



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Física

Mecanismos de nitrosación de sustratos complejos bioactivos

Mario González Jiménez

Memoria presentada por el Graduado
Mario González Jiménez para optar al
título de doctor.

Salamanca, seis de mayo de 2012.



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

Plaza de los Caídos, s/n 37008 Salamanca

Tel. (34) 923 294487 Fax. (34) 923 294574

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

CERTIFICAN que la investigación de doctorado «Mecanismos de nitrosación de sustratos complejos bioactivos» se ha realizado bajo su dirección en este Departamento por el Graduado en Química don Mario González Jiménez.

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

Salamanca, seis de mayo de 2012

Julio Casado Linarejos

Emilio Calle Martín

El trabajo descrito en esta memoria se ha desarrollado dentro de los proyectos CTQ2007-63263 y CTQ2010-18999 del Ministerio de Economía y Competitividad y SA040A08 de la Junta de Castilla y León.

Mario González Jiménez también recibió una beca del Ministerio para realizar su tesis.

Se agradece sinceramente la ayuda de estos organismos.

*Entréme donde no supe
y quedéme no sabiendo
toda ciencia trascendiendo.*

*Yo no supe dónde entraba
pero cuando allí me vi
sin saber dónde me estaba
grandes cosas entendí
no diré lo que sentí
que me quedé no sabiendo
toda ciencia trascendiendo.*

*De paz y de piedad
era la ciencia perfecta,
en profunda soledad
entendida vía recta
era cosa tan secreta
que me quedé balbuciendo
toda ciencia trascendiendo.*

*Estaba tan embebido
tan absorto y ajonado
que se quedó mi sentido
de todo sentir privado
y el espíritu dotado
de un entender no entendiendo
toda ciencia trascendiendo.*

*El que allí llega de vero
de sí mismo desfallece
cuanto sabía primero
mucho bajo le parece
y su ciencia tanto crece
que se queda no sabiendo,
toda ciencia trascendiendo.*

*Cuanto más alto se sube
tanto menos se entendía
que es la tenebrosa nube
que a la noche esclarecía
por eso quien la sabía
queda siempre no sabiendo,
toda ciencia trascendiendo.*

*Este saber no sabiendo
es de tan alto poder
que los sabios arguyendo
jamás le pueden vencer
que no llega su saber
a no entender entendiendo
toda ciencia trascendiendo.*

*Y es de tan alta excelencia
aqueste sumo saber
que no hay facultad ni ciencia
que le puedan emprender
quien se supiere vencer
con un no saber sabiendo,
toda ciencia trascendiendo.*

*Y si lo queréis oír
consiste esta suma ciencia
en un subido sentir
de la divinal esencia
es obra de su clemencia
hacer quedar no entendiendo
toda ciencia trascendiendo.*

Juan de Yepes Álvarez¹

*Sed es beberse a tragos las estrellas,
comerse el tiempo, acelerar la prisa,
asirse a un ala, atravesar la brisa,
montada la ansiedad sobre centellas.*

*Correr a ciegas sin perder las huellas
sobre el eco del llanto y de la risa,
buscando el pie que inexorable pisa
los días grises y las noches bellas.*

*Sed es beberlo todo y todavía
abrir la boca contracorriente
sin que logre saciarte el río entero.*

*La veleta que el viento desvaría.
El silencio. El ruido de la fuente.
La espera larga al borde del sendero.*

Felipe Doyagüez Chico²

Índice general

Índice de figuras	26
Índice de esquemas	28
Índice de tablas	32
1. Introducción	33
1.1. Antecedentes históricos de las reacciones de nitrosación	33
1.2. Motivación del trabajo	39
2. Informe bibliográfico	41
2.1. Ácido nitroso y nitritos	41
2.1.1. Fuentes de exposición a los nitritos	45
2.1.2. Los nitritos en el cuerpo humano	48
2.1.3. Análisis de nitritos en agua	51
2.2. Agentes nitrosantes	55
2.2.1. Iones nitrosonio y nitrosacido	55
2.2.2. Trióxido de dinitrógeno	59

2.2.3. Sales de nitrosilo	62
2.2.4. Nitritos de alquilo	65
2.2.5. Agentes nitrosantes radicalarios: NO y NO ₂	67
2.2.6. Otros agentes nitrosantes	69
2.2.6.1. Complejos metálicos	69
2.2.6.2. Carboxilatos de nitrosilo	69
2.2.6.3. Nitritos	70
2.2.6.4. <i>N</i> -Nitrosaminas	71
2.2.6.5. <i>C</i> -Nitrosocompuestos aromáticos	71
2.2.6.6. Líquidos iónicos	72
2.3. Reacciones de nitrosación	73
2.3.1. <i>C</i> -Nitrosación aromática	73
2.3.2. Diazotación de <i>C</i> -nitrosocompuestos aromáticos	77
2.3.3. <i>N</i> -Nitrosación	78
2.3.4. Reacciones de copulación	80
2.3.5. <i>O</i> -Nitrosación	81
2.3.6. Inhibición de la nitrosación	83
2.3.7. Reordenamiento interno	89
2.3.8. <i>S</i> -Nitrosación	90
2.3.9. Control por difusión	90
2.3.10. Control orbitalico	92
2.4. Nitrosación, mutagenia y carcinogenia	94
2.5. Compuestos estudiados	97
2.5.1. Etilbenceno	97

2.5.2. Fenetilamina	98
2.5.3. Tiramina	102
2.5.4. Dopamina	105
2.5.5. Serotonina	109
2.5.6. Minoxidilo	113
3. Parte experimental	117
3.1. Estudio químico	117
3.1.1. Introducción	117
3.1.1.1. Influencia de la temperatura	119
3.1.1.2. Influencia de la fuerza iónica	120
3.1.1.3. Efecto isotópico cinético	121
3.1.1.4. Reacciones rápidas	121
3.1.2. Procedimiento experimental	122
3.1.2.1. Consideraciones generales	122
3.1.2.2. Medida de las reacciones rápidas	124
3.1.2.3. Estudio de la evolución de los espectros con el pH	126
3.1.2.4. Síntesis de los nitrosocompuestos	127
3.1.2.5. Difracción de Rayos X	129
3.1.3. Metodología y detalles computacionales	130
3.2. Estudio biológico	131
3.2.1. Mutagenia: Test de Ames	131
3.2.1.1. Procedimiento experimental	134
3.2.2. Mutagenia: Test de aberraciones cromosómicas	137
3.2.2.1. Procedimiento experimental	139

3.2.3. Citotoxicidad: Test del MTT	141
3.2.3.1. Procedimiento experimental	142
3.3. Equipos y reactivos utilizados	144
3.3.1. Estudio químico	144
3.3.2. Estudio biológico	146
4. Resultados experimentales	147
4.1. Nitrosación del etilbenceno	147
4.1.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico	147
4.1.2. Reacción entre etilbenceno y nitrito	148
4.2. Nitrosación de la fenetilamina	153
4.2.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico	153
4.2.2. Reacción entre fenetilamina y nitrito	155
4.2.3. Efecto de la presión en la velocidad	156
4.2.4. Estudio espectrofotométrico del nitrito	158
4.2.5. Órdenes parciales de reacción	162
4.2.6. Velocidad de descomposición del nitrito	165
4.2.7. Influencia de la acidez del medio	166
4.2.8. Influencia de la fuerza iónica	171
4.2.9. Influencia de la temperatura	172
4.2.10. Determinación del producto de reacción	174
4.3. Nitrosación de la tiramina	176
4.3.1. Estudio espectrofotométrico	176
4.3.2. Reacción entre tiramina y nitrito	177
4.3.3. Órdenes parciales de reacción	181

4.3.4.	Influencia de la acidez del medio	184
4.3.5.	Influencia de la fuerza iónica	187
4.3.6.	Efecto isotópico cinético	188
4.3.7.	Influencia de la temperatura	189
4.3.8.	Estructura y reactividad de la tiramina	191
4.3.9.	Determinación del producto de reacción	192
4.3.10.	Actividad biológica de la nitrosotiramina	195
4.3.10.1.	Test de Ames	195
4.3.10.2.	Test de aberraciones cromosómicas	197
4.3.10.3.	Test del MTT	198
4.4.	Nitrosación de la dopamina	200
4.4.1.	Estudio espectrofotométrico	200
4.4.2.	Autooxidación de la dopamina	201
4.4.3.	Reacción de nitrosación de la dopamina	204
4.4.4.	Influencia de la concentración de iones cloruro	205
4.4.5.	Órdenes parciales de reacción	206
4.4.6.	Influencia de la acidez del medio	207
4.4.7.	Influencia de la fuerza iónica	212
4.4.8.	Efecto isotópico cinético	212
4.4.9.	Influencia de la temperatura	213
4.4.10.	Estructura y reactividad de la dopamina	215
4.4.11.	Determinación del producto de reacción	216
4.4.12.	Actividad biológica de la nitrosodopamina	217
4.4.12.1.	Test de Ames	217

4.4.12.2. Test de aberraciones cromosómicas	221
4.4.12.3. Test del MTT	222
4.5. Nitrosación de la serotonina	223
4.5.1. Estudio espectrofotométrico	223
4.5.2. Reacción entre serotonina y nitrito	225
4.5.3. Tratamiento cinético de reacciones consecutivas	226
4.5.4. Coeficientes de absorción molar	234
4.5.5. Influencia de la concentración de nitrito	235
4.5.6. Influencia de la acidez del medio	236
4.5.7. Influencia de la fuerza iónica	242
4.5.8. Efecto isotópico cinético	243
4.5.9. Influencia de la temperatura	245
4.5.10. Estructura y reactividad de la serotonina	249
4.5.11. Determinación del producto de reacción	252
4.5.12. Actividad biológica de la nitrososerotonina	253
4.5.12.1. Test de Ames	253
4.5.12.2. Test de aberraciones cromosómicas	255
4.5.12.3. Test del MTT	256
4.6. Nitrosación del minoxidilo	257
4.6.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico	257
4.6.2. Reacción entre minoxidilo y nitrito	262
4.6.3. Órdenes parciales de reacción	263
4.6.4. Determinación de las constantes de velocidad	264
4.6.5. Influencia de acidez del medio	267

4.6.6. Influencia de la fuerza iónica	270
4.6.7. Efecto isotópico cinético	271
4.6.8. Influencia de la temperatura	271
4.6.9. Determinación del producto de reacción	273
4.6.10. Actividad biológica del nitrosominoxidilo	280
4.6.10.1. Test de Ames	280
4.6.10.2. Test del MTT	282
4.7. Determinación de nitrito con minoxidilo	284
4.7.1. Descripción del método	284
4.7.2. Curva de calibrado	285
4.7.3. Catálisis por el ion cloruro	286
4.7.4. Efecto de iones metálicos	287
4.7.5. Precisión del método	288
4.7.6. Límites de detección y cuantificación	288
4.7.7. Aplicación del método	289
5. Discusión de los resultados	291
5.1. C-Nitrosación de compuestos aromáticos	291
5.2. Reacciones de N-nitrosación	298
5.3. Competencia entre N-nitrosación y C-nitrosación	299
5.4. Actividad biológica de los compuestos estudiados	302
6. Conclusiones	305
Bibliografía	309

Índice de figuras

1.1. Protagonistas de la historia de la nitrosación	37
1.2. Número de publicaciones sobre nitrosación en el tiempo	38
1.3. Sustratos investigados en esta tesis	40
2.1. Estructura del ácido nitroso	43
2.2. Técnicas de análisis del ion nitrito y sus reactivos	53
2.3. Estructura teórica del ion nitrosacidio	58
2.4. Estructura del trióxido de dinitrógeno	61
2.5. Modelo de Kekule para el benceno	73
2.6. Modelo de la teoría de orbitales moleculares para el benceno	74
2.7. Estructura de los carboxilatos de nitrosilo	83
2.8. Control por carga y control orbitálico	93
2.9. Sustratos investigados en esta tesis	97
2.10. Catecolaminas y sustancias afines	104
2.11. Productos del metabolismo del minoxidilo	114
3.1. Perfil energético de una reacción química	119
3.2. Medida de una reacción por un método de flujo	122

3.3. Esquema de un espectrofotómetro de flujo detenido	124
3.4. Curva de calibrado del espectrofotómetro de flujo	125
3.5. Montaje para medir la influencia del pH en los espectros	126
3.6. Montaje para sintetizar nitrosominóxido	129
3.7. Relación entre dosis y número de colonias	135
3.8. Aberraciones cromosómicas posibles	138
4.1. Espectro de absorción UV-visible del etilbenceno	148
4.2. Banda de absorción ultravioleta del etilbenceno	149
4.3. Reacción entre etilbenceno y nitrito	149
4.4. Espectro de masas y cromatograma de gases del etilbenceno	150
4.5. Espectro de masas y cromatograma de gases de la mezcla etilbenceno - ácido nitroso	151
4.6. Espectro de absorción UV-visible de la fenetilamina	153
4.7. Coeficiente de absorción molar de la fenetilamina	154
4.8. Coeficiente de absorción molar a 258 nm de la fenetilamina	155
4.9. Influencia del pH en el espectro de la fenetilamina	156
4.10. Reacción entre fenetilamina y nitrito en medio ácido	157
4.11. Influencia de la presión en la velocidad de reacción	157
4.12. Influencia del pH en el espectro del sistema ácido nitroso/nitrito	158
4.13. Coeficiente de absorción molar del ácido nitroso	160
4.14. Coeficiente de absorción molar del nitrito	161
4.15. Nitrosación de la fenetilamina: Orden del nitrito	163
4.16. Nitrosación de la fenetilamina: Orden de la fenetilamina	164
4.17. Influencia del pH en la descomposición del nitrito	165
4.18. Nitrosación de la fenetilamina: Influencia de la acidez	167
4.19. Nitrosación de la fenetilamina: Influencia de la fuerza iónica	171

4.20. Nitrosación de la fenetilamina: Ecuación de Arrhenius	173
4.21. Nitrosación de la fenetilamina: Ecuación de Eyring	173
4.22. Espectros de masas de la fenetilamina y de la mezcla de reacción	175
4.23. Espectro de absorción UV-visible de la tiramina	176
4.24. Influencia del pH en el espectro de la tiramina	177
4.25. Coeficiente de absorción molar de la tiramina	178
4.26. Reacción entre tiramina y nitrito en medio ácido	179
4.27. Coeficiente de absorción molar de la nitrosotiramina	180
4.28. Nitrosación de la tiramina: Orden de la tiramina	182
4.29. Nitrosación de la tiramina: Orden del nitrito	183
4.30. Nitrosación de la tiramina: Influencia de la acidez	185
4.31. Nitrosación de la tiramina: Influencia de la fuerza iónica	187
4.32. Nitrosación de la tiramina: Ecuación de Arrhenius	190
4.33. Nitrosación de la tiramina: Ecuación de Eyring	190
4.34. Estructura calculada de la tiramina	191
4.35. Mapa de densidad electrónica de la tiramina	192
4.36. Energía comparada de los complejos σ de la nitrosotiramina	193
4.37. Espectro de masas de la tiramina nitrosada	194
4.38. Nitrosotiramina: Resultados del test de Ames con la cepa TA98	196
4.39. Nitrosotiramina: Resultados del test de Ames con la cepa TA100	196
4.40. Test del MTT aplicado a la nitrosotiramina	199
4.41. Espectro UV-visible de la dopamina	200
4.42. Coeficiente de absorción molar de la dopamina	201
4.43. Espectro UV-visible de la dopamina oxidada	202
4.44. Estudio espectroscópico de la oxidación de la dopamina	203
4.45. Acidez de las disoluciones de hidrocloreuro de dopamina	203

