

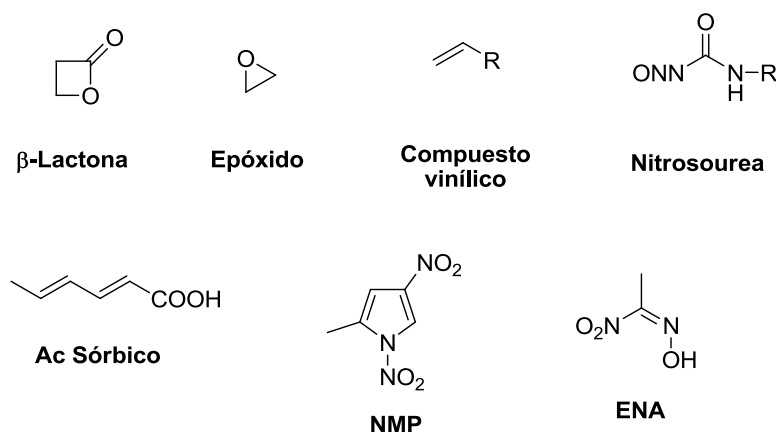
# Tabla de contenidos

1. Introducción.....	4
2. Metodología.....	6
3. Resultados y Discusión .....	8
3.1. Lactonas .....	8
3.1.1. Hidrolisis de la dicetena.....	8
3.1.2. Potencial alquilante de la dicetena.....	9
3.1.3. $pK_a$ de ésteres y cetonas.....	9
3.2. Carbonilos .....	12
3.3. Estudio computacional de la hidrólisis de lactonas .....	13
3.4. Oxetanos.....	16
3.5. Hidroxihalofuranonas .....	17
3.5.1. Reactividad de ácidos mucohólicos.....	17
3.5.2. Reactividad de MX y análogos .....	19
3.5.3. Potencial alquilante de ácidos mucohólicos .....	20
3.5.4. Potencial alquilante de MX y análogos.....	22
3.6. Intercalantes.....	25
4. Conclusiones .....	28
5. Bibliografía.....	31

# 1. Introducción

Debido a su capacidad de unión covalente al ADN, los agentes alquilantes son carcinógenos arquetípicos [1]. Por eso, su reactividad ha suscitado gran interés desde mediados del siglo, tanto desde el punto de vista químico [2-13] como bioquímico [13-15].

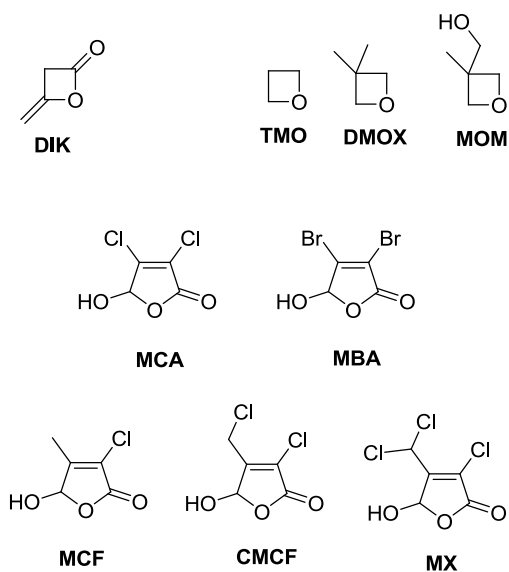
En los últimos años, en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la reactividad de diversos agentes alquilantes (Figura 1). Muchos de estos compuestos resultan de la nitrosación de precursores presentes en los alimentos. En esta línea de investigación se han estudiado  $\beta$ -lactonas ( $\beta$ -propiolactona y  $\beta$ -butirolactona), compuestos vinílicos (ácido sórbico, acrilamida, acrilonitrilo, acroleína...) epóxidos como el óxido de estireno y nitrosocompuestos como alquilnitrosoureas, o los derivados de la nitrosación del ácido sórbico (ENA y NMP) [16-29].



**Figura 1.** Algunos agentes alquilantes investigados en nuestro grupo de trabajo.

Muchos *O*-heterociclos son agentes alquilantes: la tensión en el anillo y la presencia del heteroátomo confieren a algunas de estas moléculas una notable electrofilia que facilita su reacción con las posiciones nucleófilas del ADN. Los epóxidos u oxiranos (éteres trigonales) y las  $\beta$ -lactonas (ésteres tetragonales) y algunas  $\gamma$ -lactonas sustituidas son compuestos de conocida capacidad alquilante. Además, existen pruebas que sugieren que algunos éteres tetragonales podrían ser cancerígenos.

Este trabajo tiene por objetivo estudiar la reactividad química de una serie de *O*-heterociclos potencialmente cancerígenos, prestando especial atención a su capacidad alquilante. La Figura 2 muestra las sustancias estudiadas:



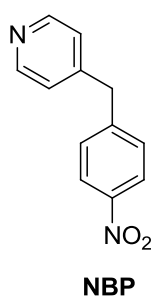
**Figura 2.** Agentes alquilantes *O*-heterocíclicos investigados

Los mecanismos de alquilación de las moléculas arriba indicadas no han sido investigados hasta la fecha. Por eso se piensa que podrían alcanzarse conclusiones novedosas respecto a los mecanismos generales de alquilación de *O*-heterociclos, tanto desde una perspectiva experimental como de la aplicación de métodos computacionales que deben contribuir poderosamente a la comprensión de los mecanismos investigados.

## 2. Metodología

---

La investigación que se llevado a cabo es, fundamentalmente, de carácter cinético: (i) mecanismos de alquilación del sustrato 4-(*p*-nitrobencil)piridina (Figura 3), nucleófilo trampa de agentes alquilantes, de nucleofilia semejante a la de las bases del ADN; (ii) reacciones propias de los agentes alquilantes en disolución, como son las reacciones de hidrólisis, descomposición, o isomerización. El trabajo experimental se completó con estudios computacionales, para profundizar en el conocimiento de los correspondientes mecanismos de reacción.



**Figura 3.** Nucleófilo trampa 4-(*p*-nitrobencil)piridina

Se abordó también el estudio de aspectos termodinámicos de los mecanismos de reacción, determinando constantes de equilibrio de disociación, hidratación e isomerización. Cuando la determinación experimental de las constantes de equilibrio resultó inasequible, se recurrió a métodos computacionales.

La Figura 4 muestra esquemáticamente los métodos y técnicas de trabajo utilizados:

- El estudio cinético del potencial alquilante de los compuestos arriba indicados (Figura 2) se abordó mediante su reacción cromógena con la NBP. El test de NBP encuentra su origen en la búsqueda de métodos rápidos y asequibles para la detección de compuestos alquilantes usados en la guerra química. Se ha utilizado en numerosas ocasiones para correlacionar los efectos biológicos de numerosos agentes alquilantes, como epóxidos, nitrosocompuestos, antineoplásicos...
- Las reacciones de hidrólisis de los respectivos compuestos se estudiaron mediante espectrofotometría UV-Vis y por volumetrías ácido-base automatizadas.

La determinación de constantes de equilibrio se hizo mediante espectrofotometría UV-Vis y por espectrometría de RMN.

- Las propiedades biológicas de algunos de los compuestos se investigaron mediante tests biológicos (Test de Ames, Test *E coli*, MTT, *comet assay*,...).
- Algunos aspectos mecánicos se abordaron mediante métodos de teoría del funcional de la densidad (DFT), mientras que la determinación de constantes de equilibrio requirió métodos más precisos (G-n y CBS).

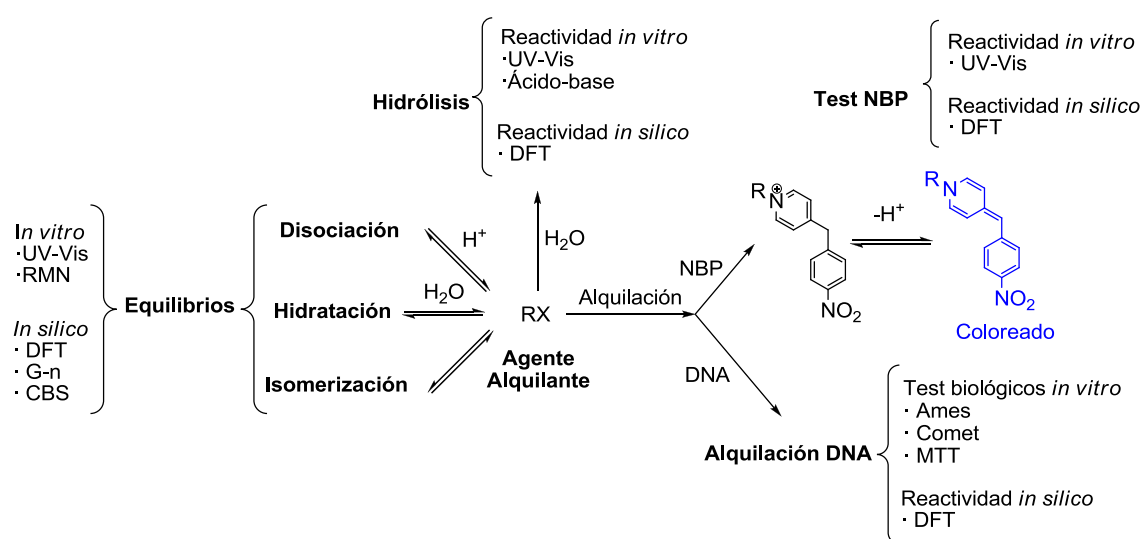


Figura 4. Esquema de la investigación llevada a cabo.

