °C.

La figura 2.3.33 muestra los resultados obtenidos con el SO en cuatro medios de reacción. Se observa pues, que los resultados obtenidos permiten concluir que f aumenta con la basicidad del medio (k_{hid} disminuye y el pH no influye en la constante de alquilación en C_{β}). Por el contrario, f_{α} no muestra una tendencia clara con la variación del pH (k_{alq} y k_{hid} aumentan con la acidez del medio). El aumento de f_{total} con el pH, revela la mayor contribución de f_{β} a la fracción alquilada total.

Los resultados recogidos en la tabla 2.3.27 muestran que a pH neutro (6,95) más del 60% del *p*XSO inicial participa en la formación de aductos (10-20% en el aducto α y 40-60% en el β), mientras que menos del 40% se hidroliza. El SO es el *p*XSO que forma mayor proporción de aducto α mientras que el *p*BrSO genera mayor proporción del β .

Por otro lado, debido a la catálisis básica que presenta $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$, la vida de los aductos β -NBP-*p*XSO aumenta con la acidez del medio. Los aductos β formados son más estables, presentan una mayor acumulación temporal a pH ácido que en medio neutro. Sin embargo, las selectividades S_{NBP} y s , muestran comportamiento contrario, con el aumento del pH lo hace también la selectividad, es decir, se ve favorecida la reacción de alquilación de NBP frente a la de hidrólisis. Los valores de la quimioselectividad y de la constante de Swain-Scott son coherentes con los mecanismos por los que se producen las reacciones de alquilación. El valor de s para el ataque en C_{α} es inferior que en C_{β} , siendo similar para SO, *p*ClSO y *p*BrSO. La primera observación indica que la reacción en C_{α} tiene menor carácter $S_{\text{N}2}$, lo que es coherente con el mecanismo $S_{\text{N}2}'$. El segundo hecho refleja que, para las reacciones que transcurren por un mecanismo $S_{\text{N}2}'$, la selectividad es poco sensible a la sustitución del anillo.

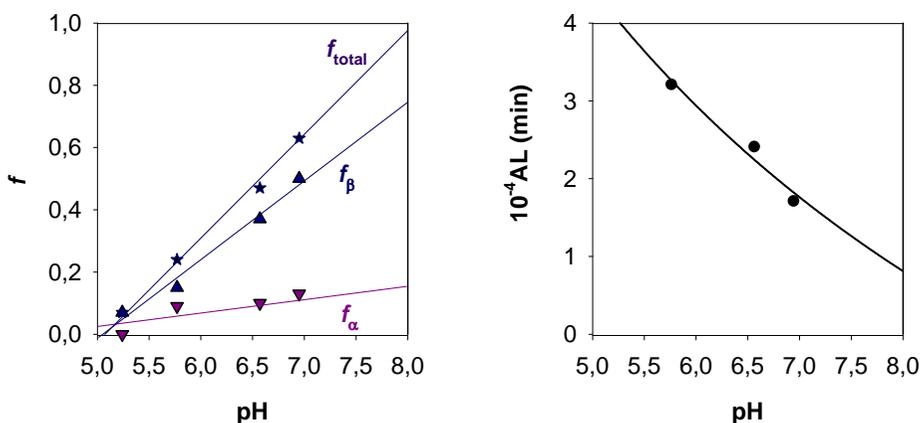


Figura 2.3.33. Influencia del pH sobre: a) las fracciones de alquilación, f (\blacktriangle), f_{α} (\blacktriangledown) y f_{total} (*) para SO y b) sobre la vida del aducto β -NBP-SO (\bullet); $T = 25,0$ °C.

b) Influencia de la temperatura en los parámetros químicos

La tabla 2.3.28 muestra los valores de los parámetros químicos en el intervalo $T = 25,0\text{--}45,0$ °C. No se han observado tendencias claras con las constantes de sustrato de Swain-Scott, la selectividad o la fracción alquilada presentan pequeñas variaciones, pero sin seguir una tendencia. Por el contrario, se ha comprobado que la vida de los aductos β disminuye notablemente con el aumento de la temperatura. Este hecho refleja el acentuado efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad de hidrólisis de los aductos β -NBP-*p*XSO, que aumenta sustancialmente con la temperatura. Los valores estimados para la constante de velocidad $k_{n=2}$ a partir de s aumentan con la temperatura, como era de esperar.

Tabla 2.3.28. Variación de los parámetros químicos con la temperatura.

	T	β			α		
	(°C)	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO	SO	<i>p</i> ClSO	<i>p</i> BrSO
$S_{NBP} / \log S_{NBP}$	25,0	2684 / 3,4	-	-	764 / 2,9	-	-
	27,5	4339 / 3,6	-	-	1359 / 3,1	-	-
	30,0	4988 / 3,7	3864 / 3,6	12456 / 4,1	2236 / 3,3	-	1096 / 3,0
	32,5	6412 / 3,8	4043 / 3,6	6255 / 3,8	2005 / 3,3	-	832 / 2,9
	35,0	2095 / 3,3	3669 / 3,6	9449 / 4,0	975 / 3,0	-	830 / 2,9
	37,5	1945 / 3,3	3117 / 3,5	4154 / 3,6	954 / 3,0	381 / 2,6	596 / 2,8
	40,0	-	1973 / 3,3	6156 / 3,8	-	345 / 2,5	778 / 2,9
	42,5	-	3235 / 3,5	5974 / 3,8	-	748 / 2,9	793 / 2,9
	45,0	-	2773 / 3,4	9645 / 4,0	-	1178 / 3,1	1095 / 3,0
s	25,0	0,98	-	-	0,82	-	-
	27,5	1,04	-	-	0,90	-	-
	30,0	1,06	1,02	1,17	0,96	-	0,87
	32,5	1,09	1,03	1,08	0,94	-	0,83
	35,0	0,95	1,02	1,14	0,85	-	0,83
	37,5	0,94	1,00	1,03	0,85	0,74	0,79
	40,0	-	-	1,08	-	-	0,83
	42,5	-	1,00	1,08	-	0,82	0,83
	45,0	-	0,98	1,14	-	0,88	0,87
f	25,0	0,50	-	-	0,14	-	-
	27,5	0,57	-	-	0,18	-	-
	30,0	0,54	0,45	0,80	0,24	0,32	0,07
	32,5	0,62	0,48	0,69	0,19	0,29	0,09
	35,0	0,42	0,52	0,77	0,19	0,20	0,07
	37,5	0,40	0,57	0,62	0,20	0,07	0,09
	40,0	-	0,46	0,69	-	-	0,09
	42,5	-	0,55	0,69	-	0,13	0,09
	45,0	-	0,47	0,76	-	0,20	0,09
$10^{-4}AL$ (min)	25,0	1,7	-	-	estable	-	-
	27,5	1,5	-	-	estable	-	-
	30,0	0,84	2,7	4,1	estable	estable	estable
	32,5	0,68	1,5	1,9	estable	estable	estable
	35,0	0,36	1,7	1,7	estable	estable	estable
	37,5	0,22	0,45	1,9	estable	estable	estable
	40,0	-	-	1,0	-	-	estable
	42,5	-	-	0,8	-	-	estable
	45,0	-	-	0,7	-	-	estable
$k_{n=2}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	25,0	2,4	-	-	1,2	-	-
	27,5	2,5	-	-	1,3	-	-
	30,0	2,8	3,2	0,53	1,8	2,6	0,66
	32,5	3,1	3,6	4,4	1,6	2,7	1,4
	35,0	5,7	4,9	4,4	3,7	2,8	1,1
	37,5	8,2	5,9	7,0	5,4	2,2	2,5
	40,0	-	9,1	7,5	-	3,4	2,3
	42,5	-	8,7	9,2	-	3,8	2,9
	45,0	-	10,2	9,2	-	6,2	2,7

Medio de reacción agua:dioxano 7:3. pH = 6,96

2.3.3.3 Conclusiones

El estudio cinético de la alquilación de 4-(*p*-nitrobencilpiridina), NBP, por el óxido de estireno (SO) y los óxidos de estireno *p*-cloro y *p*-bromo sustituidos (*p*ClSO y *p*BrSO) ha conducido a las siguientes conclusiones:

1. Las especies químicas *p*ClSO, *p*BrSO y SO, designadas genéricamente *p*XSO, muestran actividad alquilante sobre la NBP, molécula de nucleofilia análoga a la posición N7 de la guanosina. La reacción de alquilación se produce en los dos carbonos del anillo oxiránico, (C_α y C_β, más y menos impedido, respectivamente), dando lugar a dos aductos: el aducto α-NBP-*p*XSO, por reacción de NBP con C_α, a través de un mecanismo S_N2' y estable durante el tiempo de reacción; y el aducto β-NBP-*p*XSO, formado por reacción de la NBP con C_β que es inestable y se hidroliza.
2. El estudio cinético ha revelado que, para investigar la capacidad alquilante de un compuesto en términos cuantitativos, es necesario tener en cuenta cuatro reacciones: i) la reacción de formación del aducto α-NBP-*p*XSO; ii) la formación del aducto β-NBP-*p*XSO; iii) la reacción de hidrólisis de este último; y iv) la reacción de hidrólisis de *p*XSO.
3. La constante de velocidad de formación de los aductos β-NBP-*p*XSO es independiente del pH mientras que la de formación de los aductos α-NBP-*p*XSO aumenta en medios ácidos.
4. La proporción de aductos β frente a la de α aumenta al disminuir la temperatura.
5. La reacción de hidrólisis de *p*XSO experimenta catálisis ácida. Tanto el factor catalítico como la constante de velocidad en medio neutro disminuyen con la presencia de grupos atractores de electrones: SO > *p*ClSO > *p*BrSO > *p*NSO.
6. En medio neutro, la hidrólisis de los epóxidos aromáticos *para* sustituidos transcurre más lentamente que la reacción de alquilación.

7. La reacción de hidrólisis del aducto β muestra catálisis alcalina. Los grupos atrectores de electrones ralentizan la reacción.
8. Todos los p XSO estudiados son agentes alquilantes potentes. En pH neutro más del 60% del p XSO inicial da lugar a la formación de aductos (10-20% en la del aducto α y 40-60% en la del β), hidrolizándose menos del 40 %.
9. La estabilidad de los aductos β -NBP- p XSO disminuye notablemente con el aumento de la temperatura.

2.3.4 Estudio comparativo de la reactividad química y biológica de los epóxidos aromáticos

2.3.4.1 Reactividad química

Los valores obtenidos en nuestro trabajo para los parámetros cinéticos y químicos se recogen en la tabla 2.3.29.

Tabla 2.3.29. Parámetros más relevantes del estudio de la reacción de alquilación de NBP por óxidos de estireno.

	<i>pXSO</i>			
	SO	<i>pClSO</i>	<i>pBrSO</i>	<i>pNSO</i>
$10^4 k_{alq} (M^{-1}s^{-1})$	2,1	2,0	2,6	2,42
$10^4 k_{alqa} (M^{-1}s^{-1})$	1,0	0,35	0,42	-
$10^6 k_{hid} (s^{-1})$	4,2	2,15	2,2	1,0
$10^6 k_{hid}^o (s^{-1})$	2,55	2,2	2,1	1,0
$k_{H^+} (s^{-1})$	18,2	3,1	1,63	0,005
$10^7 k_{hid}^{AD} (s^{-1})$	3,1	2,1	0,55	1,02
$10^6 k_{n=2} (M^{-1}s^{-1})$	0,82	0,59	0,70	0,40
$10^6 k_{n=2a} (M^{-1}s^{-1})$	0,54	0,22	0,25	-
$S_{NBP} / \log S_{NBP}$	1945 / 3,29	3595 / 3,56	4561 / 3,66	15363 / 4,19
$S_{NBPa} / \log S_{NBPa}$	954 / 2,98	635 / 2,80	742 / 2,87	-
<i>s</i>	0,94	1,01	1,05	1,20
<i>s_a</i>	0,85	0,8	0,82	-
<i>f_β</i>	0,40	0,58	0,63	0,87
<i>f_a</i>	0,20	0,10	0,10	-
<i>f_{total}</i>	0,60	0,68	0,73	0,87
$10^{-4} AL$ (min)	0,22	0,45	1,9	1,46

Medio agua:dioxano 7:3; pH = 7; T = 37,5 °C.

2.3.4.1.1 Constantes de velocidad. Correlaciones de Hammett

Se ha utilizado la ecuación de Hammett para investigar la influencia de los sustituyentes. A continuación se muestran las correlaciones obtenidas para las

reacciones de alquilación de la NBP, de hidrólisis de los óxidos de estireno estudiados y de hidrólisis del aducto.²⁷⁰

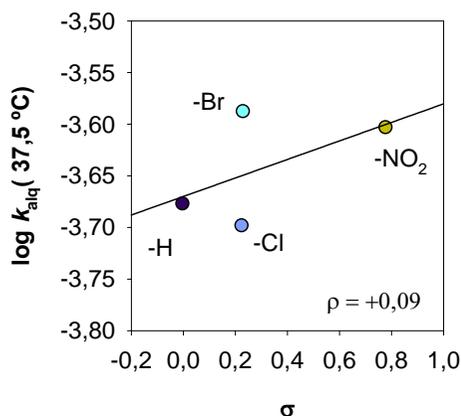


Figura 2.3.34. Correlación de Hammett de $\log k_{\text{alq}}$ frente a σ .

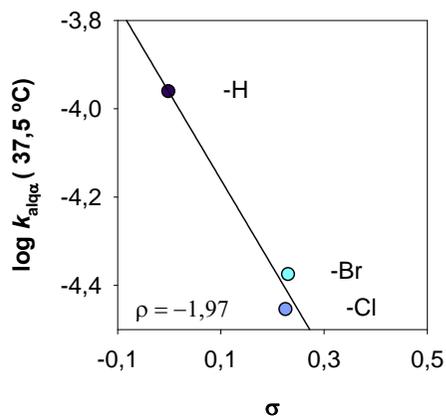


Figura 2.3.35. Correlación de Hammett de $\log k_{\text{alq}\alpha}$ frente a σ .

A pesar de su mala calidad, las correlaciones muestran que la constante de velocidad de alquilación, k_{alq} , correspondiente al ataque en C_{β} , aumenta con la presencia de grupos atractores de electrones en posición *para* del anillo bencénico ($\rho = +0,09$). Comportamiento análogo se ha descrito en la bibliografía para reacciones de diferentes sustratos con varias series de óxidos de estireno, incluida la desoxiguanosina.^{53,80,81,105,220,238,270} Rosman *et al.* encuentran el mismo comportamiento con una serie de epóxidos derivados del óxido de α -metilestireno, que reaccionan exclusivamente en C_{β} .¹⁰⁵

Al estudiar la variación de la velocidad de alquilación en C_{α} , el comportamiento observado es el opuesto, $k_{\text{alq}\alpha}$ disminuye con los grupos atractores de electrones ($\rho = -1,97$), como también ha sido observado por otros autores.^{53,220,270}

La comparación del valor absoluto de ρ obtenido para ambas reacciones, mayor para la reacción de alquilación de NBP a través de C_{α} , muestra que ésta es la que se ve más afectada por la presencia de sustituyentes.

Sobre la reacción de hidrólisis de los epóxidos también se han investigado correlaciones de Hammett, tanto para la constante de velocidad de la reacción de hidrólisis en medio neutro como para la catalizada por ácido.

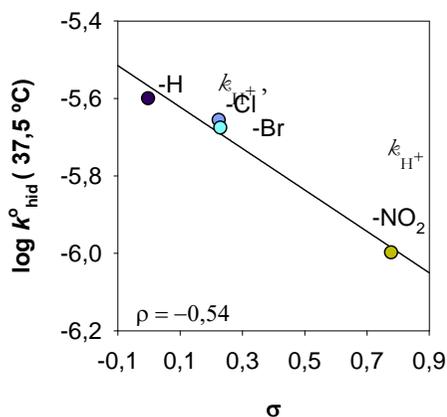


Figura 2.3.36. Correlación de Hammett de $\log k^o_{\text{hid}}$ frente a σ .

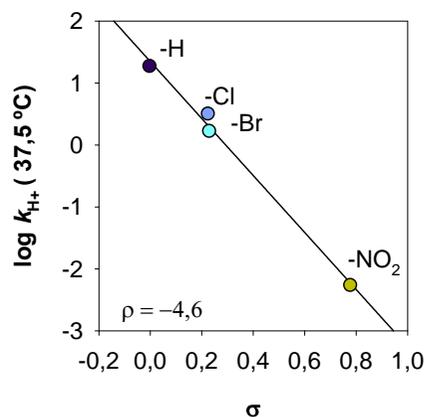


Figura 2.3.37. Correlación de Hammett de $\log k_{\text{H}^+}$ frente a σ .

En ambos casos se obtiene una buena correlación de Hammett utilizando tanto σ como σ^+ . Las pendientes obtenidas tanto para $\rho = -0,54$ y $\rho^+ = -0,50$, como para $\rho = -4,6$ y $\rho^+ = -4,3$, son negativas. Este hecho sugiere que en el estado de transición se genera una carga parcial positiva y pone de manifiesto que en ambos casos la presencia de grupos atractores de electrones disminuye la reactividad de los óxidos de estireno con el agua. Blumestein et *al.* comprobaron mediante marcaje isotópico que la adición de disolvente en ausencia de catálisis se producía mayoritariamente en posición bencílica, acorde con el signo negativo encontrado para ρ . Los valores de ρ y ρ^+ para la reacción de hidrólisis catalizada por iones hidronio, son similares a los encontrados por otros autores al estudiar de forma directa la reacción de hidrólisis (en agua pura) o alcoholisis de una serie de óxidos de estireno sustituidos ($\rho^+ = -4,2$ y $-4,1$, respectivamente).²³⁸ La concordancia en los valores de ρ obtenidos por nosotros indirectamente (a partir del estudio de la reacción de alquilación o de la reacción de hidrólisis en otros medios) con los encontrados en estudios directos, sugieren que la metodología

utilizada en nuestro trabajo es adecuada. El valor de las pendientes, en valor absoluto, mayor para $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ que para k_{hid} indica: que en el estado de transición formado para la reacción catalizada se genera una mayor carga positiva en el lugar reactivo del anillo oxiránico que en el correspondiente al de la reacción espontánea y, en consecuencia, que los sustituyentes tienen un mayor efecto en la cinética de la reacción catalizada que en la no catalizada.

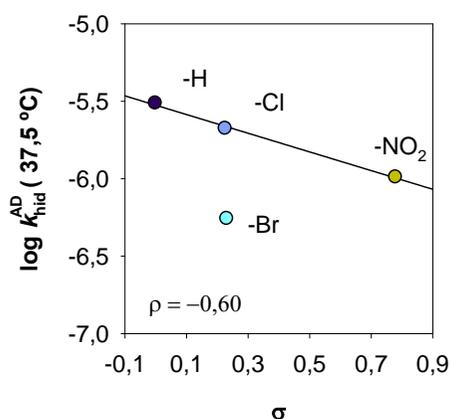


Figura 2.3.38. Correlación de Hammett $\log k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ σ .

En cuanto a la reacción de hidrólisis del aducto β , se observa una buena correlación de Hammett para las constantes de velocidad, excluyendo los valores correspondientes a $p\text{BrSO}$ (figura 2.3.38). El pequeño valor de ρ sugiere que la hidrólisis del aducto se ve ligeramente condicionada por los efectos electrónicos de los sustituyentes. El aumento del carácter atractor de los mismos produce una disminución en $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ ($\rho < 0$).

Resulta curioso observar que las constantes de velocidad que se obtendrían con un sustrato de nucleofilia $n=2$ ($k_{n=2}$ y $k_{n=2\alpha}$) para las reacciones de alquilación en C_β y C_α , respectivamente (figura 2.3.39 y figura 2.3.40) disminuyen con la presencia de grupos atractores de electrones. En los estados de transición formados en ambas reacciones se desarrollará una cierta carga positiva en el carbono reactivo, concordante con el hecho de que los oxígenos del ADN

reaccionen generalmente a través de reacciones S_N1 . Se forme o no el carbocatión correspondiente, es claro que la reacción transcurre con deficiencia electrónica.

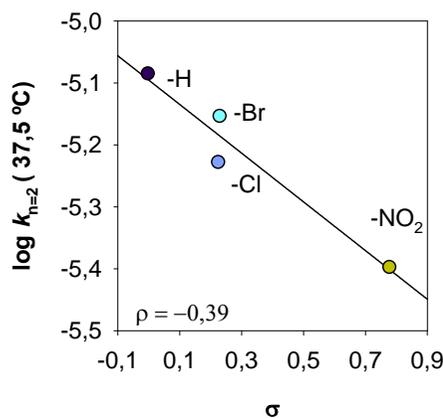


Figura 2.3.39. Correlación de Hammett para $\log k_{n=2}$.

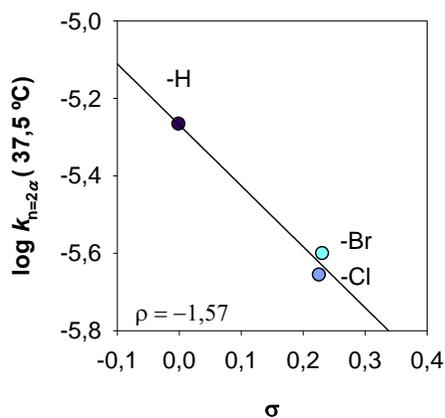


Figura 2.3.40. Correlación de Hammett para $\log k_{n=2\alpha}$.

La reacción de alquilación a través del carbono bencílico no sufre cambio sustancial con la nucleofilia del sustrato de alquilación. Tanto con NBP o la N7 de la guanina ($n=3,5$) como con los oxígenos del ADN ($n=2$), al aplicar la ecuación de Hammett se obtienen líneas rectas de pendiente negativa ($\rho_{n=3,5} = -1,97$ y $\rho_{n=2} = -1,57$). Sin embargo, existe una fuerte dependencia de las constantes de alquilación correspondientes al ataque sobre C_β ($\rho_{n=3,5} = +0,09$ y $\rho_{n=2} = -0,39$). Este hecho permite deducir que en el estado de transición para la reacción de alquilación en C_β con la NBP o el N7 de la guanina se genera una carga parcial negativa y para la reacción con los oxígenos del ADN una carga parcial positiva.

Se puede concluir pues, que todas las reacciones estudiadas se ven afectadas en mayor o menor medida por la presencia de sustituyentes en posición *para*. La presencia de grupos atradores de electrones produce la disminución de las constantes de velocidad para todas las reacciones estudiadas ($\rho_{SO} > \rho_{ClSO} > \rho_{BrSO} > \rho_{NSO}$) salvo para la reacción de alquilación de NBP a través del carbono bencílico, que se ve favorecida.

2.3.4.1.2 Parámetros químicos

Junto al análisis comparativo de los valores obtenidos para las constantes de velocidad de todas las reacciones involucradas, es importante averiguar los efectos de otros parámetros como eficacia (f) y eficiencia de alquilación (AL), la selectividad (S_{NBP}) y la constante de sustrato de Swain-Scott (s).