4.46. Reacción entre dopamina y nitrito en medio ácido	204
4.47. Coeficiente de absorción molar de la nitrosodopamina	205
4.48. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la concentración de Cl^-	206
4.49. Nitrosación de la dopamina: Orden de la dopamina	208
4.50. Nitrosación de la dopamina: Orden del nitrito	209
4.51. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la acidez	210
4.52. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la fuerza iónica	212
4.53. Nitrosación de la dopamina: Ecuaciones de Arrhenius y de Eyring	214
4.54. Estructura calculada de la dopamina	215
4.55. Mapa de densidad electrónica de la dopamina	216
4.56. Energía comparada de los complejos σ de la nitrosodopamina	217
4.57. Espectro de masas de la dopamina nitrosada	218
4.58. Nitrosotiramina: Resultados del test de Ames con la cepa TA98	219
4.59. Nitrosotiramina: Resultados del test de Ames con la cepa TA100	219
4.60. Nitrosotiramina: Test de Ames (TA98) con dosis entre 20 y 80 μg	220
4.61. Test del MTT aplicado a la nitrosodopamina	222
4.62. Espectro de absorción UV-visible de la serotonina	223
4.63. Coeficiente de absorción molar de la serotonina	224
4.64. Influencia del pH en el espectro de la serotonina	225
4.65. Reacción entre serotonina y nitrito en medio ácido	226
4.66. Estudio cinético de la reacción entre serotonina y nitrito	227
4.67. Ajuste de las cinéticas al mecanismo de reacciones consecutivas	231
4.68. Ajuste de las cinéticas al mecanismo de reacciones consecutivas	232
4.69. Ajuste de las cinéticas al mecanismo de reacciones consecutivas	233
4.70. Coeficientes de absorción molar de la nitrososerotonina	234
4.71. Nitrosación de la serotonina: Orden del nitrito	236

4.72. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la acidez ($k_{\text{obs},1}$)	238
4.73. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la acidez ($k_{\text{obs},2}$)	239
4.74. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la fuerza iónica	243
4.75. Influencia de la temperatura en los perfiles de reacción	245
4.76. Nitrosación de la serotonina: Ecuación de Arrhenius ($k_{\text{obs},1}$)	247
4.77. Nitrosación de la serotonina: Ecuación de Eyring ($k_{\text{obs},1}$)	247
4.78. Nitrosación de la serotonina: Ecuación de Arrhenius ($k_{\text{obs},2}$)	248
4.79. Nitrosación de la serotonina: Ecuación de Eyring ($k_{\text{obs},2}$)	248
4.80. Estructura calculada de la serotonina	250
4.81. Mapa de densidad electrónica de la serotonina	250
4.82. Energía comparada de los complejos σ de la nitrososerotonina	251
4.83. Espectro de masas de la serotonina nitrosada	252
4.84. Nitrososerotonina: Resultados del test de Ames con la cepa TA98	254
4.85. Nitrososerotonina: Resultados del test de Ames con la cepa TA100	254
4.86. Test del MTT aplicado a la nitrososerotonina	256
4.87. Espectro UV-visible del minoxidilo	257
4.88. Coeficiente de absorción molar del minoxidilo	258
4.89. Influencia del pH en el espectro del minoxidilo	259
4.90. Coeficiente de absorción molar del minoxidilo a pH = 3,1	260
4.91. Coeficiente extinción molar del minoxidilo a pH = 4,1	261
4.92. Reacción entre minoxidilo y nitrito en medio ácido	262
4.93. Coeficientes de absorción molar del nitrosominoxidilo	263
4.94. Nitrosación del minoxidilo: Orden del minoxidilo	265
4.95. Nitrosación del minoxidilo: Orden del nitrito	266
4.96. Ajuste de los resultados al método integral	267
4.97. Nitrosación del minoxidilo: Influencia de la acidez	269

4.98. Nitrosación del minoxidilo: Influencia de la fuerza iónica	270
4.99. Nitrosación del minoxidilo: Ecuación de Arrhenius	272
4.100. Nitrosación del minoxidilo: Ecuación de Eyring	272
4.101. Espectro de masas del nitrosominoxidilo	274
4.102. Imagen del nitrosominoxidilo por difracción de RX	275
4.103. RMN ¹ H del minoxidilo disuelto en DMSO deuterado	276
4.104. RMN ¹ H del nitrosominoxidilo disuelto en CD ₃ OD	277
4.105. RMN ¹³ C del minoxidilo disuelto en DMSO deuterado	278
4.106. RMN ¹³ C del nitrosominoxidilo disuelto en CD ₃ OD	279
4.107. Geometría de la celda unidad de un cristal de nitrosominoxidilo	280
4.108. Nitrosominoxidilo: Resultados del test de Ames con la cepa TA98	281
4.109. Nitrosominoxidilo: Resultados del test de Ames con la cepa TA100	281
4.110. Test del MTT aplicado al nitrosominoxidilo	283
4.111. Perfiles cinéticos de la nitrosación de minoxidilo	285
4.112. Curva de calibrado del método propuesto	286
4.113. Efecto de los iones Cl ⁻ en el tiempo de medida	287
5.1. Compuestos estudiados por González Mancebo <i>et al.</i>	292
5.2. Relación isocinética entre los compuestos estudiados	293
5.3. Representación de Palm-Vizgert	294
5.4. Competencia entre N-nitrosación y C-nitrosación en la tiramina y la dopamina	301
5.5. Competencia entre N-nitrosación y C-nitrosación en la serotonina	302

Índice de esquemas

1.1. Reacción de Piria	34
1.2. Obtención del primer diazocompuesto por Griess	34
1.3. Reordenamiento de Fischer-Hepp	35
1.4. Reordenamiento de Demjanov	36
2.1. Transformaciones químicas de la mioglobina.	47
2.2. Ciclo de los nitritos y nitratos en el cuerpo humano.	49
2.3. Reacción de nitrosación radicalaria con óxido nítrico	68
2.4. Mecanismo de nitrosación por nitritos	70
2.5. Método de Liebermann para la detección de nitrosaminas	71
2.6. Catálisis por <i>C</i> -nitrosocompuestos aromáticos	72
2.7. Síntesis de sales de diazonio con líquidos iónicos	72
2.8. Efecto de los sustituyentes y su posición en la S_EAr	75
2.9. S_EAr en un anillo heteroatómico: piridina	76
2.10. Mecanismo de diazotación de un <i>C</i> -nitrosocompuesto	77
2.11. Mecanismos de nitrosación y desaminación de aminas primarias	78
2.12. Mecanismo de transposición de una <i>N</i> -nitrosamina secundaria	79
2.13. Mecanismo de descomposición de una <i>N</i> -nitrosamina terciaria	80

2.14. Reacción de copulación	81
2.15. Mecanismo del reordenamiento de Fischer-Hepp	82
2.16. Mecanismo de reducción del ion nitrosacido por el ácido ascórbico	84
2.17. Reordenamiento de Tiffeneau-Demjanov	89
2.18. Reacción de ciclación de aminoácidos	90
2.19. Activación metabólica de <i>N</i> -nitrosocompuestos	96
2.20. Ruta biosintética de catecolaminas	100
2.21. Equilibrio ácido-base de la tiramina	105
2.22. Metabolización de la dopamina	108
2.23. Oxidación de la dopamina	108
2.24. Biosíntesis de serotonina	112
2.25. Productos del metabolismo del minoxidilo	114
3.1. Ruta de la síntesis de nitrosotiramina	127
3.2. Reducción metabólica de MTT	142
4.1. Mecanismo de nitrosación de la fenetilamina	168
4.2. Mecanismo de nitrosación de la tiramina	186
4.3. Reacción de complejación de la nitrosotiramina.	194
4.4. Mecanismo de nitrosación de la dopamina	211
4.5. Mecanismo de la primera nitrosación de la serotonina	237
4.6. Mecanismo de la segunda nitrosación de la serotonina	241
4.7. Reacción de complejación de la nitrososerotonina	253
4.8. Mecanismo de nitrosación del minoxidilo	268

Índice de tablas

2.1. Constantes de acidez del ácido nitroso	44
2.2. Solubilidad y estabilidad térmica de diferentes nitritos	46
2.3. Límites de detección de los métodos de determinación de nitrito	54
2.4. Magnitudes termodinámicas de la descomposición del N_2O_3	60
2.5. Propiedades físicas de algunas sales de nitrosilo	63
2.6. Constantes de equilibrio de formación de sales de nitrosilo	64
2.7. Inhibidores solubles en aceite	86
2.8. Inhibidores solubles en agua (I)	87
2.9. Inhibidores solubles en agua (II)	88
2.10. Inhibidor soluble en aceite y en agua	88
2.11. Constantes de velocidad de nitrosaciones controladas por difusión	92
2.12. Propiedades del etilbenceno	99
2.13. Propiedades de la fenetilamina	101
2.14. Propiedades de la tiramina	103
2.15. Propiedades de la dopamina	107
2.16. Propiedades de la serotonina	111
2.17. Propiedades del minoxidilo	115

3.1. Curva de calibrado del espectrofotómetro de flujo	125
3.2. Genotipos de las cepas bacterianas empleadas en el test de Ames	132
3.3. Origen de los equipos y reactivos químicos empleados (Parte I)	144
3.4. Origen de los reactivos químicos empleados (Parte II)	145
3.5. Origen del material empleado en el estudio biológico	146
4.1. Etilbenceno: Condiciones experimentales de la CG - EM	152
4.2. Coeficiente de absorción molar de la fenetilamina	155
4.3. Coeficiente de absorción molar del ácido nitroso	160
4.4. Coeficiente de absorción molar del nitrito	161
4.5. Nitrosación de la fenetilamina: Orden del nitrito	163
4.6. Nitrosación de la fenetilamina: Orden de la fenetilamina	164
4.7. Nitrosación de la fenetilamina: Influencia de la acidez	167
4.8. Nitrosación de la fenetilamina: Influencia de la fuerza iónica	171
4.9. Nitrosación de la fenetilamina: Influencia de la temperatura	172
4.10. Coeficiente de absorción molar de la tiramina	178
4.11. Coeficiente de absorción molar de la nitrosotiramina	180
4.12. Nitrosación de la tiramina: Orden de la tiramina	182
4.13. Nitrosación de la tiramina: Orden del nitrito	183
4.14. Nitrosación de la tiramina: Influencia de la acidez	185
4.15. Nitrosación de la tiramina: Influencia de la fuerza iónica	187
4.16. Nitrosación de la tiramina: Influencia de la temperatura	189
4.17. Parámetros de activación de la reacción de nitrosación de la tiramina . . .	189
4.18. Resultados del test de Ames aplicado a la nitrosotiramina	195
4.19. Test de aberraciones cromosómicas aplicado a la nitrosotiramina	197
4.20. Test del MTT aplicado a la nitrosotiramina	199
4.21. Coeficiente de absorción molar de la dopamina	201

4.22. Coeficiente de absorción molar de la nitrosodopamina	205
4.23. Nitrosación de la dopamina: Orden de la dopamina	208
4.24. Nitrosación de la dopamina: Orden del nitrito	209
4.25. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la acidez	210
4.26. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la fuerza iónica	212
4.27. Nitrosación de la dopamina: Influencia de la temperatura	213
4.28. Parámetros de activación de la reacción de nitrosación de la dopamina	215
4.29. Test de Ames aplicado a la nitrosodopamina	218
4.30. Nitrosotiramina: Test de Ames (TA98) con dosis entre 20 y 80 μg	220
4.31. Test de aberraciones cromosómicas aplicado a la nitrosodopamina	221
4.32. Test del MTT aplicado a la nitrosodopamina	222
4.33. Coeficiente de absorción molar de la serotonina	224
4.34. Coeficientes de absorción molar de la nitrososerotonina	234
4.35. Nitrosación de la serotonina: Orden del nitrito	236
4.36. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la acidez ($k_{\text{obs},1}$)	238
4.37. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la acidez ($k_{\text{obs},2}$)	239
4.38. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la fuerza iónica	243
4.39. Efectos isotópicos observados en la nitrosación de la serotonina	244
4.40. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la temperatura ($k_{\text{obs},1}$)	246
4.41. Nitrosación de la serotonina: Influencia de la temperatura ($k_{\text{obs},2}$)	246
4.42. Parámetros termodinámicos de las nitrosaciones de la serotonina	249
4.43. Test de Ames aplicado a la nitrososerotonina	253
4.44. Test de aberraciones cromosómicas aplicado a la nitrososerotonina	255
4.45. Test del MTT aplicado a la nitrososerotonina	256
4.46. Coeficiente de absorción molar del minoxidilo	258
4.47. Coeficiente de absorción molar del minoxidilo a pH = 3,1	260

4.48. Coeficiente extinción molar del minoxidilo a pH = 4,1	261
4.49. Coeficientes de absorción molar del nitrosominoxidilo	263
4.50. Nitrosación del minoxidilo: Orden del minoxidilo	265
4.51. Nitrosación del minoxidilo: Orden del nitrito	266
4.52. Ajuste de los resultados al método integral	267
4.53. Nitrosación del minoxidilo: Influencia de la acidez	269
4.54. Nitrosación del minoxidilo: Influencia de la temperatura	271
4.55. Parámetros de activación de la reacción de nitrosación del minoxidilo	273
4.56. Propiedades de la celda y del difractograma	275
4.57. Resultados del test de Ames aplicado al nitrosominoxidilo	282
4.58. Test del MTT aplicado al nitrosominoxidilo	283
4.59. Curva de calibrado del método propuesto	286
4.60. Determinación de la precisión del método propuesto	288
5.1. Relación isocinética entre los compuestos estudiados	293
5.2. Representación de Palm-Vizgert	294
5.3. Constantes de C-nitrosación aromática de diversos sustratos	296
5.4. Índices de reactividad de sustratos aromáticos C-nitrosados	297

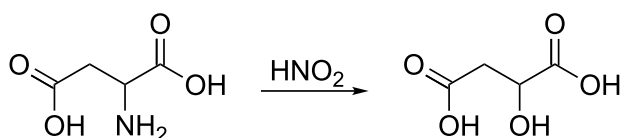
Introducción

1.1. Antecedentes históricos de las reacciones de nitrosación

El origen de las reacciones de nitrosación está ligado al de la propia química. Durante el siglo XVIII, en el albor de la nueva ciencia, una de las primeras reacciones que se estudió sistemáticamente fue el ataque de los poderosos ácidos minerales a los alcoholes aislados de los alimentos. Así, de la condensación de alcoholes y ácido nitroso se obtuvieron los primeros nitrosocompuestos: los ésteres de nitrito.⁴ Estos compuestos aún no tenían aplicación alguna y se descomponían fácilmente, por lo que merecieron escaso interés.

Mucho más atractivos fueron los siguientes nitrosocompuestos descubiertos: las nitrosaminas. En 1846, el político y químico calabrés Raffaele Piria trabajaba en la Universidad de Pisa aislando y caracterizando productos de descomposición de proteínas vegetales. En un experimento, a partir de unos kilos de almortas obtuvo unos pocos gramos de unos cristales que, tras múltiples ensayos, identificó como ácido aspártico.⁵ Haciendo pruebas con los cristales, trató una disolución de los mismos con ácido nitroso y observó que se transformaban en ácido málico (esquema 1.1).

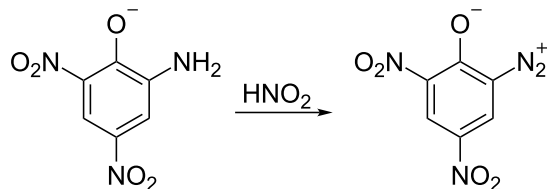
Asombrado, publicó el descubrimiento de la reacción de desaminación en una pequeña revista italiana llamada *Il Cimento*. Esta publicación apenas tenía difu-



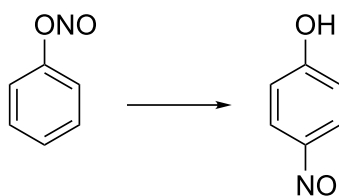
Esquema 1.1: Reacción de Piria.

sión, pero su artículo circuló por toda Europa. Dos años más tarde su trabajo se tradujo al alemán, idioma en el que alcanzó una gran repercusión.^{5,6} Uno de los químicos más importantes de la época, August Wilhelm von Hofmann, aplicó enseguida la reacción a una gran variedad de aminas alifáticas y aromáticas, entre ellas la anilina, que consiguió transformar en fenol.⁷ Uno de sus alumnos, William Henry Perkin, con tan sólo dieciocho años, descubrió por casualidad mientras experimentaba con la anilina el primer colorante sintético de la historia al que denominó púrpura de anilina.⁸ Hasta ese momento los colorantes se obtenían mediante costosos procesos a partir de plantas, insectos, moluscos o minerales, por lo que el inmenso potencial económico que tenían los nuevos colorantes artificiales espoleó la investigación sobre el tema.