# 3. Resultados y Discusión

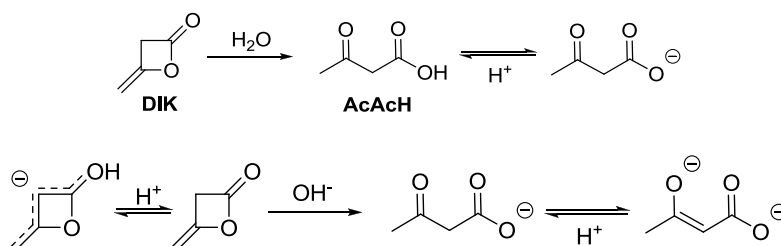
Los resultados obtenidos se clasifican sucintamente en:

## 3.1. Lactonas

Fundamentalmente  $\beta$ -lactonas y, entre estas, la dicetena (2-metilén-oxetanona), especie muy reactiva frente a nucleófilos. Las  $\beta$ -lactonas, además de tener aplicaciones industriales y en síntesis, son los productos de la nitrosación de aminoácidos en condiciones biomiméticas. Se estudiaron tanto su potencial alquilante, como sus reacciones de hidrólisis, y la acidez de su carbono  $\alpha$ , tanto desde el punto de vista experimental como teórico.

### 3.1.1. Hidrólisis de la dicetena

Se han determinado los valores de las constantes de velocidad de hidrólisis neutra de dicetena y sus parámetros de activación en diferentes medios.



**Esquema 1.** Hidrólisis neutra y alcalina de la dicetena

Los resultados, en consonancia con antecedentes bibliográficos [30-32], muestran que la velocidad de hidrólisis neutra de la dicetena es ligeramente mayor que la de otras  $\beta$ -lactonas como la  $\beta$ -propiolactona (BPL) y  $\beta$ -butirolactona (BBL) y mucho mayor que la de otras lactonas, como las  $\gamma$ -lactonas, que no muestran hidrólisis neutra apreciable.

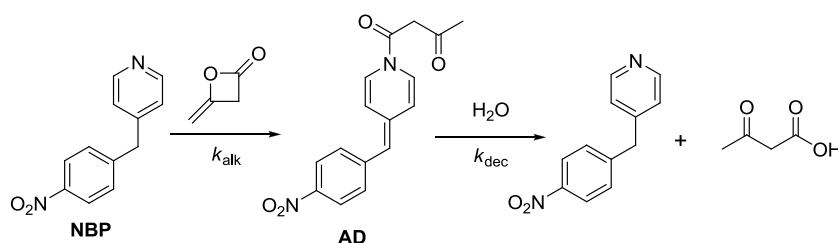
Se han determinado los valores de las constantes de velocidad de hidrólisis alcalina de dicetena y los correspondientes parámetros de activación en diferentes medios. Durante el estudio de la hidrólisis básica se observó una dependencia de la velocidad con el pH consecuente con el Esquema 1. Se determinó el  $pK_a$  del hidrógeno  $\alpha$  de la dicetena, obteniéndose un valor de aproximadamente 15.

Se han calculado también valores para la constante de disociación de la dicetena en diferentes medios de reacción. Se ha observado que la hidrólisis alcalina de la dicetena es

más rápida que la de BPL y BBL [33-35] y de la mayoría de lactonas con ciclos mayores [36-37].

### 3.1.2. Potencial alquilante de la dicetena

Se ha observado que la dicetena posee capacidad alquilante muy elevada frente al NBP, mayor que la de lactonas de conocida capacidad carcinógena, como BPL y BBL. Sin embargo el aducto NBP-dicetena es inestable en medio acuoso, habiéndose determinado también las constantes cinéticas de su descomposición. La elevada velocidad de descomposición sugiere que es la inestabilidad de los potenciales aductos dicetena-ADN la responsable de la ausencia de genotoxicidad de la dicetena, y no su rápida hidrólisis, como se había propuesto.

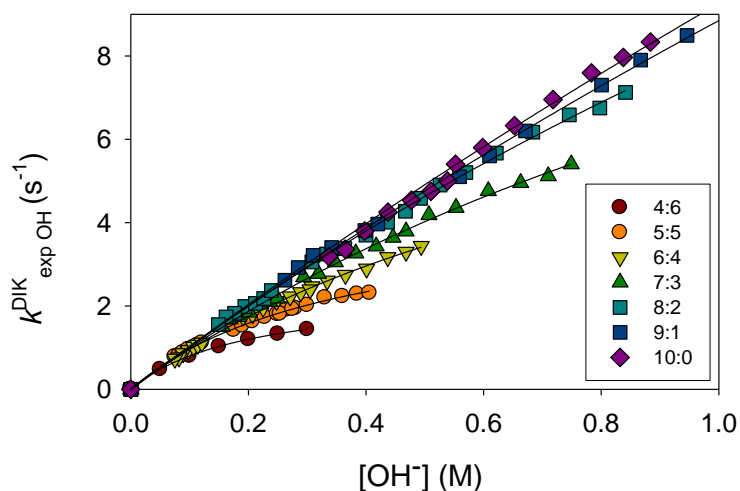


**Esquema 2.** Alquilación de NBP por dicetena

La ruptura del anillo de la dicetena transcurre por fisión acíclica, al contrario que los análogos cancerígenos BPL y BBL, cuya fisión es alquílica. De esta manera, el aducto NBP-dicetena es una  $\beta$ -cetoamida, mucho más lábil que las aminas que forman las  $\beta$ -lactonas cancerígenas. Un estudio *ab initio* es congruente con los resultados experimentales.

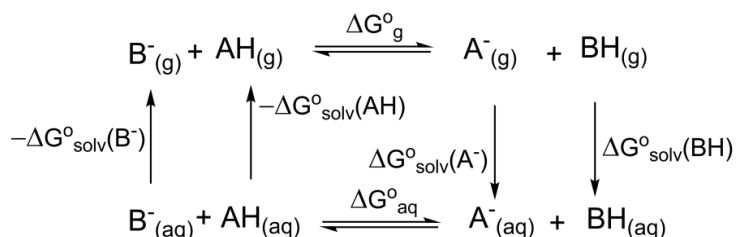
### 3.1.3. $pK_a$ de ésteres y cetonas

Durante el estudio de la hidrólisis básica de la dicetena se obtuvo un valor inesperadamente bajo para su constante de disociación ácida ( $pK_a \sim 15$ ). Esta elevada acidez implica que en medio fuertemente básico la dicetena se encuentra parcialmente desprotonada, tal y como se observa en el perfil que se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Variación de la velocidad de hidrólisis alcalina de la dicetena con respecto a la concentración de NaOH.

Por eso, para tratar de corroborar el resultado obtenido, se ha llevado a cabo un estudio teórico computacional DFT y *ab initio* del  $pK_a$  de ésteres de cadena abierta y cerrada. Los métodos utilizados han sido B3LYP 6-31++G(2df,2pd), G2 y CBS-Q, junto con los métodos de campo de reacción auto consistente C-PCM y IEF-PCM. Dado que la influencia de la energía de solvatación es muy grande, y da lugar a errores sistemáticos, especialmente en lo que se refiere al uso de la energía de solvatación del protón, se utilizó un método relativo.



**Esquema 3.** Ciclo termodinámico relativo para el cálculo de  $pK_a$

Tomando como referencia el acetato de etilo ( $pK_a = 25$ ) se predice un valor de  $pK_a$  para la dicetena de 17. Las tendencias observadas para  $\beta$ - y  $\gamma$ -lactonas, comparadas con ésteres lineales, sugieren un efecto de la ciclación sobre el  $pK_a$  de un éster de aproximadamente -2 unidades logarítmicas, mientras que el efecto de una insaturación  $\beta$ - $\gamma$  es de unas -8 unidades (Figura 6 y Figura 7). De este modo, el valor de la constante de disociación de la dicetena es el que correspondería a una lactona  $\beta$ - $\gamma$  insaturada.




















$\Delta G_{\text{isom}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$pK_a$	BPL	BBL	isoDIK	DIK
					
DFT	DFT	22.9	23.7	8.6	-32.3 14.2
CBS-Q	CBS-Q	21.6	22.5	6.1	-36.8 12.6
G2	G2	22.1	22.8	8.3	-33.2 14.1

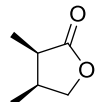
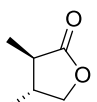
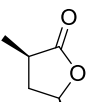
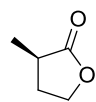
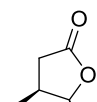
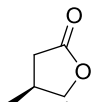
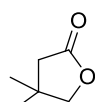
Figura 6.  $pK_a$  teóricos de varias  $\beta$ -lactonas.

$\Delta G_{\text{isom}}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$pK_a$	GBL	FUR	isoFUR	2-Me-GBL	3-Me-GBL	4-Me-GBL
							
DFT	DFT	24.1	13.8	+19.6 10.4	+14.3 24.1	+17.9 22.4	24.8
CBS-Q	CBS-Q	22.6	12.8	+19.4 9.4	+12.4 24.1	+17.0 22.1	23.8
G2	G2	23.1	13.0	+18.1 9.8	+12.5 24.4	+18.4 21.6	23.8

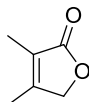
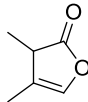
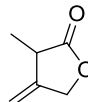
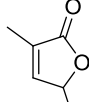
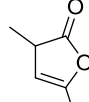
  

2-Me-FUR	2-Me-isoFUR	3-Me-FUR	3-Me-isoFUR	3-MET-GBL	BAL	AAL
						
+7.2 16.7 +2.4 16.2 +6.0 16.2	+46.2 9.9 +39.0 9.8 +38.7 10.5	16.6 15.3 15.6	+28.2 11.6 +27.0 10.5 +26.1 11.0	+40.3 13.1 +38.6 13.3 +36.8 13.8	+13.6 13.2 +9.5 13.1 +9.0 13.4	+17.8 12.5 +17.2 11.7 +16.2 12.2

c-2,3-Me-GBL	t-2,3-Me-GBL	c-2,4-Me-GBL	t-2,4-Me-GBL	c-3,4-Me-GBL	t-3,4-Me-GBL	3,3-Me-GBL
						
+27.9 22.1 +31.1 21.5 +22.7 22.7	+25.9 22.6 +30.7 22.2 +20.5 23.2	25.8 26.8 25.8	+5.4 24.8 +13.3 24.5 +3.5 25.1	+12.7 24.4 +18.5 22.6 +8.2 23.9	+5.0 23.5 +11.6 22.3 +4.0 22.7	+26.8 22.0 +30.7 20.9 +19.4 21.3

2,3-Me-FUR	2,3-Me-isoFUR	2,3-MET-GBL	2,4-Me-FUR	2,4-Me-isoFUR
				
19.5 18.8 18.6	+47.2 11.2 +42.9 11.3 +39.3 11.7	+55.8 12.4 +44.5 10.6 +47.6 13.6	+10.7 16.7 +0.8 16.7 +7.0 17.0	+34.5 12.5 +29.2 11.7 +29.2 13.1

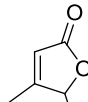
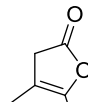
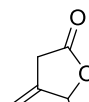
3,4-Me-FUR	3,4-Me-isoFUR	3,4-MET-GBL
		
+6.4 16.3 +4.9 15.4 +1.7 16.4	+21.1 13.7 +20.4 12.7 +19.4 13.3	+43.5 13.7 +36.1 12.8 +36.5 13.9

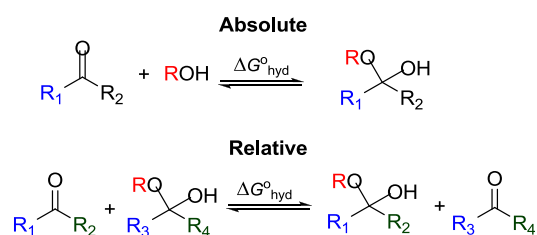
Figura 7.  $pK_a$  teóricos de varias  $\gamma$ -lactonas.