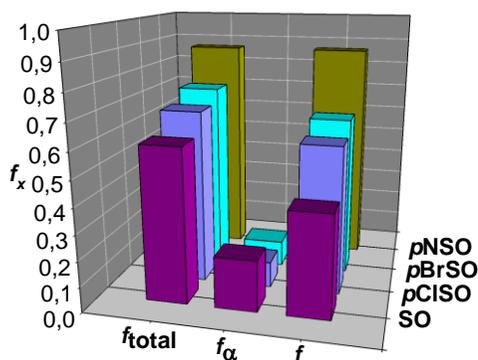


Figura 2.3.41. Eficacias de alquilación total, α , y β (f_{total} , f_{α} y f_{β} , respectivamente) para la serie de $p\text{XSO}$ estudiados. $T = 37,5$ °C; $\text{pH} = 7,0$; Medio 7:3 agua: dioxano.

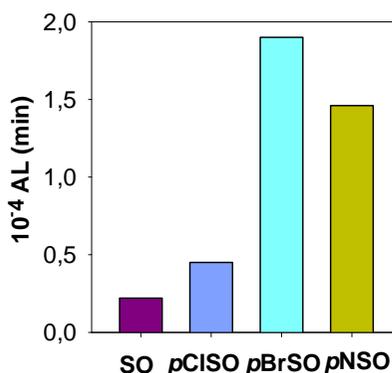


Figura 2.3.42. Variación de la vida del aducto β , AL, para la serie de $p\text{XSO}$ estudiados. $T = 37,5$ °C; $\text{pH} = 7,0$; Medio 7:3 agua: dioxano.

La figura 2.3.41 ilustra la variación de la eficacia de alquilación para los óxidos de estireno p -sustituidos. La eficacia de alquilación total, f_{total} , y la correspondiente a la alquilación en C_{β} , f_{β} , aumentan con la capacidad atractora de electrones de los sustituyentes. Sin embargo, f_{α} se comporta de forma opuesta, disminuyendo con la presencia de grupos atractores de electrones. Esto sugiere que la formación de aductos α y β está interrelacionada. En todos los casos la proporción de aducto β formado es mucho mayor que la del α . La fracción alquilada total, para todos los $p\text{XSO}$, mayor de 0,5, indica: i) que la reacción de alquilación es mayoritaria; más del 50% del epóxido inicial da lugar a la formación de aductos $\text{NBP-}p\text{XSO}$; ii) el producto de hidrólisis representa entre el 13 y el 40% de la totalidad de los productos de la reacción ($0,87 > f_{\text{total}} > 0,6$); iii)

consecuentemente, al estudiar la reacción de alquilación de NBP por p XSO es necesario tener en cuenta la hidrólisis de p XSO.

Los valores de f indican que todos los óxidos de estireno estudiados son agentes alquilantes potentes. Las fracciones de alquilación se encuentran entre las mayores obtenidas para compuestos estudiados en nuestro laboratorio,^{165,167,199,201} que incluyen agentes alquilantes tan potentes como la β -propiolactona. Además, entre los óxidos de estireno estudiados, aquellos con sustituyentes atractores en *para* presentan una mayor tendencia a producir alquilación que a ser hidrolizados. El p NSO es el que forma mayor cantidad de aducto: el 87% del epóxido inicial interviene en la formación de aducto (sólo β) mientras que el 13% restante es hidrolizado. Por el contrario, el SO es el que más se hidroliza (40%). De entre los p XSO estudiados, SO es también el que da lugar a una mayor proporción de aducto α (el 20% de SO inicial participa en la formación de aductos α).

En la figura 2.3.42 se muestra la vida de los aductos β NBP- p XSO. Los valores de AL, muy elevados, reflejan que los aductos β son bastante estables, particularmente al ser comparados con otros compuestos estudiados previamente en nuestro grupo, cuyas vidas no superan los 11 minutos.^{199,201} El agente alquilante que posee mayor eficiencia de alquilación es el p NSO. Los aductos β formados son acumulados y tienen una elevada durabilidad, hasta 8 veces mayor que la de los demás aductos β formados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los aductos α , son mucho más estables que los β , permanecen estables a lo largo de la reacción, y por tanto, cabe pensar que den lugar a una mayor actividad biológica. Como, en el caso que nos ocupa son tres los factores a considerar para juzgar la bioactividad de estos compuestos (f , f_α y AL) y cuatro los compuestos estudiados, será necesario un mayor número de compuestos para poder elucidar la relevancia del papel de cada uno de ellos en términos de actividad biológica.

Los elevados valores (tabla 2.3.28) de $\log S_{\text{NBP}}$ y $\log S_{\text{NBP}\alpha}$, junto con los obtenidos para s y s_α ($s > 0,7$) apoyan el mecanismo de sustitución nucleófila

bimolecular propuesto para las reacciones de alquilación en los dos carbonos del anillo oxiránico.^{15,46,64,148,312} También reflejan la preferencia de los *p*XSO por los centros nitrogenados del ADN, altamente nucleofílicos (e.g. N7-G, N3-A).^{46,175,303,313,314} Cabe destacar que los valores obtenidos para la alquilación a través del carbono bencílico, $S_{NB\alpha}$ y s_{α} , apenas se ven modificados por la presencia de sustituyentes en posición *para*. La sustitución del anillo aromático no influye sustancialmente en la selectividad de la reacción en C_{α} .

2.3.4.2 Actividad biológica

En la tabla 2.3.30 se recoge la actividad mutágena encontrada en la bibliografía para *p*XSO.

No se han encontrado valores para las respuestas mutágenas descritas mediante el mismo parámetro biológico para todos los compuestos estudiados. Así, con el fin de que las respuestas biológicas puedan ser comparadas entre sí se han referido todas ellas (R_X) a las del óxido de estireno (R_H) y se han obtenido las correspondientes respuestas mutágenas relativas (R_X/R_H) para cada compuesto.

Tabla 2.3.30. Respuesta mutágena a la exposición a *p*XSO en la cepa TA100 de *Salmonella Typhimurium*.

<i>p</i> XSO	Respuesta mutágena en <i>Salmonella Typhimurium</i> TA100 (R)		Respuesta mutágena en <i>Salmonella Typhimurium</i> TA100 relativa a la de SO
	$10^6 MF_{mM}$ ^a	Mutagenia ^b (mut./ μ mol)	R_X/R_H
SO	1,2	70	1
<i>p</i> CISO	2	-	1,67
<i>p</i> BrSO	-	140	2
<i>p</i> NSO	4,7	-	3,92

^a; Ref.80 ; MF_{mM} es la Frecuencia de Mutación para una concentración de compuesto 1mM , y se obtienen del cociente $(M-M_0)/N$, M y M_0 son el número de mutantes para el compuesto de estudio y el de control respectivamente y N es el número de células supervivientes por ml de la mezcla de reacción. ^b: Ref.40

A simple vista se puede afirmar que la respuesta mutágena observada en *Salmonella Typhimurium* para los óxidos de estireno aumenta con la presencia de grupos atrectores de electrones.

2.3.4.3 Correlaciones reactividad química-actividad biológica

La bibliografía recoge numerosos trabajos en los que se ha tratado de correlacionar reactividad química y actividad biológica de los óxidos de estireno. Generalmente se han seleccionado epóxidos con propiedades muy diferentes tanto en polarizabilidad como en volumen y carácter hidrófobo.^{53,80,81,105,270,337} Se han encontrado buenas correlaciones entre mutagenia y volumen molecular, pero pobre correlación mutagenia-reactividad. Cuando Tamura y Sugiura trataron de correlacionar la reactividad de los óxidos de estireno (en términos de constantes de velocidad) con su mutagenia, encontraron que aquella no era el factor más influyente, aunque la efectividad mutágena era proporcional a la constante de velocidad de alquilación en C_{α} . Sin embargo, cabe preguntarse si tiene sentido intentar correlacionar mutagenia y reactividad cuando en la serie de epóxidos existen factores mucho más influyentes que la reactividad. Los resultados de Tamura y Sugiura están en aparente contradicción con los de Rosman en su estudio de una serie de óxidos de α -metilestireno *p*-sustituídos. Estos epóxidos, que sólo reaccionan en C_{β} , poseen capacidad mutágena. Esto plantea la duda de si no será también la reactividad en C_{β} un factor relevante en la reactividad.

Para tratar de averiguar el papel de las reactividades en uno y otro carbono en la mutagenia hemos escogido una serie de óxidos de estireno con diferentes sustituyentes en posición *para*. Los epóxidos elegidos poseen coeficientes de partición y volúmenes moleculares similares,⁸⁰ para tratar de minimizar o eliminar la influencia de los mismos, pero con sustituyentes diferentes, que ejercen influencia notable en la reactividad.

A tal fin, se hizo uso de las respuestas biológicas y los parámetros químicos relativos en lugar de sus valores absolutos. Las siguientes expresiones, se utilizaron en la búsqueda de correlaciones:

$$\log(R_X/R_Y) = \log a - b \log(\tilde{k}_X/\tilde{k}_Y) \quad (2.3.46)$$

$$\log(R_X/R_Y) = \log a - b \log \rho\sigma \quad (2.3.47)$$

$$\log(R_X / R_Y) = \log a - b \log(S_{\text{NBPX}} / S_{\text{NBPH}}) \quad (2.3.48)$$

$$\log(R_X / R_Y) = \log a' - b'(s_X / s_H) \quad (2.3.49)$$

donde a , b , a' y b' son parámetros resultantes del ajuste.

Los valores de los parámetros químicos, PQ, relativos a los del SO, PQ_{rel} (PQ_X/PQ_H), y las respuestas mutágenas relativas, R_{rel} (R_X/R_H), junto con el tipo y grado de correlación (R²) para R_{rel}/PQ_{rel} se muestran en la tabla 2.3.31 y en la figura 2.3.43.

Tabla 2.3.31. Parámetros químicos de pXSO referidos al SO (PQ_{rel}), coeficientes de correlación, R², y tipos de correlaciones entre la reactividad química y la actividad biológica (PQ_{rel} y R_{rel}).

PQ _{rel}	pXSO				Correlación (log(R _{rel})/PQ _{rel})	
	SO	pCISO	pBrSO	pNSO	R ²	Tipo
σ	0,00	0,227	0,232	0,78	0,9454	Directa
$\log(k_{\text{alqX}}/\log k_{\text{alqH}})$	0,00	-0,02	0,09	0,06	0,3369	Directa
$\log(k_{\text{alqoX}}/\log k_{\text{alqoH}})$	0,00	-0,46	-0,38		0,8339	Inversa
$\log(k_{\text{ALQX}}/\log k_{\text{ALQH}})$	0,00	-0,12	-0,01	-0,11	0,3449	Inversa
$\log(k_{\text{hidX}}/\log k_{\text{hidH}})$	0,00	-0,29	-0,28	-0,62	0,9776	Inversa
$\log(k_{\text{n=2}}/k_{\text{n=2H}})$	0,00	-0,14	-0,07	-0,31	0,8581	Inversa
$\log(k_{\text{n=2a}}/k_{\text{n=2aH}})$	0,00	-0,39	-0,33		0,8565	Inversa
$\log(f_X/f_H)$	0,00	0,16	0,20	0,34	0,9833	Directa
$\log(f_{\text{ox}}/f_{\text{aH}})$	0,00	-0,29	-0,29		0,9372	Inversa
$\log(f_{\text{totalX}}/f_{\text{totalH}})$	0,00	0,06	0,09	0,16	0,9971	Directa
$\log(\text{Al}_X/\text{Al}_H)$	0,00	0,31	0,94	0,82	0,6423	Directa

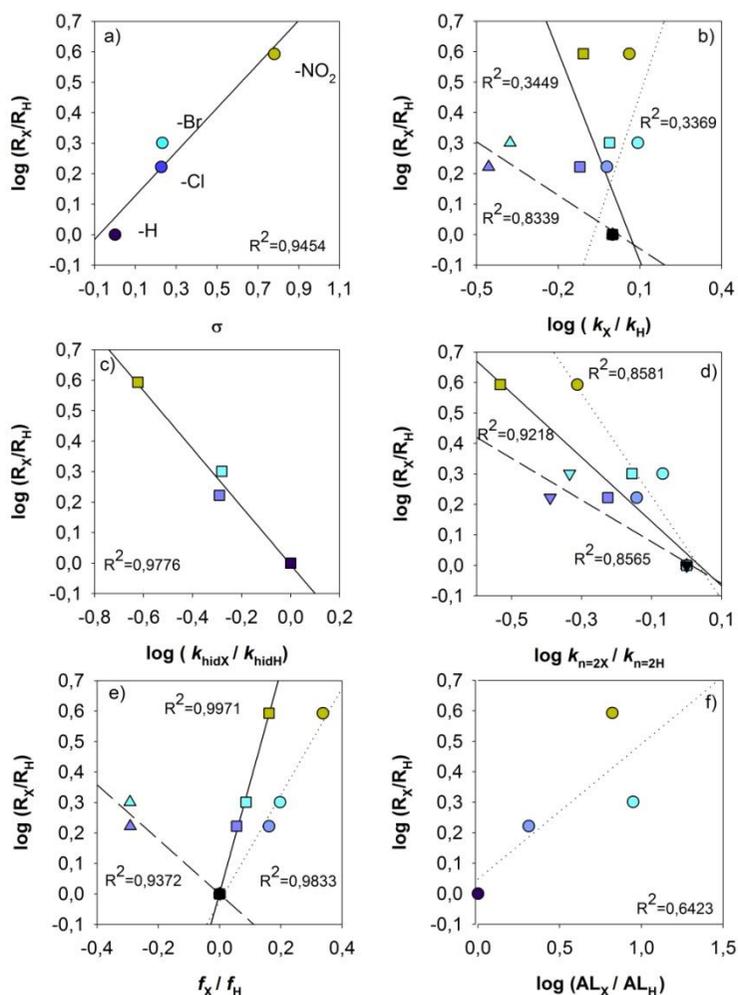


Figura 2.3.43. Correlaciones entre las respuestas mutágenas relativas (R_x/R_H) y los parámetros químicos relativos totales (■ y -) y los correspondientes a la alquilación a través de C_β (● y ...) y a través del carbono bencílico(▲ y - -); (Valores experimentales y ajuste lineal, respectivamente); en b) k es la constante de alquilación.

La buena correlación directa $\log (R_x/R_H)/\sigma$ (figura 2.3.43 y tabla 2.3.31), contrasta con la ausencia de correlación respuesta mutágena/ σ descrita por Tamura *et al.*⁸⁰ y revela que la mutagenia de los óxidos de estireno, al igual que su reactividad, se encuentra influida por factores electrónicos (la presencia de grupos aceptores de electrones en *para* produce un aumento notable en la respuesta mutágena en *Salmonella Typhimurium*).

Las correlaciones PQ_{rel}/R_{rel} (tabla 2.3.31) revelan que:

- 1) La constante de velocidad que presenta un mayor grado de correlación con R_{rel} es la de hidrólisis (relación inversa; figura 2.3.43c y tabla 2.3.31). A medida que aumenta la constante de hidrólisis del epóxido, menos concentración de éste queda disponible para la alquilación y menores los efectos biológicos; la mutagenia de los glicoles es generalmente pequeña o nula.
- 2) Se ha observado un elevado grado de correlación $f_{totalrel}/R_{rel}$. (figura 2.3.43 e). Cuanto mayor es la fracción de epóxido inicial que forma aducto, mayor la mutagenia en la cepa TA100 de *Salmonella Typhimurium*. Como la relación f_{rel}/R_{rel} es directa y f_{urel}/R_{rel} inversa, la fracción alquilada β será más influyente que la α en la mutagenia. Este hecho apoya los resultados obtenidos por Rosman *et al.*¹⁰⁵
- 3) La vida de los aductos β no es factor determinante en la mutagenia en *Salmonella Typhimurium* probablemente porque todos son muy estables. Este hecho también podría explicar la excelente correlación $f_{totalrel}/R_{rel}$. Si los aductos β no fuesen tan estables, cabría esperar que la fracción alquilada relativa f_{urel} , y no f_{rel} , fuese la más influyente en la mutagenia.

Sería conveniente un análisis más profundo del efecto conjunto de la fracción alquilada y la vida del aducto en la mutagenia. Para ello habría que disponer de datos sobre una serie de epóxidos más amplia. En cualquier caso, los resultados sugieren que, para óxidos de estireno con volúmenes moleculares y caracteres hidrófobos semejantes, la reactividad es un factor influyente en su mutagenia.

2.3.4.4 Conclusiones

Del estudio comparativo de la reactividad y la actividad biológica de los óxidos de estireno se deducen las siguientes conclusiones:

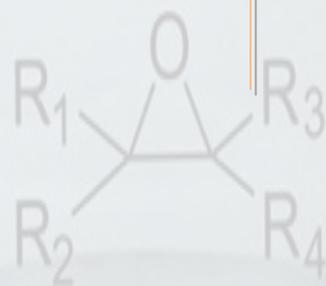
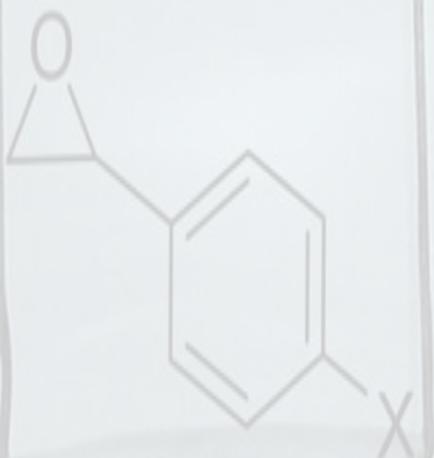
1. Todas las reacciones estudiadas se ven afectadas por la presencia de sustituyentes en posición *para*.
2. La formación de aductos β se ve favorecida por atractores de electrones en posición *para* del anillo bencénico. La formación de aductos α sufre el efecto contrario.
3. Los grupos atractores de electrones causan disminución de las constantes de velocidad para las hidrólisis de los epóxidos (catalizada por ácido y neutra) y de los aductos β . La velocidad de estas reacciones disminuye en el siguiente orden: SO > *p*ClSO > *p*BrSO > *p*NSO.
4. Más del 50% del epóxido inicial da lugar a la formación de aductos y se forma siempre mayor proporción de aducto β que de α .
5. Para los óxidos de estireno estudiados, tanto la fracción alquilada total y en C_β como la vida del aducto β , aumentan con la presencia de grupos atractores de electrones. Se ha observado comportamiento contrario para la fracción alquilada en C_α .
6. La selectividad de la reacción en C_α no se ve modificada por la sustitución en posición *para* mientras que la selectividad de la reacción en C_β aumenta considerablemente con la presencia de grupos atractores de electrones.
7. La presencia de grupos atractores de electrones produce un incremento notable en la respuesta mutágena en *Salmonella Typhimurium*.
8. La mutagenia de los óxidos de estireno en *Salmonella Typhimurium* está directamente relacionada con la capacidad alquilante –fracción alquilada total–. Probablemente relacionado con la elevada estabilidad de los aductos α y β . La fracción alquilada β es más influyente que la α en la mutagenia.

2.4 Estudio comparativo de los epóxidos lineales y aromáticos

2.4.1 Reactividad química

2.4.2 Actividad biológica

2.4.3 Conclusiones generales



2.4.1 Reactividad química

En la tabla 2.4.1 se recogen los valores de los principales parámetros químicos obtenidos para los epóxidos estudiados (aromáticos y alifáticos) que reflejan el relevante papel de la sustitución en el anillo oxiránico en la reactividad de los epóxidos frente a nucleófilos.

La tendencia general para la alquilación en C_β se ha analizado mediante la ecuación de Taft.³⁴⁰ La pendiente positiva obtenida (figura 2.4.1) indica que la reacción de alquilación por epóxidos monosustituídos está favorecida por la capacidad atractora de electrones de los sustituyentes (aumento de σ^*). Los valores encontrados para k_{alq} (tabla 2.4.1) revelan que los epóxidos disustituídos reaccionan mucho más lentamente.

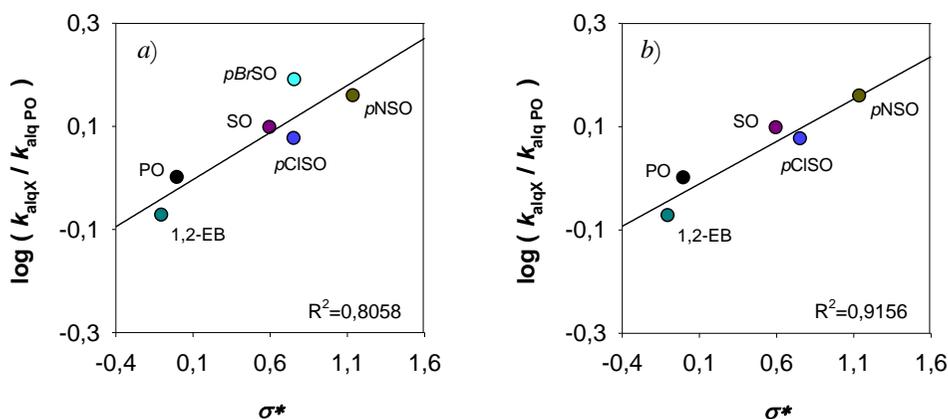


Figura 2.4.1. Correlación de Taft para k_{alqX}/k_{alqPO} considerando a) PO, 1,2-EB y todos los epóxidos aromáticos; b) PO, 1,2-EB y epóxidos aromáticos a excepción de pBrSO.

De los valores recogidos en la tabla se concluye que:

1. La tendencia de reactividad encontrada para la alquilación de la NBP por epóxidos es la misma que las de hidrólisis de éstos y de los aductos β formados: óxidos de estireno > epóxidos lineales monosustituídos > epóxidos lineales disustituídos. La presencia de grupos atractores de electrones en

posición para del anillo aromático facilita la ruptura del enlace C-O y el impedimento estérico en los disustituídos dificulta la reacción con nucleófilos.

2. Los óxidos de *cis*- y *trans*-2,3-epoxibutano son los epóxidos menos reactivos y forman los aductos β más estables. La estabilidad de los aductos sigue el siguiente orden: aductos de epóxidos lineales disustituídos > aductos de epóxidos lineales monosustituídos > aductos de óxidos de estireno.
3. Todos los epóxidos estudiados forman aductos muy estables con la NBP y, de acuerdo con las fracciones alquiladas obtenidas (excepto los disustituídos) son agentes alquilantes muy potentes. Más del 60% del epóxido inicial forma aducto.
4. La influencia de los sustituyentes en el anillo oxiránico en las distintas reacciones sigue la secuencia: hidrólisis de aductos β > alquilación en C_β > hidrólisis de epóxidos > alquilación en C_α . La gran influencia ejercida por los sustituyentes del anillo oxiránico para la hidrólisis de los aductos β apunta el papel determinante de esta reacción en el estudio de la efectividad como agentes alquilantes de los epóxidos. No considerar la reacción conduce a resultados erróneos.
5. Los valores de selectividad encontrados (s y S_{NBP}) apoyan los dos mecanismos de sustitución nucleófila bimolecular propuestos para las reacciones de alquilación en los dos carbonos del anillo oxiránico ($S_{N2'}$ en C_α y S_{N2} en C_β).

Tabla 2.4.1. Resumen de los parámetros más relevantes del estudio de la reacción de alquilación de NBP por los epóxidos objeto de estudio.