En 1858 —mientras Perkin inauguraba su primera fábrica de púrpura de anilina⁹— el alemán Johann Peter Griess aisló el primer diazocompuesto en un paso intermedio de la reacción de Piria aplicada al ácido picrámico (esquema 1.2).¹⁰ Al cabo de un tiempo también consiguió aislar las primeras sales de diazonio aromáticas¹¹ y descubrió que se podían acoplar a otros compuestos aromáticos para obtener pigmentos cuyo color dependía de las moléculas de partida.¹² Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de dinero que podía haber



Esquema 1.2: Primer diazocompuesto aislado.



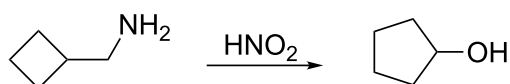
Esquema 1.3: Reordenamiento de Fischer-Hepp.

ganado con los resultados de su investigación, Peter Griess nunca quiso sacar provecho económico de su trabajo. Cedió libremente todas sus recetas a la industria de los colorantes y apenas registró patentes. Sus descubrimientos le habían dado toda la satisfacción que necesitaba.

En los años siguientes se produjeron un gran número de avances en el área de la nitrosación. En 1863, utilizando la reacción de Piria, se aislaron las primeras nitrosaminas a partir de aminas secundarias¹³ y, en 1874, Viktor Meyer describió por primera vez la nitrosación de un carbono de una molécula aromática.¹⁴⁻¹⁶ Pronto se fueron caracterizando nuevos nitrosocompuestos procedentes de las reacciones entre el ácido nitroso y otros grupos funcionales de moléculas orgánicas.

En aquella época, elucidar la estructura de los nuevos compuestos no era nada fácil.¹⁷ A la ausencia de técnicas se sumaban las peculiares propiedades de las moléculas estudiadas. Los nitrosocompuestos presentaban colores muy variados que incluso cambiaban al preparar disoluciones y los diazocompuestos mostraban una reactividad muy diferente a la de las sales de diazonio, pese a tener ambos la misma fórmula empírica, ArN_2X . Por consiguiente, la determinación de los mecanismos de reacción se hacía más compleja todavía, especialmente tras encontrarse nuevas reacciones de reordenamiento que afectaban a moléculas nitrosadas.¹⁸ En 1886, Otto Fischer y Eduard Hepp descubrieron que el grupo nitroso en *O*-nitrosocompuestos aromáticos podía cambiar su posición de un oxígeno a un carbono de la misma molécula (esquema 1.3)¹⁹ y en 1903 Nikolai Demjanov observó que los ciclos con radicales que poseen una amina primaria, al tratarlos con ácido nitroso, se expandían (esquema 1.4).^{20,21}

Con el tiempo, la obtención de nuevos colorantes dejó de ser un incentivo



Esquema 1.4: Reordenamiento de Demjanov.

para investigar sobre las nitrosaciones y, dadas las escasas aplicaciones que tenían en otras industrias y su poca utilidad en síntesis orgánica, estas reacciones perdieron interés, como demuestra el número de publicaciones sobre la materia en la primera mitad del siglo XX (figura 1.2).

En los años 50 un descubrimiento volvió a atraer la atención de la comunidad científica hacia las reacciones de nitrosación. Dos toxicólogos británicos, John Barnes y Peter Magee, descubrieron que la dimetilnitrosamina, un nitroso-compuesto utilizado como disolvente, provoca cáncer. Unos años antes habían estudiado su toxicidad tras conocer que, después haber estado expuestos durante unas semanas a dimetilnitrosamina, los empleados de un laboratorio inglés habían contraído graves enfermedades hepáticas, llegando a fallecer uno de ellos.²² La forma en que el compuesto dañaba el hígado, con necrosis y hemorragias internas, les recordó los casos de envenenamiento con “Hierba de Santiago”, una planta temida por los ganaderos de toda Europa.²³ Casualmente, unas semanas después de su estudio, apareció un artículo que demostraba que animales a los que se les había suministrado durante un largo periodo de tiempo una pequeña cantidad no tóxica de extractos de Hierba de Santiago habían desarrollado cáncer.²⁴ Magee y Barnes repitieron el mismo experimento con dimetilnitrosamina, obteniendo idéntico resultado: las ratas a las que habían administrado pequeñas dosis de dimetilnitrosamina durante semanas enfermaron con tumores cancerosos en el hígado.²⁵ El impacto de su trabajo hizo que científicos de todo el mundo comenzasen a estudiar las propiedades biológicas de otros nitrosocompuestos, descubriéndose casi siempre que eran igualmente peligrosos.

En 1964 se encontró una nueva fuente de nitrosocompuestos tras la muerte por cáncer hepático de varias ovejas en Noruega. El análisis de su pienso a base de harina de arenque demostró que el nitrito sódico utilizado como conservante había reaccionado con elementos del pescado formando nitrosaminas.²⁶⁻²⁸



Figura 1.1: De izquierda a derecha y de arriba a abajo: Raffaele Piria (1814-1865), August Wilhelm von Hoffman (1818-1892), William Henry Perkin (1838-1907); Johann Peter Griess (1829-1888), Viktor Meyer (1848-1897), Nikolai Yakovlevich Demjanov (1861-1938); Peter Noel Magee (1921-2000) y John Morrison Barnes (1913-1975).

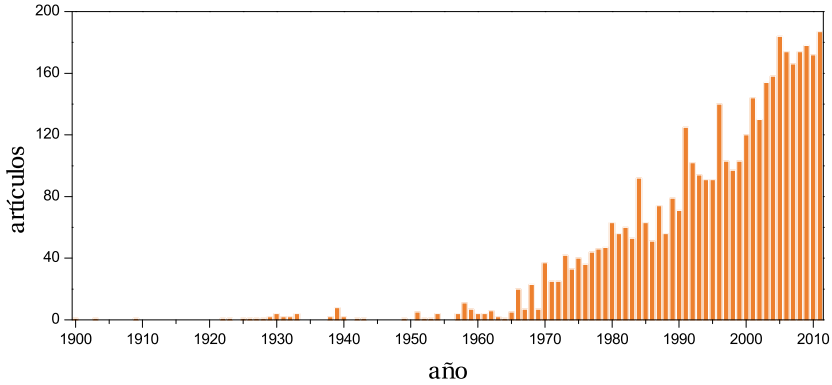


Figura 1.2: Número de publicaciones por año con el tema “nitrosación” según la página *ISI web of knowledge*.²⁹

Como el uso del nitrito sódico estaba muy extendido en la industria alimentaria —como colorante, potenciador del sabor e inhibidor del crecimiento de la *Clostridium botulinum*, bacteria anaerobia responsable del botulismo— aumentó la preocupación por la exposición humana a los nitrosocompuestos y, en 1968, la Organización Mundial de la Salud organizó en Jamaica un congreso sobre el tema. En él se apremió a desarrollar un nuevo método de análisis puesto que los que había entonces, basados en el análisis colorimétrico de los nitrosocompuestos separados por cromatografía, no tenían la sensibilidad suficiente para determinar las pequeñas cantidades presentes en los alimentos.³⁰ Al poco tiempo, una empresa norteamericana, *Thermo-Electron Corporation*, presentó un dispositivo que sometía a pirólisis a los nitrosocompuestos que había separado por cromatografía. De esta forma, se descomponían emitiendo óxido de nitrógeno, que cuantificaba por medio de espectroscopía de infrarrojos. El aparato, denominado “Analizador de energía térmica” (*TEA*), era tan eficaz que inmediatamente se convirtió en un instrumento estándar.³¹

Tras el trabajo de Magee y Barnes fueron apareciendo nuevas fuentes de exposición humana a nitrosocompuestos. En 1965 se encontraron en el tabaco,³² en 1973 en el caucho de tetinas y chupetes,³³ en 1977 en cosméticos^{34,35} y en

1979 en la cerveza.^{36,37} También se demostró que el hecho de consumir nitrito sódico en la dieta podía hacer que los nitrosocompuestos se formasen en el propio aparato digestivo³⁸ (condiciones ideales de pH y temperatura del estómago o catálisis por enzimas de los flujos digestivos³⁹). Por ello, las agencias y organismos reguladores en el ámbito de la Ciencia y Tecnología alimentaria fueron elaborando normas *ad hoc* para reducir sus niveles. Así aparecieron reglas para limitar las cantidades permitidas de nitrito sódico en alimentos o para modificar el proceso de secado del tabaco y de tostado de la malta en la fabricación de cervezas. El grupo de Sidney Mirvish,⁴⁰ en Estados Unidos, demostró que el ácido ascórbico dificulta el mecanismo de nitrosación por inhibición *in vivo* de nitrosocompuestos⁴¹ o por conversión de los agentes nitrosantes en el inocuo óxido nítrico.⁴² Pronto se demostró que el consumo de ácido ascórbico inhibía también la formación de nitrosocompuestos *in vivo*, reduciendo el cáncer en estudios epidemiológicos. Por ello, se estableció que a todo alimento que incluyese nitrito sódico como aditivo se le debería incorporar también una pequeña cantidad de ácido ascórbico u otro inhibidor (véase página 87).

En la actualidad el estudio de las reacciones y mecanismos de nitrosación ocupa diversas áreas científicas: los biólogos examinan los mecanismos de actuación de los nitrosocompuestos,⁴³ los médicos hacen estudios epidemiológicos sobre personas y áreas de exposición⁴⁴ y los químicos estudian los mecanismos de nitrosación y la forma de inhibirlos o bloquearlos.⁴⁵

1.2. Motivación del trabajo

En todos esos años de historia, la química de la N-nitrosación (página 78) ha sido un área fructífera para la química física orgánica y la cinética química. Actualmente se entienden perfectamente muchas reacciones y, en muchos casos, se ha establecido la naturaleza de las especies nitrosantes efectivas, a menudo por procedimientos cinéticos.

En contraste, las reacciones de C-nitrosación (página 73) son mucho menos conocidas, debido en parte a la debilidad de los agentes nitrosantes como electrófilos y a la baja solubilidad de los sustratos, que dificultan mucho el

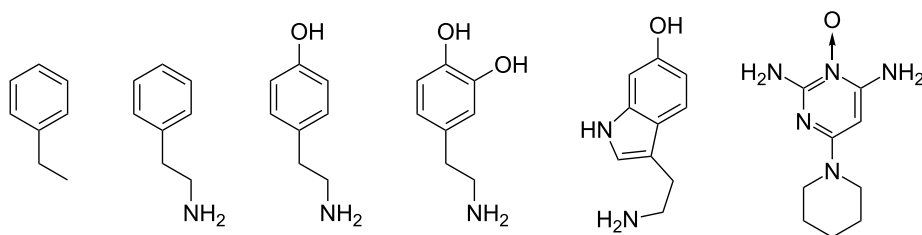


Figura 1.3: Sustratos cuya nitrosación se ha estudiado. De izquierda a derecha: etilbenceno, fenetilamina, tiramina, dopamina, serotonina y minoxidilo.

seguimiento de las cinéticas y el establecimiento de un mecanismo.

En la bibliografía apenas se encuentran trabajos donde se haya abordado la nitrosación de moléculas complejas que puedan ser objeto de C- y N-nitrosación simultánea.⁴⁶ Y eso a pesar de que el hombre está muy frecuentemente en contacto con sustratos con varios grupos nitrosables que pueden conducir a la formación de nitrosocompuestos potencialmente peligrosos. Dentro de esa categoría se encuentran algunos aminoácidos, lípidos y medicamentos.

Por esas razones se ha abordado el trabajo descrito en esa Memoria. Como objeto de estudio se ha elegido una serie de moléculas bioactivas con varios sitios nitrosables: etilbenceno, fenetilamina, tiramina, serotonina y minoxidilo (figura 1.3).

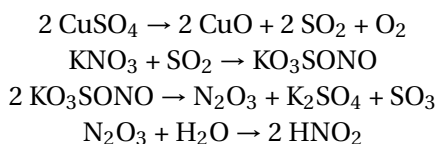
Las cinco primeras moléculas constituyen el grupo de las catecolaminas y compuestos relacionados. Ejercen importantes funciones en el organismo donde actúan como neurotransmisores, siendo frecuentes en numerosos alimentos. Por su parte, el minoxidilo es un fármaco antihipertensivo cuyo uso se ha popularizado en los últimos años para combatir la alopecia.

Además del problema que entraña la ingestión de estos compuestos por su posible interacción con agentes nitrosantes en el aparato digestivo, existe el riesgo de que alguna de estas moléculas neurotransmisoras (dopamina y serotonina, principalmente) puedan reaccionar con los nitratos/nitritos presentes en el fluido cerebroespinal, especialmente en el caso de alguna enfermedad neurológica, cuando la concentración de nitrito aumenta y el pH del medio puede facilitar mecanismos de nitrosación.⁴⁷

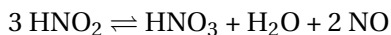
Informe bibliográfico

2.1. Ácido nitroso y nitritos

El ácido nitroso, HNO_2 , es un ácido inorgánico monoprótico conocido desde la Edad Media. Fue descrito por primera vez en el siglo XIII por el falso Geber, un famoso alquimista anónimo probablemente de origen español en su libro *De inventione veritatis*.⁴⁸ A partir de vitriolo de Chipre (CuSO_4), salitre y agua obtenía ácido nitroso según las siguientes reacciones:⁴⁹



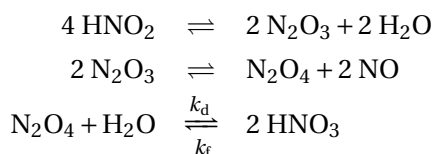
El ácido nitroso es un compuesto que no puede ser aislado como compuesto puro,⁵⁰ ya que se descompone en ácido nítrico, agua y óxido nítrico:⁵¹



La constante de este equilibrio fue determinada por Gilbert Lewis hace más de un siglo:⁵²

$$K = \frac{[\text{H}^+][\text{NO}_3^-]p_{\text{NO}}^2}{[\text{HNO}_2]^3} = 29 \text{ atm}^2 \text{ M}^{-1} (25 \text{ }^\circ\text{C}) \quad (2.1)$$

También se determinó el mecanismo de descomposición, que consiste en la formación del anhídrido nitroso y su posterior transformación, seguida de hidrólisis:⁵¹



Si la hidrólisis es la etapa limitante, se puede deducir la ecuación teórica de velocidad a partir del mecanismo anterior:

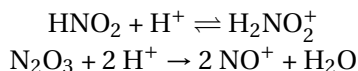
$$v = k_d \frac{[\text{HNO}_2]^4}{P_{\text{NO}}^2} - k_f [\text{HNO}_3][\text{H}^+][\text{NO}_3^-] \quad (2.2)$$

Esta ecuación explica por qué en procesos industriales, para evitar la descomposición del ácido nitroso, se trabaja en una atmósfera de óxido nítrico. Una presión parcial de 1 atm garantiza la supresión del proceso.

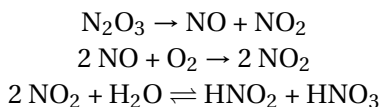
También el hecho de que el producto de reacción sea un gas con baja solubilidad en agua ($1,93 \cdot 10^{-3} \text{ M atm}^{-1}$, 23 veces menor que el oxígeno molecular) hace que la velocidad de descomposición dependa de la agitación del medio.⁵³ Otro factor caracterizado es la influencia de la temperatura en la velocidad:

$$\log_{10} k_d = 22,65 - \frac{6250}{T} \text{ atm}^2 \text{ M}^{-3} \text{ min}^{-1} \quad (2.3)$$

En condiciones ácidas, la descomposición del ácido nitroso a lo largo del tiempo aumenta de complejidad, ya sea por reacciones de protonación de los compuestos implicados:



o por reacciones de los productos gaseosos de la descomposición:



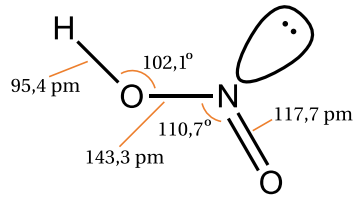
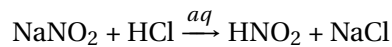
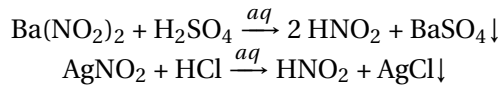


Figura 2.1: Estructura del ácido nitroso.