Sin embargo, existe una diferencia importante: todos los demás ésteres favorecen la isomerización de las insaturaciones  $\gamma$ - $\beta$  a  $\beta$ - $\alpha$  por diferencias de entre 35 a 5 kJ mol<sup>-1</sup> ( $\Delta G_{\text{isom}}$  Figura 6 y Figura 7). La dicetena es el único entre los compuestos estudiados en que la forma  $\gamma$ - $\beta$  insaturada está favorecida. Por tanto, si bien todas las lactonas  $\beta$ - $\gamma$  insaturadas son igualmente ácidas, la dicetena es la única que una vez desprotonada no se isomeriza a una forma más estable y por tanto menos ácida.

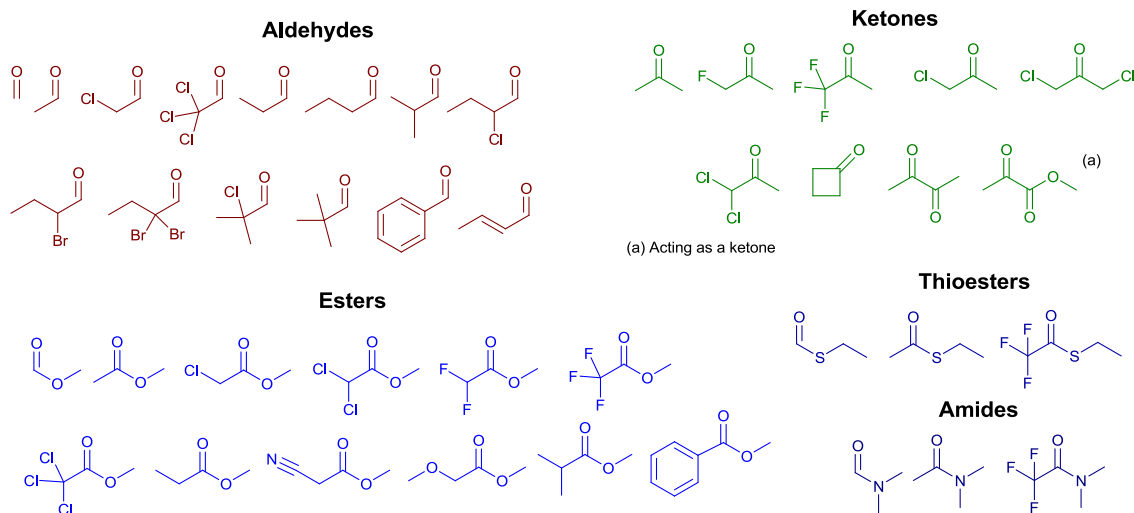
Con el objetivo de ampliar el estudio, se calcularon también las constantes de disociación de ciclobutan- y ciclohexan-onas y sus análogos insaturados. Los resultados son, en general semejantes: la ciclación incrementa la acidez en unas dos unidades logarítmicas, y la presencia de dobles enlaces incrementa la acidez, si bien el efecto es más suave que el observado en lactonas. La única diferencia significativa es que la lactona equivalente a la dicetena, la 3-metilén-ciclobutanona es menos estable que su isómero  $\alpha$ - $\beta$  insaturado.

### 3.2. Carbonilos

Tras la aplicación de métodos computacionales para el cálculo de constantes ácidas de disociación, se propuso aplicar un método similar (Esquema 4) para la determinación de constantes de hidratación de grupos carbonilo. Para ello se escogieron los compuestos mostrados en la Figura 8. Además de su interés intrínseco, este método resultará necesario en el estudio de halofuranonas mutágenas (*vide infra*).

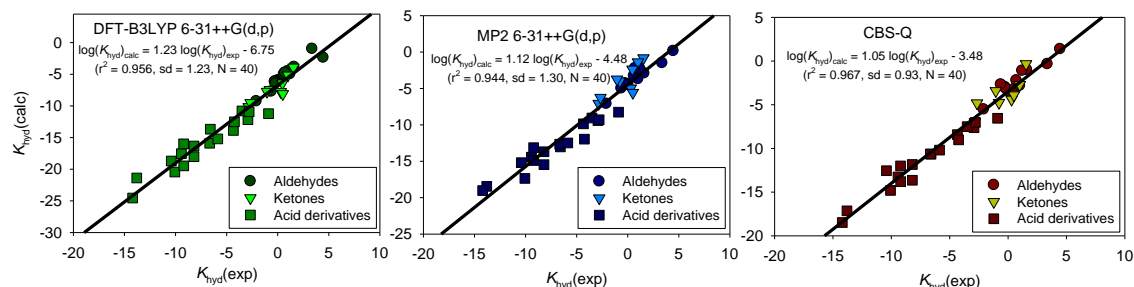


**Esquema 4.** Ciclos termodinámico relativo y absoluto para el cálculo de constantes de hidratación.



**Figura 8.** Especies cuyos equilibrios de hidratación se han estudiado.

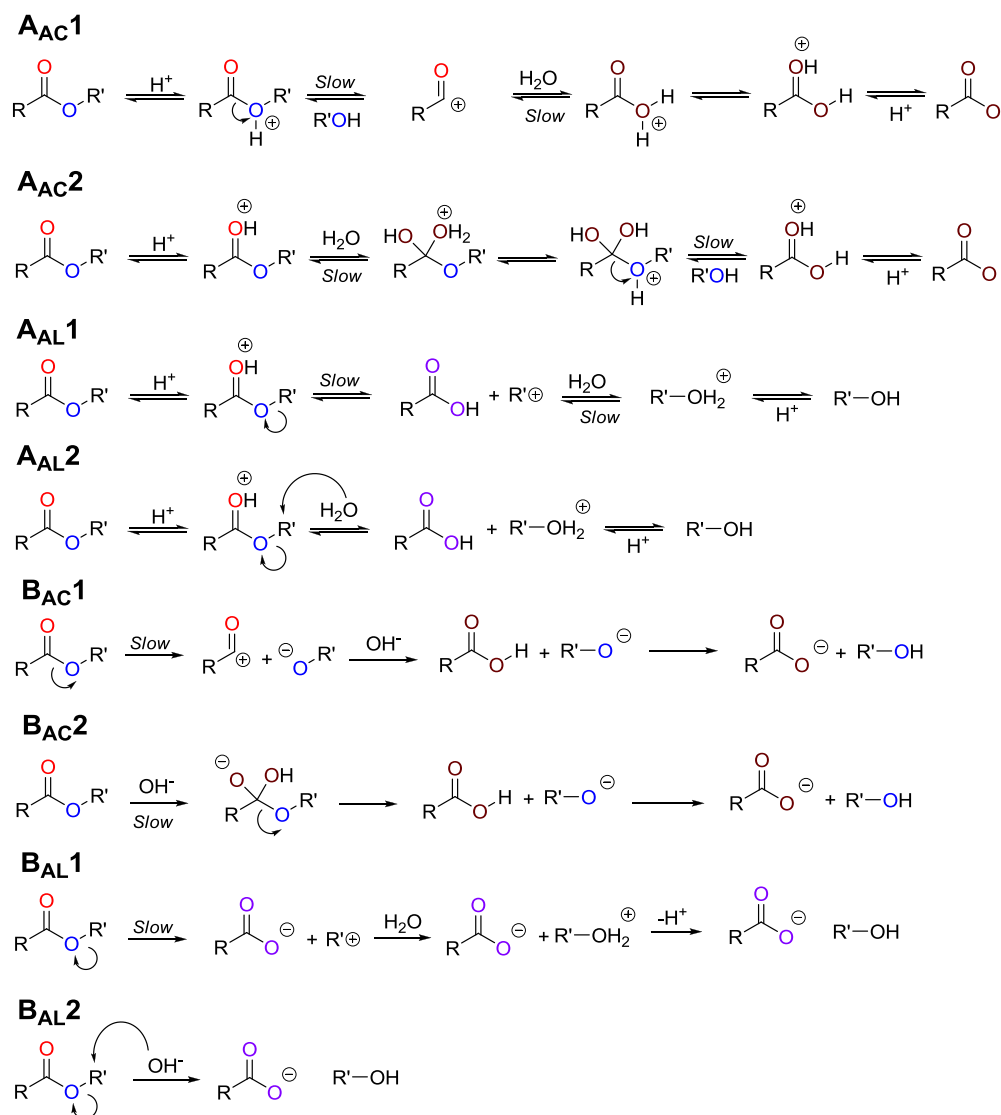
Los resultados obtenidos (Figura 9) sugieren que el método relativo arroja valores de  $K_{\text{hyd}}$  con un error promedio por debajo de una unidad logarítmica (en un rango de aproximadamente 25). Dentro los tres niveles de teoría usados, DFT-B3LYP/6-31++G(d,p); MP2/6-31++G(d,p) y el método compuesto CBS-Q, la calidad de los resultados mejora según aumenta el nivel del método, a la vez que aumentan el tiempo y los recursos necesarios para el cálculo.