Parámetros químicos	Epóxidos estudiados							
	SO	pCISO	pBrSO	pNSO	PO	1,2-EB	trans-2,3-EB	cis-2,3-EB
$10^4 k_{alq} (M^{-1}s^{-1})$	2,1	2,0	2,6	2,42	1,7	1,4	0,14	0,15
$10^4 k_{alq\alpha} (M^{-1}s^{-1})$	1,0	0,35	0,42	-	-	-	-	-
$10^6 k_{hid} (s^{-1})$	4,2	2,15	2,2	1,0	1,06	0,80	0,65	0,6
$10^6 k_{hidAD} (s^{-1})$	3,1	2,1	0,55	1,02	0,531	0,513	0,149	0,119
$S_{NBP} / \log S_{NBP}$	1945 / 3,29	3595 / 3,56	4561 / 3,66	15363 / 4,19	6177 / 3,79	6890 / 3,84	971 / 2,99	762 / 2,88
$S_{NBP\alpha} / \log S_{NBP\alpha}$	954 / 2,98	635 / 2,80	742 / 2,87	-	-	-	-	-
s	0,94	1,01	1,05	1,20	1,08	1,10	0,85	0,88
s_{α}	0,85	0,8	0,82	-	-	-	-	-
f_{β}	0,40	0,58	0,63	0,87	0,76	0,8	0,33	0,28
f_{α}	0,20	0,10	0,10	-	-	-	-	-
f_{total}	0,60	0,68	0,73	0,87	0,76	0,8	0,33	0,28
$10^{-4}AL (min)$	0,22	0,45	1,9	1,46	2,4	2,5	3,8	4,0

Medio *agnaciloxano* 7:3; pH = 7; T = 37,5 °C.

2.4.2 Actividad biológica

No se han encontrado en la bibliografía los valores de mutagenia en la cepa TA100 de *Salmonella Typhimurium* descritas mediante el mismo parámetro biológico para todos los compuestos estudiados. Por eso se han calculado las respuestas mutágenas relativas de los compuestos utilizando la del PO como referencia (tabla 2.4.2).

Tabla 2.4.2. Respuesta mutágena a la exposición de epóxidos en la cepa TA100 de *Salmonella Typhimurium*.

Epóxido	Respuesta mutágena en <i>Salmonella Typhimurium</i> TA100 (R)			Respuesta mutágena en <i>Salmonella Typhimurium</i> TA100 relativa a la de PO	
	$10^6 MF_{mM}^a$	Mutagenia (rev./ μmol)	Mutagenia ^b (mut./ μmol)	R_x/R_{PO}	$\log(R_x/R_{PO})$
SO	1,2	1600	70	16,0	1,2
<i>p</i> CISO	2	-	-	26,7	1,4
<i>p</i> BrSO	-	-	140	32,0	1,5
<i>p</i> NSO	4,7	-	-	62,7	1,8
PO	-	100,2 ^c	-	1,0	0,0
1,2-EB	-	120,6 ^d	-	1,2	0,1
<i>cis</i> -2,3-EB	-	19,7 ^c	-	0,2	-0,7
<i>trans</i> -2,3-EB	-	3,2 ^c	-	0,032	-1,5

a: Ref. 80 ; MF_{mM} es la Frecuencia de Mutación para una concentración de compuesto 1 mM, y se obtienen del cociente $(M-M_0)/N$, M y M_0 son el número de mutantes para el compuesto de estudio y el de control respectivamente y N es el número de células supervivientes por ml de la mezcla de reacción. b: Ref. 40; c: Ref. 306; d: Ref. 263.

Todos los epóxidos objeto de estudio son agentes mutágenos débiles, siéndolo particularmente los disustituidos. Con los epóxidos monosustituidos se ha comprobado que la respuesta mutágena relativa está correlacionada con la capacidad atractora de electrones del sustituyente (figura 2.4.2).

No se ha tratado de establecer correlaciones cuantitativas reactividad química-actividad biológica para la serie de compuestos estudiada porque, a pesar de que los volúmenes moleculares y caracteres hidrófobos de los óxidos de estireno *p*-sustituidos son muy similares, difieren sustancialmente de los de los epóxidos lineales.

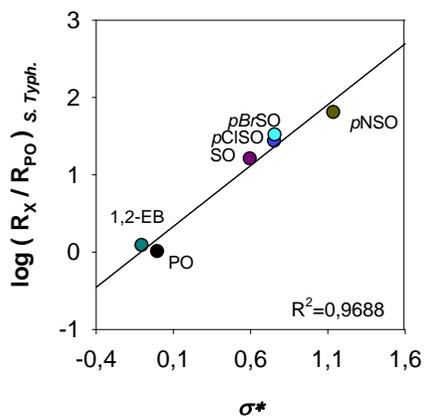


Figura 2.4.2. Correlación de Taft para la respuesta mutágena relativa en la cepa TA100 de *Salmonella Typhimurium*.

2.4.3 Conclusiones generales

La investigación de la reactividad y actividad biológica de epóxidos lineales y óxidos de estireno han conducido a las siguientes conclusiones:

1. La alquilación del sustrato 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP) por los epóxidos lineales (EP) tiene lugar en el carbono menos sustituido del anillo oxiránico, C_{β} , para formar, a través de un mecanismo S_N2 los aductos β -NBP-EP, que son inestables y sufren hidrólisis. Con epóxidos aromáticos (*p*XSO) la alquilación, además de producirse en C_{β} para formar los aductos inestables β -NBP-*p*XSO, también tiene lugar en el carbono más sustituido del anillo oxiránico, C_{α} , a través de un mecanismo S_N2' , dando lugar a aductos α -NBP-*p*XSO, estables durante el tiempo de reacción. El óxido de *p*-nitroestireno se encuentra en el límite de ambas series ya que, aunque es un óxido de estireno, reacciona con la NBP sólo en C_{β} , como los epóxidos alquílicos.
2. El estudio cinético ha puesto de manifiesto la necesidad de tener en cuenta, junto a las reacciones de alquilación propiamente dichas, las de hidrólisis de los epóxidos y de los aductos β -NBP-epóxido. La elusión de estas últimas es causa de frecuentes conclusiones erróneas encontradas en la bibliografía.
3. La reactividad de los epóxidos con NBP y su mutagenia en *Salmonella Typhimurium* está controlada por la capacidad atractora de los sustituyentes del anillo oxiránico. La influencia de estos últimos en las reacciones implicadas en la alquilación sigue la tendencia: hidrólisis de aductos β > alquilación en C_{β} > hidrólisis de epóxidos > alquilación en C_{α} .
4. La investigación cinética de la reactividad de los epóxidos como agentes alquilantes, requiere evaluar previamente, para cada uno de ellos, los coeficientes de absorción molar de los aductos formados. La asunción de

algunas aproximaciones encontradas en la bibliografía puede conducir a conclusiones erróneas.

5. La constante de velocidad de formación de los aductos β -NBP-epóxido es independiente del pH mientras que la de formación de los aductos α -NBP-pXSO aumenta en medio ácido. La hidrólisis de β -NBP-epóxido presenta catálisis básica y la de hidrólisis de los epóxidos catálisis ácida en las condiciones de trabajo (pH = 4-7). La presencia de grupos atractores de electrones en la posición *para* del anillo aromático facilita la ruptura del enlace C-O y, en los disustituidos, el impedimento estérico dificulta la reacción con nucleófilos. La tendencia de reactividad encontrada para la alquilación de la NBP por los epóxidos es la misma que las de hidrólisis de los epóxidos y de los aductos β formados: óxidos de estireno > epóxidos lineales monosustituidos > epóxidos lineales disustituidos.
6. Los valores de la quimioselectividad y constante de sustrato de Swain-Scott de los epóxidos apoyan los mecanismos propuestos para la alquilación y son acordes con su mayor afinidad hacia los centros nitrogenados de las bases del ADN.
7. Se ha encontrado correlación entre la mutagenia *in vitro* y la reactividad química de los oxiranos del mismo tipo.

3

Otros estudios cinéticos mediante moléculas modelo del ADN

3.1	Estudio cinético del cambio conformacional del ADN.....	219
-----	---	-----



3.1 Estudio cinético del cambio conformacional del ADN

3.1.1 Antecedentes

- 3.1.1.1 Formas del ADN
- 3.1.1.2 ADN Z

3.1.2 Materiales y método

3.1.3 Resultados y discusión

- 3.1.3.1 Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC)·poli(dGdC) en presencia de NiCl_2
- 3.1.3.2 Estudio del cambio conformacional del poli(dGdC) en presencia de EtOH
- 3.1.3.3 Efecto de la temperatura en la conformación Z* del poli(dGdC) en presencia de EtOH
- 3.1.3.4 Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC) en presencia de ZnCl_2
- 3.1.3.5 Efecto de la temperatura en la conformación Z del poli(dGdC) en presencia de ZnCl_2

3.1.4 Conclusiones

“I wouldn't like to have my DNA messed up”

Mortimer Mendelson

3.1.1 Antecedentes

Desde la publicación en *Nature* (1953) de una serie de artículos en los que se describían la estructura y funcionalidad del ADN, los hallazgos en torno a esta molécula –portadora de la información genética– han sido impulsores de una revolución que ha sobrepasado el ámbito científico, permitiendo conocer el mecanismo de numerosos procesos biológicos.

La forma en que el ADN codifica la información biológica no sólo depende de su estructura primaria –secuencia de pares de bases– sino también de la secundaria –conformación– que tiene un papel importante en las funciones del ADN.³⁵⁰⁻³⁵² Desde que Watson y Crick propusieron el modelo de la doble hélice dextrógira para el ADN natural, B-ADN,³⁵³ se suele hacer referencia a él como a la doble hélice. No obstante, aunque esta conformación es la adoptada más frecuentemente, el ADN es una molécula flexible y dinámica que, en determinadas condiciones, puede adoptar otras conformaciones.^{354,355} Así ocurre durante los procesos metabólicos del ADN (replicación, transcripción, reparación o recombinación)³⁵⁶⁻³⁵⁸ durante ellos se produce un desenrollamiento parcial del ADN que da lugar, temporalmente, a la separación en dos hebras sencillas en una determinada región del ADN. Cuando esas hebras presentan secuencias repetitivas, pueden formarse estructuras en el ADN con conformación diferente a la B.³⁵⁹ Hasta el momento se han identificado, además del ADN B, más de diez conformaciones que se encuentran en estados de energía más elevados, A-, C-, Z-, H-ADN, estructuras cruciformes, triplex, tetraplex, G-quadruplex-ADN, etc.³⁵⁹

3.1.1.1 Formas del ADN

La aparición de conformaciones alternativas del ADN, se ve favorecida por: i) superenrollamiento negativo; ii) unión con algunas proteínas y iii) presencia de determinadas secuencias de pares de bases, generalmente repetitivas.^{360,361} Se ha demostrado que los efectos biológicos de secuencias repetitivas no se deben a las mismas *per se*, sino a la conformación alternativa que adquieren.³⁶²

La investigación de los cambios conformacionales del ADN permite: i) conocer las causas que los generan; ii) sus consecuencias biológicas; iii) investigar su posible control con fines terapéuticos.^{355,360,363-365} Gracias a los avances en campos como la biofísica, genética humana, genómica y biología molecular, se han logrado numerosos avances en la investigación de los efectos biológicos asociados a las conformaciones alternativas del ADN.

3.1.1.1.1 Características de las conformaciones del ADN.

Las características generales de algunas de las conformaciones más comunes del ADN se recogen en la tabla 3.1.1.

Tabla 3.1.1. Características de algunas conformaciones alternativas del ADN descritas en bibliografía.

ADN	Naturaleza	Secuencia requerida	Apareamiento	Ref.
B	Hélice dextrógira (2H)	-	WC	
A	Hélice dextrógira (2H)	-	WC	
C	Hélice dextrógira (2H)	-	WC	
Z	Hélice levógira (2H)	(GC) _n	WC	
cruciforme	ADN B intramolecular con lazo	Secuencias repetidas invertidas de 6 o más nucleótidos	WC	356,366
H	Triple hebra	Repeticiones especulares homopurinas-homopirimidinas	Hoogsten	
G	Cuádruple hebra: Apilamiento unidades planas (cuarteto-G)	Regiones ricas en G	Hoogsten	
E	Extrahelicoidal	(CCG) ₂₋₅ , (CGC) ₂ , (GCC) ₂ y (CGCCG)	WC	367,368
i	Intrahelicoidal	Regiones ricas en C	C/C	359,369

Medio agua; WC: Watson y Crick; 2H: doble hebra.

Las características de las conformaciones de doble hélice más comunes son las siguientes:

ADN B: Es la conformación más frecuente del ADN, una doble hélice dextrógira constituida por dos hebras antiparalelas con apareamiento de Watson y Crick (figura 3.1.1). La elevada humedad (92%) y las condiciones fisiológicas, en general, estabilizan esta forma.

ADN A: Estructura similar a la de la conformación B pero más ancha y rígida (figura 3.1.1). Su formación está favorecida por condiciones de baja humedad (75%).

ADN C: Se forma con concentraciones de sodio elevadas y condiciones de humedad intermedia a las que se requiere para la formación de las conformaciones A y B. Se suele clasificar como una doble hélice B distorsionada.

ADN Z: Recibe ese nombre porque el esqueleto de grupos fosfato sigue un patrón en zigzag (figura 3.1.1).^{355,370} Su estructura es de doble hélice levógira y se forma en fragmentos con secuencias de alternancia purinas-pirimidinas. El cambio conformacional B-Z, al que nos referiremos más adelante, es reversible y está dirigido por diversos factores.^{365,370-372} Se ha demostrado que tiene lugar *in vivo*.³⁶¹

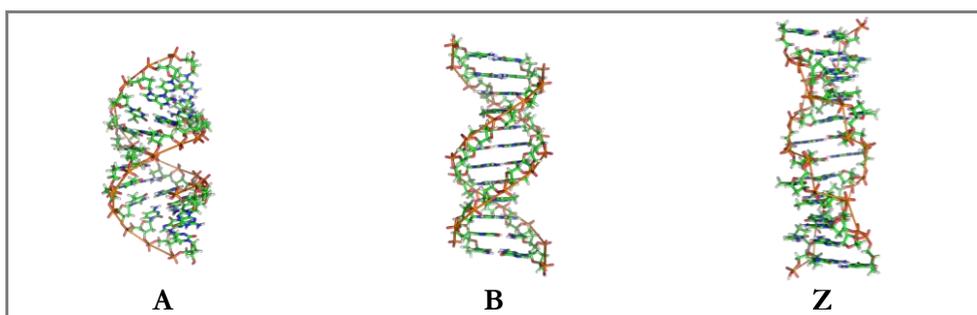


Figura 3.1.1. Modelos de las formas A, B y Z del ADN.

En la tabla 3.1.2 se recogen las características estructurales de las conformaciones de doble hélice más comunes.

Tabla 3.1.2. Características estructurales de las principales conformaciones de doble hélice del ADN.

Parámetros	B-DNA	Z-DNA	A-DNA	C-DNA
Sentido de rotación de hélice	Dextrógira	Levógira	Dextrógira	Dextrógira
Proporciones generales	Alargada y fina	Alargada y fina	Corta y ancha	
p.b. por vuelta de hélice	10.5	12	11	9,
p.b. por repetición de hélice	1	2	1	1
Alzada por p.b. (A°)	3.3	3.72	2,6	3,3
Alzada por vuelta de hélice (A°)	34	45	25-26	
Rotación por p.b.	36°	-60°	33.6°	
Diámetro de compactación de la hélice (A°)	~20	~18	~25	~19
Conformación de los enlaces glicosídicos	anti	anti en C sin en G	anti	
Surco mayor	Ancho y de profundidad intermedia	Aplanado sobre la superficie de la hélice	Muy angosto y profundo	
Surco menor	Angosto y de profundidad	Muy angosto y profundo	Muy ancho y poco profundo	
Ubicación del eje de la hélice	A través de los p.b.	Surco menor	Surco mayor	

Medio agua ; p.b: pares de bases.

3.1.1.1.2 Factores que determinan la conformación del ADN

Entre los factores que determinan la conformación que adopta el ADN destacan:³⁷³ la concentración de sales,³⁷⁴ la modificación de las bases,^{375,376} el superenrollamiento,³⁷⁷ la actividad del agua,³⁷⁸ la temperatura y la presión.

3.1.1.1.3 Efectos biológicos de las conformaciones alternativas del ADN

Las conformaciones alternativas del ADN son generalmente adoptadas por los lugares más frágiles del neoplasma humano.³⁷⁹ Por ello contribuyen a la inestabilidad genética:³⁸⁰ i) generan reordenamientos genómicos graves; ii) afectan a la replicación y transcripción; y iii) son la base molecular de más de setenta enfermedades genéticas humanas:³⁶¹ desórdenes neurológicos hereditarios, enfermedades psiquiátricas, mieloma, leucemia o linfomas.^{361,381}

3.1.1.1.4 Metodología utilizada para estudiar los cambios conformacionales

Para estudiar los cambios conformacionales del ADN se han aplicado tanto técnicas experimentales como computacionales. Entre las técnicas más utilizadas

cabe destacar: el dicroísmo circular (DC), resonancia magnética nuclear (RMN), difracción de rayos X, espectroscopias de UV, de IR y Raman.³⁸²

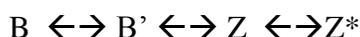
3.1.1.2 ADN Z

De entre todas las conformaciones posibles que puede adquirir el ADN hemos centrado nuestra atención sobre la conformación Z y sobre el cambio conformacional B-Z, objeto de estudio del presente trabajo.

Descubrimiento del ADN Z.

En 1972, Pohl y Jovin descubrieron que al añadir una elevada concentración de sal a un polinucleótico sintético, con una secuencia alternada d(GC)_n, se producía la inversión de su espectro de DC. Este hecho revelaba un cambio conformacional en el mismo.³⁸³ Poco después se descubrió que la presencia de etanol producía el mismo efecto.^{378,384} En 1979 se estudió por primera vez la estructura del d(CG)₃ con cristalografía de resolución atómica y se descubrió que la nueva estructura adoptada era de doble hélice con apareamiento de bases de Watson y Crick, pero levógira, no destrógira como se esperaba. Se hizo patente que el cambio conformacional descrito por Pohl y Jovin correspondía a la transición B-Z.³⁷⁸ Mediante el análisis de la forma Z del ADN con diferentes técnicas físico-químicas se ha demostrado que su estructura no es única sino que existe una familia de formas levógiras del ADN. El ADN Z es propenso a la agregación, la forma agregada, descubierta por Van de Sande y Jovin con poli(dGdC)₂, se ha denominado Z*. La transición B-Z* es un proceso cooperativo para el cual se han propuesto dos mecanismos diferentes:

- con tres pasos: nucleación, condensación y agregación.³⁸⁵



- con cuatro pasos dos de ellos de nucleación, B_{nucl}, monomolecular y Z_{nucl}, bimolecular (entre dos hebras de ADN).³⁸⁶



3.1.1.2.1 Factores que favorecen su formación

Aunque el ADN se encuentra generalmente en la forma B, numerosos factores químicos y ambientales promueven el cambio conformacional B-Z. A continuación se reseñan algunos de ellos.

a) *Secuencias de pares de bases*

La estructura primaria del ADN influye en el cambio conformacional B-Z. Las secuencias que permiten la adopción de la conformación Z son repetitivas. La que más facilita el cambio conformacional B-Z alterna pirimidinas y purinas $d(\text{CG})_n$; por ello suele utilizarse el polinucleótido sintético $\text{poli}(d\text{GdC})_2$ para estudiar el cambio conformacional B-Z *in vitro*. Otras secuencias requieren más energía de estabilización, en orden creciente, $d(\text{TG})_n$, $d(\text{GGGC})_n$ y $d(\text{TA})_n$.^{350,360,373}

b) *Condiciones de elevada concentración salina*³⁸⁷

Las interacciones electrostáticas tienen un papel fundamental en la formación del ADN Z. En la conformación Z algunos grupos fosfato se encuentran muy cercanos entre sí y la repulsión electrostática entre ellos, cargados negativamente, es muy grande, mucho mayor que en el ADN B. Por ello, la conformación Z del ADN, se encuentra desestabilizada en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en condiciones de elevada concentración salina, la repulsión electrostática disminuye considerablemente y la conformación Z del ADN se ve favorecida.

Cuando la transición B-Z se produce por la presencia de sales de diversos iones, en el cambio conformacional influyen diversos factores:

- *La naturaleza del catión*.³⁸⁸ En presencia de iones metálicos alcalinos (Na(I), K(I), Rb(I), Cs(I), Li(I)) la transición B-Z se produce en concentraciones salinas elevadas 2,3-5 M. Con los cationes Ca(II) y Mg(II) las concentraciones necesarias son más bajas, 0,1-0,7 M.³⁷⁶ En presencia de iones de metales de

transición (Mn(II), Co(II), Ni(II), y Zn(II)) bastan concentraciones milimolares o submillimolares.^{387,389}

- *Temperatura y presión* también modificarán la concentración salina necesaria para que se produzca el cambio conformacional.³⁹⁰

c) Modificaciones químicas a bajas concentraciones salinas

c.i) Metilación de la guanina en la posición N7

La metilación en la posición N7 de la guanina facilita la formación de la forma Z del poli(dG-dC).³⁹¹⁻³⁹³ En concentraciones salinas similares a las fisiológicas, si todos los residuos de desoxiguanosa se encuentran metilados, la forma predominante del ADN es la Z –la metilación reduce la concentración de sal e incrementa la velocidad a la que se produce la conversión B-Z del ADN.^{391,394} Este fenómeno se debe en parte a la presencia de una carga positiva en el residuo de la guanosina, que disminuye las repulsiones entre los grupos fosfato de las dos cadenas del nucleótido.^{376,391}

c.ii) Bromación o metilación de la posición C-5 de la citosina o C-8 de la guanosina

Cuando la metilación o bromación de la citosina en C5 se producen en regiones de secuencias alternadas dCdG facilitan la formación de la forma Z.^{376,395} La presencia de un sustituyente voluminoso, incapaz de acomodarse en el espacio que le queda en conformación *anti*, desplaza el equilibrio en favor de la conformación *sin* y, por tanto, de la forma Z del ADN.³⁹⁵ La metilación de la citosina es un factor estabilizante para los segmentos de Z ADN *in vivo*, y puede actuar como desencadenante del desplazamiento del equilibrio B-Z en el interior de las células.³⁷⁵

d) Condiciones de superenrollamiento negativo elevado

El superenrollamiento negativo consiste en el retorcimiento de la doble hélice en el sentido que produce el desenrollamiento local de la misma.