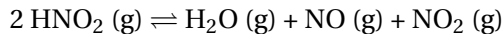
Debido a su descomposición, el ácido nitroso no se puede adquirir de forma comercial, pero se prepara fácilmente *in situ* por acidificación de cualquier nitrito con un ácido mineral:⁵⁴



Se pueden preparar disoluciones libres de otros iones escogiendo combinaciones de reactivos cuyas sales sean insolubles:



El ácido nitroso gaseoso se puede preparar mezclando agua, óxido nítrico y dióxido de nitrógeno en la misma proporción:



Como $K_p = 8,0 \cdot 10^5 \text{ N m}^{-2}$, a temperatura ambiente y 7,9 atm, una presión parcial $p_x = 2,63 \text{ atm}$ de reactivos permite obtener tan sólo $p_{\text{HNO}_2} = 0,0047 \text{ atm}$ de ácido nitroso.

La figura 2.1 muestra la estructura de la molécula gaseosa de ácido nitroso determinada mediante espectroscopía de microondas. Corresponde a la forma *trans* del compuesto. Existe también la forma *cis*, que al igual que la *trans* es plana, pero más inestable. Medidas realizadas con infrarrojos sugieren que la forma *trans* es $2,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ más estable que la forma *cis* a temperatura ambiente.

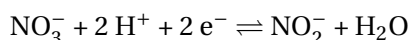
$T / ^\circ\text{C}$	pK_a
15	3,224
20	3,177
25	3,138
35	3,100

Tabla 2.1: Constantes de acidez del ácido nitroso en función de la temperatura.⁵⁵

A pesar del enlace simple central, la energía de activación del cambio es relativamente alta, $45,2 \text{ kJ mol}^{-1}$, por lo que la forma *trans* es más abundante en condiciones normales.

El ácido nitroso es bastante débil. Su pK_a (tabla 2.1) se encuentra entre los del ácido acético (4,75) y cloroacético (2,85) y es similar a los del ácido fórmico (3,75) y sulfanílico (3,23). Ello implica, que a pHs superiores a 5, todo el ácido nitroso está desprotonado.

Los nitritos se suelen preparar por reducción suave de nitratos, utilizando carbono, hierro o plomo. El potencial estándar de reducción para la reacción:



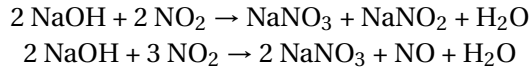
es $E^\circ = 0,835 \text{ V}$. A escala industrial, el nitrito sódico se prepara por reacción entre una mezcla de óxidos de nitrógeno y una disolución de carbonato sódico o hidróxido sódico.⁵⁶ La fracción molar de dióxido de nitrógeno se denomina grado de oxidación (OD):

$$\frac{[\text{NO}_2]}{[\text{NO}] + [\text{NO}_2]} \times 100 = \text{OD} \quad (2.4)$$

Cuando el grado de oxidación es menor del 50%, la reacción que ocurre es la siguiente:



El exceso de monóxido de nitrógeno no reacciona pero el oxígeno ambiental lo oxida a dióxido de nitrógeno. A OD > 50% y una presión parcial del oxígeno alta, las siguientes reacciones, más lentas, también tienen lugar:



Con carbonato sódico, la reacción transcurre de la misma manera. En la práctica, la formación de nitrato no puede ser completamente bloqueada incluso en OD inferiores al 50%. La forma de evitar al máximo la aparición de nitrato sódico consiste en mantener un grado de oxidación menor al 50% y un pH superior a 8, para impedir la descomposición del ácido nitroso. De esta forma se consigue un nitrito sódico de pureza superior al 99% y con un contenido de nitrato sódico de tan solo un 0,6%.

Los demás nitritos se preparan de la misma forma, excepto aquellos cuyos hidróxidos son caros, como el nitrito potásico, que se prepara por reducción.

El ángulo $\widehat{\text{ONO}}$ de las moléculas de nitritos de numerosos metales (Li, Na, K, Cs, Ag, Tl, Ba) varía entre 116 y 132°, con longitudes del enlace N–O comprendidas entre 113 y 123 pm.⁵⁰ Los nitritos de metales menos básicos como Co(II), Ni(II) y Hg(II) tienen colores intensos; en ellos el enlace entre el metal y el resto de la molécula probablemente sea de tipo covalente. La solubilidad de los nitritos en agua varía considerablemente con el catión, así como su estabilidad térmica (tabla 2.2).

2.1.1. Fuentes de exposición a los nitritos

La principal vía de exposición humana a los nitritos es oral. Otras vías de exposición son excepcionales dado que los nitritos no pueden ser absorbidos por la piel y que la inhalación involuntaria es muy complicada.⁵⁷ Dos son las fuentes principales de exposición a los nitritos: su generación por bacterias y su empleo como aditivos alimentarios.

Existen dos tipos de bacterias generadoras de nitritos. Unas son las bacterias nitrificantes, de los géneros *nitrosomonas* y *nitrosococcus*, que forman parte del

Nitrito	Solubilidad / g/100 ml	Estabilidad térmica / °C
NaNO ₂	85,5 ^a	284 (p.f.) ^c
KNO ₂	314 ^b	441 (p.f.) ^c
AgNO ₂	0,41	140
Ba(NO ₂) ₂	72,8	220
Hg(NO ₂) ₂		75
NH ₄ NO ₂		60 ^d

^a Higroscópico

^b Delicuescente

^c Funden sin descomposición

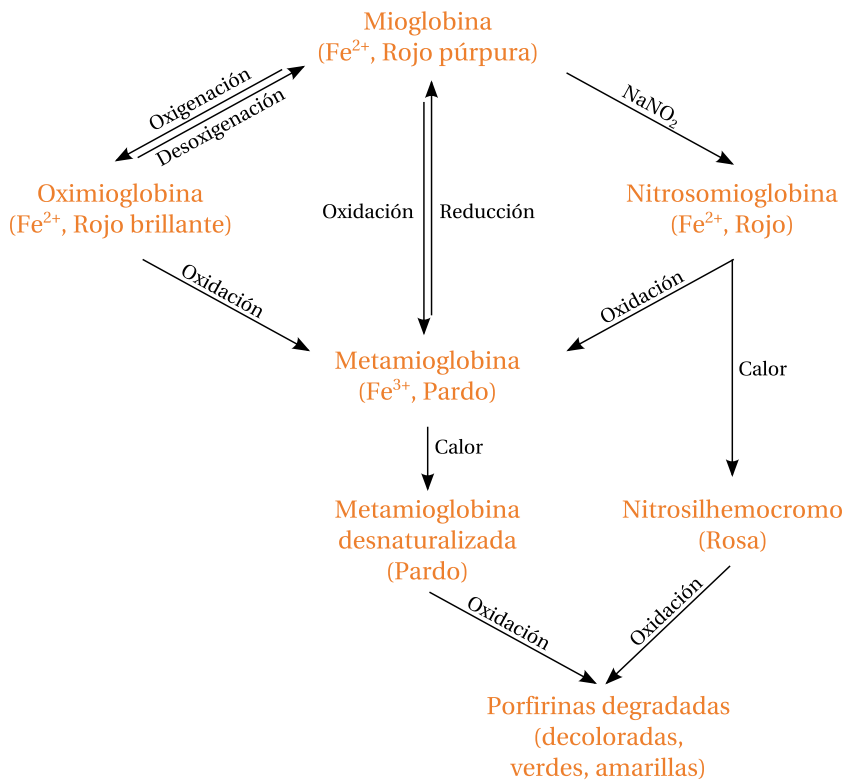
^d Su descomposición puede ser explosiva

Tabla 2.2: Solubilidad en agua a 25 °C y estabilidad térmica de diferentes nitritos.

ciclo del nitrógeno convirtiendo las sales de amonio del suelo y las aguas en nitrito, siendo la principal fuente de nitritos en el agua, especialmente si procede de zonas agrícolas con gran uso de fertilizantes ricos en nitratos de amonio.⁵⁸ Otras son las bacterias desnitrificantes (*Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Clostridium ramosum*, entre otras) presentes en la boca y en el intestino, donde reducen los nitratos procedentes de los alimentos y el agua a nitritos.^{59,60} El agua de zonas agrícolas y productos como las verduras o los tubérculos son ricos en nitratos, por lo que su consumo aumenta la cantidad de nitritos de forma natural.

El uso del nitrito sódico como aditivo se remonta siglos atrás, ya que en carnes y otros alimentos actúa como colorante, potenciador del sabor, antioxidante y antimicrobiano.

Su utilidad como colorante se debe a que reacciona con la mioglobina de las fibras musculares. Esta proteína contiene un átomo de hierro dentro de un grupo hemo, que proporciona a la carne su característico color rojo. En condiciones normales, la proteína capta una molécula de oxígeno, adquiriendo un color rojo



Esquema 2.1: Transformaciones químicas de la mioglobina.

brillante (oximioglobina) y la transporta dentro del músculo.⁶¹ Al cortar la carne, la mioglobina queda expuesta al oxígeno del aire que oxida su átomo de hierro (esquema 2.1) cambiando su color a un antiestético color pardo (metamioglobina), que el consumidor asocia a carne en malas condiciones. Para evitarlo se puede envasar la carne en una atmósfera rica en oxígeno que favorece la formación de oximioglobina, utilizar un antioxidante o añadir nitrito sódico que, al descomponerse en óxido nítrico, se une al hierro del grupo hemo haciendo que la proteína, nitrosomioglobina, adquiera un color rojo duradero.⁶² Cuando se calienta la carne por encima de 60 °C, este pigmento se desnaturaliza y se convierte en el nitrosilhemocromo que da como resultado el color rosado típico

de las salchichas cocidas. Tanto el nitrosilhemocromo como la metamioglobina pueden seguir oxidándose con el tiempo y generar colorantes que van del amarillo al verde.

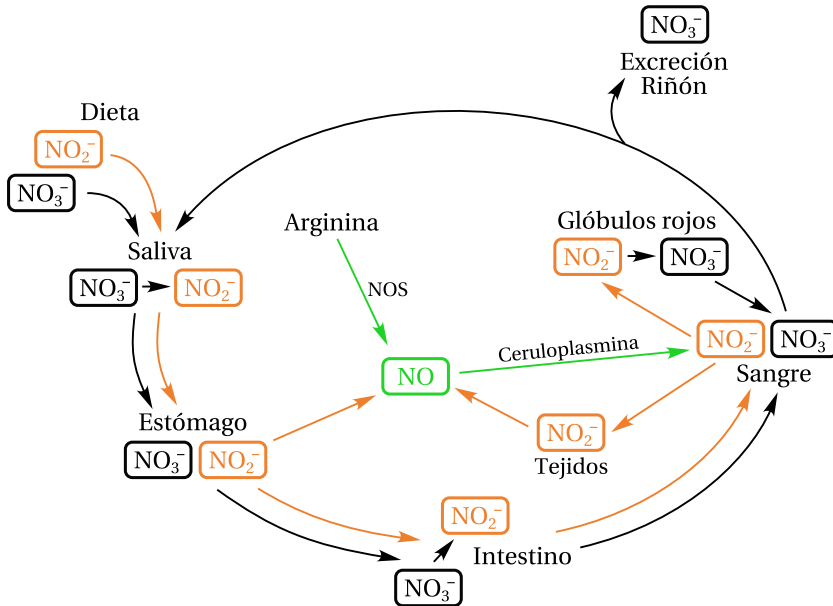
La principal aplicación de los nitritos en la industria alimentaria es como conservantes ya que inhiben el desarrollo de bacterias a partir de sus esporas. De esta forma los nitritos eliminan el peligro de contaminación con *Clostridium botulinum*, bacteria esporogénica que provoca el botulismo.⁶³ Este organismo segrega una toxina que está considerada uno de los compuestos más venenosos, dado que 1 mg puede matar a más de un millón de conejillos de indias. Al ser anaerobia, era frecuente su aparición en embutidos, conservas y alimentos envasados al vacío. El uso de nitrito y otras técnicas de esterilización han hecho que esta bacteria actualmente sólo aparezca en algunas ocasiones en conservas domésticas. En medicina estética, su toxina se conoce como *Botox*.

La exposición a nitritos y nitratos está muy regulada. Actualmente se permite 0,5 mg/l de nitritos y 50 mg/l de nitratos en el agua potable (Directiva 98/83/CE y Real Decreto 140/2003).^{64,65} Como aditivo (el nitrito potásico recibe el código E249 y el sódico E250) se autorizan 50 mg/kg en productos cárnicos no tratados por calor, curados o desecados, 100 mg/kg en productos cárnicos enlatados y foie gras y 175 mg/kg en productos curados (Directiva 95/2/CE).⁶⁶ Según la OMS, la ingestión diaria admisible de nitritos y nitratos en mg por kg de peso corporal es de 0,07 y 3,7 respectivamente.⁶⁷

2.1.2. Los nitritos en el cuerpo humano

Hasta hace una década se pensaba que los nitritos y nitratos, ya sea ingeridos en la dieta o como residuos del metabolismo del óxido nítrico, carecían de utilidad alguna para el organismo. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado que el cuerpo humano los utiliza para generar óxido nítrico de forma alternativa a la NO sintasa.⁶⁸

En 1998, los estadounidenses Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad recibieron el premio Nóbel por demostrar que el óxido nítrico es una de las pocas moléculas gaseosas que el cuerpo humano utiliza como molécula señalizadora. El NO actúa como neurotransmisor en el cerebro, regulador del sistema cardio-



Esquema 2.2: Ciclo de los nitritos y nitratos en el cuerpo humano. Las flechas de color negro representan la circulación del nitrato en el organismo, las flechas de color naranja, la del nitrito y las flechas de color verde, la del óxido nítrico.

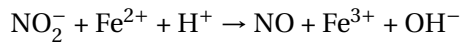
vascular⁶⁹ y en las defensas, que lo emplean para destruir microorganismos utilizando el NO para atacar ADN, proteínas y componentes de la pared celular.⁷⁰ Por eso se emplean habitualmente en medicina compuestos que liberan óxido nítrico, como la nitroglicerina o el nitrito de amilo (página 65), o bien favorecen su liberación, como el sildenafil o el taladafilo.

Generalmente el cuerpo humano genera NO con ayuda de la óxido nítrico sintasa (NOS) que transforma la arginina en óxido nítrico y citrulina. De forma análoga a la respiración y fermentación celular, cuando la célula no tiene suficiente oxígeno para poder sintetizar óxido nítrico mediante la enzima NOS, utiliza la ruta alternativa del nitrato/nitrito (esquema 2.2).⁷¹ Esta ruta aprovecha el nitrito que se encuentra almacenado en la sangre procedente de la dieta y de la reducción del nitrato por las bacterias presentes en la saliva y lo reduce de

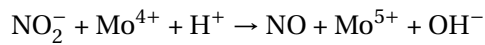
50 | Ácido nitroso y nitritos

varias formas a óxido nítrico:

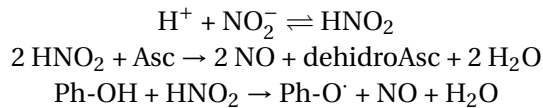
- Por medio de la mioglobina muscular:



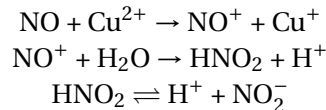
- Con la enzima xantina oxidoreductasa:



- Por reacciones entre el nitrito y compuestos reductores presentes en la sangre, como ácido ascórbico (Asc) o polifenoles (Ph-OH):



De igual forma, el NO no utilizado se convierte otra vez en nitrito con ayuda de la enzima ceruloplasmina, presente en la sangre y en los tejidos.



Este nitrito se acumula para convertirse de nuevo en NO cuando sea necesario. Si hay demasiado nitrito en sangre, los glóbulos rojos lo oxidan a nitrato mediante su hemoglobina (Hb) para que pueda ser excretado en el riñón:



Así, los niveles de nitrito en el plasma sanguíneo se mantienen constantes en el rango de 20 - 40 μM . Los niveles de nitrato son menores: 50 - 300 nM. Las personas que hacen ejercicio a menudo tienen mayor actividad de la enzima NOS y a la vez mayores niveles de nitrito y nitrato en sangre.

2.1.3. Análisis de nitritos en agua

Debido al potencial peligro de los nitritos, su frecuencia e importancia económica y biológica, se han desarrollado multitud de métodos para el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras.