**Figura 9.** Correlación de valores experimentales y teóricos de las constantes de hidratación de aldehídos, ésteres y cetonas.

### 3.3. Estudio computacional de la hidrólisis de lactonas

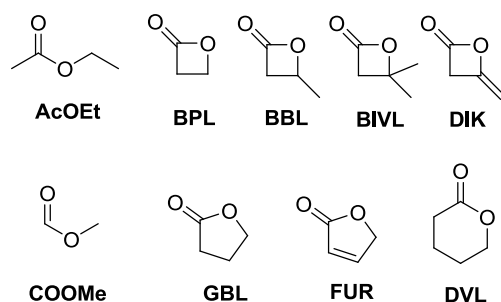
La hidrólisis de ésteres es una de las reacciones cuyo mecanismo se ha estudiado en mayor profundidad, hasta el punto de que son la base de la mayoría de las correlaciones estructura-actividad, como por ejemplo las ecuaciones de Hammett o Taft. Existen ocho posibles mecanismos de reacción (Esquema 5), que han sido también objeto de estudios computacionales.



**Esquema 5.** Mecanismos de hidrólisis de ésteres.

La hidrólisis de lactonas, especialmente de aquellas con anillos muy tensionados ha sido estudiada experimentalmente en numerosas ocasiones, y es interesante resaltar que pequeñas variaciones estructurales puede cambiar completamente el mecanismo por el que se hidrolizan estos compuestos. Por ejemplo, BPL y BBL experimentan hidrólisis bimolecular alquílica, mientras que DIK se hidroliza siguiendo el mecanismo más habitual, B<sub>AC</sub>2, la  $\beta$ -isovalerolactona (con solo un grupo metilo de diferencia respecto a BBL) se hidroliza de acuerdo al mecanismo B<sub>AL</sub>1.

A la vista de la falta de estudios computacionales que traten específicamente sobre lactonas, se ha estudiado la reactividad de las moléculas que se muestran en la Figura 10 en medio neutro, básico y ácido.



**Figura 10.** Moléculas cuya hidrólisis se ha estudiado.

Los resultados obtenidos están en excelente acuerdo con las generalidades observadas en el estudio de los mecanismos de hidrólisis de ésteres lineales, y con los resultados experimentales descritos en la bibliografía.

En lo que respecta a los mecanismos de hidrólisis neutra de lactonas, se ha podido predecir correctamente el mecanismo de hidrólisis para cada una de las especies estudiadas. Se ha obtenido, además, un buen acuerdo entre los datos experimentales y teóricos, tal y como se muestra en la Tabla 1 para la hidrólisis neutra, en la

Tabla 2 para la hidrólisis alcalina y en la

Tabla 3 para la hidrólisis ácida.

**Tabla 1.** Comparación de resultados experimental y teóricos para la hidrólisis neutra de lactonas.

	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		$\Delta S$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )		$\Delta G(25\text{ }^\circ\text{C})$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		Mecanismo	
	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc
COOMe	77	69	-115	-134	110	109	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
AcOEt	-	90	-	-131	~ 128	129	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
BPL	83 ± 2	85	-46 ± 8	-24	97	92	B <sub>AL</sub> 2	B <sub>AL</sub> 2
BBL	88 ± 3	99	-44 ± 9	10	101	96	B <sub>AL</sub> 2	B <sub>AL</sub> 2
BIVL	-	76	-	-13	~ 87	80	B <sub>AL</sub> 1	B <sub>AL</sub> 1
DIK	56 ± 2	59	-126 ± 6	-84	94	84	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2

**Tabla 2.** Comparación de resultados experimental y teóricos para la hidrólisis básica de lactonas.

	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		$\Delta S$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )		$\Delta G(25\text{ }^\circ\text{C})$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		Mecanismo	
	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc
COOMe	38.7 ± 2.5	35.4	-83 ± 8	-77	63.4 ± 4.9	67.2	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
AcOEt	45.3 ±	50.7	-111 ±	-112	78.5 ±	85.9	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
BPL	50.1 ± 0.9	46.5	-71 ± 3	-61	71.3 ± 1.3	78.8	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
BBL	51.3 ± 2.1	49.1	-74 ± 6	-76	73.4 ± 2.7	81.6	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
BIVL	-	55.5	-	-63	~ 77	87.7	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
DIK	47.4 ± 0.6	27	-63 ± 2	-89	66.1 ± 0.8	60.8	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
GBL	44.6 ± 1.3	56.3	-94 ± 5	-97	72.6 ± 2.0	86.8	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
FUR	49.8 ± 0.8	63.8	-104 ± 3	-102	80.8 ± 1.8	95.3	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2
DVL	30.1 ± 1.7	45.5	-117 ± 6	-127	65.0 ± 2.5	80.4	B <sub>AC</sub> 2	B <sub>AC</sub> 2

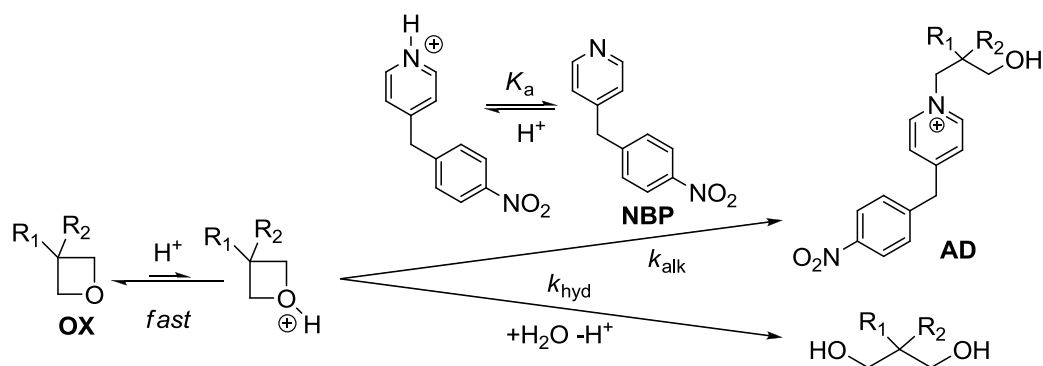
**Tabla 3.** Comparación de resultados experimental y teóricos para la hidrólisis ácida de lactonas.

	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		$\Delta S$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )		$\Delta G(25\text{ }^\circ\text{C})$ (kJ mol <sup>-1</sup> )		Mecanismo	
	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc
COOMe	60 ± 2	87	-89 ± 7	-22	87 ± 3	94	A <sub>AC2</sub>	A <sub>AC2</sub>
AcOEt	68 ± 1	97	-94 ± 1	-59	96 ± 1	114	A <sub>AC2</sub>	A <sub>AC2</sub>
BPL	-	94/97	-	-4/	~103	98 / 103	A <sub>AC1</sub>	A <sub>AC2</sub> / A <sub>AC1</sub>
BBL	-	94/102	-	-20/	~105	99 / 111	A <sub>AC1</sub>	A <sub>AC2</sub> / A <sub>AC1</sub>
BIVL	-	91	-	33	~88	81	A <sub>AL1</sub>	A <sub>AL1</sub>
DIK	-	88 / 85	-	-25/	~96	93 / 92	A <sub>AC1</sub>	A <sub>AC2</sub> / A <sub>AC1</sub>
GBL	65 ± 1	86	-96 ± 3	-2	94 ± 2	87	A <sub>AC2</sub>	A <sub>AC2</sub>
FUR	-	104	-	-27	-	112	A <sub>AC2</sub>	A <sub>AC2</sub>
DVL	47 ± 1	73	-113 ± 5	-46	81 ± 2	84	A <sub>AC2</sub>	A <sub>AC2</sub>

### 3.4. Oxetanos

Éteres tetragonales relacionados estructuralmente con los dos grandes grupos de *O*-heterociclos alquilantes: análogos reducidos de las β-lactonas poseen un eslabón más en su ciclo que los epóxidos. Se estudiarán las moléculas de metil-oxetan-*O*-metanol (MOM), dimetiloxetano (DMOX) y el óxido de trimetileno (TMO). Fueron objeto de análisis su capacidad alquilante y su genotoxicidad.

Se ha estudiado cinéticamente la reacción de varios oxetanos de capacidad tumorigénica conocida: óxido de trimetileno, dimetiloxetano y metiloxetanometanol con la NBP. Los resultados obtenidos sugieren que la reacción de alquilación está catalizada en medio ácido y es muy lenta, de modo que es probable que los oxetanos no sean alquilantes directos, siendo necesaria su activación metabólica para ejercer su genotoxicidad.



**Esquema 6.** Alquilación de NBP por oxetanos e hidrólisis de los mismos.

Los resultados de las pruebas biológicas (Test de Ames, BTC *E. Coli*, Comet assay) sugieren que los oxetanos no son mutágenos ni genotóxicos, tanto directamente, como tras

su activación metabólica. Las pruebas de proliferación (ensayo del azul de formazán MTT) sugieren que la toxicidad de los oxetanos es muy baja, y por tanto los resultados bibliográficos no podrían atribuirse a la toxicidad de los compuestos y los efectos tumorigénicos de la proliferación que sigue a la necrosis.

Así pues, la incongruencia con resultados anteriores podría atribuirse a la utilización de compuestos impuros, en tan altas dosis que incluso impurezas muy minoritarias podrían tener efectos biológicos. De tenerlo, el efecto carcinógeno de los oxetanos debe actuar a través de mecanismos completamente diferentes a los de los agentes alquilantes análogos: oxiranos y  $\beta$ -lactonas.

### 3.5. Hidroxihalofuranonas

Carcinógenos que se forman a partir de los ácidos húmicos en procesos de cloración de aguas. Su estructura pentagonal los aleja de las lactonas cancerígenas estándar, tetragonales, ya que pocas  $\gamma$ -lactonas son agentes alquilantes directos. Se estudiaron los ácidos mucohálicos (mucoclórico, MCA y mucobromico, MBA) además del mutágeno más potente conocido, la lactona MX (3-clor*O*-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona) y sus análogos CMCF (3-clor*O*-4-(clorometil)-5-hidroxi-2(5H)-furanona) y MCF (3-clor*O*-4-metil-5-hidroxi-2(5H)-furanona). La atención se dirigió a las reacciones de alquilación, la descomposición y los muchos equilibrios tautoméricos y de disociación de estos compuestos.