En el ADN natural las regiones que se encuentran en la forma Z están embebidas en regiones que permanecen en la forma B. La formación de las uniones B-Z en el ADN supone una barrera energética considerable. Esto es acorde con la hipótesis de que la energía necesaria para formar el ADN Z *in vivo* es producida durante los procesos metabólicos del ADN, como la transcripción o la replicación.^{359,396-398} La formación de la forma Z tendrá lugar cuando el polinucleótido esté sometido a una elevada tensión de torsión.^{373,397}

e) La presencia de disolventes deshidratantes

La forma Z del ADN es estabilizada por disolventes que deshidratan el ADN, como etanol, metanol o etilenglicol, que aumentan los efectos iónicos y producen la agrupación de los contraiones cerca del ADN. El ADN Z se encuentra más protegido frente a las repulsiones de los grupos fosfato y, por tanto, estabilizado en presencia de disolventes deshidratantes del ADN.³⁸²

f) Unión con proteínas

Existen determinadas proteínas y anticuerpos que se unen de forma selectiva al ADN Z. Las proteínas actúan como estabilizadoras del ADN Z, al unirse al mismo, no como inductoras del cambio conformacional B-Z.³⁹⁹

3.1.1.2.2 Formación del Z-ADN *in vivo*

Se han realizado numerosos estudios para demostrar la formación del ADN Z *in vivo*; y su formación como resultado de procesos metabólicos. Esta hipótesis se ha visto apoyada por resultados de estudios computacionales y por el hallazgo de proteínas que se unen de manera específica al Z-ADN.^{358,361,400} Sin embargo, obtener evidencias experimentales no resulta sencillo pues sólo un 1% del ADN genómico natural es capaz de adoptar una conformación de hélice Z, y, en los genes humanos oscila entre el 35 y el 62%.³⁵⁰

3.1.1.2.3 Efectos biológicos

Se ha demostrado que la transición B-Z tiene lugar en las células vivas y que puede afectar tanto a la mutagénesis como a la iniciación de la transcripción y recombinación.³⁵⁰ Las secuencias repetitivas que facilitan el cambio conformacional B-Z aparecen habitualmente en el ADN telomérico y en la región promotora de algunos oncogenes.³⁵⁹ Por eso se ha relacionado la formación del ADN Z con la carcinogénesis.

3.1.1.2.4 Coordinación del ADN con metales

El ADN se encuentra en disolución formando complejos con contraiones que, junto con la esfera de hidratación, determinan su estructura. Los iones metálicos pueden alterar la estructura secundaria o terciaria del ADN regulando, en cierto modo, sus funciones.⁴⁰¹

Las tres cuestiones fundamentales para caracterizar la unión ion metálico-ADN son: i) en qué átomos del ácido nucleico se produce la unión con el metal ii) cómo afecta la interacción a la estructura del ADN; y iii) cuál es la afinidad de la unión.

Los ácidos nucleicos contienen fundamentalmente cuatro centros de unión con los iones metálicos:⁴⁰²

- a) Los átomos de oxígeno del grupo fosfato, cargados negativamente.
- b) Los grupos hidroxilo de la ribosa.
- c) Los nitrógenos de los anillos de las bases.
- d) El grupo cetónico exocíclico de las bases.

La coordinación de los iones metálicos con el ADN es un proceso fundamental para neutralizar la carga de éste y controla sus funciones biológicas. En contraposición, puede dar lugar a la desestabilización de la conformación B del ADN, particularmente si, en lugar de coordinarse con el grupo fosfato, lo hace con un átomo de las bases. La afinidad de los iones metálicos por las bases frente a

los grupos fosfatos disminuye en el siguiente orden: Hg(II) > Cu(II) > Pb(II) > Cd(II) > Zn(II) > Mn(II) > Ni(II), Co(II) > Fe(II) > Ca(II) > Mg(II), Ba(II).⁴⁰³

La acumulación de algunos iones metálicos o su deficiencia se han relacionado con el desarrollo de algunas enfermedades.⁴⁰⁴ Algunos estudios han sugerido que la forma Z del ADN promovida por Ni(II) puede estar involucrada en la carcinogénesis asociada a la exposición a este metal.^{405,406}

3.1.1.2.5 Cambio conformacional B-Z facilitado por metales

El papel de los metales en el cambio conformacional B-Z y la estabilización de la forma levógiara es doble: i) la esfera de coordinación externa (electrostática) se coordina con los residuos de fosfato cargados negativamente, produciendo una nube de ion metálico cargado positivamente alrededor del esqueleto del polímero, lo que estabiliza la forma Z; ii) la esfera de coordinación interna se coordina con los fosfatos y los nitrógenos de las bases formando posibles quelatos que son más estables en la forma Z que en la B.⁴⁰⁷ La presencia de aniones puede afectar a la estabilización de la forma Z, por formación de complejos con los iones metálicos,^{408,409} y el AEDT es capaz de desplazar los cationes metálicos y producir el retorno de la forma Z a la B.⁴¹⁰

No sólo los iones metálicos sino también los complejos metálicos pueden inducir la formación de la forma Z (son estabilizados en la superficie del ADN principalmente por atracción electrostática).⁴¹¹⁻⁴¹⁷ Otros no son capaces de promover la transición pero sí de estabilizar la forma Z.⁴¹⁸

Aunque la formación del complejo metálico previa al cambio conformacional pueda parecer esencial para que éste se produzca, existen otros procesos concurrentes que explican el comportamiento de los iones metálicos en la inducción de la transición B-Z.

Algunos metales como Ni(II), Co(II), La(II), Ce(II), Tb(II) y Zn(II) dan lugar a curvas de transición bifásicas. Se ha comprobado que con Ni(II), Co(II) y

Cr(III) tiene lugar la formación de un complejo estable ADN-catión que actúa como intermedio en la transición B-Z, que se corresponde con la forma C del polinucleótido, teniendo lugar así la transición B-C-Z. Sin embargo, en el caso del Zn(II) se observa que el intermedio de transición no se corresponde con la forma C y la conformación final tampoco corresponde con la conformación Z adoptada por los otros metales.⁴¹⁹ Algunos autores han propuesto que el ZnCl₂ no produce cambio conformacional a la forma Z del polinucleótido, mientras que otros han comprobado que la forma Z aparece a concentraciones relativamente bajas.⁴²⁰

El níquel

Los iones Ni(II) son capaces de promover la transición B-Z no sólo del poli(dGdC)₂ sino también de poli(dA-dT)₂⁴²¹ y de poli(dA-dC)poli(dG-dT).^{407,422} Estudios del espectro de infrarojos de polinucleótidos doble-hebra deuterados han mostrado que la coordinación de Ni(II) con la posición N7 de las purinas favorece la formación de la forma Z.⁴²³

El zinc

El zinc es un elemento traza esencial que después del hierro, es el metal más abundante en el cuerpo humano.⁴²⁴ El papel de este metal es fundamental en la química y bioquímica de los ácido nucleicos. En un estudio realizado acerca del cambio conformacional B-Z utilizando diferentes ligandos con el zinc, se ha comprobado que los cambios observados en el espectro de dicroísmo circular son independientes del ligando. Se observan diferentes transiciones: una pequeña disminución de la intensidad de las bandas observadas en 275 y 290 nm con un punto isobéptico poco definido en torno a 260 nm. La especie formada correspondería a una forma de las familias de las B. A concentraciones más elevadas de complejo metálico se observa un segundo paso, mucho más lento, la transición B-Z caracterizada por la aparición de un punto isobéptico a 278 nm y una banda negativa a 292 nm.⁴²⁵

3.1.1.2.6 Método utilizado para estudiar el cambio conformacional B-Z

3.1.1.2.6.1 Dicroísmo circular

Los datos obtenidos por espectroscopia de dicroísmo circular (DC) han tenido un papel fundamental en la mayoría de los descubrimientos sobre la estructura secundaria del ADN. Es una técnica sensible, rápida, simple y relativamente barata, que presenta numerosas ventajas a la hora de determinar las propiedades conformacionales de las moléculas de ADN.⁴²⁶ Se puede utilizar para seguir el cambio conformacional B-Z con moléculas de ADN de longitudes muy diversas y para un amplio margen de concentraciones.

3.1.1.2.6.2 Espectroscopia UV-visible

Los ácidos nucleicos absorben en la región del UV lejano, con un máximo de absorbancia en torno a 260 nm. Esta absorción se debe a transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ (y en menor medida a transiciones $n\text{-}\pi^*$) de los electrones de los anillos púricos y pirimidínicos. El enlace por puente de hidrógeno y el apilamiento de bases con la doble hélice producen una notable disminución de la intensidad de absorción en comparación con la forma enrollada aleatoriamente. Algunas alteraciones en la estructura del ADN se reflejan como un desplazamiento, hiper o hipobatocrómico en el espectro de UV.⁴¹⁹

Para monitorizar los cambios que se producen en la región UV del espectro se puede representar el cociente de absorbancias $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, sensible a los cambios del espectro UV producidos por la transición B-Z. La relación $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ presenta una buena correlación con los datos correspondientes de DC.

3.1.2 Materiales y método

Se utilizó la sal sódica del ácido poli(desoxiguanílico-desoxicitidílico) (poli) suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) sin purificación posterior. El etanol usado fue Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) como el cloruro sódico utilizado para mantener la fuerza iónica y el cacodilato sódico empleado para mantener las disoluciones a un pH constante de 7,0. La sal sódica dihidratada del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) utilizada fue Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Se preparó una disolución madre de poli(dGdC)·poli(dGdC) en agua ultrapura, cuya concentración se determinó mediante espectroscopia UV-vis – [poli] = $9,32 \cdot 10^{-4}$ M, expresada como molaridad de pares de bases (pb)–. Se prepararon también disoluciones stock de tampón cacodilato sódico, NaCac (0,01 M), NaCl (0,1 M), ZnCl₂ (0,014 M), NiCl₂ (0,014 M) y AEDT (0,01 M). Las concentraciones de las disoluciones de ZnCl₂ y NiCl₂ se determinaron mediante valoración con AEDT, utilizando como indicadores negro de eriocromo y muréxida respectivamente.

Se comprobó que en ausencia de agentes promotores del cambio conformacional, el poli(dGdC) permanece estable en las condiciones de trabajo. Se utilizaron los espectros de UV-vis para valorar el poli(dGdC)·poli(dGdC) con ZnCl₂, NiCl₂ y con EtOH, con el fin de realizar un estudio comparativo de estos dos agentes que producen el cambio conformacional de la forma B a una forma de la familia de las Z (Z, Z* u otras).

Las medidas espectrofotométricas se hicieron con un espectrofotómetro UV-vis Shimadzu con portacubetas acoplado a un termostato con recirculación que permite mantener la temperatura constante ($\pm 0,1$ °C).

Las medidas de pH se hicieron con un pH metro Metrohm 713.

Tanto en las titulaciones del poli(dGdC) con los agentes promotores del cambio conformacional como en los experimentos cinéticos se sigue, inicialmente, el mismo procedimiento: en la cubeta de medida y en la de referencia se añade el medio de reacción –disolución acuosa de NaCl, para mantener la fuerza iónica y cacodilato sódico para mantener pH 7–. A continuación se añade en la cubeta de medida con una micropipeta un pequeño volumen de la disolución stock de poli(dGdC)·poli(dGdC) y en la cubeta de referencia el mismo volumen de agua ultrapura. Se termostata en el portacubetas. Termostatada la mezcla, se añade el volumen de disolución, también termostatada, del agente promotor del cambio conformacional (NiCl₂, ZnCl₂, AEDT o EtOH) que contiene cacodilato y NaCl para no modificar las condiciones de trabajo.

Los experimentos cinéticos se llevaron a cabo monitorizando la variación temporal de la absorbancia a una determinada longitud de onda a partir del momento en que se añade el agente promotor del cambio conformacional.

Las titulaciones de poli(dGdC) con los agentes promotores del cambio conformacional se hicieron mediante adiciones sucesivas de disolución de los mismos (pH 7 e $I = 0,1$ M). Para cada adición se obtienen varios espectros hasta comprobar que no se produce variación. Se repite el proceso hasta completar la titulación.

3.1.3 Resultados y discusión

Se investigó el cambio conformacional producido en el poli(dGdC)·poli(dGdC) por: i) metales divalentes, Ni (II) y Zn(II), haciendo uso de los cloruros correspondientes; y ii) un disolvente que produce la deshidratación del ADN, EtOH.

3.1.3.1 Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC) en presencia de NiCl₂

Algunos autores han comprobado que la transición B-Z en presencia de NiCl₂ está desfavorecida por la presencia de iones Cl⁻.⁴⁰⁸ Otros, a fuerza iónica 0,1 M ajustada con NaCl, no han observado la forma Z.³⁸⁹ Sin embargo, a fuerzas iónicas mucho más elevadas (1,6-1,7 M) han observado la transformación B-Z del poli(dGdC). Se ha valorado el poli(dGdC) con NiCl₂ para comprobar si en las condiciones de trabajo (pH = 7,0, T = 25,0 °C e I = 0,1 M) se produce la transición B-Z y, en ese caso, determinar el margen de concentraciones a las que tiene lugar el cambio conformacional.

Se han registrado los espectros de UV tras cada adición de NiCl₂ (figura 3.1.2) y se ha obtenido el espectro diferencial (figura 3.1.3) mediante tratamiento de datos. Los espectros diferenciales obtenidos para distintas concentraciones de NiCl₂ muestran un máximo a la longitud de onda de 295 nm, aproximadamente, y un mínimo a 250 nm. El punto isobéptico aparece en torno a 270 nm. La morfología de los espectros diferenciales obtenidos en la valoración de poli(dGdC) (figura 3.1.3), es típica del cambio conformacional B-Z promovido por Ni (II).³⁸⁹

Se ha representado la relación A_{295}/A_{260} obtenida en la valoración de poli(dGdC) frente a la concentración de Ni(II) (figura 3.1.4). El perfil es característico de una transición B-Z bifásica, lo que indica que la reacción tiene lugar en dos etapas.

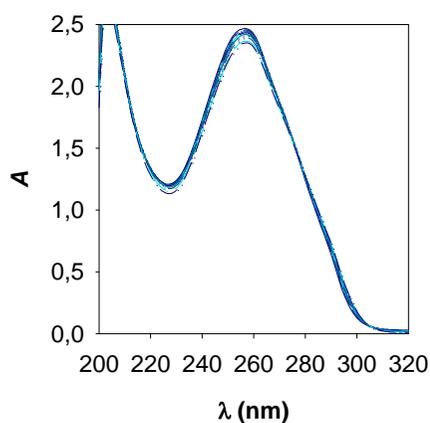


Figura 3.1.2. Espectros obtenidos para la valoración de poli con NiCl_2 . $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,33 \cdot 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NiCl}_2] = (0-2,26) \cdot 10^{-3}\text{ M}$.

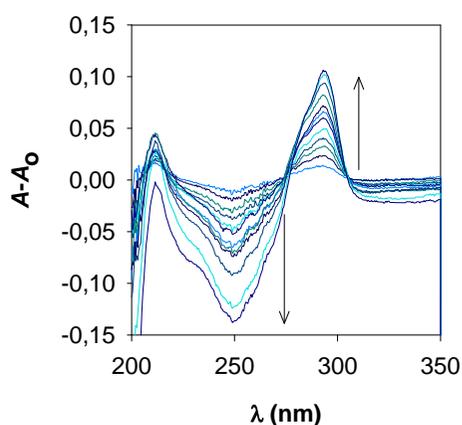


Figura 3.1.3. Espectros diferenciales obtenidos para la valoración de poli con NiCl_2 . $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,33 \cdot 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NiCl}_2] = (0-2,26) \cdot 10^{-3}\text{ M}$.

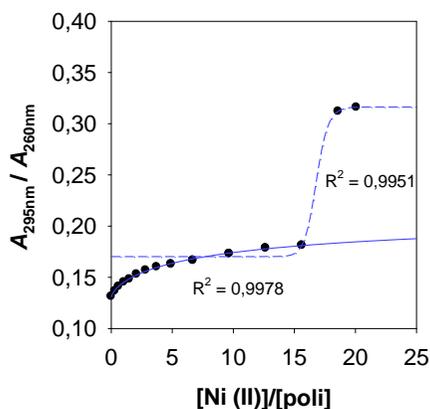


Figura 3.1.4. Variación de la relación $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ con la concentración de NiCl_2 . $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,33 \cdot 10^{-4}\text{ M}$.

La característica fundamental que distingue una transición de este tipo en la representación del cociente de absorbancias (A_{295}/A_{260}) es la existencia de:

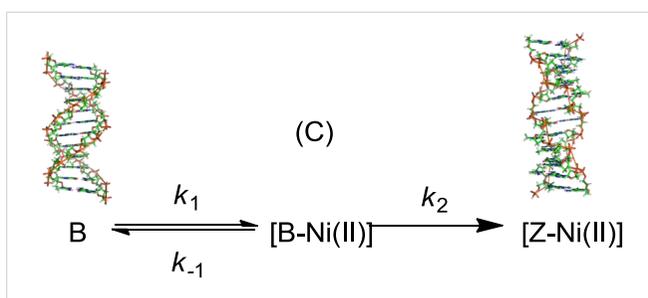
- i) Una primera meseta de pretransición que para algunos metales divalentes corresponde a una proporción de absorbancias en torno a 0,20 (0,17 para Ni(II)). Esta meseta se ha asociado a la formación de un complejo catión metálico-

polinucleótido estable, conformación C,³⁷³ que se diferencia de la B en el número de bases por giro, el enrollamiento.⁴²⁷

ii) La aparición de una segunda meseta que presenta una relación de absorbancias A_{295}/A_{260} característica, 0,3-0,4, (0,32 para Ni(II)).⁴¹⁹ Esta segunda meseta corresponde a la completa conversión del poli(dGdC) a la forma Z.

Los resultados obtenidos sugieren que, en las condiciones de trabajo (pH 7, 25,0 °C y fuerza iónica 0,1 M) el poli(dGdC) experimenta un cambio conformacional B-C-Z con la adición de NiCl₂. Los espectros de DC obtenidos en la titulación del poli(dGdC) con NiCl₂ corroboran que, para la segunda meseta de la figura 3.1.4, el poli(dGdC) se encuentra en conformación Z.

En las condiciones de estudio se ha propuesto el siguiente esquema para el cambio conformacional B-Z.



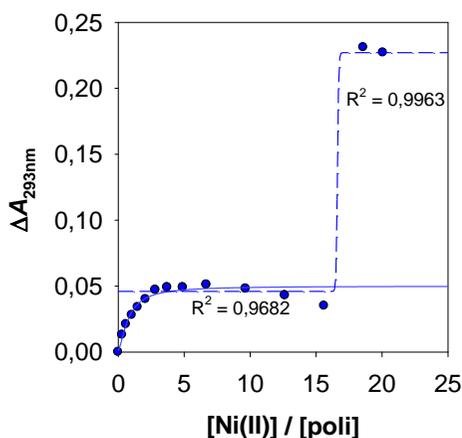
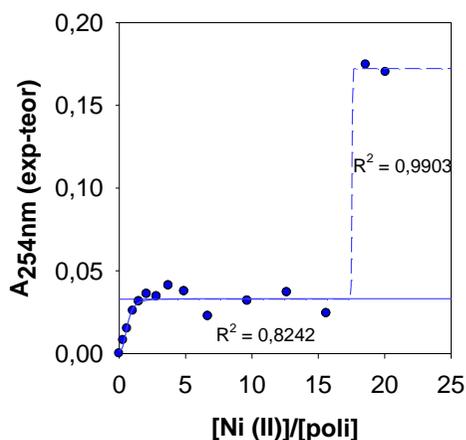
Esquema 3.1.1. Reacciones involucradas en el cambio conformacional B-Z promovido por la presencia de Ni(II).

La tabla 3.1.3 muestra los intervalos de Ni(II)/poli(dGdC) en que se producen las transiciones B-C y C-Z. El cambio conformacional B-C tiene lugar de forma poco cooperativa. Sin embargo, el cambio conformacional C-Z se produce en un intervalo Ni(II)/poli(dGdC) muy pequeño, lo que indica que el proceso es muy cooperativo. Los valores obtenidos por nosotros son coherentes con los obtenidos a 37,0 °C por otros autores (tabla 3.1.3). El aumento de la temperatura facilita el cambio conformacional.

Tabla 3.1.3. Intervalos de proporciones molares Ni(II)/poli para los que tienen lugar la transición B-C-Z.

<i>T</i> (°C)	Ni(II)/poli*	
	B-C	C-Z
37,0 ^a	0-3,4	3,4-5,2
25,0	0-16,1	16,1-19,6

*Proporciones molares; a: Ref.:419

**Figura 3.1.5.** Variación de la absorbancia a 293 nm con la concentración de NiCl₂. *T* = 25,0 °C; pH = 7,0; *I* = 0,1 M (NaCl); [poli]₀ = 1,33 · 10⁻⁴ M.**Figura 3.1.6.** Variación de la absorbancia a 254 nm con la concentración de NiCl₂. *T* = 25,0 °C; pH = 7,0; *I* = 0,09 M (NaCl); [poli]₀ = 1,33 · 10⁻⁴ M.

Se han representado: i) la variación de absorbancia en 293 nm para cada concentración de NiCl₂ ($\Delta A_{293\text{nm}}$ (figura 3.1.5)) y ii) la diferencia de absorbancias en 254 nm, experimental y teórica corregida, para la dilución correspondiente ($A_{254\text{nm}}(\text{exp-teor})$ (figura 3.1.6)).

Las curvas obtenidas son análogas a las encontradas utilizando el cociente $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ (figura 3.1.4). Por lo tanto, el seguimiento del cambio conformacional B-Z puede realizarse a otras longitudes de onda.

3.1.3.1.1 El equilibrio de asociación

Se sabe que el Ni(II) se puede unir a dos posiciones en el ADN, la N7 de la guanina y los grupos fosfato. Al representar la variación de absorbancia $\Delta A_{293\text{nm}}$ frente a la concentración de NiCl₂ (figura 3.1.5), se observa que, a concentraciones bajas ($[\text{NiCl}_2] < 1,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$) tiene la forma esperada para un equilibrio de asociación cuya constante se obtiene de forma sencilla a partir de estos datos.³⁸⁹ Este mismo comportamiento fue observado por Schoenknecht *et al.* al estudiar el cambio conformacional producido por el ion Ni(II) en el poli(dG-dC) a diferentes fuerzas iónicas.³⁸⁹

La expresión para la constante de asociación para cualquier metal (M) viene dada por la siguiente expresión:

$$K_a = \frac{[\text{MS}]}{[\text{M}^{2+}][\text{S}]} \quad (3.1.1)$$

donde $[\text{M}^{2+}]$ es la concentración del metal y $[\text{S}]$ la concentración de sitios de asociación o unión del polinucleótido. K_a , según el mecanismo propuesto (esquema 3.1.1), se puede definir también como:

$$K_a = k_1 / k_{-1} \quad (3.1.2)$$

Si el proceso de asociación se describe como enlace a una sola clase de sitios independientes, la constante se puede obtener a partir de la expresión de Benesi-Hildebrand, utilizable cuando $[\text{M}^{2+}]_0 \gg [\text{S}]_0$:

$$\frac{[\text{M}^{2+}]_0}{\Delta A} = \frac{1}{K_a \Delta A_0} + \frac{[\text{M}^{2+}]_0}{\Delta A_0} \quad (3.1.3)$$

Para una fuerza iónica $I = 0,1 \text{ M}$ siguiendo la reacción en el intervalo $\lambda = 260\text{-}310 \text{ nm}$ la variación de absorbancia es acorde con un proceso de unión simple.³⁸⁹ Así se obtiene el valor de la constante de asociación (figura 3.1.7) a partir de la ordenada en el origen: $K_{a \text{ Ni}} = (3,4 \pm 0,4) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ($T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 7,0$).