Al principio, la cantidad de nitrito que había en una muestra se conocía añadiéndole hidroxilamina o yoduro. De esta forma, el nitrito se reducía a nítrógeno que se recogía y se medía.⁷² En 1879, Peter Griess, consciente de la poca precisión y sensibilidad del método gasométrico, propuso utilizar las reacciones de diazotación que había descubierto (página 34) para la cuantificación de nitritos.⁷³ La mezcla que sugirió, ácido sulfanílico y 1-naftilamina en presencia de ácido sulfúrico, se denominó reactivo de Griess. En 1889, Lajos Ilosvay, profesor de química en la Universidad de Budapest, perfeccionó el reactivo sustituyendo el ácido sulfúrico por ácido acético, que reducía la descomposición del nitrito a la vez que aceleraba la velocidad de reacción.⁷⁴ Su mezcla, llamada posteriormente reactivo de Griess-Ilosvay, se hizo muy popular y actualmente se sigue utilizado rutinariamente en multitud de áreas.⁷⁵ Un ejemplo es el procedimiento oficial de la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) para determinar nitritos en la carne. Consiste en homogeneizar y extraer el nitrito de la muestra, diluir 100 veces, calentar durante una hora para eliminar interferencias y tras neutralizar, aplicar el reactivo de Griess-Ilosvay.⁷⁶ El reactivo incluso se utiliza en el análisis cuantitativo de nitratos, previa reducción a nitritos mediante zinc. Una crítica habitual al método de Griess es que para poder medir el nitrito requiere de cuatro reacciones en las que participan compuestos muy inestables. En primer lugar, a partir de nitrito se forma un agente nitrosante que nitrosa la 1-naftilamina. A continuación, ésta se reordena en un diazocompuesto y, por último, se produce la reacción de copulación entre el diazocompuesto y el ácido sulfanílico (página 80). Esto puede producir una reducción de la exactitud que ha promovido la búsqueda de nuevos reactivos para la reacción u otros métodos de análisis basados en nuevos sistemas.

Existen técnicas que miden el nitrito directamente por conductimetría o electrocatálisis. Son métodos incómodos que requieren una separación previa del nitrito por cromatografía. Esta condición excluye la mayor parte de muestras

de origen biológico, que tienden a precipitar en la columna, a no ser que se sometan a otra purificación previa. También se puede analizar el nitrito directamente por espectroscopía ultravioleta o por infrarroja. Sin embargo, además de la alta pureza que requieren, debido a su baja absorptividad molar, no se pueden medir concentraciones diluidas por debajo de 1 mM.

La alternativa más sencilla a la reacción de Griess es cuantificar el nitrito por medio de una reacción de nitrosación. Presenta la ventaja de que existen un gran número de sustratos nitrosables, cada uno con propiedades diferentes que permiten utilizar multitud de técnicas para la medida. Así, se puede utilizar difenilamina para medir mediante polarografía de pulso diferencial; 2,4,6-triaminopirimidina, mepazina, 2-mercaptoetanol o ácido cromotrópico, entre otros, para el uso de colorimetría; diaminonaftaleno para fluorimetría, o los compuestos volátiles 1-hidrazinoftalazina o *p*-bromoanilina para la determinación mediante cromatografía de gases. Esta variedad de técnicas permite esquivar interferencias, problemas de purificación y descomposiciones. Sin embargo, el principal inconveniente de estas reacciones es que requieren medios ácidos que favorecen la descomposición del nitrito en óxido nitroso (página 41), aunque cada técnica tiene fijadas unas condiciones de trabajo que lentifican dicho proceso.

Una forma de evitar los inconvenientes de la descomposición es nitrosar compuestos reductores como el ion yoduro o el ácido ascórbico que convierten todo el nitrito en óxido nitroso, que se puede medir luego por quimioluminiscencia. Son técnicas de tres pasos, puesto que después de la nitrosación del reductor existe una reacción de transferencia electrónica interna que forma óxido nítrico. Otro reductor empleado es la hidroquinona, que permite cuantificar el óxido nítrico por neumatoamperometría.

Existen otros métodos para el análisis cuantitativo del nitrito, pero son poco frecuentes y tienen menos aplicaciones. Algunos están basados en la capacidad del nitrito de catalizar algunas reacciones, otros utilizan enzimas biológicas, como la nitritorreductasa para obtener amoníaco y cuantificarlo o, incluso, se ha desarrollado un método de cinco pasos, basado en el de Griess que, tras la copulación, emplea sulfato de amonio y cobre (II) para formar un triazol fluorescente. Aunque se puede escoger entre infinidad de métodos en función del

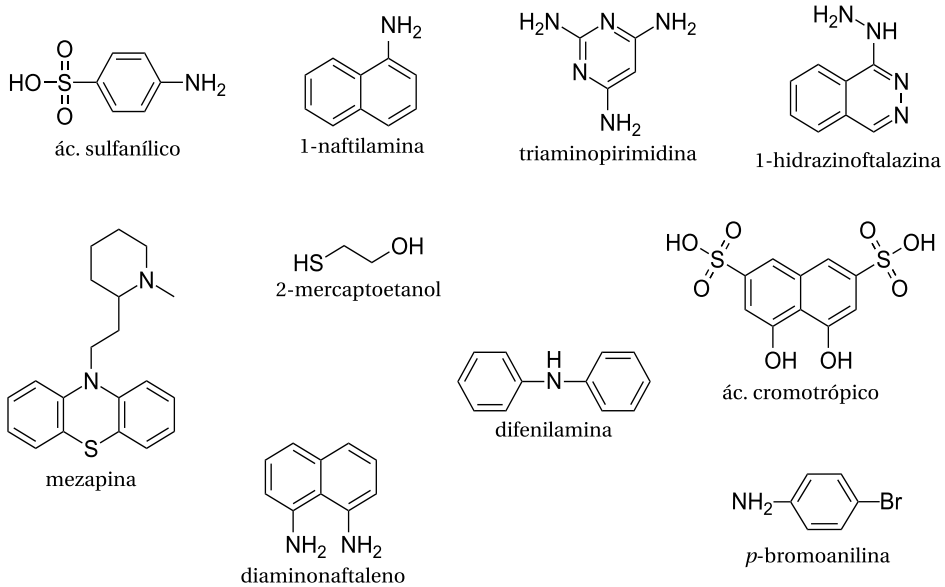
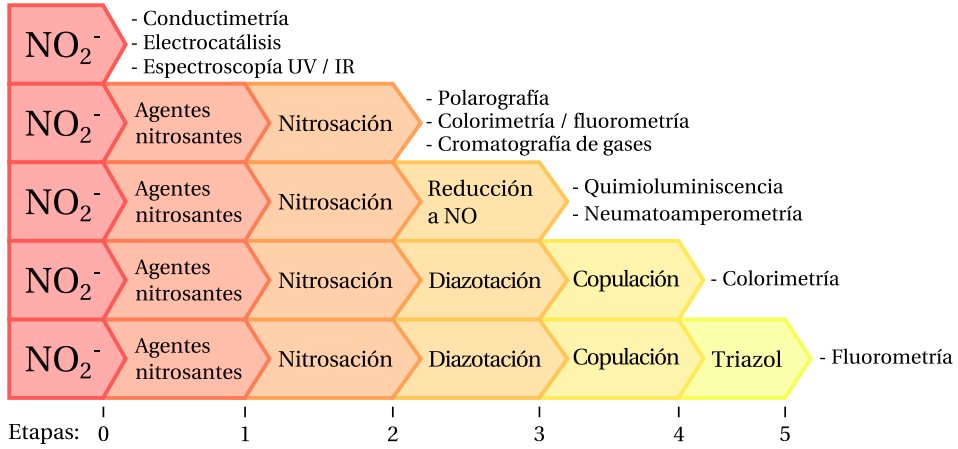


Figura 2.2: Técnicas de análisis del ion nitrito según el número de etapas y reactivos empleados.

Método	LD	Método	LD
Absorción óptica directa	1,0 mM	Catálisis de reacciones	0,4 μ M
Cromatografía en papel	0,2 mM	Conductimetría	0,2 μ M
Enzimas biológicas	0,1 mM	Cromatografía indirecta	0,2 μ M
Formación de complejos	40,0 μ M	Captura de electrones	0,1 μ M
Electrocatalisis	10,0 μ M	Quimioluminiscencia	0,1 μ M
Absorción óptica de NOX	4,0 μ M	Resonancia Raman	0,1 μ M
Neumatoamperometría	4,0 μ M	Extracción del disolvente	40,0 nM
Electrodos	1,0 μ M	Fluorescencia	20,0 nM
Método de Griess	1,0 μ M	Crom. gas-líquido	20,0 nM
Desactivación de fluoresc.	1,0 μ M	Polarografía	6,0 nM
Valoración	1,0 μ M	Absorción de colorantes	0,02 nM

Tabla 2.3: Límites de detección (LD) de los diferentes métodos de determinación de nitrito.

origen de las muestras, del precio o del tiempo, material y precisión necesarios (tabla 2.3), el método de Griess sigue siendo hoy el más utilizado a pesar de su antigüedad.

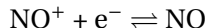
En cuanto al análisis cualitativo, la forma tradicional de caracterizar nitritos en una muestra consiste en añadir ácido sulfúrico o acético concentrados y sulfato ferroso. Si hay nitritos aparece un color pardo oscuro que corresponde al complejo nitrosilhierro.⁷⁷ Existe otra forma, que pasa por descomponer el nitrito añadiendo ácido sulfúrico concentrado e hirviendo. A continuación se hacen pasar los gases desprendidos por un filtro húmedo con yoduro y almidón. Si hay nitrito, el NO₂ desprendido oxida el yoduro haciendo que el yodo creado de lugar a un color azul con el almidón.

2.2. Agentes nitrosantes

Por sí mismo, el ácido nitroso no es un buen agente nitrosante. Se puede valorar como un hidróxido de nitrosilo, NO^+OH^- , donde la elevada basicidad del hidroxilo hace que el nitrosonio pierda su capacidad electrófila. Al estar en medio ácido, el ácido nitroso se descompone en compuestos mucho más activos que nitrosan mucho más rápido, por lo que no se puede considerar un agente nitrosante efectivo y no se tiene en cuenta.

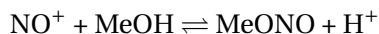
2.2.1. Iones nitrosonio y nitrosacido

El ion nitrosonio, NO^+ , es un compuesto isoelectrónico con el CO y el N_2 . Debido a la existencia del triple enlace entre el nitrógeno y el oxígeno, el espacio entre los núcleos de estos dos átomos es de 106 pm. Se trata de un compuesto muy utilizado en química orgánica e inorgánica dado su carácter de oxidante monoeléctrico.⁷⁸

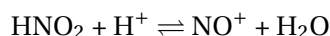


El potencial estándar de reducción para esta reacción se encuentra comprendido entre $E^\circ = 1,28 \text{ V}$ y $E^\circ = 1,02 \text{ V}$, en función de la polaridad del disolvente que estabilice su carga eléctrica.⁷⁹

Existen ciertas sales de nitrosilo (página 62) que son estables e incluso comerciales, con purzas superiores al 95%: NOBF_4 , NOClO_4 , NOPF_6 ... El tetrafluoroborato de nitrosilo también se puede preparar en el laboratorio por reacción entre nitrito de amilo y anhídrido propiónico en presencia de una disolución acuosa de HBF_4 .⁸⁰ Las sales de nitrosilo son sensibles a la humedad y se suelen almacenar en botellas de plástico y atmósfera inerte, puesto que los productos de descomposición expuestos al aire reaccionan con el vidrio. Son solubles y estables en MeCN, MeNO_2 o SO_2 líquido, pero reaccionan con dietil éter, acetona o tetrahidrofurano. Son insolubles en CH_2Cl_2 y otros disolventes clorados. También se pueden disolver en metanol, aunque forman un equilibrio con él.



El ion nitrosonio se forma por la acidificación del ácido nitroso:

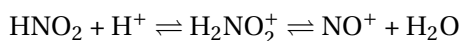


La constante de este equilibrio viene dada por la ecuación:

$$K = \frac{[\text{NO}^+] a_w}{[\text{HNO}_2] a_{\text{H}^+}} \quad (2.5)$$

La constante de este equilibrio, a 20 °C, vale $2 \cdot 10^{-7}$.⁸¹ Su valor implica que la formación de ion nitrosonio está favorecida a alta acidez y baja actividad acuosa, como ocurre con los ácidos concentrados. Siguiendo los picos característicos del ion nitrosonio en 260 nm en espectroscopía ultravioleta y en 2.300 cm^{-1} en Raman, se ha demostrado que el ácido nitroso en ácido perclórico al 60% o en ácido sulfúrico al 60% está totalmente convertido en NO^+ .⁸²

Sin embargo, en condiciones de moderada acidez, existen pruebas de que el ion nitrosacidio (H_2NO_2^+) es un constituyente importante de la disolución, ya que en los espectros no todo el ácido nitroso que desaparece se presenta como ion nitrosonio.⁸³ El ion nitrosacidio se forma en un equilibrio intermedio:



Por su estructura, donde una molécula neutra como el agua se encuentra asociada al ion nitrosonio, $\text{NO}^+\text{H}_2\text{O}$, es de esperar que sea casi tan nitrosante como el propio ion nitrosonio. Como la mayor parte de las nitrosaciones suelen transcurrir en medios acuosos levemente ácidos, existe controversia sobre cual de los dos iones es el nitrosante efectivo en estas condiciones. A través de la cinética química no es posible resolver la polémica, ya que ambos reactivos proporcionan la misma ecuación de velocidad:

$$v = k[\text{S}][\text{HNO}_2][\text{H}^+] \quad (2.6)$$

Existen algunos argumentos que sugieren que en disolución acuosa, el agente nitrosante es el ion nitrosacidio. Uno de los más importantes es el resultado de la nitrosación del ácido hidrazoico en agua enriquecida en oxígeno-18, que sirve

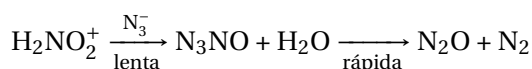
como trazador.⁸⁴ El producto de la reacción, azida de nitrosonio, es inestable y se descompone rápidamente en nitrógeno y óxido nitroso, cuya proporción en ¹⁸O se puede analizar fácilmente por espectroscopía de masas. Estas reacciones son:



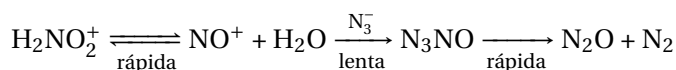
El estudio cinético de esta reacción obtuvo una ecuación experimental de velocidad como la 2.6:

$$v = k[\text{N}_3^-][\text{HNO}_2][\text{H}^+] \quad (2.7)$$

lo que quiere decir que tanto el ion nitrosonio como el ion nitrosacidio pueden ser los agentes nitrosantes. En caso de que fuese el ion nitrosacidio, el mecanismo de reacción sería:



donde la etapa limitante de la velocidad sería el ataque nucleófilo de la azida al ion nitrosacidio. Si el agente nitrosante fuese el ion nitrosonio, la etapa limitante de la velocidad (la reacción entre el ion nitrosonio y el ion azida) vendría precedida por la ruptura y formación continua del ion nitrosacidio.



Dado que este equilibrio es el responsable del intercambio de oxígeno entre el agua y el ácido nitroso, si es más rápido que la reacción de nitrosación, el óxido nitroso resultante tendría en el experimento la misma proporción de ¹⁸O que el agua utilizada. Sin embargo, la relación entre ¹⁶N₂O y ¹⁸N₂O es mucho menor que la del agua de los experimentos, lo que invalida el segundo mecanismo y apunta al ion nitrosacidio como responsable de la nitrosación.