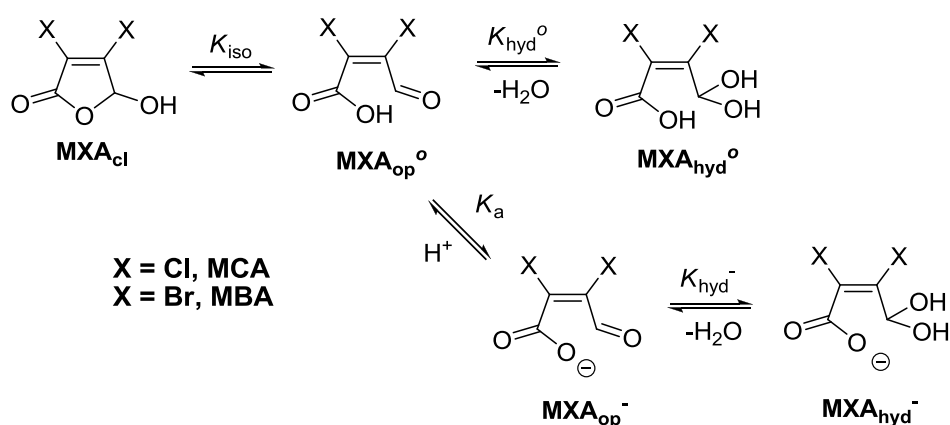
La lactona MX (3-clor*O*-4-(diclorometil)-5-hidroxifuran-2(5H)-ona) es uno de los mutágenos más potentes probados con el test de Ames, una cantidad tan baja como 10 ng provoca más del 1500 revertientes en la cepa TA 100. Dado que uno de los mecanismos propuestos para la acción de la MX es la alquilación y se han identificado algunos aductos que forma con el ADN, se ha estudiado computacionalmente su reacción con nucleobases. Además se estudió la reactividad de los compuestos 3-clor*O*-4-(clorometil)-5-hidroxifuran-2(5H)-ona (CMCF) y 3-clor*O*-5-hidroxi-4-metilfuran-2(5H)-ona (MCF), dos análogos de la lactona MX que, si bien, son mutágenos y carcinógenos probados, poseen una capacidad mutágena varios órdenes de magnitud inferiores a los de la lactona MX.

#### 3.5.1. Reactividad de ácidos mucohálicos

Los ácidos mucohálicos existen como una mezcla de especies en equilibrio. La forma hidroxilactónica cerrada está en equilibrio con el carboxil*O*-aldehído abierto. Este, a su vez, es un ácido que se disocia en medio neutro o básico.

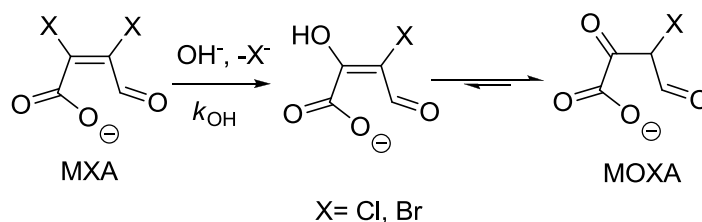
En el estudio experimental se determinaron las constantes de disociación aparentes entre las formas cerrada y abierta desprotonada, que tienen valores cercanos a 4.0. Además, se calculó la constante de hidratación del grupo aldehído.

En el estudio teórico se aislaron las contribuciones de las constantes de acidez y de tautomerización a la constante global (Esquema 7). Los resultados sugieren que los MXA son ácidos fuertes ( $pK_a$  en torno a 1) y por tanto la forma aldehídica protonada ( $MXA_{op}^0$ ) es siempre muy minoritaria.



**Esquema 7.** Equilibrios de los ácidos mucohálicos

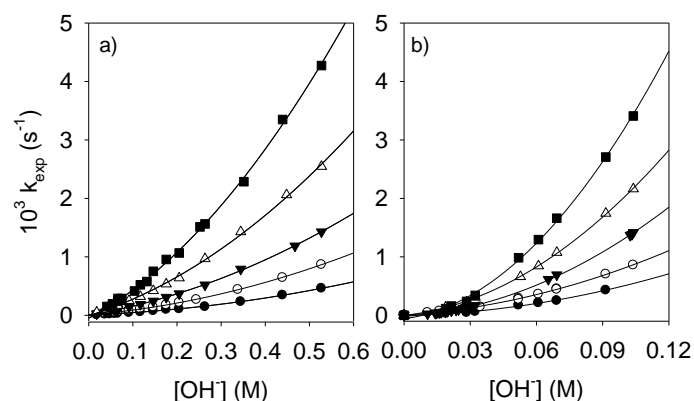
Los MXA se hidrolizan en medio fuertemente básico. Esta reacción ha sido propuesta como el primer paso en el mecanismo de alquilación del ADN por parte de los ácidos mucohálicos. Nuestros resultados sugieren que la hidrólisis de ácidos mucohálicos es muy lenta en medio neutro y, por tanto, su papel en el mecanismo de alquilación por parte de estos *in vivo* es nulo.



**Esquema 8.** Hidrólisis de MXA en medio básico.

El estudio de la reacción de los MXA con los aniones hidróxido arrojó un resultado interesante: el mecanismo es de orden cinético dos respecto a la concentración de hidróxido (Figura 11), lo cual se interpreta como un preequilibrio de desprotonación seguido del ataque nucleofílico del hidróxido.



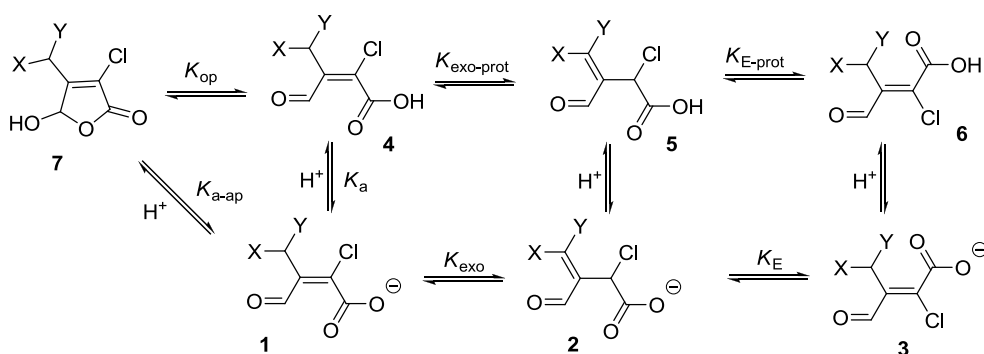


**Figura 11.** Dependencia cuadrática de la constante de hidrólisis de MXA respecto a  $[\text{OH}^-]$

### 3.5.2. Reactividad de MX y análogos

La lactona MX puede existir bajo varias formas diferentes en solución acuosa (Esquema 9): como hidroxihalofuranona puede encontrarse en forma cerrada (**7**) o abierta. A su vez, la forma abierta (**4**), como ácido carboxílico, se disocia (**1**). Las reacciones anteriores son idénticas a las descritas para los equilibrios de los ácidos mucohálicos en disolución acuosa.

Además, las MXY se isomerizan en medio básico de la forma *Z* (**1, 4**) a la *E* (**3, 6**). Como intermedio de este equilibrio, y especialmente, como agente alquilante efectivo *in vivo*, se ha propuesto la existencia de una especie (**2, 5**) que reaccionaría con un nucleófilo biológico a través de su grupo metileno-terminal.



**Esquema 9.** Equilibrios de disociación e isomerización de MX y análogos.

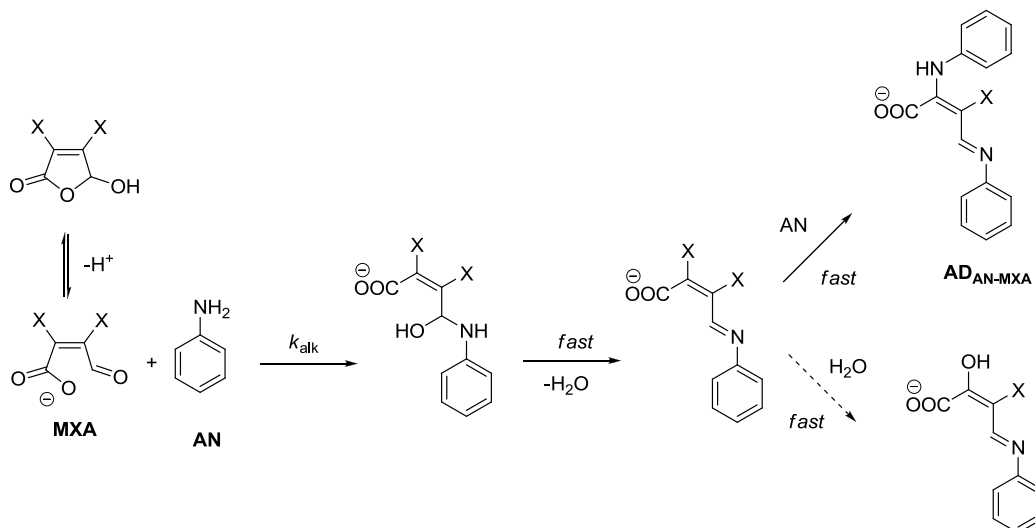
Con objeto de conocer la distribución de especies de MXY en solución y alcanzar conclusiones acerca del origen de la actividad de MX *in vivo*, se han determinado las constantes de equilibrio que se muestran en el Esquema 9 ( $K_{op}$ ,  $K_{a-ap}$ ,  $K_{exo}$ ,  $K_E$ ), junto con las concentraciones de equilibrio de las especies **1-7** en medio neutro.

Los resultados sugieren que, al igual que los ácidos mucohálicos, los MX<sub>Y</sub> protonados se encuentran mayoritariamente en la forma cerrada. Además, la forma abierta es un ácido fuerte, de manera que la constante de acidez aparente entre formas aniónicas y neutras es  $pK_{a-ap} \sim 6$ .