Su valor es del orden de los bibliográficos y mayor que el encontrado a 20,0 °C, como era esperable (tabla 3.1.4).

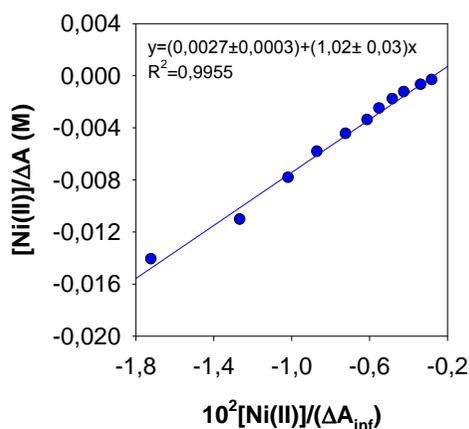


Figura 3.1.7. Obtención de la constante de binding del poli(dGdC) por NiCl₂. $T = 25,0$ °C; pH = 7,0; $I = 0,1$ M (NaCl).

Tabla 3.1.4. Valores de la constante de asociación aparente obtenida para el binding del ion Ni²⁺ para la forma B del poli(dGdC).

T (° C)	I (M)	$10^{-3}K_a$ (M ⁻¹)
20,0 ^a	0,001	1600 ± 500
	0,01	550 ± 120
	0,1	2,0 ± 0,1
25,0	0,09	3,4 ± 0,4

a: Ref. 389; pH = 7,0; $T = 20,0$ °C.

3.1.3.1.2 Cambio conformacional B-Z

En las condiciones de trabajo la transición B-Z del poli(dGdC) se produce a 25,0 °C para una fuerza iónica $I = 0,1$ M, próxima a la fisiológica (0,12-0,26 M).^{371,428} Schoenknecht *et al.* en su trabajo realizado en condiciones próximas a las utilizadas por nosotros (pH 7,0 y fuerza iónica 0,1 M) a excepción de la temperatura, 20 °C, observaron unión de Ni(II) con el poli(dGdC) pero no el cambio conformacional B-Z posterior.³⁸⁹ Se puede afirmar así que el efecto de la temperatura es fundamental en el estudio de las transiciones B-Z.

De acuerdo con el mecanismo planteado para el cambio conformacional mediado por NiCl_2 (esquema 3.1.1), la constante observada, $k_{\text{obs Ni}}$, para ese cambio viene dada por la siguiente expresión:

$$k_{\text{obs Ni}} = \frac{K_a k_2 [\text{Ni(II)}]}{1 + K_a [\text{Ni(II)}]} \quad (3.1.4)$$

Se ha seguido cinéticamente la reacción de transformación B-Z del poli(dGdC) en presencia de NiCl_2 . La figura 3.1.8 muestra la variación de los espectros UV-vis a lo largo del tiempo. Se aprecian dos puntos isobésticos bien definidos a 221 y 267 nm. El perfil cinético a 295 nm (figura 3.1.9) muestra un cambio conformacional B-Z particularmente lento que requiere más de dos días para alcanzar la meseta. La constante de velocidad observada para el cambio conformacional B-Z a 25,0 °C, pH 7,0 e $I = 0,1 \text{ M}$ es $k_{\text{obs Ni}} = (1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

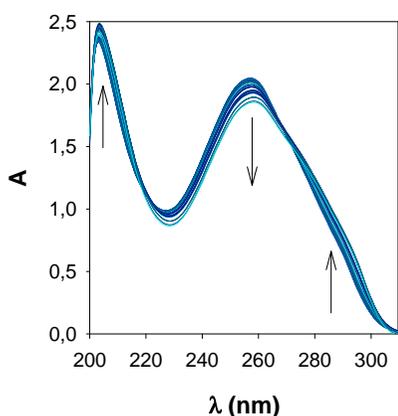


Figura 3.1.8. Variación temporal de los espectros UV-visible para la transición B-Z con NiCl_2 . $T = 25,0 \text{ °C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,16 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{NiCl}_2] = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

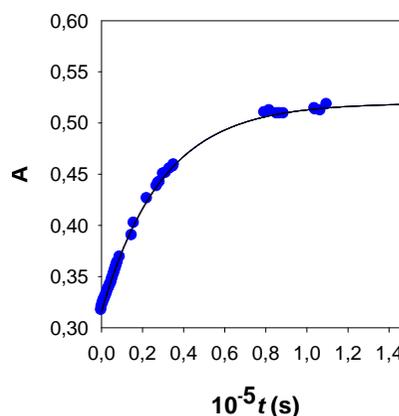


Figura 3.1.9. Perfil cinético de la reacción de conversión B-Z del poli(dG-dC) con NiCl_2 . $T = 25,0 \text{ °C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,16 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{NiCl}_2] = 1,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Conocidas $k_{\text{obs Ni}}$ y la constante de asociación, K_a , en las condiciones de trabajo puede estimarse el valor de $k_{2\text{Ni}}$.

$$k_{2 \text{ Ni}} = \frac{k_{\text{obs Ni}} (1 + K_a[\text{Ni(II)}])}{K_a[\text{Ni(II)}]} \quad (3.1.5)$$

$$k_{2 \text{ Ni}} = (1,63 \pm 0,2) \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \quad (3.1.6)$$

3.1.3.1.3 Efecto de la temperatura en la conformación Z del poli(dGdC)· en presencia de NiCl₂

Finalizado el cambio conformacional B-Z, se investigó el efecto de la temperatura en la forma Z del poli(dGdC) en el intervalo 25,0-65,0 °C mediante espectroscopia UV-vis. Se utilizaron incrementos de temperatura $\Delta T = 5,0$ °C.

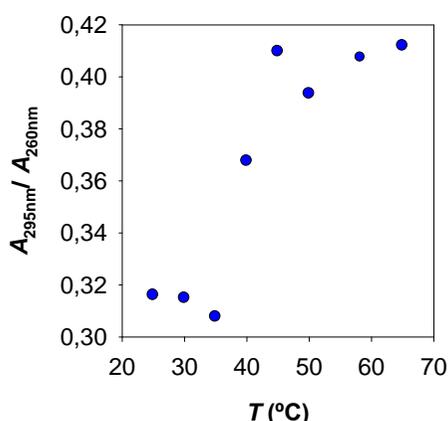


Figura 3.1.10. Variación del cociente de absorbancias $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ con la temperatura. $I = 0,1$ M (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,16 \cdot 10^{-4}$ M; $[\text{NiCl}_2] = 1,8 \cdot 10^{-3}$ M;

La figura 3.1.10 muestra la evolución del cociente $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, con la temperatura. En el intervalo $T = 25,0$ - $35,0$ °C, ese cociente permanece constante, $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}} = 0,32$, lo que indica que el poli(dGdC)·poli(dGdC) mantiene la conformación Z. Entre 35,0 y 45,0 °C se produce un aumento significativo del cociente $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ y a 45,0 °C alcanza una meseta. El aumento del cociente se ha atribuido a la unión de iones Ni(II) al poli(dGdC) en conformación Z, facilitada por la temperatura.

La muestra se sometió a cada temperatura hasta que no se observaba variación en el espectro.

3.1.3.2 Estudio del cambio conformacional del poli(dGdC) en presencia de EtOH

Se ha investigado el cambio conformacional B-Z del poli(dGdC)·poli(dGdC) mediado por EtOH mediante espectroscopia UV-Vis (figura 3.1.11). El hecho de que el EtOH induzca la transición B-Z sugiere que es capaz de modificar el estado de hidratación del ADN y, consecuentemente, de influir en la cinética de la transición y en la estructura del producto resultante.

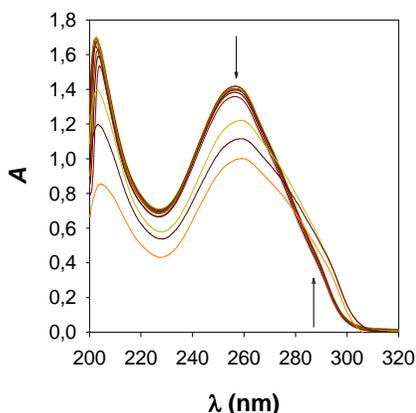


Figura 3.1.11. Espectros obtenidos para la titulación de poli(dG-dC) con EtOH. EtOH (v:v) 0-56%; $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 8,43 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

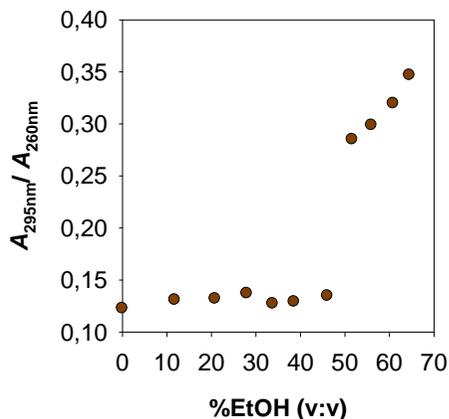


Figura 3.1.12. Relación de absorancias $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ obtenidas en la titulación de poli(dGdC) con EtOH. $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 8,43 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

La valoración del poli(dGdC) se hizo con EtOH (figura 3.1.12), encontrándose que, en las condiciones de trabajo, la concentración de EtOH en el punto medio de la transición B-Z es 46,1% (v:v). La figura 3.1.12 revela la gran cooperatividad del cambio conformacional B-Z en presencia de etanol. Una vez se ha producido el cambio de conformación B-Z (46,1% EtOH), se observa que una adición ulterior de EtOH produce aumento progresivo de la relación $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$, asociado al cambio conformacional entre las conformaciones Z del

poli(dGdC), Z-Z* (figura 3.1.12).⁴²⁹ La adición de EtOH al poli(dGdC) produce una transición B-Z-Z* confirmada mediante los espectros de dicroísmo circular.

3.1.3.2.1 Estudio cinético del cambio conformacional B-Z mediado por etanol.

Se ha realizado el estudio cinético del cambio conformacional B-Z a 25,0 °C. Se ha seguido la evolución temporal del espectro (figura 3.1.13) y se ha monitorizado la variación de la relación $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ (figura 3.1.14).

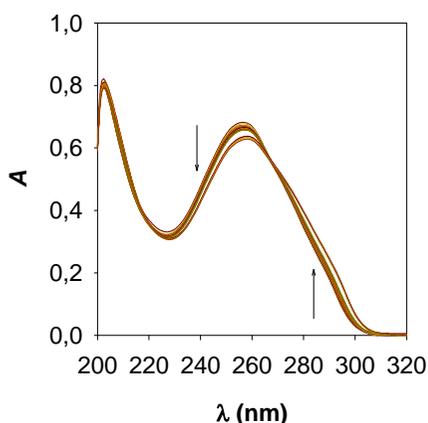


Figura 3.1.13. Evolución temporal de los espectros obtenidos para la valoración de poli(dG-dC) con 46,1% EtOH (v:v). $T = 25,0\text{ °C}$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 8,43 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

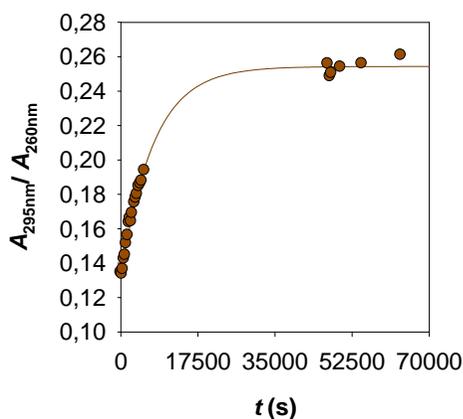


Figura 3.1.14. Perfil cinético de la reacción del poli(dGdC) en presencia de 46,1% EtOH (v:v). $T = 25,0\text{ °C}$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 8,43 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

La reacción es lenta y alcanza la meseta después de 1 día (figura 3.1.14). La constante de velocidad observada ha sido: $k_{\text{obs EtOH}} = (1 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$, acorde con el bibliográfico para el cambio conformacional del polinucleótico metilado, poli(dG-m⁵dC), $(1,69 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ en condiciones de trabajo similares a las nuestras ($I = 0,10\text{ M}$ (NaCl), $\text{pH} = 7,0$, $T = 25,0\text{ °C}$). El cambio conformacional para el poli(dG-m⁵dC) se produce para un porcentaje de EtOH menor (16 % v:v) y a mayor velocidad. Es lógico, puesto que la metilación del polinucleótido facilita el cambio conformacional.

En la tabla 3.1.5 se recogen las concentraciones de EtOH requeridas en distintas condiciones para que se produzca el cambio conformacional B-Z.

Tabla 3.1.5. Concentraciones de etanol (%vol.) correspondientes al punto medio de la transición B-Z obtenidas con diferentes sales metálicas y condiciones.

% vol. EtOH	Sal	[sal] (M)	[poli] (μM)	Tampón	[Tampón] (mM)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Ref.
46,1	NaCl	$9 \cdot 10^{-2}$	84,3	cacodilato	1	25	a
50	-	-	50-150	fosfato	1	20	378
48	MgCl ₂	0,66	40-50	-	-	20-25	429
20	MgCl ₂	$3,5 \cdot 10^{-4}$	40-50	hepes	10	20-25	429

a Este trabajo.

Los resultados ponen de manifiesto que la presencia de sales facilita el cambio conformacional B-Z mediado por EtOH.

3.1.3.3 Efecto de la temperatura en la conformación Z* del poli(dGdC) en presencia de EtOH

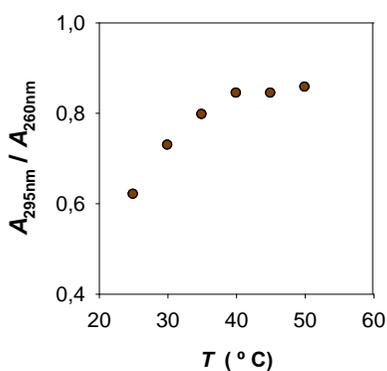


Figura 3.1.15. Variación de $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ en la titulación de poli(dGdC) con EtOH. $[\text{poli}]_0 = 8,43 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl); EtOH 65% v:v.

Se ha estudiado la influencia de la temperatura en la estructura del polinucleótido en presencia de EtOH una vez se ha comenzado a generar la forma Z*. Se ha sometido a temperaturas crecientes comprobando que la formación de

Z^* se ve favorecida hasta alcanzar los 40 °C. De 40 a 50 °C no se observa ninguna variación significativa en el cociente de absorbancias, no se producen cambios conformacionales del poli(dGdC) y la forma Z^* permanece estable.

3.1.3.4 Estudio cinético espectrofotométrico de la reacción del poli(dGdC) en presencia de $ZnCl_2$.

A continuación se describe el efecto del catión $Zn(II)$ sobre el cambio conformacional B-Z.

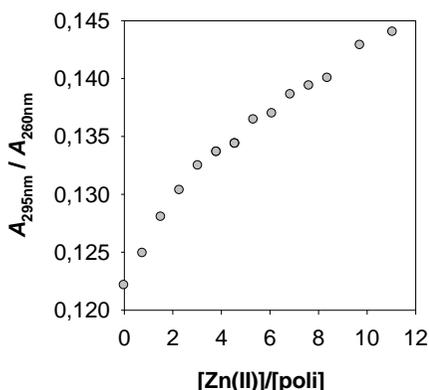


Figura 3.1.16. Curva obtenida para la valoración de poli(dG-dC) con $ZnCl_2$. $T=25,0$ °C; $pH=7,0$; $I = 0,1$ M (NaCl); $[poli]_0=9,32 \cdot 10^{-5}$ M.

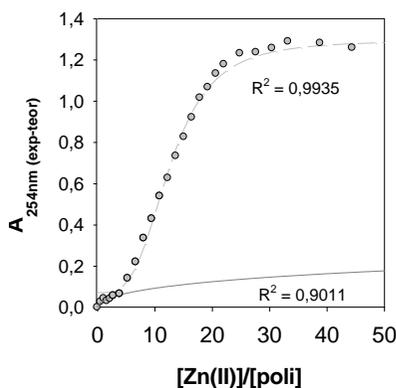
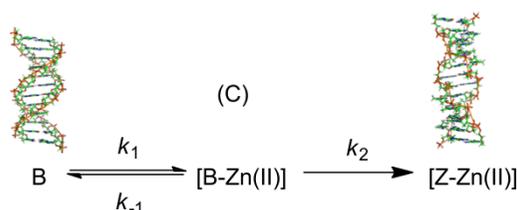


Figura 3.1.17. Curva obtenida para la valoración de poli(dG-dC) con $ZnCl_2$. $T = 25,0$ °C; $pH=7,0$; $I = 0,1$ M (NaCl); $[poli]_0 = 1,33 \cdot 10^{-5}$ M.

Para comprobar que el cloruro de zinc produce un cambio conformacional en el polinucleótido sintético poli(dGdC), se hizo la titulación del polinucleótido sintético con $ZnCl_2$ en las mismas condiciones en que se estudió el cambio conformacional mediado por $NiCl_2$ ($pH 7,0$, $I = 0,1$ M y $T = 25,0$ °C). En dos experimentos independientes se comprobó que la curva de valoración del poli(dGdC) con $ZnCl_2$ es bifásica (figura 3.1.16 y figura 3.1.17) lo que sugiere la formación de dos conformaciones diferentes, dependiendo de la concentración de sal. Al representar A_{295nm}/A_{260nm} frente a $[Zn(II)]$ (figura 3.1.16), se observa que los valores obtenidos para la primera meseta (0,135) son inferiores a los

observados con otros metales divalentes (0,180), lo que sugiere que las conformaciones adoptadas son diferentes.³⁸⁹

Los espectros de dicroísmo circular en las condiciones de cada una de las mesetas demuestran que la primera de ellas corresponde a una conformación de la familia de las B y la segunda con una de la familia de las Z. Tanto los espectros de dicroísmo circular como los de UV-vis sugieren que la conformación Z adoptada en presencia de $ZnCl_2$ es diferente de la conformación Z clásica. Así se ha propuesto el siguiente mecanismo para el cambio conformacional B-Z mediado por $Zn(II)$ en las condiciones de trabajo:



Esquema 3.1.2. Reacciones involucradas en el cambio conformacional B-Z promovido por la presencia de $Zn(II)$.

Se investigó también el efecto de la adición de $ZnCl_2$ en proporciones muy elevadas. Para facilitar los cambios que se pudiesen producir se trabajó a $35,0\text{ }^\circ\text{C}$, observando que adiciones sucesivas de esta sal producen dos cambios conformacionales adicionales a los detectados a $25,0\text{ }^\circ\text{C}$ (figura 3.1.18).

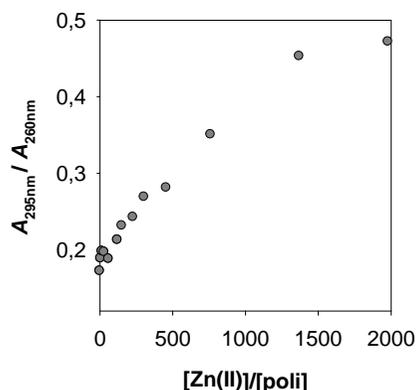


Figura 3.1.18. Curva obtenida para la valoración de poli(dG-dC) con $ZnCl_2$. $T = 35,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = 1,46 \cdot 10^{-5}\text{ M}$;

3.1.3.4.1 Estudio cinético del cambio conformacional B-Z mediado por ZnCl_2

A continuación, se investigó, mediante espectroscopia UV-vis, la conversión del poli(dGdC) desde la forma dextrógira a la levógira en las siguientes condiciones: a) a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$: i) en presencia de distintas concentraciones de ZnCl_2 ; y ii) en una mezcla de ZnCl_2 y EtOH; b) A $T = 35,0^\circ\text{C}$ en presencia de ZnCl_2 para obtener la configuración asociada al cociente $A_{295\text{nm}}/A_{260\text{nm}} = 0,47$ (figura 3.1.18) que se ha comprobado por espectroscopia de dicroísmo circular que corresponde a otra forma de la familia de las Z.

La figura 3.1.19 muestra, a modo de ejemplo, uno de los perfiles cinéticos obtenidos, junto con el ajuste. Teniendo en cuenta el mecanismo propuesto (esquema 3.1.2) la constante de velocidad observada es:

$$k_{\text{obs Zn}} = \frac{K_{\text{aZn}} k_{2\text{Zn}} [\text{Zn(II)}]}{1 + K_{\text{aZn}} [\text{Zn(II)}]} \quad (3.1.7)$$

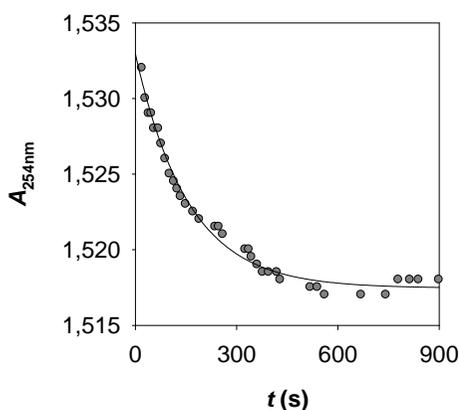


Figura 3.1.19. Perfil cinético obtenido para el cambio conformacional B-Z en presencia de ZnCl_2 . $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; $I = 0,01\text{ M}$ (NaCl); $[\text{ZnCl}_2] = 1,2 \cdot 10^{-3}\text{ M}$; $[\text{poli}]_0 = 9,32 \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

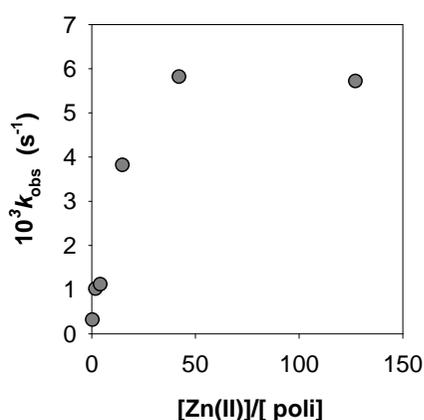


Figura 3.1.20. Influencia de la proporción $[\text{Zn(II)}]/[\text{poli}]$ en la constante observada para el cambio conformacional B-Z. $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7$; $I = 0,1\text{ M}$ (NaCl); $[\text{poli}]_0 = (9,00-9,32) \cdot 10^{-5}\text{ M}$.

En la tabla 3.1.6 se recogen los valores obtenidos para las constantes observadas con distintas concentraciones de ZnCl_2 .

Tabla 3.1.6. Constantes observadas, k_{obs} , para el cambio conformacional B-Z del poli(dGdC) promovido por $ZnCl_2$.