Otros experimentos han aportado pruebas de la capacidad del ion nitrosacidio como agente nitrosante efectivo. Un trabajo sobre resonancia magnética de ¹⁵N del ácido nitroso y sus derivados encontró pruebas de un equilibrio entre

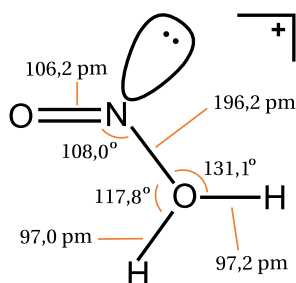
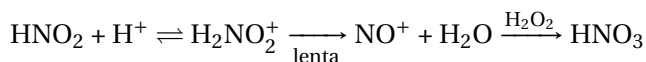


Figura 2.3: Estructura teórica del ion nitrosacido.

el ácido nitroso y el ion nitrosacido, que lentamente se descomponía en ion nitrosonio.⁸⁵ El desplazamiento del equilibrio hacia el nitrosacido aumentaba con la acidez. Estudios teóricos han calculado la estructura del ion nitrosacido (figura 2.3), en el que aparece un enlace O-N tan largo que la molécula se tiene que interpretar como un complejo $[\text{NO}^+ \cdots \text{H}_2\text{O}]$.⁸⁶ La energía de disociación de esta molécula para dar NO^+ ha sido calculada en $18,2 \text{ kcal mol}^{-1}$. Aun así, a falta de una prueba física definitiva, la duda subsiste, ya que también hay experimentos que demuestran nitrosación por ion nitrosonio, como la nitrosación del peróxido de hidrógeno, donde la ecuación de velocidad tiene un orden 0 respecto al sustrato:

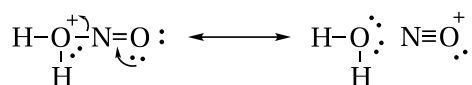
$$v = k[\text{HNO}_2][\text{H}^+] \quad (2.8)$$

lo que implica que la etapa limitante de velocidad es la formación del ion nitrosonio



coherentemente con el valor teórico calculado.

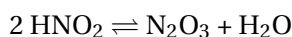
Algunos autores han propuesto que la estructura del electrófilo debería considerarse como participación de dos formas resonantes, el ion nitrosacido y el ion nitrosonio junto a una molécula de agua, donde el coeficiente de participación del ion nitrosacido disminuye al aumentar la acidez:



Esta teoría podría explicar la influencia del efecto del medio en algunas nitrosaciones, en las que una gran concentración de sales neutras acelera la velocidad de reacción.⁸⁷

2.2.2. Trióxido de dinitrógeno

El trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 , es uno de los óxidos binarios del nitrógeno más inestables. Se trata de la forma anhidra del ácido nitroso:



A finales de los años 60 y principio de los 70 la bibliografía sobre mecanismos de formación de N-nitrosocompuestos mostraba resultados contrapuestos sobre la influencia de los diferentes sustratos nitrosables en la constante de velocidad, k , de la reacción de ataque del trióxido de dinitrógeno sobre la amina libre. Así, mientras Challis,⁸⁸ Mirvish⁸⁹ y Moss⁹⁰ encontraban para la nitrosación de aminas de pKs elevados una constancia de los valores de k difícil de explicar,¹⁸ Schmid encontró que, en la diazotación de anilinas de $\text{pK} < 5$, el valor de k varía, mostrando correlación entre k y el pK del sustrato.⁹¹ Casado *et al.* llegaron a conclusiones coherentes con los resultados de Schmid.⁹²

En 1981, Markovits *et al.* determinaron el valor de la constante de equilibrio de formación de N_2O_3 :⁹³

$$K = \frac{[\text{N}_2\text{O}_3] a_w}{[\text{HNO}_2]^2} \quad (2.9)$$

Markovits encontró el valor $K = (3,03 \pm 0,23) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ ostensiblemente distinto del encontrado con anterioridad por Turney^{94,95} ($K = 0,20 \text{ M}^{-1}$).

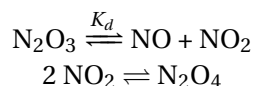
Con el valor de Markovits, Casado *et al.* investigaron las reacciones de nitrosación de una larga serie de aminas, recalculando los valores obtenidos por otros autores.⁹⁶ Los valores de k encontrados y los de las correspondientes entalpía de activación evidenciaron que las reacciones de nitrosación de aminas

Propiedad	Valor
K_d	1,91 atm
ΔH	40,5 kJ mol ⁻¹
ΔS	139 J K ⁻¹ mol ⁻¹
ΔG	-1,59 kJ mol ⁻¹

Tabla 2.4: Magnitudes termodinámicas de la descomposición del N₂O₃ a 25 °C.

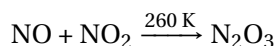
secundarias transcurren mediante control por difusión, no dependiendo de la especificidad de los sustratos.

El trióxido de dinitrógeno sólo se puede aislar a bajas temperaturas debido a que, por encima de su punto de fusión (-100,1 °C) se descompone:

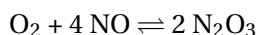


En estado sólido, el N₂O₃ es de color azul pálido; líquido tiene un azul intenso a bajas temperaturas, pero su color se desvanece y se vuelve verdoso debido a la presencia de NO₂ a temperaturas más altas. El espectro visible del N₂O₃ tiene un máximo de absorción en $\lambda = 630 \text{ nm}$ ($\epsilon = 29,3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁹⁷ La disociación también limita la precisión con la que las propiedades físicas del compuesto pueden ser determinadas. A 25 °C, el equilibrio disociativo en la fase gaseosa se caracteriza por las magnitudes termodinámicas recogidas en la tabla 2.4.⁵⁰

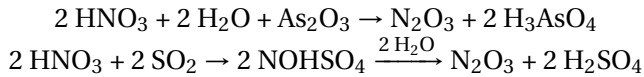
En el laboratorio, el trióxido de dinitrógeno se prepara condensando cantidades equimoleculares de NO y NO₂:



o por adición de la proporción exacta de O₂ al NO:



También se puede preparar de forma alternativa por reducción de ácido nítrico con As_2O_3 a $70\text{ }^\circ\text{C}$, o por reducción de ácido nítrico fumante con dióxido de azufre, seguida de hidrólisis:



Sin embargo, con estos métodos no se puede conseguir un producto totalmente anhidro.

Mediante espectroscopía de microondas se determinó la estructura del compuesto (figura 2.4).⁹⁸ Destaca por tener la misma estructura plana que el ion nitrosacidio y, también como él, un enlace central muy largo entre los dos nitrógenos.

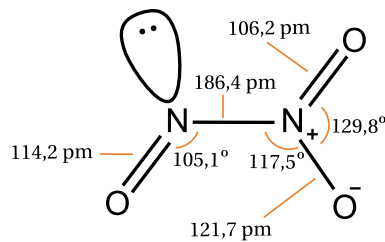
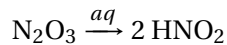


Figura 2.4: Estructura del trióxido de dinitrógeno.

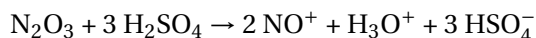
El estudio de la reactividad química del trióxido de dinitrógeno se ha visto muy limitado por su disociación en los reactivos NO y NO_2 . Sin embargo, se ha comprobado que se comporta como el anhídrido del ácido nitroso que es. Así, en medio acuoso se hidroliza:



y en medio alcalino se convierte en nitrito:



La reacción del N_2O_3 con ácidos concentrados forma sales de nitrosilo:



Esta reacción se utiliza como otra vía de obtención de sales como $NOClO_4$ o $NOBF_4$.

El trióxido de dinitrógeno puede actuar como agente nitrosante en fase gaseosa o en disolución acuosa. Se trata de un importante electrófilo en disolución acuosa, habiéndose encontrado que es la especie activa en múltiples reacciones orgánicas e inorgánicas en las que participa el ácido nitroso, generalmente a pHs bajos. Las reacciones de nitrosación en las que participa este agente se caracterizan por presentar un orden parcial dos respecto a la concentración de ácido nitroso:⁹⁹

$$v = k[S][HNO_2]^2 \quad (2.10)$$

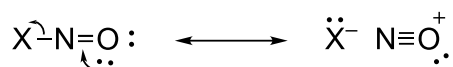
De igual forma que con el ion nitrosonio, pueden aparecer reacciones que presenten un orden parcial cero respecto a la concentración de sustrato cuando la reacción entre el N_2O_3 y el sustrato sea más rápida que la formación del propio N_2O_3 :

$$v = k[HNO_2]^2 \quad (2.11)$$

2.2.3. Sales de nitrosilo

Dentro del grupo de sales de nitrosilo entran todas las combinaciones del ion nitrosonio con otros aniones (X^-) como Cl^- , HSO_4^- ó BF_4^- . Debido a la electronegatividad de los átomos de nitrógeno y oxígeno, estos aportan muy poca electrofilia al enlace, por lo que dependiendo del anión, los enlaces pueden tener muy poco carácter iónico.⁸¹ Prueba de ello son las distancias de enlace entre los iones, menores a las que se esperarían para una unión iónica o que algunas sales de nitrosilo sean gaseosas (tabla 2.5).

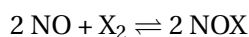
La mejor representación de estas sales es la combinación de dos estructuras resonantes:



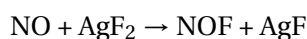
NOX	P. F. / °C	P. E. / °C	d _{N-O} / pm	d _{N-X} / pm	$\overline{\text{O-N-X}}$
NOF	-132,5	-59,9	113	152	110°
NOCl	-59,6	-6,4	114	198	113°
NOBr	-56,0	descomp.	115	214	117°
NOHSO ₄	73,5	descomp.			
NOBF ₄	250	250			

Tabla 2.5: Propiedades físicas de algunas sales de nitrosilo.⁵⁰

Las sales de nitrosilo puras se preparan de forma diferente en función de su estabilidad. Los haluros de nitrosilo, más inestables, se preparan por reacción directa entre el óxido nítrico y el halógeno:⁸²

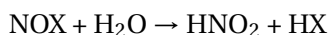


excepto el fluoruro de nitrosilo que se suele preparar por fluoración con AgF₂:⁵⁰



Las sales de nitrosilo más estables, como las ya mencionadas NOClO₄, NOBF₄ ó NOPF₆, se preparan haciendo reaccionar trióxido de dinitrógeno (página 62) o cloruro de nitrosilo con una fuente del anión en acetonitrilo o nitrometano. Muchas de estas sales están disponibles comercialmente (página 55).

La reactividad de las sales de nitrosilo es muy alta. En medio acuoso se hidrolizan rápidamente:



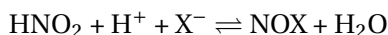
Debido a las condiciones ácidas del medio, el ácido nitroso se oxida a ácido nítrico haciendo que estas disoluciones acuosas tengan la propiedad de disolver metales. De esta forma, en poco tiempo, la disolución acuosa concentrada de NOCl se transforma en agua regia.¹⁰⁰

NOX	$K_{\text{NOX}} / \text{M}^{-1}$	NOX	$K_{\text{NOX}} / \text{M}^{-1}$
NOHSO ₄	$3 \cdot 10^{-5}$	NOSCN	30
NONO ₃	$3 \cdot 10^{-3}$	NOSC(NH ₂) ₂	5.000
NOCl	$1,1 \cdot 10^{-3}$	NOS ₂ O ₃ ⁻	$1,7 \cdot 10^7$
NOBr	$5,1 \cdot 10^{-2}$		

Tabla 2.6: Valores de K_{NOX} a 25 °C.

Las sales de nitrosilo se emplean para nitrosar compuestos muy poco reactivos, como amidas o sulfonamidas, o compuestos inestables en medio ácido, aunque se suelen evitar en la medida de lo posible, ya que son muy peligrosas.¹⁰¹ Para evitar su hidrólisis, las síntesis siempre se realizan en medio anhidro.

Como consecuencia de su alta reactividad, la presencia de algunos aniones en el medio de una reacción de nitrosación puede hacer que aumente su velocidad, debido a que se forman sales de nitrosilo mediante el equilibrio:



$$K_{\text{NOX}} = \frac{[\text{NOX}] a_w}{[\text{HNO}_2][\text{X}^-] a_{\text{H}^+}} \quad (2.12)$$

La tabla 2.6 recoge valores experimentales de K_{NOX} de varias sales de nitrosilo. Existe una correlación entre la magnitud de K_{NOX} y la nucleofilia de X^- . La presencia de los aniones y la formación de NOX modifica la ecuación de velocidad de la reacción de nitrosación:

$$v = K_{\text{NOX}} k_{\text{NOX}} [\text{HNO}_2][\text{X}^-][\text{H}^+][\text{S}] \quad (2.13)$$

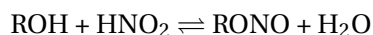
donde [S] es la concentración de sustrato y k_{NOX} la constante de velocidad de orden dos de la reacción entre NOX y el sustrato.

Para evitar el efecto catalítico de las sales de nitrosilo, en estudios cinéticos o en otras situaciones se pueden utilizar aniones que no forman NOX, como los iones perclorato o *p*-toluensulfonato.^{87,102}

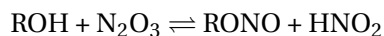
2.2.4. Nitritos de alquilo

Los nitritos de alquilo o ésteres de nitrito son compuestos de fórmula general RONO donde R es un grupo alquilo. Como todos los ésteres inorgánicos procedentes de la condensación de un alcohol y un oxoácido inorgánico, los nitritos de alquilo se conocen desde las primeras investigaciones químicas en el siglo XVIII. Así, el éster de nitrito más famoso, el nitrito de amilo, fue descubierto en 1844 por el químico francés Antoine-Jérôme Balard, dos años antes de que Piria describiese su reacción de nitrosación (página 33).⁴

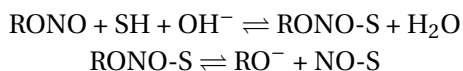
Los nitritos de alquilo se preparan haciendo reaccionar alcoholes con ácido nitroso en presencia de un catalizador ácido:⁸²



Después se pueden separar de la mezcla de reacción por destilación, puesto que, al no poder formar puentes de hidrógeno, tienen un punto de ebullición menor que el del alcohol del que proceden. Una forma alternativa para preparar ésteres de nitrito es empleando trióxido de dinitrógeno, con el que generalmente se consiguen mejores rendimientos.



La mayor parte de los nitritos de alquilo proceden de alcoholes alifáticos y suelen ser líquidos volátiles incoloros o amarillentos. Tienen la ventaja de que pueden ser agentes nitrosantes en medio básico, por lo que se usan frecuentemente para nitrosar, tanto en disoluciones acuosas como orgánicas, compuestos que se descomponen en medio ácido. Por su estabilidad en medio básico, en nuestro grupo se abordó el estudio de reacciones de nitrosación en medios alcalinos (no infrecuentes en órganos humanos como el intestino y el páncreas y en algunos fluidos humanos como la saliva y la orina). Las reacciones de nitrosación transcurren en dos pasos, una reacción electrófila en la que el nitrito de alquilo reacciona con el sustrato y una ruptura posterior:^{103,104}



La ecuación de velocidad de esta reacción es:^{105,106}

$$v = k[S][\text{RONO}] \quad (2.14)$$

Se ha demostrado que en la velocidad de nitrosación influye la ramificación del radical alquilo, siendo más rápidas las nitrosaciones con nitritos de alquilo primarios que las que emplean secundarios.¹⁰⁷ A su vez, los nitritos de alquilo secundarios son más rápidos que los terciarios.

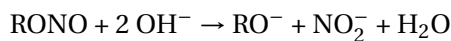
En medio ácido, los nitritos de alquilo también pueden nitrosar, porque aunque se hidrolicen rápidamente:¹⁰⁸



el producto de su descomposición es un agente nitrosante. Sin embargo, no se utilizan porque existen alternativas mucho más prácticas para nitrosar en medio acuoso ácido. La ecuación de velocidad para la descomposición es de orden dos:

$$v = k[\text{RONO}][\text{H}^+] \quad (2.15)$$

La hidrólisis también ocurre en medio básico, sin embargo es mucho más lenta que la ácida, lo que permite utilizarla en síntesis. A diferencia del medio ácido, esta descomposición tiene como producto un compuesto no nitrosante, el ion nitrito:



La ecuación de velocidad de esta reacción es de orden tres:¹⁰⁹

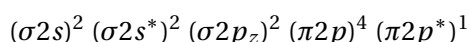
$$v = k[\text{RONO}][\text{OH}^-]^2 \quad (2.16)$$

La principal aplicación de los nitritos de alquilo se encuentra en medicina. Debido a que desprenden óxido nítrico al ser metabolizados son eficaces vasodilatadores (página 48). El nitrito de alquilo más empleado es el nitrito de amilo. Ya su descubridor, Balard, indicó que le producía dolores de cabeza, pero no fue hasta 1867 cuando el médico escocés Thomas Lauder Brunton empezó a

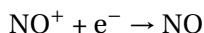
utilizarlo como tratamiento contra la angina de pecho.¹¹⁰ Fue un medicamento muy popular en la época victoriana y aparece incluso en una novela de Sherlock Holmes, *The Adventure of the Resident Patient*, donde se le administra a uno de los personajes para tratarlo de un ataque de catalepsia.¹¹¹ Actualmente, el nitrito de amilo ha cedido su protagonismo a la nitroglicerina y sólo se usa en casos de emergencia. Debido a sus propiedades psicoactivas, es empleado, junto con otros nitritos de alquilo, como estupefaciente.