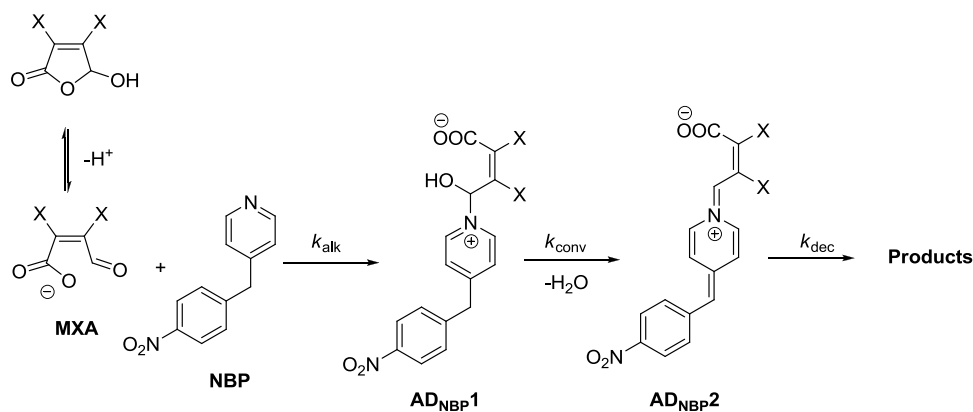
Las concentraciones de equilibrios de los las especies metilen $O$ -terminales son igualmente bajas (aproximadamente una millonésima de la concentración total de halofuranona) para MX, CMCF y MCF.

### 3.5.3. Potencial alquilante de ácidos mucohálicos

Los ácidos mucohálicos reaccionan con las bases del ADN, tanto en sus formas monoméricas como en el propio ADN, dando lugar a derivados eteno, oxalo eteno y halopropenal [38-45]. Para confirmar el posible papel de los productos de hidrólisis de los MXA en su reacción de alquilación y con objeto de conocer en profundidad los mecanismos de alquilación por MXA, se ha estudiado la reacción de estos con dos nucleófilos modelo. Se utilizó anilina como modelo de las aminas exocíclicas de las bases, y la NBP como modelo de los nitrógenos endocíclicos. Los mecanismos de reacción observados para anilina (Esquema 10) y NBP (Esquema 11) son coherentes con los productos observados en la alquilación de los nitrógenos end $O$ - y ex $O$ -cíclicos de los nucleótidos.



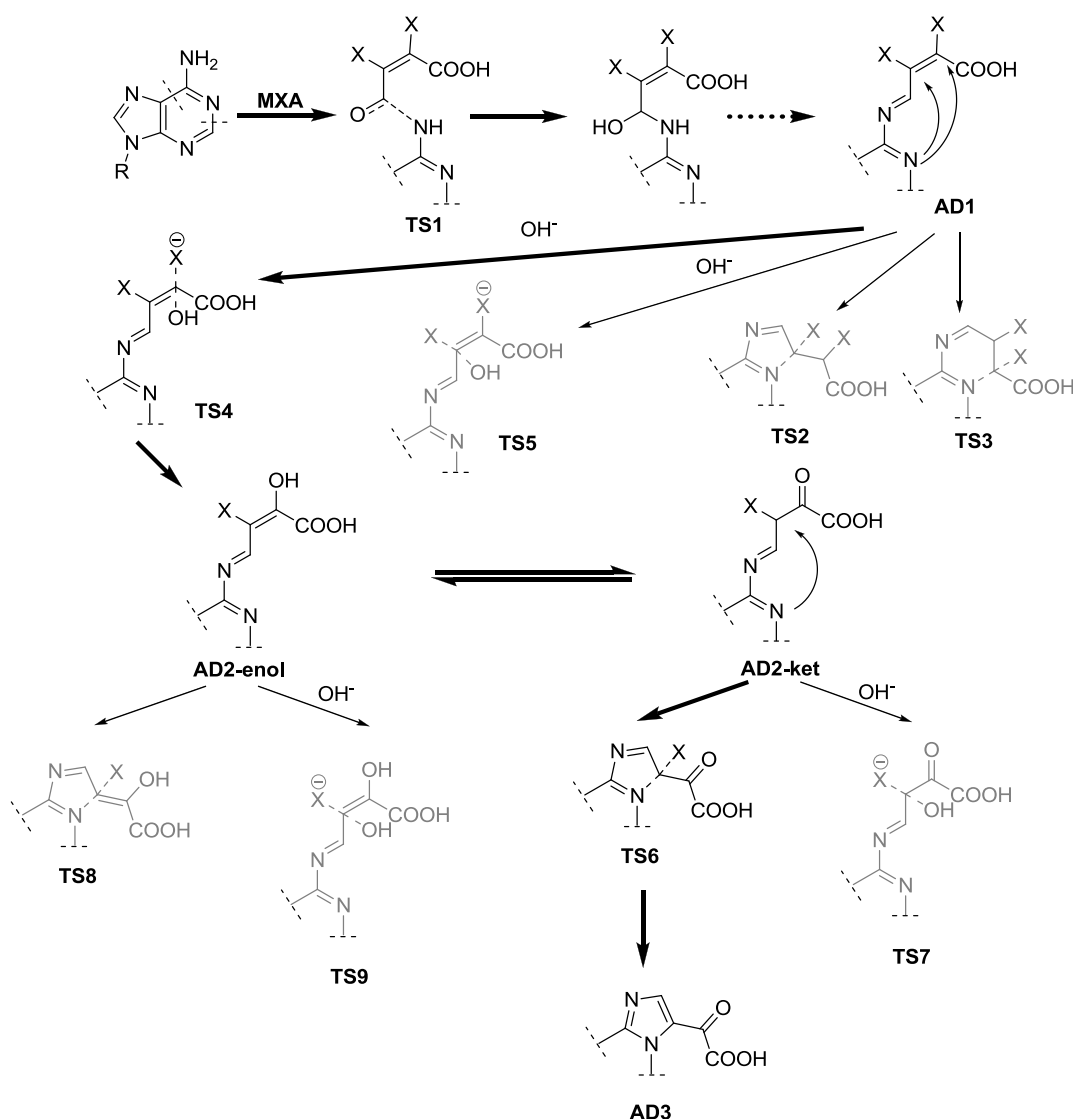
**Esquema 10.** Mecanismo de alquilación de anilina por MXA



**Esquema 11.** Mecanismo de alquilación de NBP por MXA

Se determinaron las constantes de velocidad y los parámetros de activación de las etapas limitantes de cada mecanismo. Los resultados sugieren que los ácidos mucohálicos son agentes alquilantes fuertes que muestran preferencia por las posiciones exocíclicas del ADN. Las velocidades de alquilación son lo suficientemente elevadas para que la intervención de los MOXA (los productos de hidrólisis de los ácidos mucohálicos) pueda considerarse nula.

Además, se ha modelado computacionalmente el mecanismo de reacción de los MXA con adenosina, así como algunas alternativas posibles al mecanismo propuesto en la bibliografía. Los resultados son congruentes con el mecanismo propuesto y descartan, por estar desfavorecidas cinéticamente, algunas posibles etapas alternativas. En el Esquema 12 se muestra el mecanismo de reacción en negro, y, en gris, las reacciones no favorecidas.



**Esquema 12.** Mecanismo de alquilación de nucleótidos por MXA

Los resultados obtenidos permiten concluir que la alquilación de nucleótidos por ácidos mucohálicos tiene lugar por la formación de la base de Schiff, seguida de hidrólisis del halógeno en posición  $\alpha$  con respecto al grupo carboxilato. A continuación tiene lugar la isomerización del enol formado, lo que da lugar a la presencia de un enlace C-halógeno en posición  $\alpha$  con respecto a un carbonilo. Este grupo halógeno especialmente reactivo es expulsado en un reacción de ciclación, o bien sustituido por un grupo hidroxilo.

Nuevamente se observó que la reacción de hidrólisis de los MXA para formar MOXA es mucho más lenta que la alquilación, lo que descarta por completo que los ácidos mucoxihálicos jueguen papel alguno en la alquilación de nucleótidos por MXA.

### 3.5.4. Potencial alquilante de MX y análogos

El espectro de las mutaciones inducidas por MX sugiere que las lesiones generadas por este compuesto tiene lugar en la guanosina. No obstante, no se han logrado aislar aductos guanosina-MX (aunque sí adenosina-MX) en experimentos utilizando ADN de doble hélice.

Dado que las halofuranonas se reducen fácilmente, se ha propuesto que pueden oxidar al ADN. Dado que la guanosina es la base más fácilmente oxidable, esto sería congruente con la mutagenia de MX.

Por ello, en una primera fase del trabajo, se calcularon las afinidades electrónicas en disolución (o potenciales de reducción) para las MXY. Si bien los resultados sugieren que se trata de especies con una clara tendencia a reducirse, sus afinidades electrónicas verticales no son lo suficientemente elevadas como para oxidar directamente a los nucleótidos.

En este trabajo se ha estudiado la reactividad de MX, CMCF y MCF (MXY) con los nucleótidos guanosina y adenosina. En la bibliografía se ha propuesto que estos compuestos reaccionan con las bases en su *isO*-forma metileno terminal.

Nuestros resultados sugieren que MX y CMCF reaccionan por sustitución de los átomos de cloro presentes en el grupo metilo, sin que intervenga la forma con el doble enlace en posición terminal. No es, por tanto, ni la gran reactividad de estos supuestos intermedios, ni su elevada concentración (*vide supra*), las causas de los efectos biológicos extremos de MX.