$[Zn(II)]/[poli]$	$10^3 k_{obs Zn}$ (s^{-1})	$10^5 [poli]$ (M)	$10^4 [ZnCl_2]$ (M)
0,76	$0,30 \pm 0,05$	8,43	0,643
2,23	$1 \pm 0,1$	13,02	2,91
4,57	$1,1 \pm 0,3$	8,25	3,77
15,24	$3,8 \pm 0,5$	11,65	17,75
42,54	$5,8 \pm 0,9$	9,32	39,64
127,61	$5,7 \pm 0,3$	9,32	118,93

$pH = 7,0; I = 0,01 M.$

Para concentraciones elevadas de $Zn(II)$ k_{obs} no varía. Para dichas concentraciones. Considerando la ecuación (3.1.7): $1 + K_{aZn}Zn(II) = K_{aZn}Zn(II)$, quedando reducida la expresión a la siguiente:

$$k_{obs Zn} = k_{2Zn} \quad (3.1.8)$$

En las condiciones de trabajo ($pH = 7,0, I = 0,1 M, T = 25,0 \text{ }^\circ C$) $k_{2Zn} = (5,7 \pm 0,3) 10^{-3} s^{-1}$. El cambio conformacional mediado por $Zn(II)$ se produce cien veces (aprox.) más rápidamente que el mediado por $Ni(II)$.

Con la ecuación (3.1.7) se podría obtener el valor de K_a , conociendo k_{obsZn} . Debido al elevado error asociado a las constantes más pequeñas, optamos por utilizar la ecuación de Benesi-Hildebrand (Ec.(3.1.3)). Con ella, a partir de los valores de la pendiente y la ordenada en el origen obtenidas ((Ec.(3.1.9), figura 3.1.21), se encuentra que $K_{aZn} = (2,8 \pm 0,2) 10^3 M^{-1}$. La constante de asociación del $Zn(II)$ al poli(dGdC) para formar el complejo $[B-Zn]$ es menor que la correspondiente al $Ni(II)$, aunque las dos son del mismo orden de magnitud.

$$\frac{[M^{2+}]_o}{\Delta A} = (45 \pm 3) + (0,0162 \pm 0,0009)[M^{2+}]_o \quad (3.1.9)$$

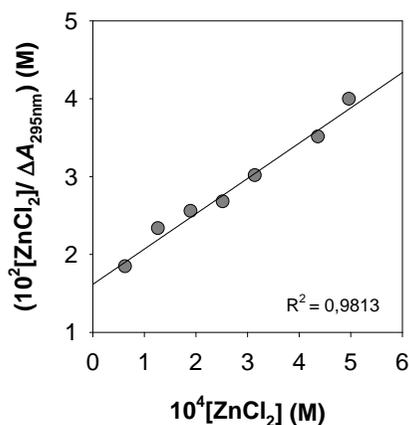


Figura 3.1.21. Diagrama de Benesi-Hildebrand.
 $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 7,0$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl);
 $[\text{ZnCl}_2] = 1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{poli}]_0 = 9,32 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Se ha investigado el efecto de la adición conjunta de etanol (46,1% v:v) y Zn(II) en la cinética del cambio conformacional B-Z y el efecto de la temperatura. Las formas Z obtenidas tienen conformaciones diversas a la forma Z obtenida a $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla 3.1.7. Valores de las constante observada del cambio conformacional B-Z en presencia de diferentes agentes y a distintas temperaturas.

T ($^\circ\text{C}$)	Agente promotor del cambio conformacional	$10^3 k_{\text{obs}}$ (s^{-1})	$[\text{Zn(II)}]/[\text{poli}]$	EtOH % (v:v)
25,0 $^\circ\text{C}$	Zn (II)	$5,7 \pm 0,3$	119	-
	EtOH	$0,1 \pm 0,01$	-	46,1
	Zn (II) + EtOH	$11,8 \pm 0,1$	119	46,1
35,0 $^\circ\text{C}$	Zn (II)	$1,30 \pm 0,03$	1500	-

$\text{pH} = 7,0; I = 0,1 \text{ M}$.

El cambio conformacional B-Z en presencia de la mezcla (Zn(II)+EtOH) es el más favorecido en comparación con los procesos que transcurren con uno solo de los dos agentes. El menos favorecido es el cambio conformacional en presencia de EtOH.

A 35,0 °C, en presencia de Zn(II), incluso con proporciones $[Zn(II)]/[poli]$ mayores que a 25,0 °C el cambio conformacional no se ve tan favorecido como a esta temperatura.

3.1.3.5 Efecto de la temperatura en la conformación Z del poli(dGdC) en presencia de $ZnCl_2$

Mediante espectroscopia UV-vis se investigó la estabilidad de la conformación Z con la temperatura en el intervalo $T = 25,0-60,0$ °C. La muestra, en conformación Z en presencia de Zn(II), se sometía a cada temperatura hasta que no se observaba variación en el espectro. Se trabajó con saltos de temperatura $\Delta T = 5,0$ °C.

La figura 3.1.22 muestra la evolución de A_{295nm}/A_{260nm} , con la temperatura. En el intervalo $T = 25,0-30,0$ °C no se observan variaciones significativas. Sin embargo, a partir de 35,0 °C se produce una variación en A_{295nm}/A_{260nm} indicadora de un cambio conformacional. A 35,0 °C los espectros obtenidos muestran puntos isobéuticos que reflejan la existencia de un equilibrio. La conformación adquirida a esa temperatura es inestable como refleja el aumento del cociente A_{295nm}/A_{260nm} con el aumento de la temperatura.

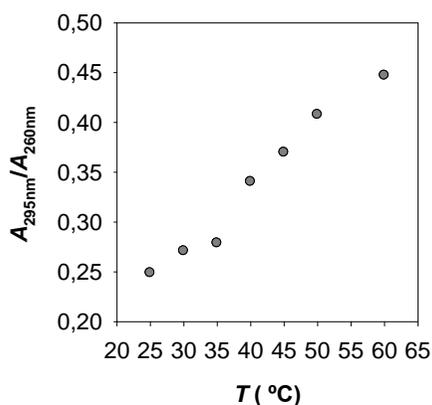


Figura 3.1.22. Variación del cociente de absorbancias A_{295nm}/A_{260nm} con la temperatura. pH = 7,0; $I = 0,1$ M (NaCl); $[poli]_0 = 1,46 \cdot 10^{-5}$ M;

3.1.3.5.1 Estudio cinético del cambio conformacional Z-B mediado por AEDT

El retorno de la forma Z del ADN obtenida en presencia de Zn (II), a la forma B original, se estudió mediante adición de un exceso de AEDT, que compleja el metal. Se ha centrado la atención en los cambios conformacionales Z-B tanto de la forma Z originada a 25,0 °C como de la generada a 35,0 °C. Se muestran a modo de ejemplo las cinéticas obtenidas para los cambios conformacionales B-Z y Z-B a 35,0 °C (figura 3.1.23 y figura 3.1.24).

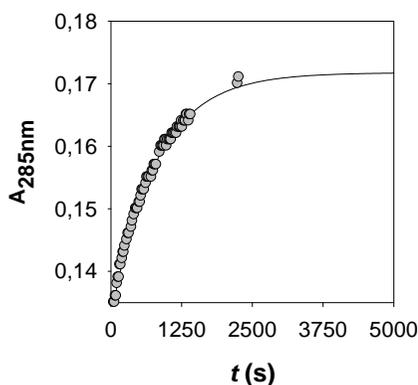


Figura 3.1.23. Perfil cinético para el cambio conformacional B-Z en presencia de ZnCl₂. $T = 35,0$ °C; pH = 7,0; $I = 0,1$ M (NaCl); $[ZnCl_2] = 8,7 \cdot 10^{-3}$ M; $[poli]_0 = 6,50 \cdot 10^{-6}$ M.

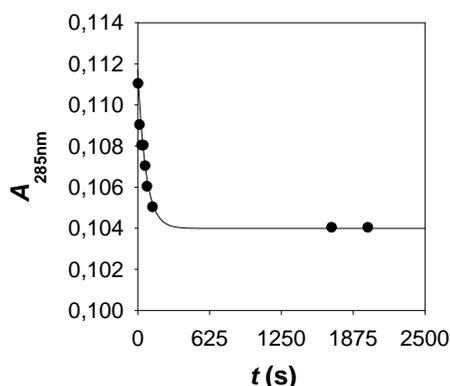


Figura 3.1.24. Perfil cinético para el cambio conformacional Z-B en presencia de ZnCl₂ y AEDT. $T = 35,0$ °C; pH = 7; $I = 0,1$ M (NaCl); $[ZnCl_2] = 5,8 \cdot 10^{-3}$ M; $[poli]_0 = 4,33 \cdot 10^{-6}$ M; $[AEDT] = 2,6 \cdot 10^{-2}$ M.

Los valores de las constantes observadas para el cambio conformacional Z-B son mayores que las asociadas al cambio B-Z (tabla 3.1.8). Estos resultados son acordes con los parámetros de activación obtenidos para ambos procesos con el polinucleótido metilado.⁴³⁰ La energía libre de activación asociada al proceso B-Z es mayor que la del cambio conformacional inverso.

Tabla 3.1.8. Constantes observadas para el cambio conformacional Z-B a diferentes temperaturas.

T (°C)	$10^3 k_{obs}$ (s ⁻¹)	$[Zn(II)]/[poli]$
25,0	$8,7 \pm 1,5$	119
35,0	$14,3 \pm 1,8$	1500

$pH = 7,0; I = 0,1$ M.

3.1.3.5.2 Efectividad de los iones Ni(II) y Zn(II) para inducir el cambio conformacional B-Z

La habilidad de inducir el cambio conformacional B-Z, aumenta en el siguiente orden: Na < Mg < Ni < Mn < Zn.^{376,389,419,431} El papel de Na(I) y Mg(II) es esencialmente de naturaleza electrostática, la nube iónica de carga positiva envolvente del esqueleto del ADN reduce la repulsión entre los iones fosfato adyacentes, en dirección vertical, más eficientemente en la forma Z que en la B (estabiliza la forma Z).⁴¹¹⁻⁴¹⁷ Sin embargo, en presencia de concentraciones elevadas de sal sódica, la interacción electrostática es baja y se requieren elevadas concentraciones de sal de magnesio, mientras que cantidades ínfimas de Ni(II), Zn(II) y Mn(II) son suficientes para promover la transición.^{387,389} La elevada eficiencia de estos últimos iones no puede explicarse en términos electrostáticos, pues será similar para Mg(II). El aumento de la eficiencia podría estar relacionado con su capacidad para formar quelatos con algunos sitios de reacción del ADN, fosfatos y la posición N7 de las purinas con estos metales. La estabilidad de los quelatos no explica los resultados obtenidos, ya que, si esto fuese así, el ión Ni(II) que da lugar a enlaces más fuertes que Zn (II), sería el promotor más eficiente.⁴³² Otro factor que podría explicar la tendencia observada experimentalmente, es la labilidad de los cationes, la rapidez con que el catión es capaz de expulsar una molécula de agua de su esfera de coordinación interna para albergar el complejo formado con un sitio del ADN y expresada como el tiempo de permanencia del agua en la esfera de coordinación. Este factor se descarta porque el tiempo de permanencia del agua para el ión $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (10^{-5} s) es menos eficiente que para $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ (10^{-4} s). El más lábil es $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ que es menos eficiente que el menos lábil, $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$.⁴³³ La energía de hidratación de los cationes –habilidad para modular el estado de hidratación del sistema– puede ser un factor crucial. La relevancia de este factor es evidenciada por el efecto positivo del etanol. En el proceso de transferencia del catión desde el agua a la superficie hidrófoba del ADN, se encuentra implicado un proceso de deshidratación. En la tabla 3.1.9 que muestra las entalpías de hidratación de los iones (ΔH_{hydr}) se observa que toman

valores negativos para todos los cationes,⁴³⁴ lo que indica que el proceso opuesto, de deshidratación está desfavorecido energéticamente, en particular para Ni(II), que presenta el mayor valor en términos absolutos. La secuencia de los valores ΔH_{hidr} es paralela a la secuencia de inducción del proceso B-Z.

Tabla 3.1.9. Entalpías de hidratación para el proceso de hidratación de los tres metales considerados, Ni(II), Zn(II) y Mn (II).⁴³⁴

ΔH_{hidr} (kJ mol ⁻¹)		
Ni(II)	Zn(II)	Mn(II)
-2106	-2044	-1845

3.1.4 Conclusiones

El estudio cinético del cambio conformacional B-Z inducido por iones metálicos divalentes (Zn(II) y Ni(II)) y por etanol ha conducido a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que la mezcla etanol/ión metálico induce la transición de B-Z de forma más eficaz que cada promotor (EtOH y ión metálico) por separado. El efecto sinérgico es debido al hecho de que los promotores por separado inducen la transición B-Z del poli(dG-dC)-poli(dG-dC) mientras que la mezcla (EtOH/ión metálico) produce una forma agregada de las familias de las Z.
2. El estudio del efecto de la temperatura en el cambio conformacional del ADN promovido por Ni(II) y Zn(II) muestra que la transición del poli(dG-dC)-poli(dG-dC) de la forma B, dextrógira, a la Z, levógira o a la forma agregada Z* depende de la temperatura que actúa como factor selectivo respecto a los tres procesos.
3. Las tres estructuras (B, Z y Z*) muestran diferentes relaciones de absorbancias a 295 y 260 nm. $A_{295}/A_{260} = 0,12$ para la forma B, 0,32 para la forma Z y en torno a 0,8 e incluso mayor para la forma Z*. Estas diferencias permiten determinar la forma que prevalece en unas determinadas condiciones por un simple análisis mediante espectroscopia UV.
4. En el proceso de transferencia del catión desde el agua a la superficie hidrófoba del ADN, se encuentra implicado un proceso de deshidratación que explica la tendencia de las eficiencias de los iones observadas en este trabajo para la inducción del proceso B-Z.

4

Bibliografía

- (1) Ross, W. C. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, *68*, 669.
- (2) Ross, W. C. J. *Biological alkylating agents: fundamental chemistry and the design of compounds for selective toxicity*; Cancer Monograph; Butterworths: London, 1962.
- (3) Guliaev, A. B.; Singer, B. In *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Editors-in-Chief: William, J. L., Lane, M. D., Eds.; Elsevier: New York, 2004, p 609.
- (4) Price, C. C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1958**, *68*, 663.
- (5) Miller, E. C.; Miller, J. A. *Pharmacol. Rev.* **1966**, *18*, 805.
- (6) Hemminki, K. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 2007.
- (7) DeVita, V. T.; Chu, E. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 8643.
- (8) Auerbach, C. *Hereditas* **1949**, *35*, 128.
- (9) Hosseini-khalili, A.; Haines, D. D.; Modirian, E.; Soroush, M.; Khateri, S.; Joshi, R.; Zendeheel, K.; Ghanei, M.; Giardina, C. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2009**, *678*, 1.
- (10) Ehrenberg, L.; Hussain, S. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1981**, *86*, 1.
- (11) Craig, C. R.; Stitzel, R. E. *Modern Pharmacology with Clinical Applications*; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 2003.
- (12) Arcangelo, V. P.; Peterson, A. M. *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 2011.
- (13) Block, S. S. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 2000.
- (14) Fraise, A.; Lambert, P. A.; Maillard, J. Y. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2008.
- (15) Lawley, P. D. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1974**, *23*, 283.
- (16) Dipple, A. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 437.
- (17) Guthrie, R. D.; Jencks, W. P. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 343.
- (18) Bartsch, H.; Terracini, B.; Malaveille, C.; Tomatis, L.; Wahrendorf, J.; Brun, G.; Dodet, B. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1983**, *110*, 181.
- (19) Gourdie, T. A.; Valu, K. K.; Gravatt, G. L.; Boritzki, T. J.; Baguley, B. C.; Wakelin, L. P. G.; Wilson, W. R.; Woodgate, P. D.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1177.
- (20) Beranek, D. T. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1990**, *231*, 11.
- (21) Mason, W. A.; Meloan, C. E. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 299.
- (22) Trams, E. G. *Anal. Chem.* **1958**, *30*, 256.
- (23) Tee, K. L.; Schwaneberg, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5380.
- (24) Doderer, K.; Lutz-Wahl, S.; Hauer, B.; Schmid, R. D. *Anal. Biochem.* **2003**, *321*, 131.
- (25) Zocher, F.; Enzelberger, M. M.; Bornscheuer, U. T.; Hauer, B.; Schmid, R. D. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *391*, 345.
- (26) Fishbein, L.; Cavanaugh, M. A. *J. Chromatogr. A* **1965**, *20*, 283.
- (27) Nelis, H. J. C. F.; Airy, S. C.; Sinsheimer, J. E. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 213.

- (28) Hooberman, B. H.; Chakraborty, P. K.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1993**, *299*, 85.
- (29) Eder, E.; Kutt, W.; Deininger, C. *Chem.-Biol. Interact.* **2006**, *164*, 76.
- (30) Eder, E.; Kutt, W. *Chem.-Biol. Interact.* **1989**, *69*, 45.
- (31) Eder, E.; Espinosa-Gonzalez, J.; Mayer, A.; Reichenberger, K.; Boerth, D. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 952.
- (32) Boffa, L. C.; Bolognesi, C.; Mariani, M. R. *Mutat. Res. Lett.* **1987**, *190*, 119.
- (33) Dickens, F.; Jones, H. E. *Br. J. Cancer* **1965**, *19*, 392.
- (34) Gates, K. S. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1747.
- (35) Drabløs, F.; Feyzi, E.; Aas, P. A.; Vaagbø, C. B.; Kavli, B.; Bratlie, M. S.; Peña-Diaz, J.; Otterlei, M.; Slupphaug, G.; Krokan, H. E. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1389.
- (36) van Sittert, N. J.; Boogaard, P. J.; Natarajan, A. T.; Tates, A. D.; Ehrenberg, L. G.; Törnqvist, M. A. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2000**, *447*, 27.
- (37) Fu, D.; Calvo, J. A.; Samson, L. D. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 104.
- (38) Hemminki, K. *Arch. Toxicol.* **1983**, *52*, 249.
- (39) Loechler, E. L. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 277.
- (40) Spears, C. P.; Kang, S.-I.; Kundu, N. G.; Shamma, T.; Ohla, G. *Curr. Top. Med. Chem.* **1997**, *2*, 85.
- (41) Swain, C. G.; Scott, C. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 141.
- (42) Kang, S. I.; Spears, C. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 597.
- (43) Sedgwick, B. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 148.
- (44) Barbin, A.; Bartsch, H. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1989**, *215*, 95.
- (45) Vogel, E. W. *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 2093.
- (46) Vogel, E. W.; Nivard, M. J. M.; Ballering, L. A. B.; Bartsch, H.; Barbin, A.; Nair, J.; Comendador, M. A.; Sierra, L. M.; Aguirrezabalaga, I.; Tosal, L.; Ehrenberg, L.; Fuchs, R. P. P.; Janel-Bintz, R.; Maenhaut-Michel, G.; Montesano, R.; Hall, J.; Kang, H.; Miele, M.; Thomale, J.; Bender, K.; Engelbergs, J.; Rajewsky, M. F. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**, *353*, 177.
- (47) Ho, T.-L. *Chem. Rev.* **1975**, *75*, 1.
- (48) Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W. *DNA Repair and Mutagenesis*; ASM Press: Washington, DC, 1995.
- (49) Kondo, N.; Takahashi, A.; Ono, K.; Ohnishi, T. *J. Nucleic Acids* **2010**, *2010*.
- (50) Swenberg, J. A.; Richardson, F. C.; Boucheron, J. A.; Dyroff, M. C. *Environ. Health Perspect.* **1985**, *177*.
- (51) Boysen, G.; Pachkowski, B. F.; Nakamura, J.; Swenberg, J. A. *Mutat. Res., Gen. Toxicol. Environm. Mutagen.* **2009**, *678*, 76.
- (52) Margison, G. P.; Santibáñez Koref, M. F.; Povey, A. C. *Mutagenesis* **2002**, *17*, 483.
- (53) Sugiura, K.; Goto, M. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *35*, 71.
- (54) Sanderson, B. J. S.; Shield, A. J. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1996**, *355*, 41.

- (55) Miller, E. C.; Miller, J. A. *Cancer* **1981**, *47*, 2327.
- (56) Siddik, Z. H. In *The Cancer Handbook*; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ, 2005.
- (57) Garcia, S. T.; McQuillan, A.; Panasci, L. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1988**, *37*, 3189.
- (58) 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.
- (59) McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 5135.
- (60) McCann, J.; Spingarn, N. E.; Kobori, J.; Ames, B. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 979.
- (61) Ames, B. N.; Lee, F. D.; Durston, W. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 782.
- (62) Ames, B. N.; McCann, J.; Yamasaki, E. *Mutat. Res.* **1975**, *31*, 347.
- (63) Mortelmans, K.; Zeiger, E. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2000**, *455*, 29.
- (64) Osterman-Golkar, S.; Ehrenberg, L.; Wachtmeister, C. A. *Radiat. Bot.* **1970**, *10*, 303.
- (65) Ross, W. C. J. *J. Chem. Soc.* **1950**, 2257.
- (66) Van Duuren, B. L.; Goldschmidt, B. M. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 77.
- (67) Dipple, A.; Slade, T. A. *Eur. J. Cancer (1965-1981)* **1970**, *6*, 417.
- (68) Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616.
- (69) Moriguchi, I.; Kanada, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 926.
- (70) Könemann, H.; Musch, A. *Toxicology* **1981**, *19*, 223.
- (71) Könemann, H. *Toxicology* **1981**, *19*, 209.
- (72) Hansch, C. *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 232.
- (73) Hermens, J.; Canton, H.; Janssen, P.; De Jong, R. *Aquat. Toxicol.* **1984**, *5*, 143.
- (74) Tuppurainen, K.; Lötjönen, S.; Laatikainen, R.; Vartiainen, T.; Maran, U.; Strandberg, M.; Tamm, T. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1991**, *247*, 97.
- (75) Hansch, C. *Sci. Total Environ.* **1991**, *109*, 17.
- (76) Hakura, A.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1986**, *34*, 1728.
- (77) Eder, E.; Neudecker, T.; Lutz, D.; Henschler, D. *Chem.-Biol. Interact.* **1982**, *38*, 303.
- (78) Wheeler, G. P.; Bowdon, B. J.; Grimsley, J. A.; Lloyd, H. H. *Cancer Res.* **1974**, *34*, 194.
- (79) Wishnok, J. S.; Archer, M. C.; Edelman, A. S.; Rand, W. M. *Chem.-Biol. Interact.* **1978**, *20*, 43.
- (80) Tamura, N.; Takahashi, K.; Shirai, N.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 1393.
- (81) Sugiura, K.; Yamanaka, S.; Fukasawa, S.; Goto, M. *Chemosphere* **1978**, *7*, 737.
- (82) Deneer, J. W.; Sinnige, T. L.; Seinen, W.; Hermens, J. L. M. *Aquat. Toxicol.* **1988**, *13*, 195.
- (83) Chabner, B. A.; Longo, D. L. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 2010.
- (84) Koenigs, E.; Friedrich, H.; Jurany, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1925**, *58*, 2571.
- (85) Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1435.