2.2.5. Agentes nitrosantes radicalarios: NO y NO₂

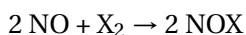
El interés sobre el poder nitrosante del óxido nítrico, NO, ha aumentado desde el descubrimiento de sus efectos fisiológicos (página 48). Sin embargo, por sí mismo, el óxido nítrico no es un compuesto nitrosante ya que, pese a su similitud con el ion nitrosonio,⁸² sus diferencias son significativas.¹¹² La configuración electrónica del óxido nitroso



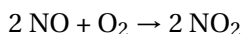
con un electrón π antienlazante desapareado que da lugar a un orden de enlace 2,5, mientras que el NO⁺, con su configuración electrónica igual a la del N₂ y el CO, tiene un orden de enlace 3. Esto se refleja en la longitud de enlace (frecuencias de vibración 1.840 cm⁻¹ para el NO y 2.300 cm⁻¹ para el NO⁺). Para poder ejercer como agente nitrosante, es necesario que el óxido nítrico pierda ese electrón desapareado. Dado que el potencial estándar de reducción para la reacción:



es de 1,21 V, es muy fácil para muchos compuestos retirar el electrón. Dos reacciones son de interés para la nitrosación debido a que forman potentes sales de nitrosilo. Una es la oxidación del óxido nítrico por halógenos:

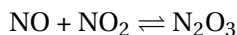


que produce haluros de nitrosilo y la otra es la reacción del óxido nítrico con el oxígeno de la atmósfera para producir dióxido de nitrógeno:



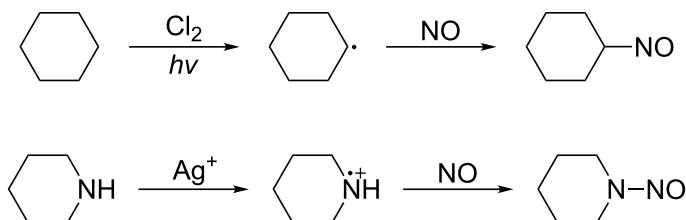
El dióxido de nitrógeno es otro radical libre que por si mismo tampoco es nitrosante. Sin embargo, dimeriza rápidamente a tetraóxido de dinitrógeno, sal de nitrosilo que, como se ha visto en la tabla 2.6 (página 64), tiene una estabilidad similar a la de los haluros de nitrosilo.

Además, la mezcla de óxido nítrico y dióxido de nitrógeno en un mismo recipiente conduce, mediante el siguiente equilibrio



a la formación de trióxido de dinitrógeno. Esta es una de las múltiples razones por las que los óxidos de nitrógeno (NO_x), procedentes del tráfico, son un problema de salud pública, especialmente en las grandes ciudades. En zonas costeras, donde la atmósfera tiene cloro, el peligro aumenta.

Tanto el óxido nítrico como el dióxido de nitrógeno, como radicales libres que son, pueden unirse a otras moléculas orgánicas con un electrón desapareado para formar un nitrosocompuesto. Existen técnicas que primero preparan los radicales libres mediante metales como litio, iones monocargados como Ag^+ o con radiación visible o ultravioleta y luego los nitrosan burbujeando óxido nítrico.¹¹³ Dos ejemplos encontrados en la bibliografía, uno de C-nitrosación y otro de N-nitrosación, se muestran en el esquema 2.3^{114,115}.



Esquema 2.3: Reacción de nitrosación radicalaria con óxido nítrico.

En algunos artículos antiguos, especialmente en el área biológica, se afirmaba que el óxido nítrico es un agente nitrosante. Sin embargo se ha demostrado que se trataba de un error producido por contaminaciones con oxígeno.¹¹⁶

2.2.6. Otros agentes nitrosantes

Complejos metálicos

Los complejos del óxido nítrico se conocen desde hace siglos; en ellos el grupo NO está en forma de ion nitrosonio.¹¹⁷ Algunos complejos de nitrosilo son las sales de Roussin, roja $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{NO})_4\text{S}_2]$ o negra $\text{Na}[\text{Fe}_4(\text{NO})_7\text{S}_3]$, o el ion nitroprusiato $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$. Dada su condición de portadores de óxido nítrico se han empleado históricamente como vasodilatadores, siendo el nitroprusiato sódico (se comercializa bajo la marca *Nitropress*) uno de los más potentes. En estos compuestos el átomo de nitrógeno tiene hibridación *sp* por lo que en la unión con el metal, el ligando tiene configuración lineal.

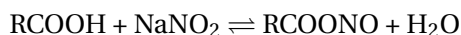
En cuanto su comportamiento como agentes nitrosantes un estudio en el que se utilizó nitroprusiato sódico revela una curiosa ecuación de velocidad en la que el orden de reacción respecto a la concentración de sustrato es dos:¹¹⁸

$$v = k[\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]][\text{S}]^2 \quad (2.17)$$

lo que se ha explicado mediante un mecanismo en el que, en primer lugar, existe una reacción rápida entre el sustrato y el nitroprusiato, seguida de una segunda reacción en la que ese complejo reacciona con otra molécula de sustrato, liberando el compuesto nitrosado.

Carboxilatos de nitrosilo

Los carboxilatos de nitrosilo se forman en el equilibrio que se produce al disolver nitrito sódico en ácido carboxílico⁸²:



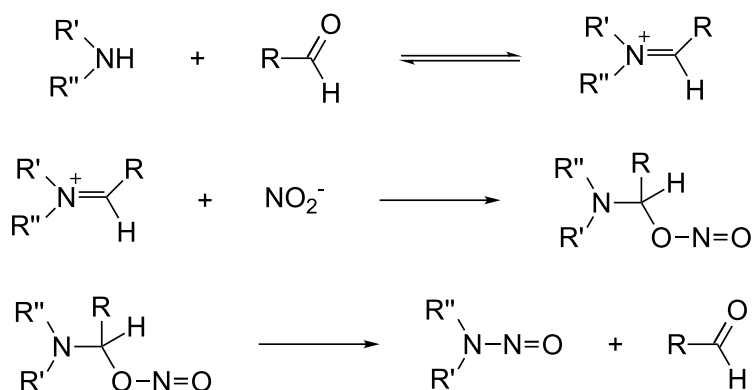
Son agentes nitrosantes muy efectivos, lo que hace que, como con las sales de nitrosilo, la presencia de carboxilatos en el medio de reacción aumenta la velocidad de la misma.¹¹⁹⁻¹²¹ Este efecto fue utilizado por Lajos Ilosvay para perfeccionar el método de Griess para análisis de nitritos (página 51). Por la misma razón, se debe evitar el uso de tampones acetato en estudios cinéticos de nitrosación.

En síntesis, se emplea nitrito sódico disuelto en ácido trifluoroacético para nitrosar amidas insolubles en agua o anilinas altamente desactivadas como perfluoroanilina o 2,6-difluoroanilina.

Nitritos

Ya se ha indicado que los nitritos, por si solos, no son agentes nitrosantes efectivos. Sin embargo, es posible emplearlos como agentes N-nitrosantes si se transforma la amina en un ion iminio haciéndola reaccionar con un aldehído, que actúa como catalizador. De esta forma, la carga positiva del ion atrae al nitrito, que efectúa un ataque nucleófilo (esquema 2.4).^{122,123}

Además, esta reacción presenta la ventaja de no requerir medio ácido. En síntesis, los aldehídos más utilizados son benzaldehído, formaldehído, piridoxal o cloral.

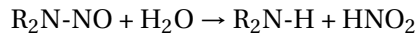


Esquema 2.4: Mecanismo de nitrosación por nitritos.

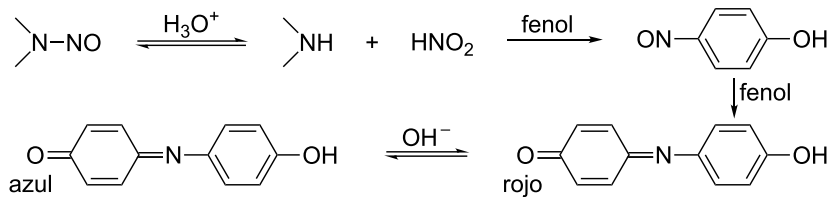
N-Nitrosaminas

Las *N*-nitrosaminas no son buenos nitrosantes debido a la fuerza del enlace entre sus dos nitrógenos. Para que se produzca una transferencia directa del grupo nitroso es necesario que exista en el medio algún compuesto que catalice la ruptura de ese enlace, como los iones haluro o tiocianato.

Mucho más comunes son las nitrosaciones debidas a la hidrólisis de las nitrosaminas. Éstas se descomponen fácilmente en medios acuosos y ácidos para liberar ácido nitroso:⁸²



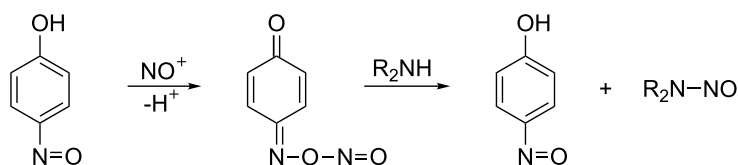
El método de Liebermann aprovecha esta propiedad para determinar nitrosaminas cualitativamente (esquema 2.5) haciendo reaccionar el ácido nitroso que se libera con exceso de fenol, que rápidamente da un compuesto de color rojo.¹²⁴ Una prueba adicional consiste en comprobar que la mezcla se torna azul al añadir una disolución de hidróxido sódico al 10%. Este método también se emplea para confirmar la presencia de fenol en una muestra añadiendo nitrito sódico en medio ácido.



Esquema 2.5: Método de Liebermann para la detección de nitrosaminas.

C-Nitrosocompuestos aromáticos

De igual modo que las *N*-nitrosaminas, los *C*-nitrosocompuestos pueden actuar como agentes nitrosantes cuando se rompe el enlace que une el grupo nitroso al carbono y lo liberan al medio. Sin embargo, el efecto más interesante que poseen es la capacidad de catalizar reacciones de nitrosación cuando se



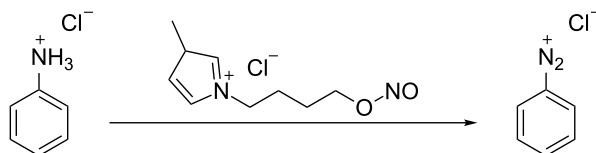
Esquema 2.6: Catálisis por *C*-nitrosocompuestos aromáticos.

encuentran presentes.¹²⁵ El mecanismo propuesto para explicar este efecto se muestra en el esquema 2.6.

El grupo nitroso unido al anillo aromático actúa como un nucleófilo que se asocia al ion nitrosacido atrayendo su carga eléctrica y aumentando su electrofilia. Así, el ion nitrosacido activado es más efectivo y por lo tanto la reacción se acelera. Se ha demostrado que incluso a un pH de 5, donde apenas hay ácido nitroso puede haber reacción de nitrosación a una velocidad significativa en presencia de *C*-nitrosocompuestos aromáticos.

Líquidos iónicos

Un líquido iónico es un fluido constituido exclusivamente por iones. Se considera que están dentro de esta categoría todas las sales cuyo punto de fusión es inferior al punto de ebullición del agua. La composición química de estos compuestos generalmente consiste en un catión orgánico y un anión inorgánico. Se han sintetizado líquidos iónicos cuyo catión es un nitrosocompuesto que actúa como portador del ion nitrosonio, siendo muy eficiente en la nitrosación de otros compuestos. Dada su naturaleza iónica, es un método especialmente útil en la síntesis de sales de diazonio, que son muy estables en su seno.¹²⁶



Esquema 2.7: Síntesis de sales de diazonio con líquidos iónicos.

2.3. Reacciones de nitrosación

Pese al gran número de agentes nitrosantes que existen y a la variedad de sustratos susceptibles de ser nitrosados, los mecanismos de las reacciones de nitrosación se pueden agrupar en unas pocas categorías en función del camino que siguen para alcanzar los productos y del átomo del sustrato que reaccione. El conocimiento de estos mecanismos permite proponer compuestos que catalicen o inhiban las reacciones según interese.

2.3.1. C-Nitrosación aromática

Cuando en 1825 Michael Faraday descubrió el benceno, dos de sus características asombraron a los químicos de su época.¹²⁷ La primera era la fórmula empírica que se desprendía de su análisis elemental, CH, una inusual proporción carbono-hidrógeno. La segunda era su estabilidad. August von Kekule en 1866 propuso una estructura cíclica con tres dobles enlaces que explicaba la primera propiedad (figura 2.5).

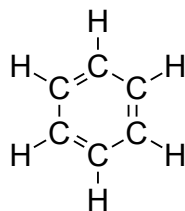


Figura 2.5: Modelo de Kekule.

Para comprender la segunda tuvieron que pasar más de seis décadas hasta el desarrollo de la teoría de orbitales moleculares. Esta teoría describía la molécula de benceno como seis átomos de carbono con hibridación sp^2 que utilizaban sus tres orbitales híbridos para unirse entre sí y con el hidrógeno en un anillo. Los seis orbitales p restantes se solapan para formar el sistema π del benceno (figura 2.6). Este sistema consta de seis orbitales moleculares de los que sólo están ocupados por electrones los tres que son enlazantes, lo que explica la

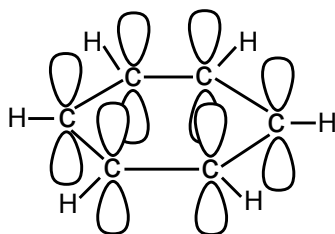


Figura 2.6: Modelo de la Teoría de Orbitales Moleculares.

estabilidad inusual del benceno. Los compuestos que presentan esta estabilidad adicional se denominan compuestos aromáticos.

Sin embargo, aunque los electrones se encuentran estabilizados formando el sistema aromático, algunos electrófilos fuertes pueden tomarlos para formar un carbocatión.

Este carbocatión, denominado complejo sigma o complejo de Wheland, ya no es aromático, pero se encuentra estabilizado por resonancia y regresa a la aromaticidad o bien expulsando al grupo electrófilo atacante o bien deshaciéndose del protón.

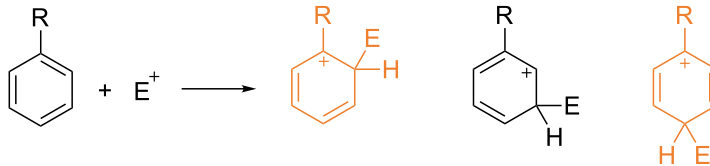
Si la pérdida del protón está más favorecida que la del grupo electrófilo, la reacción global se denomina sustitución electrofílica aromática (S_EAr).