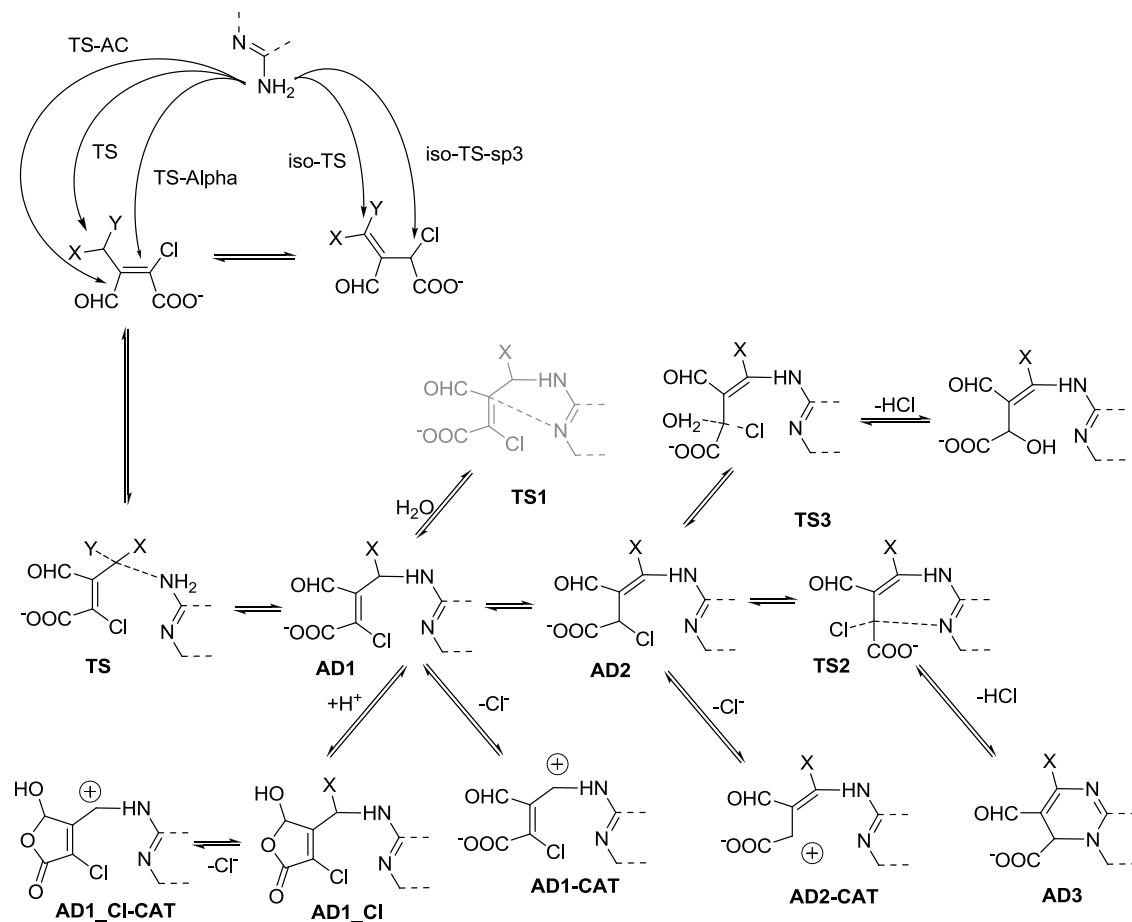
El Esquema 13 muestra el mecanismo estudiado para la alquilación de nucleótidos por MXY. Los productos de la reacción de alquilación, así como las transformaciones sucesivas de estos son coherentes con los aductos descritos en la bibliografía.

Los potenciales de reducción de los aductos nucleótido-MXY son inferiores a los potenciales de oxidación de los nucleótidos que componen el ADN, lo que también descarta que las lesiones oxidativas observadas sean consecuencia de la reacción de reducción de los aductos nucleótido-MXY.

Se observó, además, una tendencia de los aductos a experimentar rotura unimolecular de los enlaces C-Cl, para dar lugar a aductos cargados positivamente.

Las barreras energéticas calculadas sugieren que los MXY son agentes alquilantes moderadamente fuertes, aunque menos reactivos que, por ejemplo, los ácidos mucohólicos y que no existen diferencias importantes entre la reactividad de MX y CMCF a excepción de la que se detalla a continuación.

La presencia de un segundo grupo halógeno hace que la formación de cationes derivados de los aductos MX-nucleótido esté favorecida, especialmente de aquellos derivados de la forma cerrada de AD1 (Esquema 13).



**Esquema 13.** Mecanismo de alquilación de nucleótidos por MX.

Si bien el papel de estos cationes no está claro, se observó que:

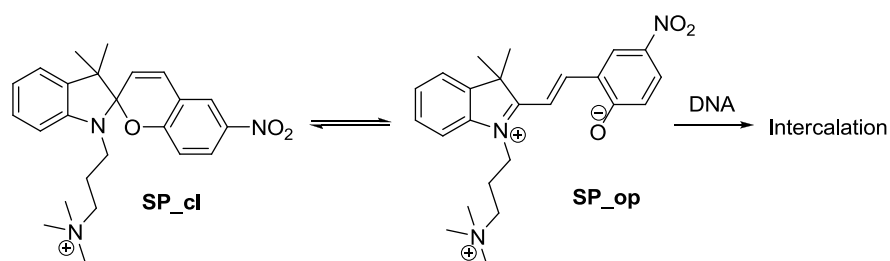
(i) Mientras que las reacciones bimoleculares que conducen a los mismos productos tienen barreras energéticas muy elevadas, las reacciones de ciclación de los cationes conducen a algunos de los aductos observados experimentalmente.

(ii) Las afinidades electrónicas verticales de los cationes son lo suficientemente elevadas como para oxidar directamente a los nucleótidos. La formación de dos radicales, uno de los cuales puede conducirse de base en base a lo largo de la molécula de ADN, podría explicar los efectos biológicos exclusivos de la MX.

### 3.6. Intercalantes

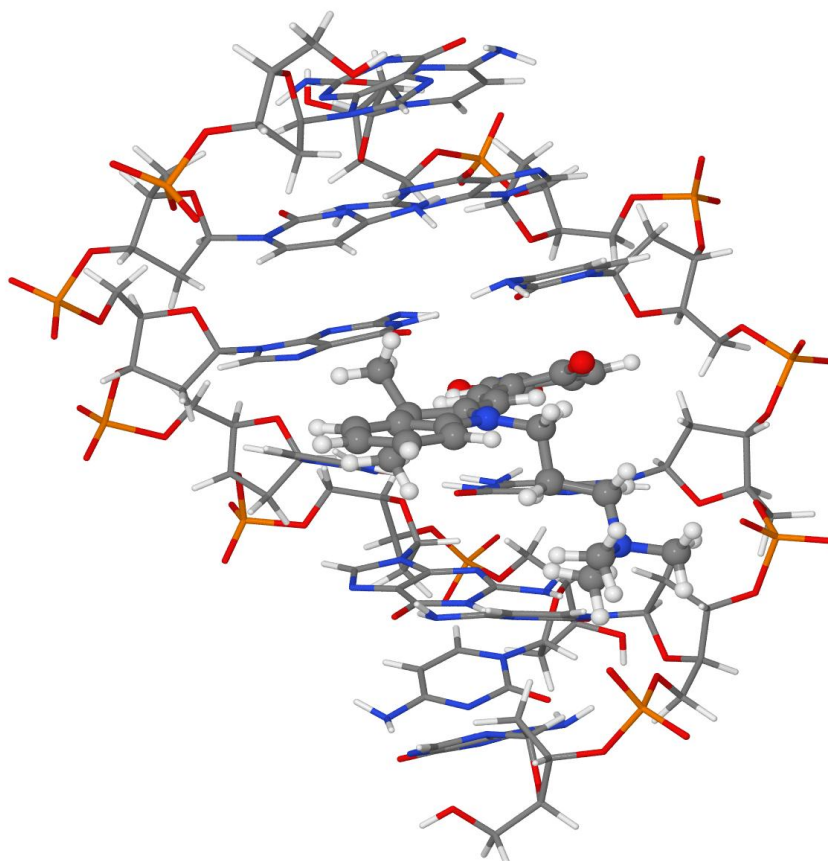
El fotocromismo consiste en la transformación reversible de una especie química entre dos formas con diferentes espectros UV-vis, por absorción de radiación electromagnética.

Los fotocromos tienen múltiples aplicaciones, una de las más comunes es en la fabricación de lentes, y recientemente se han propuestos como interruptores ópticos. A la luz de esta posible aplicación, se ha descrito recientemente un fotocromo capaz de unirse al ADN. El control de este proceso podría tener aplicaciones prácticas muy importantes, tanto tecnológicas como médicas, como serían el control de la transcripción y la replicación.



**Esquema 14.** Fotocromismo de un espiropirano capaz de unirse al ADN.

Para comprender mejor el funcionamiento de un espiropirano capaz de unirse al ADN, descrito por Andersson et al. (Esquema 14), se ha modelado el proceso de intercalación del fotocromo en cuestión en oligonucleótidos dAdT y dGdC. En la Figura 12 se muestra la geometría de equilibrio del fotocromo intercalado.

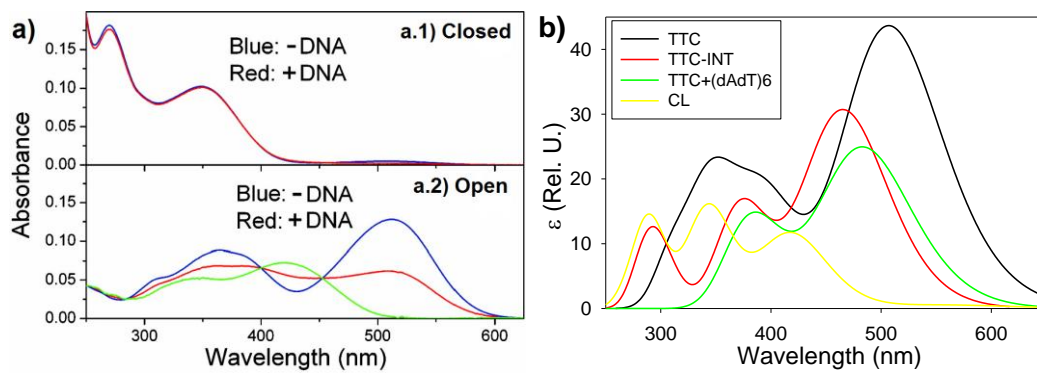


**Figura 12.** Geometría de equilibrio para la intercalación del fotocromo SP en un oligonucleótido tri[dGdC]<sub>2</sub> al nivel de teoría DFT-MPWB1K/6-31G(d).