- (86) Bardos, T. J.; Datta-Gupta, N.; Hebborn, P.; Triggle, D. J. *J. Med. Chem.* **1965**, *8*, 167.
- (87) Van Duuren, B. L.; Melchionne, S.; Seidman, I.; Pereira, M. A. *Environ. Health Perspect.* **1986**, *69*, 109.
- (88) Perlman, M. E.; Bardos, T. J. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1761.
- (89) Wilman, D. E. V.; Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2256.
- (90) Grover, P. L.; Sims, P. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1970**, *19*, 2251.
- (91) Sims, P. *Biochem. J.* **1973**, *131*, 405.
- (92) Swaisland, A. J.; Grover, P. L.; Sims, P. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1973**, *22*, 1547.
- (93) Agarwal, S. C.; Van Duuren, B. L.; Kneip, T. J. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* **1979**, *23*, 825.
- (94) Agarwal, S. C.; Neton, J. *Sci. Total Environ.* **1989**, *79*, 69.
- (95) Malaveille, C.; Brun, G.; Kolar, G.; Bartsch, H. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 1446.
- (96) Hemminki, A.; Vayrynen, T.; Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, *93*, 51.
- (97) Phillips, D. H.; Grover, P. L.; Sims, P. *Chem.-Biol. Interact.* **1978**, *20*, 63.
- (98) Turchi, G.; Bonatti, S.; Citti, L.; Gervasi, P. G.; Abbondandolo, A.; Presciuttini, S. *Mutat. Res.* **1981**, *83*, 419.
- (99) Turchi, G.; Bauer, C.; Bronzetti, G.; Citti, L.; Corsi, C.; Fassina, G. F.; Gervasi, P. G.; Lippi, A.; Nieri, R.; Abbondandolo, A.; Berti, G.; Mastroianni, E. *Mutat. Res.* **1983**, *117*, 213.
- (100) Sinsheimer, J. E.; Chakraborty, P. K.; Messerly, E. A.; Gaddamidi, V. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1989**, *224*, 171.
- (101) Padgett, S. R.; Wimalasena, K.; Herman, H. H.; Sirimanne, S. R.; May, S. W. *Biochemistry (Moscow)* **1985**, *24*, 5826.
- (102) Banerjee, R.; Rachid, Z.; McNamee, J.; Jean-Claude, B. J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5546.
- (103) Hemminki, K.; Falck, K. *Toxicol. Lett.* **1979**, *4*, 103.
- (104) Hemminki, K.; Heinonen, T.; Vainio, H. *Arch. Toxicol.* **1981**, *49*, 35.
- (105) Rosman, L. B.; Beylin, V. G.; Gaddamidi, V.; Hooberman, B. H.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1986**, *171*, 63.
- (106) Planche, G.; Croisy, A.; Malaveille, C.; Tomatis, L.; Bartsch, H. *Chem.-Biol. Interact.* **1979**, *25*, 157.
- (107) Thier, R.; Muller, M.; Taylor, J. B.; Pemble, S. E.; Ketterer, B.; Guengerich, F. P. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 465.
- (108) Barbin, A.; Bresil, H.; Croisy, A.; Jacquignon, P.; Malaveille, C.; Montesano, R.; Bartsch, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 596.
- (109) Metzler, M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3113.
- (110) Robertson, K. A. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 8.
- (111) Sobol, Z.; Engel, M. E.; Rubitski, E.; Ku, W. W.; Aubrecht, J.; Schiestl, R. H. *Mutat. Res.* **2007**, *633*, 80.
- (112) Sawicki, E.; Bender, D. F.; Houser, T. R.; Wilson, R. M.; Meeker, J. E. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1479.

- (113) Hemminki, A.; Vayrynen, T.; Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1994**, *93*, 51.
- (114) Connors, T. A.; Elson, L. A.; Leese, C. L. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1964**, *13*, 963.
- (115) Eder, E.; Neudecker, T.; Lutz, D.; Henschler, D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1980**, *29*, 993.
- (116) Neudecker, T.; Lutz, D.; Eder, E.; Henschler, D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1980**, *29*, 2611.
- (117) Raikova, E.; Grueva, D.; Golovinsky, E. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1981**, *30*, 289.
- (118) Eder, E.; Henschler, D.; Neudecker, T. *Xenobiotica* **1982**, *12*, 831.
- (119) Ashby, J.; Callander, R. D.; Gilman, D. *Mutat. Res. Lett.* **1984**, *140*, 71.
- (120) Ashby, J.; Hilton, J.; Dearman, R. J.; Callander, R. D.; Kimber, I. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *101*, 62.
- (121) Zoetemelk, C. E. M.; Mohn, G. R.; Vandergen, A.; Breimer, D. D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1987**, *36*, 1829.
- (122) Schmiedel, G.; Filser, J. G.; Bolt, H. M. *Toxicol. Lett.* **1983**, *19*, 293.
- (123) Magata, Y.; Lang, L.; Kiesewetter, D. O.; Jagoda, E. M.; Channing, M. A.; Eckelman, W. C. *Nucl. Med. Biol.* **2000**, *27*, 163.
- (124) Jablonkai, I. *Pest Manage. Sci.* **2003**, *59*, 443.
- (125) Hill, B. T.; Harrap, K. R. *Chem.-Biol. Interact.* **1972**, *5*, 117.
- (126) Juma, F. D.; Rogers, H. J.; Trounce, J. R. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1979**, *8*, 209.
- (127) Juma, F. D.; Rogers, H. J.; Trounce, J. R. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1980**, *10*, 327.
- (128) Braun, R.; Dittmar, W.; Hefter, B.; Weber, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *35*, 229.
- (129) Miyahara, M.; Miyahara, M.; Kamiya, S.; Maekawa, A. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, *29*, 2366.
- (130) Katzenellenbogen, J. A.; McGorin, R. J.; Tatee, T.; Kempton, R. J.; Carlson, K. E.; Kinder, D. H. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 435.
- (131) Budzisz, E.; Nawrot, E.; Malecka, M. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2001**, *334*, 381.
- (132) Nawrot-Modranka, J.; Nawrot, E.; Graczyk, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1301.
- (133) Imamura, T.; Talcott, R. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1985**, *155*, 1.
- (134) Kalinowska-Lis, U.; Szmigiero, L.; Studzian, K.; Ochocki, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 660.
- (135) Preussmann, V.; R.; Schneider, H.; Eppler, F. *Arzneimittel-Forsch.* **1969**, *19*, 1059.
- (136) Mellett, L. B.; Woods, L. A. *Cancer Res.* **1960**, *20*, 524.
- (137) Van Duuren, B. L.; Nelson, N.; Orris, L.; Palmes, E. D. *J. Natl. Cancer Inst.* **1963**, *31*, 41.
- (138) Van Duuren, B.; Orris, L.; Nelson, N. *J. Natl. Cancer Inst.* **1965**, *35*, 707.
- (139) Van Duuren, B. L.; Langseth, L.; Orris, L.; Teebor, G.; Nelson, N.; Kuschner, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1966**, *37*, 825.

- (140) Van Duuren, B. L.; Langseth, L.; Orris, L.; Baden, M.; Kuschner, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1967**, *39*, 1213.
- (141) Bagley, C. M., Jr.; Bostick, F. W.; DeVita, V. T., Jr. *Cancer Res.* **1973**, *33*, 226.
- (142) Chmielewicz Z. F.; Fiel, R. J.; Bardos, T. J.; Ambrus, J. L. *Cancer Res.* **1967**, *27*, 1248.
- (143) Lewis, L. D.; Fitzgerald, D. L.; Mohan, P.; Thatcher, N.; Harper, P. G.; Rogers, H. J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1991**, *31*, 77.
- (144) Lewis, L. D.; Burton, L. C.; Harper, P. G.; Rogers, H. J. *Eur. J. Cancer* **1992**, *28*, 1976.
- (145) Lewis, L. D.; Fitzgerald, D. L.; Harper, P. G.; Rogers, H. J. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *30*, 725.
- (146) Hsieh, K. H.; Marshall, G. R. *J. Med. Chem.* **1981**, *24*, 1304.
- (147) Truhaut, R.; Delacoux, E.; Brule, G.; Bohuon, C. *Clin. Chim. Acta* **1963**, *8*, 235.
- (148) Kawazoe, Y.; Tamura, N.; Yoshimura, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 2077.
- (149) Friedman, O. M.; Boger, E. *Anal. Chem.* **1961**, *33*, 906.
- (150) Acosta, D.; Mitchell, D. B. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1981**, *30*, 3225.
- (151) Archer, M. C.; Eng, V. W. S. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *33*, 207.
- (152) Fisher, G. R.; Donis, J.; Gutierrez, P. L. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1992**, *44*, 1625.
- (153) Hipkens, J. H.; Struck, R. F.; Gurtoo, H. L. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 3571.
- (154) Parodi, S.; Picca, M.; Bolognesi, C.; Cavanna, M.; Carlo, P.; Finollo, R.; Brambilla, G. *Pharmacol. Res. Commun.* **1977**, *9*, 621.
- (155) Samanta, S.; Pain, A.; Ghosh, M.; Dutta, S.; Sanyal, U. *Exp. Oncol.* **2005**, *27*, 279.
- (156) Schasteen, C. S.; Reed, D. J. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1983**, *70*, 423.
- (157) Schmid, F. A.; Otter, G. M.; Mehta, B. M. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 40.
- (158) Shyam, K.; Cosby, L. A.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1323.
- (159) Wheeler, G. P.; Chumley, S. J. *Med. Chem.* **1967**, *10*, 259.
- (160) Kim, J. H.; Thomas, J. J. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 879.
- (161) Van Duuren, B. L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, *163*, 633.
- (162) Nakano, N.; Yamamoto, A.; Kobayashi, Y.; Nagashima, K. *Talanta* **1995**, *42*, 641.
- (163) Dierickx, K. M. E.; Journé, F.; Gerbaux, P.; Morandini, R.; Kauffmann, J.-M.; Ghanem, G. E. *Talanta* **2009**, *77*, 1370.
- (164) 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.
- (165) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
- (166) Arenas-Valgañón, J.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; González-Jiménez, M.; Calle, E.; Casado, J. *Food Chem.* **2012**, *134*, 986.
- (167) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 386.
- (168) Hammock, L. G.; Hammock, B. D.; Casida, J. E. *Bul. Environ. Contam. Toxicol.* **1974**, *12*, 759.

- (169) Agree, A. M.; Meeker, R. L. *Talanta* **1966**, *13*, 1151.
- (170) Thomas, J. J.; Kim, J. H.; Mauro, D. M. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *22*, 219.
- (171) Vogel, E. W.; Nivard, M. J. M. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1994**, *305*, 13.
- (172) Spears, C. P. *Mol. Pharmacol.* **1981**, *19*, 496.
- (173) Swenson, D. H.; Lawley, P. D. *Biochem. J.* **1978**, *171*, 575.
- (174) Ehrenberg, L.; Granath, F.; Tornqvist, M. *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104 Suppl 3*, 423.
- (175) Walles, S. A. S. *Toxicol. Lett.* **1980**, *5*, 161.
- (176) Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 193.
- (177) Boerth, D. W.; Eder, E.; Rasul, G.; Morais, J. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 368.
- (178) Yano, K.; Isobe, M. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 5147.
- (179) Yano, K.; Katayama, H.; Takemoto, K. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 1027.
- (180) Rosman, L. B.; Gaddamidi, V.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1987**, *189*, 189.
- (181) Rosman, L. B.; Chakraborty, P. K.; Messerly, E. A.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1988**, *206*, 115.
- (182) Schrader, T. J.; Langlois, I.; Soper, K.; Cherry, W. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2002**, *22*, 425.
- (183) Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1981**, *34*, 323.
- (184) Eya, S. K.; Talcott, R. E. *Environ. Mutagen.* **1980**, *2*, 395.
- (185) Hemminki, K.; Paasivirta, J.; Kurkirinne, T.; Virkki, L. *Chem.-Biol. Interact.* **1980**, *30*, 259.
- (186) Isobe, M.; Yano, K. *Mutat. Res.* **1982**, *93*, 57.
- (187) Ehrenberg, L.; Osterman-Golkar, S.; Singh, D.; Lundqvist, U. *Radiat. Bot.* **1974**, *14*, 185.
- (188) Agurell, E.; Cederberg, H.; Ehrenberg, L.; Lindahlkiessling, K.; Rannug, U.; Tornqvist, M. *Mutat. Res.* **1991**, *250*, 229.
- (189) Norppa, H.; Vainio, H. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1983**, *116*, 379.
- (190) Das, L.; Das, S. K.; Chu, E. H. Y.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1993**, *299*, 19.
- (191) Giri, A. K.; Messerly, E. A.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res.* **1989**, *224*, 253.
- (192) Schiffmann, D.; Eder, E.; Neudecker, T.; Henschler, D. *Cancer Lett.* **1983**, *20*, 263.
- (193) Nishi, Y.; Hasegawa, M. M.; Taketomi, M.; Ohkawa, Y.; Inui, N. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 3270.
- (194) Shyam, K.; Penketh, P. G.; Divo, A. A.; Loomis, R. H.; Rose, W. C.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3496.
- (195) Jesson, M. I.; Johnston, J. B.; Robotham, E.; Begleiter, A. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 7031.
- (196) Casado, J.; Lopez-Quintela, M. A.; Lorenzo-Barral, F. M. *J. Chem. Educ.* **1986**, *63*, 450.
- (197) Peterson, L. A.; Harris, T. M.; Guengerich, F. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3284.
- (198) García-Santos, M. P.; González-Mancebo, S.; Hernández-Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2177.
- (199) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964.

- (200) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Caballero, M. C.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11824.
- (201) 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.
- (202) Vogel, E. W.; Barbin, A.; Nivard, M. J. M.; Bartsch, H. *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 2211.
- (203) Kawazoe, Y.; Tamura, N.; Yoshimura, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1982**, *30*, 2077.
- (204) Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32*, 1326.
- (205) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Solution Chem.* **2008**, *37*, 459.
- (206) Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 10244.
- (207) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *22*, 386.
- (208) Karchesy, J. J.; Arbogast, B.; Deinzer, M. L. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3867.
- (209) Giraud, I.; Rapp, M.; Maurizis, J.-C.; Madelmont, J.-C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2116.
- (210) Kagn, S. I.; Spears, C. P. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 597.
- (211) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. D.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
- (212) Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.
- (213) 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.
- (214) Reingold, I. D. *Organic Chemistry: An Introduction Emphasizing Biological Connections*; Indo American Books: Delhi, 2007.
- (215) Archelas, A.; Furstoss, R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 112.
- (216) Wade, L. G. *Organic Chemistry*; Pearson Prentice Hall: London, 2010.
- (217) Parker, R. E.; Isaacs, N. S. *Chem. Rev.* **1959**, *59*, 737.
- (218) Smith, K.; El-Hiti, G.; Al-Shamali, M. *Catal. Lett.* **2006**, *109*, 77.
- (219) Shen, Y.-M.; Wang, B.; Shi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1429.
- (220) Laird, R. M.; Parker, R. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4277.
- (221) Addy, J. K.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1965**, 644.
- (222) Addy, J. K.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1963**, 915.
- (223) Chapman, N. B.; Isaacs, N. S.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1959**, 386, 1925.
- (224) Addy, J. K.; Laird, R. M.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1961**, 1708.
- (225) Parker, R. E.; Rockett, B. W. *J. Chem. Soc.* **1965**, 2569.
- (226) Parker, R. E.; Rockett, B. W. *J. Chem. Soc. B* **1966**, 681.
- (227) Laird, R. M.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1965**, 4784.
- (228) Isaacs, N. S.; Parker, R. E. *J. Chem. Soc.* **1960**, 3497.

- (229) Biggs, J.; Chapman, N. B.; Finch, A. F.; Wray, V. *J. Chem. Soc. B* **1971**, 55.
- (230) Pritchard, J. G.; Siddiqui, I. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1973**, 452.
- (231) Pritchard, J. G.; Long, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 2667.
- (232) Muniz Filho, R. C. D.; de Sousa Ferreira, S. A. A.; da Silva Pereira, F.; Castro Ferreira, M. M. *J. Phys. Chem. A* **2010**, 114, 5187.
- (233) Brown, H. C.; Roy, C. D. *Molecules Online* **1998**, 2, 114.
- (234) Brønsted, J. N.; Kilpatrick, M.; Kilpatrick, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, 51, 428.
- (235) Kirkovsky, L. I.; Lermontov, S. A.; Zavorin, S. I.; Sukhozhenko, I. I.; Zavel'sky, V. I.; Thier, R.; Bolt, H. M. *Environ. Toxicol. Chem.* **1998**, 17, 2141.
- (236) Long, F. A.; Pritchard, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 2663.
- (237) Shipley, D. S.; Ross, A. M.; Mohan, R. S.; Whalen, D. L.; Sayer, J. M.; Serve, P. M.; Jerina, D. M. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 977.
- (238) Blumenstein, J. J.; Ukachukwu, V. C.; Mohan, R. S.; Whalen, D. L. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 924.
- (239) Nellaiah, H.; Morisseau, C.; Archelas, A.; Furstoss, R.; Baratti, J. C. *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, 49, 70.
- (240) Magdalou, J.; Hammock, B. D. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1988**, 37, 2717.
- (241) Day, B. W.; Naylor, S.; Gan, L.-S.; Sahali, Y.; Nguyen, T. T.; Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. *Cancer Res.* **1990**, 50, 4611.
- (242) Ríos-Blanco, M. N.; Ranasinghe, A.; Upton, P.; Lee, M. S.; Filser, J. G.; Swenberg, J. A. *J. Chromatogr. B* **2002**, 778, 383.
- (243) Osterman-Golkar, S.; Czene, K.; Lee, M. S.; Faller, T. H.; Csanády, G. A.; Kessler, W.; Pérez, H. L.; Filser, J. G.; Segerbäck, D. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2003**, 191, 245.
- (244) Svensson, K.; Olofsson, K.; Osterman-Golkar, S. *Chem.-Biol. Interact.* **1991**, 78, 55.
- (245) Svensson, K.; Ostermangolkar, S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, 73, 363.
- (246) Czene, K.; Osterman-Golkar, S.; Yun, X.; Li, G.; Zhao, F.; Pérez, H. L.; Li, M.; Natarajan, A. T.; Segerbäck, D. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **2002**, 11, 315.
- (247) Osterman-Golkar, S.; Ehrenberg, L.; Segerbäck, D.; Hällström, I. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1976**, 34, 1.
- (248) Boyland, E.; Williams, K. *Biochem. J.* **1965**, 94, 190.
- (249) Fjellstedt, T. A.; Allen, R. H.; Duncan, B. K.; Jakoby, W. B. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 3702.
- (250) DeMeester, C. *Toxicol. Lett.* **1984**, 21, 255.
- (251) Koskinen, M.; Plna, K. *Chem.-Biol. Interact.* **2000**, 129, 209.
- (252) Solomon, J. J.; Mukai, F.; Fedyk, J.; Segal, A. *Chem.-Biol. Interact.* **1988**, 67, 275.
- (253) Barlow, T.; Dipple, A. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 44.
- (254) Li, F.; Segal, A.; Solomon, J. J. *Chem.-Biol. Interact.* **1992**, 83, 35.
- (255) Kumar, R.; Vodicka, P.; Peltonen, K.; Hemminki, K. *Carcinogenesis* **1997**, 18, 407.
- (256) Selzer, R. R.; Elfarra, A. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, 343, 63.

- (257) Plna, K.; Nilsson, R.; Koskinen, M.; Segerbäck, D. *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 2025.
- (258) Plna, K.; Segerbäck, D.; Schweda, E. K. H. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1465.
- (259) Tretyakova, N. Y.; Sangaiah, R.; Yen, T.-Y.; Swenberg, J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 779.
- (260) Tretyakova, N.; Sangaiah, R.; Yen, T.-Y.; Gold, A.; Swenberg, J. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1171.
- (261) Qian, C.; Dipple, A. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 389.
- (262) Koskinen, M.; Vodičková, L.; Vodička, P.; Warner, S.; Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, *138*, 111.
- (263) Gervasi, P. G.; Citti, L.; Del Monte, M.; Longo, V.; Benetti, D. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1985**, *156*, 77.
- (264) Kølmark, G.; Giles, N. H. *Genetics* **1955**, *40*, 890.
- (265) Kølmark, H. G.; Kilbey, B. J. *Mol. Gen. Genet.* **1968**, *101*, 89.
- (266) von der Hude, W.; Seelbach, A.; Basler, A. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen* **1990**, *231*, 205.
- (267) Ríos-Blanco, M. N.; Plna, K.; Faller, T.; Kessler, W.; Håkansson, K.; Kreuzer, P. E.; Ranasinghe, A.; Filser, J. G.; Segerbäck, D.; Swenberg, J. A. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1997**, *380*, 179.
- (268) Voogd, C. E.; van der Stel, J. J.; Jacobs, J. J. J. A. A. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1981**, *89*, 269.
- (269) Cochrane, J. E.; Skopek, T. R. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 719.
- (270) Sugiura, K.; Kimura, T.; Goto, M. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1978**, *58*, 159.
- (271) Glatt, H.; Jung, R.; Oesch, F. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1983**, *111*, 99.
- (272) DeMeester, C.; Mercier, M.; Poncelet, F. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **1982**, *90*, B19.
- (273) Wade, D. R.; Airy, S. C.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1978**, *58*, 217.
- (274) Frantz, S. W.; Sinsheimer, J. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1981**, *90*, 67.
- (275) Canter, D. A.; Zeiger, E.; Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K.; Speck, W. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1986**, *172*, 105.
- (276) Frantz, S. W.; van den Eeckhout, E.; Sinsheimer, J. E.; Yoshihara, M.; Koreeda, M. *Toxicol. Lett.* **1985**, *25*, 265.
- (277) Pfeiffer, E. H.; Dunkelberg, H. *Food Cosmet. Toxicol.* **1980**, *18*, 115.
- (278) Djuric, Z.; Hooberman, B. H.; Rosman, L.; Sinsheimer, J. E. *Environ. Mutagen.* **1986**, *8*, 369.
- (279) von der Hude, W.; Carstensen, S.; Obe, G. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen* **1991**, *249*, 55.
- (280) Dunkelberg, H. *Br. J. Cancer* **1979**, *39*, 588.
- (281) Ciliberti, A.; Maltoni, C.; Perino, G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *534*, 235.
- (282) Snellings, W. M.; Weil, C. S.; Maronpot, R. R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1984**, *75*, 105.
- (283) Dunkelberg, H. *Br. J. Cancer* **1982**, *46*, 924.
- (284) Brookes, P.; Lawley, P. D. *Br. Med. Bull.* **1964**, *20*, 91.
- (285) Melnick, R. L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *982*, 177.