Los resultados obtenidos están en excelente acuerdo con las medidas experimentales, tanto en lo que se refiere a la isomerización y decoloración térmica del fotocromo, como a sus propiedades ópticas, así como a las energías del proceso de intercalación y las propiedades ópticas del complejo ADN-SP.

Tal y como se muestra en la Figura 13, el espectro UV-Vis calculado para el fotocromo antes y después de la intercalación muestra la misma variación que se observa experimentalmente: un descenso de la absorción (hipocromismo) y cierto desplazamiento hacia el azul (hipsocromismo). Estos cambios son consecuencia de dos efectos en parte opuestos y de desigual magnitud: la pérdida de planaridad tiene como consecuencia un descenso de la absorbancia y desplazamiento hacia el azul, mientras que la interacción electrónica  $\pi$ - $\pi$  resulta en un desplazamiento hacia el rojo y un descenso adicional del a absorbancia.





**Figura 13.** Comparación de los espectros de absorción UV-Vis del fotocromo SP. a) Resultados experimentales. b) Resultados teóricos obtenidos en este trabajo.

## 4. Conclusiones

---

Las conclusiones obtenidas se pueden resumir en:

- ❖ La dicetena se hidroliza rápidamente en medio acuoso, tanto neutro como alcalino.
  - ❖ La influencia del medio de reacción en los parámetros de activación está de acuerdo con los observados para otras lactonas, así como con las propiedades de las mezclas-agua dioxano.
  - ❖ La dicetena es un electrófilo fuerte que reacciona con la NBP más rápido que otras lactonas.
  - ❖ Dado que la alquilación de NBP por DIK es mucho más rápida que la hidrólisis de esta, la falta de efectos biológicos por parte de la dicetena debe ser consecuencia de la corta vida de los aductos de alquilación.
  - ❖ El hidrógeno  $\alpha$  de la dicetena tiene un  $pK_a$  de 15, un resultado que está de acuerdo con las predicciones teóricas para compuesto similares
  - ❖ El hecho de que esta constante de disociación tan elevada pueda medirse, es consecuencia de que DIK es un caso único en el que el isómero  $\beta$ - $\gamma$  insaturado está favorecido respecto del  $\alpha$ - $\beta$ .
- 
- Las hidrólisis neutra, alcalina y ácida de lactonas se han modelado *in silico*.
  - Desde el punto de vista cualitativo, los mecanismos de hidrólisis predichos están de acuerdo con los resultados experimentales.
  - Los parámetros de activación teóricos están en consonancia con los valores experimentales, con errores generalmente inferiores a 5 kJ mol<sup>-1</sup>.
  - La dicetena se hidroliza en medio alcalino por un mecanismo poco común de eliminación-adición de la forma desprotonada.
- 
- La combinación de datos cinéticos y biológicos sugieren que los oxetanos no son agentes alquilantes directos a pH fisiológico.
  - La falta de mutagenia, genotoxicidad y citotoxicidad en presencia de mezcla S9 y citocromo humano CYP2E1 y CYP2A6, indican también que los oxetanos no son activados para formar agentes alquilantes o mutágenos de acción directa *in vivo*.
  - La contradicción aparente entre nuestros resultados y ensayos en animales sugiere que o bien (*i*) los oxetanos son genotoxinas extremadamente débiles o no

son genotóxicos en absoluto y que los resultados previos son erróneos; o bien (ii) el efecto carcinogénico de estos compuestos se ejerce a través de mecanismos completamente diferentes a los de compuestos similares, como epóxidos o lactonas, que son capaces de causar daño directo al ADN.

- El uso de un método relativo permite la determinación precisa de constantes de hidratación del grupo carbonilo de aldehídos, cetonas y ésteres, incluso a niveles de teoría modestos.
- ❖ Los ácidos mucoxihálidos existen en disolución como un equilibrio ácido-base aparente entre la furanon cíclica y carboxilato disociado de cadena abierta. La constante de equilibrio global es  $3,95 \pm 0,02$  y  $4,27 \pm 0,02$ .
- ❖ Los MXA son ácidos fuertes que se disocian rápidamente, con pKa cercanos a la unidad. EN lo que respecta a las formas no disociadas, el tautómero de cadena cerrar está más favorecido por  $30 \text{ kJ mol}^{-1}$ .
- ❖ Los MXA se hidrolizan a MOXA a velocidades despreciables, excepto en condiciones fuertemente básicas, como las que se usan en ablandado por cal. Esto descarta que los MOXA puedan jugar algún papel en la alquilación por MXA *in vivo*.
- ❖ Los MXA reaccionan preferentemente con grupos amino exocíclicos de los nucleótidos del DNA, con formación de una base de Schiff en la etapa limitante. Las reacciones siguientes incluyen hidrólisis, isomerización y circulación o hidrólisis. Los aductos formados y la preferencia por la guanosina, más nucleofílica, está de acuerdo con el espectro mutaciones de los MXA.
- Los MXY existen en disolución acuosa como una mezcla compleja en equilibrio, compuesta mayoritariamente por la forma cerrada y las formas disociadas *E* y *Z*. Las formas no disociadas y aquellas que presentan un grupo metilo terminal son minoritarias.
- Los potenciales de reducción de los MXY sugieren que estos compuestos se reducen fácilmente, pero la reacción no es lo bastante exergónica para dar lugar a la oxidación directa de los nucleótidos del ADN.
- MX y CMCF alquilan el DNA a través del desplazamiento SN2 del grupo cloro, especialmente en la forma *E*. MCF reacciona a través del grupo carbonilo y en la isoforma metileno-*O*-terminal.
- Los aductos nucleótido-*O*-MXY no pueden explicar los efectos biológicos externos de MX. Sin embargo la afinidad electrónica de algunos aductos catiónicos es lo

bastante elevada como para apoyar la hipótesis de que MX inflige daño oxidativo al ADN.

- Las propiedades de unión al ADN de un espiropirano fotocromico se han modelado *in silico*.
- Las energías de intercalación están de acuerdo con el comportamiento observado experimentalmente. Los resultados obtenidos con el funcional MPWB1K son superiores a los obtenidos con el funcional híbrido B3LYP.
- Las propiedades ópticas del completo DNA-SP están también de acuerdo con los espectros UV-Vis experimentales.

## 5. Bibliografía

---

- [ 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] a) Zollinger, H. *Diazo Chemistry I*; VCH: Weinheim, 1994. b) *Diazo Chemistry II*; VCH: Weinheim, 1995.
- [ 3] Williams, D. L. H. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*, Elsevier: Amsterdam, 2004.
- [ 4] Casado, J. Invited Lecture, *Nitrosation Reactions*. En *Fast Reactions in Solution*, Discussion Group, The Royal Society of Chemistry, Annual Meeting 1994.
- [ 5] Casado, J. Invited Lecture, "Chemistry of nitrosation reactions in solution". En *Kolloquien der Ortsverbände, Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie*, 1997.
- [ 6] Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; García Mateos, F. J.; Tostado, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1992**, 987.
- [ 7] Casado, J.; González Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.*, **1996**, 28, 307.
- [ 8] Iglesias, E.; Casado, J. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2002**, 21, 37.
- [ 9] Iglesias, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 13057.
- [10] Iglesias, E. *New J. Chem.* **2000**, 24, 1025.
- [11] Iglesias, E.; García Río, L.; Leis, J. R.; Casado, J. *Recent Res. Devel. Phys. Chem.* **1997**, 1, 403.
- [12] Casado, J., Invited Review, "Nitrosation of Amino Acids as a Precursor of Alkylation Mechanisms". *Recent Studies in Solution Chemistry: Fundamentals and Applications*, **2007**, 37, 139.
- [13] Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds*; Cambridge Univ. Pres: Cambridge, 1992.
- [ 14] Mirvish, S. S. *Cancer Lett.* **1995**, 93, 17.
- [15] Gates, K. S., *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, 22, 1747.
- [16] Casado, J., "Mecanismos de alquilación y potencial mutágeno", Conferencia Inaugural Invitada, XIII Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, Segovia, 2004.
- [17] García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7506.
- [18] García Santos, M. P.; González Mancebo, S.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2177.

- [19] Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 420.
- [20] Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
- [21] Fernández-Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. D. P.; Calle, E.; Casado, J. *Int. J. Chem. Kinet.* **2007**, *39*, 591.
- [22] Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.
- [23] Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; García-Santos, M. D.; Calle, E.; Casado, J. *J. Solution Chem.* **2008**, *37*, 459.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Céspedes, I. F.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2009**, *22*, 418.
- [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**, *75*, 1444.
- [30] Okeya, S.; Kawaguchi, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1984**, *57*, 1217.
- [31] Van Duuren, B. L.; Goldschmidt, B. M. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 77.
- [32] Briody, J. M.; Satchell, D. P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1965**, 3778.
- [33] Blackburn, G. M.; Dodds, H. L. H. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1974**, 377.
- [34] Long, F. A.; Purchase, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 3267.
- [35] Bartlett, P. D.; G. Small, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4867.
- [36] Kaiser, E. T.; F. J. Kézdy, *Prog. Bioorg. Chem.* **1976**, *4*, 239.
- [37] Huisgen, R.; Ott, H.; *Tetrahedron* **1959**, *6*, 253.
- [38] Kronberg, L.; Sjöholm, R.; Karlsson, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, *5*, 852.
- [39] Kronberg, L.; Karlsson, S.; R. Sjöholm, *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 495.
- [40] Asplund, D.; Kronberg, L.; Sjöholm, R.; Munter, T. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 841.
- [41] Kronberg, L.; Asplund, D.; Mäki, J.; Sjöholm, R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 1257.

- [42] Mäki, J.; Sjöholm, R.; Kronberg, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2923.
- [43] Klika, K. D.; Mäki, J.; Sjöholm, R.; Kronberg, L. *Arkivoc* **2006**, 65.
- [44] LeCurieux, F.; Munter, T.; Kronberg, L. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1180.
- [45] Mäki, J.; Sjöholm, R.; Kronberg, L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, *24*, 4445.