- (286) Norppa, H.; Vainio, H.; Sorsa, M. *Am. J. Ind. Med.* **1981**, *2*, 299.
- (287) Sinsheimer, J. E.; Chen, R.; Das, S. K.; Hooberman, B. H.; Osorio, S.; You, Z. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1993**, *298*, 197.
- (288) von der Hude, W.; Carstensen, S.; Gürtler, R.; Obe, G. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1992**, *278*, 289.
- (289) Pero, R. W.; Osterman-Golkar, S.; Högstedt, B. *Cell Biol. Toxicol.* **1985**, *1*, 309.
- (290) Thaens, D.; Heinzelmann, D.; Böhme, A.; Paschke, A.; Schüürmann, G. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 2092.
- (291) Nivard, M. J. M.; Czene, K.; Segerback, D.; Vogel, E. W. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *529*, 95.
- (292) Hemminki, K.; Falck, K.; Vainio, H. *Arch. Toxicol.* **1980**, *46*, 277.
- (293) IARC. *Some industrial chemicals*; Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; WHO: Lyon, 1994; Vol. 60
- (294) IARC. *Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide* Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; WHO: Lyon, 1999; Vol. 71.
- (295) Stellman, J. M.; Office, I. L. *Encyclopaedia of Occupational Health and Safety: Guides, Indexes, Directory*; International Labour Office: Washington, D.C., 1998.
- (296) Ríos-Blanco, M. N.; Ranasinghe, A.; Lee, M. S.; Faller, T.; Filser, J. G.; Swenberg, J. A. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 1233.
- (297) Minerath, E. C.; Elrod, M. J. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 1386.
- (298) Barbin, A.; Béréziat, J.-C.; Croisy, A.; O'Neill, I. K.; Bartsch, H. *Chem.-Biol. Interact.* **1990**, *73*, 261.
- (299) Ríos-Blanco, M. N.; Faller, T. H.; Nakamura, J.; Kessler, W.; Kreuzer, P. E.; Ranasinghe, A.; Filser, J. G.; Swenberg, J. A. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 2011.
- (300) Roe, R.; Paul, J. S.; Montgomery, P. O. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 859.
- (301) Moussou, P.; Archelas, A.; Baratti, J.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3532.
- (302) Moussou, P.; Archelas, A.; Baratti, J.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1539.
- (303) Simmon, V. F. *J. Natl. Cancer Inst.* **1979**, *62*, 901.
- (304) Migliore, L.; Rossi, A. M.; Loprieno, N. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1982**, *102*, 425.
- (305) Rossi, A. M.; Migliore, L.; Barale, R.; Loprieno, N. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **1983**, *3*, 75.
- (306) Castelain, P.; Criado, B.; Cornet, M.; Laib, R.; Rogiers, V.; Kirsch-Volders, M. *Mutagenesis* **1993**, *8*, 387.
- (307) Knaap, A.; Voogd, C. E.; Kramers, P. G. N. *Mutat. Res.* **1982**, *101*, 199.
- (308) Bootman, J.; Lodge, D. C.; Whalley, H. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol.* **1979**, *67*, 101.
- (309) Albertini, R. J.; Sweeney, L. A. *Crit. Rev. Toxicol.* **2007**, *37*, 489.
- (310) Pottenger, L. H.; Malley, L. A.; Bogdanffy, M. S.; Donner, E. M.; Upton, P. B.; Li, Y.; Walker, V. E.; Harkema, J. R.; Banton, M. I.; Swenberg, J. A. *Toxicol. Sci.* **2007**, *97*, 336.
- (311) Jones, R. B.; Mackrodt, W. C. *Biochem. Pharm. (Amsterdam, Netherlands)* **1983**, *32*, 2359.
- (312) Ninomiya, S.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32*, 1326.

- (313) Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25*, 1176.
- (314) Uziel, M.; Munro, N. B.; Sue Katz, D.; Vo-Dinh, T.; Zeighami, E. A.; Waters, M. D.; Griffith, J. D. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1992**, *277*, 35.
- (315) 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.
- (316) 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.
- (317) Silvari, V.; Haglund, J.; Jenssen, D.; Golding, B. T.; Ehrenberg, L.; Törnqvist, M. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2005**, *580*, 91.
- (318) Gates, K. S.; Nooner, T.; Dutta, S. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 839.
- (319) Maria, I. M.; Murielle, L.; Alain, A.; Annette, C.; Michael, A.; Roland, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2801.
- (320) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.
- (321) Hwang, S.; Choi, C.; Lee, E. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1219.
- (322) Di Fabio, R.; Pietra, C.; Thomas, R. J.; Ziviani, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 551.
- (323) Pedragosa-Moreau, S.; Morisseau, C.; Baratti, J.; Zylber, J.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9707.
- (324) Kotik, M.; Stepanek, V.; Grulich, M.; Kyslik, P.; Archelas, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 41.
- (325) Xu, W.; Xu, J. H.; Pan, J.; Gu, Q.; Wu, X. Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1737.
- (326) Kotik, M.; Brichac, J.; Kyslik, P. *J. Biotechnol.* **2005**, *120*, 364.
- (327) Zoher, F.; Enzelberger, M. M.; Bornscheuer, U. T.; Hauer, B.; Wohlleben, W.; Schmid, R. D. *J. Biotechnol.* **2000**, *77*, 287.
- (328) Pedragosa-Moreau, S.; Morisseau, C.; Zylber, J.; Archelas, A.; Baratti, J.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7402.
- (329) Westkaemper, R. B.; Hanzlik, R. P. *Anal. Biochem.* **1980**, *102*, 63.
- (330) Yeates, C. A.; van Dyk, M. S.; Botes, A. L.; Breytenbach, J. C.; Krieg, H. M. *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 675.
- (331) *12th Report on Carcinogens* Research Triangle Park, N.C.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program., 2011.
- (332) Philo, M. R.; Fordham, P. J.; Damant, A. P.; Castle, L. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 821.
- (333) Mark, J. E. *Physical Properties of Polymers Handbook*; Springer: Heidelberg, 2006.
- (334) Fishbein, L. *Scand. J. Work Environ. Health* **1992**, *18 Suppl 1*, 5.
- (335) Guss, C. O.; Mautner, H. G. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 887.
- (336) Cristol, S. J.; Helmreich, R. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4083.
- (337) Sugiura, K.; Maeda, A.; Goto, M. *Chemosphere* **1979**, *8*, 369.
- (338) Chung, J.-K.; Shen, S.; Jiang, Z.; Yuan, W.; Zheng, J. *Toxicol. Lett.* **2012**, *210*, 353.

- (339) Hammett, L. P. *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 125.
- (340) Upadhyay, S. K. *Chemical Kinetics and Reaction Dynamics*; Springer: Heidelberg, 2006.
- (341) Sangal, A. *Krishna's Advanced Organic Chemistry; Volume 1*; Krishna Prakashan: Meerut, Uttar Pradesh, 2011.
- (342) Savela, K.; Hesso, A.; Hemminki, K. *Chem.-Biol. Interact.* **1986**, *60*, 235.
- (343) Vodicka, P.; Koskinen, M.; Arand, M.; Oesch, F.; Hemminki, K. *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.* **2002**, *511*, 239.
- (344) Norppa, H.; Vainio, H. *Scand. J. Work Environ. Health* **1983**, *9*, 108.
- (345) Santosusso, T. M.; Swern, D. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 2764.
- (346) Arnaut, L. G.; Formosinho, S. J.; Burrows, H. *Chemical Kinetics: From Molecular Structure to Chemical Reactivity*; Elsevier: Amsterdam, 2007.
- (347) Akerlof, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4125.
- (348) De Flora, S.; Znacchi, P.; Camoirano, A.; Bennicelli, C.; Badolati, G. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1984**, *133*, 161.
- (349) Hemminki, K.; Alhonen-Raatesalmi, A.; Koivisto, P.; Vodicka, P. *Chem.-Biol. Interact.* **1990**, *75*, 281.
- (350) Herbert, A.; Rich, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11595.
- (351) Zhao, J.; Bacolla, A.; Wang, G.; Vasquez, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 43.
- (352) Vasudevaraju, P.; Bharathi; Garruto, R. M.; Sambamurti, K.; Rao, K. S. *J. Brain Res. Rev.* **2008**, *58*, 136.
- (353) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (354) Sannohe, Y.; Endo, M.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16311.
- (355) Zimmer, C.; Marck, C.; Guschlbauer, W. *FEBS Lett.* **1983**, *154*, 156.
- (356) Bacolla, A.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47411.
- (357) Bacolla, A.; Jaworski, A.; Larson, J. E.; Jakupciak, J. P.; Chuzhanova, N.; Abeyinghe, S. S.; O'Connell, C. D.; Cooper, D. N.; Wells, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14162.
- (358) Wang, G.; Vasquez, K. M. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *598*, 103.
- (359) Choi, J.; Majima, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5893.
- (360) Zhao, J.; Bacolla, A.; Wang, G.; Vasquez, K. *Cell. Mol. Life Sci.*, *67*, 43.
- (361) Wells, R. D. *Trends Biochem. Sci* **2007**, *32*, 271.
- (362) Wojciechowska, M.; Napierala, M.; Larson, J. E.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24531.
- (363) Karapetyan, A. T.; Minyat, E. E.; Ivanov, V. I. *FEBS Lett.* **1984**, *173*, 243.
- (364) Shimada, N.; Kano, A.; Maruyama, A. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 3590.
- (365) Ferreira, J. M.; Sheardy, R. D. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3383.
- (366) Brazda, V.; Laister, R.; Jagelska, E.; Arrowsmith, C. *BMC Mol. Biol.* **2011**, *12*, 33.
- (367) Rojsitthisak, P.; Romero, R. M.; Haworth, I. S. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4716.

- (368) Gao, X.; Huang, X.; Smith, G. K.; Zheng, M.; Liu, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8883.
- (369) Völker, J.; Klump, H. H.; Breslauer, K. J. *Biopolymers* **2007**, *86*, 136.
- (370) Lee, J.; Kim, Y.-G.; Kim, K. K.; Seok, C. J. *Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 9872.
- (371) D'Urso, A.; Choi, J. K.; Shabbir-Hussain, M.; Ngwa, F. N.; Lambousis, M. I.; Purrello, R.; Balaz, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, *397*, 329.
- (372) Kastenholz, M. A.; Schwartz, T. U.; Hünenberger, P. H. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2976.
- (373) Zacharias, W.; Larson, J. E.; Klysik, J.; Stirdivant, S. M.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 2775.
- (374) Loprete, D. M.; Hartman, K. A. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4077.
- (375) Zacharias, W.; Caserta, M.; O'Connor, T. R.; Larson, J. E.; Wells, R. D. *Gene* **1988**, *74*, 221.
- (376) Behe, M.; Felsenfeld, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 1619.
- (377) Stirdivant, S. M.; Klysik, J.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10159.
- (378) Pohl, F. M. *Nature* **1976**, *260*, 365.
- (379) Raghavan, S. C.; Lieber, M. R. *BioEssays* **2006**, *28*, 480.
- (380) Bacolla, A.; Wells, R. D. *Mol. Carcinog.* **2009**, *48*, 273.
- (381) Lupski, J. R. *Trends Genet.* **1998**, *14*, 417.
- (382) Chang, Y.-M.; Chen, C. K.-M.; Hou, M.-H. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3394.
- (383) Pohl, F. M.; Jovin, T. M. *J. Mol. Biol.* **1972**, *67*, 375.
- (384) Gray, D. M.; Edmondson, S. P.; Lang, D.; Vaughan, M.; Nave, C. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *6*, 2089.
- (385) van de Sande, J. H.; Jovin, T. M. *The EMBO journal* **1982**, *1*, 115.
- (386) Chaires, J. B.; Norcum, M. T. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *5*, 1187.
- (387) van de Sande, J. H.; McIntosh, L. P.; Jovin, T. M. *EMBO J.* **1982**, *1*, 777.
- (388) Guéron, M.; Demaret, J. P.; Filoche, M. *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1070.
- (389) Schoenkecht, T.; Diebler, H. J. *Inorg. Biochem.* **1993**, *50*, 283.
- (390) Klump, H. H.; Schmid, E.; Wosgien, M. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2343.
- (391) Möller, A.; Nordheim, A.; Nichols, S. R.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 4777.
- (392) Malfoy, B.; Hartmann, B.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 5659.
- (393) Rich, A.; Nordheim, A.; Wang, A. H. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 791.
- (394) Chen, F. M. *Biochemistry* **1984**, *23*, 6159.
- (395) Moller, A.; Nordheim, A.; Kozlowski, S. A.; Patel, D.; Rich, A. *Biochemistry* **1984**, *23*, 54.
- (396) Liu, L. F.; Wang, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7024.
- (397) Peck, L. J.; Wang, J. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1983**, *80*, 6206.
- (398) Mirkin, S. M.; Lyamichev, V. I.; Kumarev, V. P.; Kobzev, V. F.; Nosikov, V. V.; Vologodskii, A. V. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *5*, 79.
- (399) Bae, S.; Kim, D.; Kim, K. K.; Kim, Y.-G.; Hohng, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *133*, 668.

- (400) Wang, G.; Christensen, L. A.; Vasquez, K. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 2677.
- (401) Sun, X.-G.; Cao, E.-H.; Zhang, X.-Y.; Liu, D.; Bai, C. *Inorg. Chem. Commun.* **2002**, *5*, 181.
- (402) Eichhorn, G. L.; Shin, Y. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 7323.
- (403) Duguid, J. G.; Bloomfield, V. A.; Benevides, J. M.; Thomas Jr, G. J. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 2623.
- (404) Zatta, P.; Drago, D.; Bolognin, S.; Sensi, S. L. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 346.
- (405) Liquier, J.; Bourtayre, P.; Pizzorni, L.; Sournies, F.; Labarre, J. F.; Taillandier, E. *Anticancer Research* **1984**, *4*, 41.
- (406) Sunderman, F. W. *Scandinavian Journal of Work Environment & Health* **1989**, *15*, 1.
- (407) Taillandier, E.; Taboury, J. A.; Adam, S.; Liquier, J. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5703.
- (408) Spingler, B. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 831.
- (409) Spingler, B.; Da Pieve, C. *Dalton Transactions* **2005**, 1637.
- (410) Vandesande, J. H.; Mcintosh, L. P.; Jovin, T. M. *Embo Journal* **1982**, *1*, 777.
- (411) Thiyagarajan, S.; Rajan, S. S.; Gautham, N. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, 5945.
- (412) Bharanidharan, D.; Thiyagarajan, S.; Gautham, N. *Acta Crystallographica Section F- Structural Biology and Crystallization Communications* **2007**, *63*, 1008.
- (413) Bharanidharan, D.; Thiyagarajan, S.; Gautham, N. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2007**, *63*, 1008.
- (414) Song, H.; Kaiser, J. T.; Barton, J. K. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 615.
- (415) Lim, M. H.; Song, H.; Olmon, E. D.; Dervan, E. E.; Barton, J. K. *Inorganic Chemistry* **2009**, *48*, 5392.
- (416) Barton, J. K.; Olmon, E. D.; Sontz, P. A. *Coordination Chemistry Reviews* **2011**, *255*, 619.
- (417) Boon, E. M.; Barton, J. K. *Bioconjugate Chemistry* **2003**, *14*, 1140.
- (418) Biver, T.; Cavazza, C.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 461.
- (419) Rossetto, F. E.; Nieboer, E. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *54*, 167.
- (420) Fazakerley, G. V. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 3643.
- (421) Middendorf, S. M.; Diebler, H. *Berichte der Bunsen-Gesellschaft* **1996**, *100*, 641.
- (422) Taboury, J. A.; Taillandier, E. *Nucleic Acids Research* **1985**, *13*, 4469.
- (423) Adam, S.; Bourtayre, P.; Liquier, J.; Taillandier, E. *Nucleic Acids Research* **1986**, *14*, 3501.
- (424) Amo-Ochoa, P.; Castillo, O.; Sanz Miguel, P. J.; Zamora, F. J. *Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 203.
- (425) Woisard, A.; Fazakerley, G. V. *Biochemistry* **1986**, *25*, 2672.
- (426) Kypr, J.; Kejnovska, I.; Renciuik, D.; Vorlickova, M. *Nucl. Acids Res.* **2009**, *37*, 1713.
- (427) Kankia, B. I. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 911.
- (428) Mouat, M.; Manchester, K. *Comp. Haematol. Int.* **1998**, *8*, 58.
- (429) van de Sande, J. H.; Jovin, T. M. *EMBO J.* **1982**, *1*, 115.
- (430) Biver, T.; Garcia, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Turriani, E. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 13309.

- (431) van de Sande, J. H.; McIntosh, L. P.; Jovin, T. M. *The EMBO journal* **1982**, *1*, 777.
- (432) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical stability constants*; Plenum Press: NY, 1975.
- (433) Hunt, J. P.; Friedman, H. L. In *Prog. Inorg. Chem.*; John Wiley & Sons, Inc.: 2007, p 359.
- (434) Burgess, J. *Metal ions in solution*; Ellis Horwood: Chichester, England, 1978.
- (435) Ninomiya, S.I.; Ebie, M.; Hakura, A.; Kohda, K.; Kawazoe, Y.; Shioiri, T. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5785.
- (436) Singer, B.; Grunberger, D. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*; Plenum Press: New York, NY, 1983.
- (437) Snodin, D. J. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *45*, 79.

5

Apéndices

“El aprendizaje es un simple apéndice de nosotros mismos;
dondequiera que estemos, está también nuestro aprendizaje”

William Shakespeare

Apéndice 1. Variación de $\log(O^6/N7)$ y $\log(1/TD_{50})$ con la constante de sustrato de Swain-Scott.

Tabla 3.1.1. Variación de $\log(O^6/N7)$ y $\log(1/TD_{50})$ con la constante de sustrato de Swain-Scott.

Compuesto	s	$\log O^6/N7$	$\log (1/TD_{50})$
N-nitroso-N-etilurea	0,27 ⁴³⁵	-0,20 ¹⁸	-1,04 ⁴⁵
Isopropil metanosulfonato	0,29 ⁴⁶	-0,52 ¹⁵	-1,84 ⁴⁶
N-nitroso-N-metil-N'-nitrosodimetilurea	0,42 ^{44,46}	-1,00 ¹⁵	-2,01 ⁴⁶
N-nitroso-N-metilurea	0,44 ⁴³⁵	-1,00 ¹⁵	-1,45 ⁴⁶
N-nitroso-N-metiluretano	0,5 ^{44,46}	-1,15 ¹⁸	-
Clorozotocina	0,58 ⁴⁶	-	-1,60 ⁴⁶
Dietilsulfato	0,64 ^{44,46}	-1,70 ²⁰	-2,00 ⁴⁶
Etil metanosulfonato	0,67 ^{46,435}	-1,52 ¹⁵	-
1,3-propanosultona	0,71 ^{45,46}	-1,88 ¹⁸	-3,25 ⁴⁶
Óxido de cloroetileno	0,83 ²⁹⁸	-	-1,79 ⁴⁶
Glicidaldehído	0,83 ^{44,46}	-2,30 ¹⁸	-3,78 ⁴⁶
Metilmetanosulfonato	0,83 ^{44,46}	-2,40 ¹⁸	-4,09 ⁴⁶
Dimetilsulfato	0,86 ^{44,46}	-2,57 ⁴³⁶	-2,48 ⁴⁶
Etilenimina	0,9 ⁴⁶	-	-2,45 ⁴⁶
Trimetilfosfato	0,91 ^{44,46}	-	-2,22 ⁴⁵
Epiclorhidrina	0,93 ⁴⁶	-2,66 ¹⁸	-4,14 ^{45,46}
Óxido de etileno	0,96 ²⁹⁸	-	-3,27 ⁴³⁷
β-propiolactona	1,07 ⁴⁴	-2,09 ¹⁸	-2,75 ⁴⁶
Óxido de propileno	1,08 ^a	-	-4,46 ⁴⁵
Cloruro de bencilo	1,43 ⁴¹	-	-3,43 ⁴⁶

a: Este trabajo.

Apéndice 2 Influencia de la temperatura y la composición del medio en la alquilación de NBP por SO.

Se ha considerado oportuno utilizar el método de velocidades iniciales para evaluar el efecto de la composición del medio y la temperatura sobre la constante de alquilación, k_{alq} , dados: i) los elevados tiempos de reacción necesarios para obtener los parámetros del ajuste a reacciones consecutivas; y ii) la pequeña aportación del aducto α a la absorbancia inicial. La desviación existente entre los valores de k_{alq} obtenidos a partir del parámetro a del ajuste y de la velocidad inicial (tabla 3.1.2) considerando que la velocidad inicial es exclusivamente la de formación del aducto β es del 10% aproximadamente.

Los valores de k_{alq} obtenidos en los diferentes medios en el intervalo de temperatura 25,0- 37,5 °C se recogen a continuación.

Tabla 3.1.2. Influencia de T sobre las constantes de alquilación k_{alq} para la reacción de alquilación de NBP por SO.

T (°C)	$10^4 k_{alq}$ ($M^{-1}s^{-1}$)					
	Agua:Dioxano (v:v)					
	7,5:2,5	7,0:3,0	6,5:3,5	6,0:4,0	5,5:4,5	5,0:5,0
25,0	1,3	0,81	0,48	0,36	0,21	0,17
27,5	1,5	0,92	0,70	0,43	0,33	0,20
30,0	1,9	1,1	0,85	0,52	0,37	0,28
32,5	2,1	1,4	1,0	0,66	0,43	0,42
35,0	2,3	1,5	1,2	0,82	0,63	0,53
37,5	2,4	1,9	1,2	1,1	0,64	0,57

pH neutro

Se han obtenido los parámetros de activación para todos los medios (tabla 3.1.3). Al comparar los correspondientes al medio 7:3 agua:dioxano obtenidos a partir del parámetro a del ajuste A_{AD}/t (tabla 2.3.21) y a partir del método de velocidades iniciales, se observa una buena concordancia (tabla 3.1.3).

Tabla 3.1.3. Parámetros de activación de la reacción de alquilación de NBP por pNSO.

Parámetros de activación	Agua:Dioxano (v:v)					
	7,5:2,5	7:3	6,5:3,5	6:4	5,5:4,5	5:5
$E_{a\text{ alq}}$ (kJ·mol ⁻¹)	40 ± 5	52 ± 2	58 ± 8	67 ± 3	76 ± 10	92 ± 7
$\Delta^\ddagger H^\circ_{\text{alq}}$ (kJ·mol ⁻¹)	37 ± 5	49 ± 2	55 ± 8	65 ± 3	73 ± 10	89 ± 7
$-\Delta^\ddagger S^\circ_{\text{alq}}$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	194 ± 15	159 ± 7	141 ± 25	113 ± 9	85 ± 33	37 ± 21
$\Delta G^\ddagger_{\text{alq}}(25,0^\circ\text{C})$ (kJ·mol ⁻¹)	97 ± 10	98 ± 4	98 ± 15	100 ± 6	99 ± 20	100 ± 13

pH neutro.

Se ha comprobando también que existe una correlación isocinética entre los parámetros de activación (figura 3.1.1) lo que sugiere que el mecanismo por el que transcurre la reacción de alquilación de la NBP a través de C_β, S_N2, es independiente del medio de reacción.

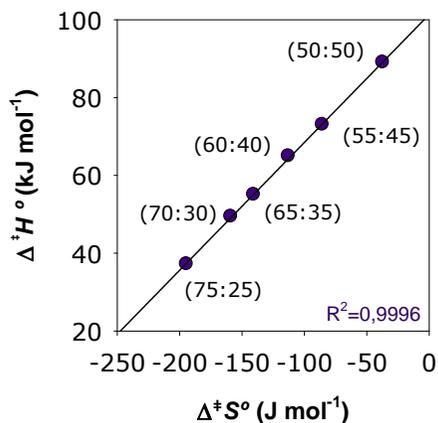


Figura 3.1.1. Correlación isocinética en medio neutro para medios agua:dioxano (50:50-75:25). $[\text{NBP}]_0 = 1,96 \cdot 10^{-2}$ M; $[\text{SO}]_0 = (7,69-8,62) \cdot 10^{-5}$ M;