Debido a la electronegatividad de sus átomos, los electrófilos de las reacciones de nitrosación son débiles y requieren que el anillo aromático esté fuertemente activado para poder reaccionar con él.¹²⁸ Por ejemplo, el ion nitrosonio, NO^+ , es 10^{14} veces más lento reaccionando con el benceno que el ion nitronio, NO_2^+ .¹²⁹

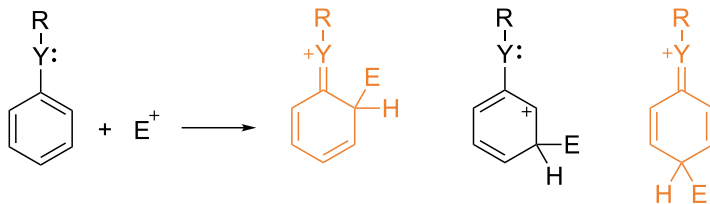
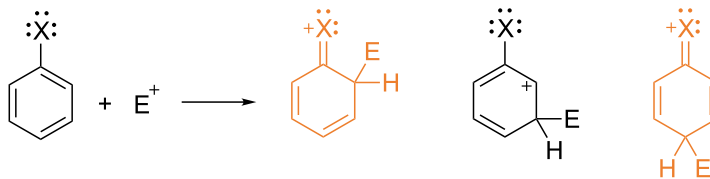
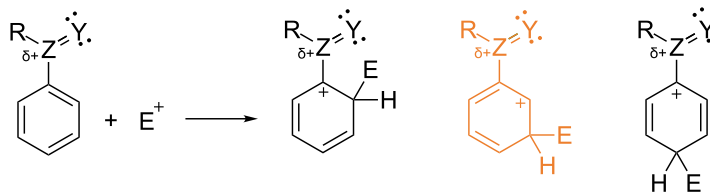
Se dice que un anillo aromático está activado cuando su estructura presenta un sustituyente en una posición determinada que hace que aumente la velocidad de reacción. Que un sustituyente sea más o menos activante depende de su capacidad de estabilizar el complejo σ bien sea por inducción, es decir, cediendo densidad electrónica a través del enlace σ (alquilos, arilos), o por resonancia, es decir, cediendo densidad electrónica a través de un enlace π en una de las estructuras de resonancia (aminas, amidas, alcoholes, éteres). Estas estabilizaciones sólo son posibles cuando el sustituyente se encuentra en las posiciones

Grupos activantes

- Estabilizado por inducción



- Estabilizado por resonancia

**Grupos desactivantes**- *orto*-, *para*- orientadores- *meta*-orientadores

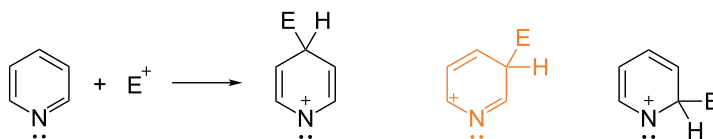
Esquema 2.8: Resumen de los complejos σ obtenidos por ataque electrófilo en función del sustituyente y su posición. Las estructuras estables responsables de la orientación en la sustitución se muestran de color naranja.

orto o *para* respecto al electrófilo entrante.

Los grupos deficientes en electrones (ésteres, carboxilos, carbonilos, nitrilos, nitratos) retrasan la sustitución electrofílica. Su gran efecto desactivante en las posiciones *orto* y *para* hace que el ataque electrofílico ocurra principalmente en la posición *meta*, ya que esta posición está menos desactivada.

Los halógenos y los óxidos de amina se comportan como un tercer tipo de sustituyente. Son compuestos desactivantes, ya que su gran electronegatividad hace disminuir la densidad electrónica a través del enlace σ , efecto denominado sustracción inductiva. Sin embargo, se comportan como *orto*-, *para*- orientadores, debido a que sus pares electrónicos libres estabilizan por resonancia el complejo σ de la misma forma que los activantes. Un resumen de la influencia que tienen los sustituyentes y su posición se muestra en el esquema 2.8.

En los anillos heteroaromáticos la posición del heteroátomo influye en el lugar en que se produce la sustitución. Anillos de cinco miembros como furano, pirrol o tiofeno ceden su par de electrones π al anillo favoreciendo la reacción de sustitución en la posición menos impedida. Anillos de seis miembros como la piridina atraen con su electronegatividad los electrones del anillo aromático, desactivando la reacción. Como los sustituyentes desactivantes, la presencia de un heteroátomo desactiva la sustitución en cualquier posición, aunque está menos desactivada la posición *meta* (esquema 2.9).



Esquema 2.9: S_{EAr} en un anillo heteroatómico: piridina. La estructura estable responsable de la orientación en la sustitución se muestra de color naranja.

Si el sustrato aromático es policíclico, el mayor número de opciones de resonancia aumenta la estabilidad de los intermedios de reacción, lo que los hace más reactivos que el benceno. Si no tienen sustituyentes, los anillos policíclicos reaccionarán en los puntos en los que se forme el carbocatión más estable, esto es, en la posición 1 para el naftaleno y en los carbonos libres del anillo central

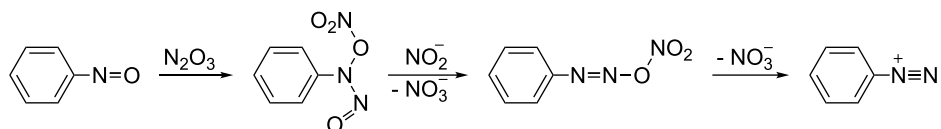
para el fenantreno y el antraceno.

El efecto de los grupos sustituyentes depende de la reactividad del electrófilo. Cuanto más fuerte es, menos energía requiere para llegar al estado de transición, formando el complejo de Wheland sin ceder casi carga positiva durante la mayor parte del proceso, haciendo que el grupo sustituyente apenas influya en la posición de sustitución.

A los electrófilos débiles, como el $\text{NO}^+/\text{H}_2\text{NO}_2^+$, la baja reactividad hace que su estado de transición sea muy próximo al complejo de Wheland, apareciendo una carga positiva importante en el anillo, haciendo que los sustituyentes sean muy influyentes.

2.3.2. Diazotación de C-nitrosocompuestos aromáticos

Cuando la C-nitrosación de un compuesto aromático se lleva a cabo en condiciones de acidez suave y con exceso de ácido nitroso, el C-nitrosocompuesto formado puede volver a nitrosarse para formar una sal de diazonio¹³⁰. El mecanismo por el que se cree que esta reacción transcurre se representa en el esquema 2.10. El compuesto nitrosado es atacado por el trióxido de dinitrógeno u otro agente nitrosante. La estequiometría de la reacción ha demostrado que el producto de la nitrosación en su transformación a sal de diazonio oxida dos iones nitrito a iones nitrato. Bajo una acidez más fuerte la reacción también se produce, pero el mecanismo es más complicado. En ambas situaciones, si se añade un ion metálico que actúe de quelante, como el ion cúprico, Cu^{2+} , no transcurre la reacción. Esta reacción es una alternativa a la ruta habitual de diazotación de anillos aromáticos que consiste en nitrar el anillo, reducir el grupo nitro a una amina y nitrosar la amina para obtener la sal de diazonio.



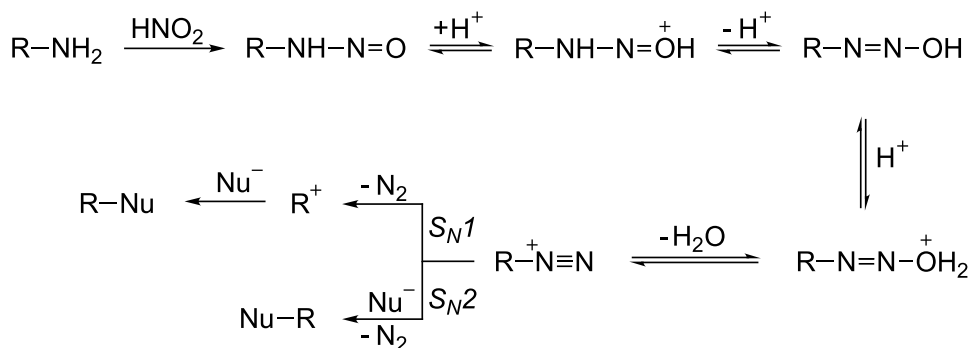
Esquema 2.10: Mecanismo de diazotación de un C-nitrosocompuesto.

2.3.3. N-Nitrosación

El curso de las reacciones de nitrosación de aminas depende de la sustitución a la que están sometidas y de si son aromáticas o alifáticas. Sin embargo todas tienen en común que el primer paso consiste en el ataque nucleófilo de la amina sobre el agente nitrosante. Si la reacción se produce con el ácido nitroso, la mayor parte de los estudios indican que la especie implicada es el trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 . El comportamiento del producto de reacción depende de la naturaleza de la amina.¹³¹

Las aminas primarias al nitrosarse se convierten en *N*-nitrosaminas, que rápidamente se transforman, vía hidroxilazocompuesto, en una sal de diazonio (esquema 2.11). Si la sal de diazonio está unida a un radical alifático, se descompondrá inmediatamente, empujada por la estabilidad del nitrógeno resultante. En el caso de que el radical sea aromático, las estructuras resonantes que forma estabilizan la sal de diazonio, permitiendo preparar sales y conservarlas en disolución o incluso aisladas.

La descomposición de la sal de diazonio puede producirse mediante un proceso S_N1 o un proceso S_N2 . Los productos de la descomposición, también denominados productos de desaminación, dependen de los nucleófilos presentes. Algunos compuestos derivados de la descomposición de sales de diazonio son éteres, lactonas (esquema 2.18, página 90)¹³² o productos de eliminación, si el



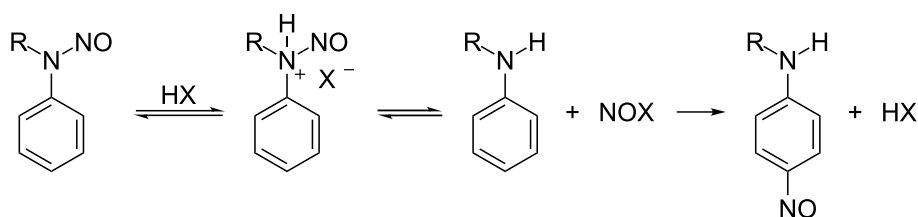
Esquema 2.11: Mecanismos de nitrosación y desaminación de aminas primarias.

nucleófilo es un alcohol, el ácido carboxílico de un aminoácido o una base fuerte, respectivamente. La reacción de Piria de la que se habló en la introducción (página 34) es el conjunto de la reacción entre una amina primaria y el ácido nitroso en disolución acuosa formando alcohol como producto de desaminación.

Estas reacciones pueden tener utilidad en síntesis si se evita la mezcla de productos. La formación de nitrógeno, un grupo saliente excelente, es aprovechado en multitud de procedimientos para obtener diversos compuestos a partir de aminas aromáticas. Algunos ejemplos son la desaminación directa por reducción con ácido fosfórico, la reacción de Schiemann para sustituir la amina por flúor, las reacciones de Sandmeyer y de Gatterman, para sustituirla por cloro o bromo, la reacción de Gomberg-Bachmann, para unir dos anillos aromáticos o la arilación de Meerwein, para sustituir el hidrógeno de un doble enlace pobre en electrones por un anillo aromático.¹³³

La nitrosación de aminas secundarias conduce a una *N*-nitrosamina, independientemente de que la amina sea aromática o alifática. Este producto, al contrario que la amina de la que procede, no tiene carácter básico al tratarse de la amida de un ácido nitroso. Las *N*-nitrosaminas secundarias son muy estables y pueden aislarse. Generalmente, los *N*-nitrosoderivados de las aminas secundarias tienen aspecto oleoso y son de color amarillo.

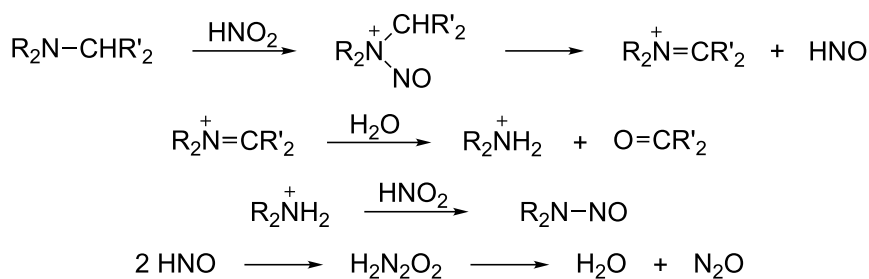
Las *N*-nitrosaminas secundarias aromáticas, ante catalizadores nucleófilos en medio ácido se transponen para dar *C*-nitrosocompuestos. Esta transposición es en realidad una reacción intermolecular entre la nitrosamina y el nucleófilo, que actúa como transportador del ion nitrosonio (esquema 2.12). Cuanto mayor es la acidez, más favorecida está la formación del compuesto termodinámicamente



Esquema 2.12: Mecanismo de transposición de una *N*-nitrosamina secundaria aromática.

más estable que es el producto de C-nitrosación.

Las aminas terciarias también reaccionan formando *N*-nitrosocompuestos, sin embargo, esta reacción es reversible y el producto está poco favorecido, aunque se han sintetizado algunas sales de nitrosaminas terciarias con tetrafluoroborato y otros contraiones.¹³⁴ Estos compuestos son muy inestables y se descomponen en un carbonilo, una nitrosamina secundaria y óxido nitroso, según el mecanismo que recoge el esquema 2.13.¹³⁵ Esta es la principal fuente de errores en la determinación de su toxicología. Si uno de los radicales de la amina es un grupo aromático, la reacción de C-nitrosación estará más favorecida siempre que las posiciones *orto* o *para* estén libres. Existe la posibilidad de que esta reacción se produzca por transposición del grupo nitroso desde la amina a través de una primera etapa de nitrosación en *meso*.

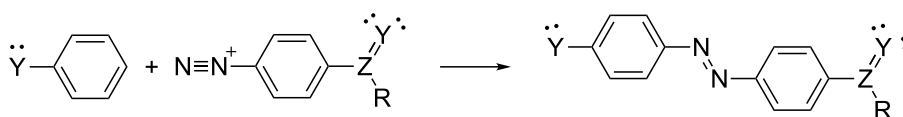


Esquema 2.13: Mecanismo de descomposición de una *N*-nitrosamina terciaria.

Existen reacciones de nitrosación de sales de amonio cuaternario y de óxidos de amina a altas temperaturas. Sin embargo, apenas se conocen los mecanismos por los que transcurren.¹³⁶

2.3.4. Reacciones de copulación

Los iones diazonio aromáticos son electrófilos débiles capaces de realizar sustituciones en compuestos ricos en electrones, como los anillos aromáticos activados. Esta reacción se conoce como reacción de copulación (esquema 2.14).¹³¹ Los sustituyentes del ion diazonio y del anillo aromático con el que



Esquema 2.14: Reacción de copulación.

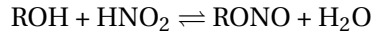
copula son fundamentales para fomentar la reacción. Como se ha visto en la sección 2.3.1 con la C-nitrosación (página 73), favorecerá la reacción que el anillo aromático esté unido a grupos que cedan sus electrones y aumenten su densidad electrónica, como alcoholes o éteres. Del mismo modo, sustituyentes deficientes en electrones, como nitratos o ésteres, aumentan el carácter electrófilo del ion diazonio y facilitan la reacción.

El pH es también un factor importante en la copulación. Si es demasiado bajo, se puede protonar el grupo que cede electrones al anillo aromático y sustraerlos. Si el pH es demasiado alto, la mayor parte del ion diazonio se encuentra en forma de Ar-N=N-OH ó Ar-N=N-O^- , por lo que la concentración de diazonio efectiva es muy baja.

Los productos de la reacción de copulación son los azocompuestos. Generalmente se utilizan como colorantes debido a que tienen un color muy intenso provocado por la deslocalización electrónica que proporciona el puente azo. Además, el gran número de combinaciones diferentes que se pueden preparar mediante las reacciones de copulación permite obtener casi cualquier color. Otro uso de los azocompuestos es como antibióticos. Esta propiedad se descubrió cuando se intentaron teñir bacterias con un colorante formado por un azocompuesto con el grupo sulfanilamida. Investigaciones posteriores han demostrado que su efectividad se debe a que el producto de su reducción en el cuerpo humano es antibacteriano.

2.3.5. O-Nitrosación

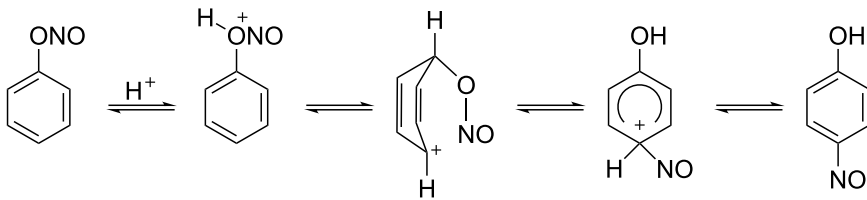
Ya se ha visto en la sección 2.2.4 (página 65) que la reacción electrófila entre un agente nitrosante y un alcohol conduce a la formación del correspondiente nitrito de alquilo mediante el siguiente equilibrio:



$$K = \frac{[\text{RONO}]a_w}{[\text{HNO}_2][\text{ROH}]} \quad (2.18)$$

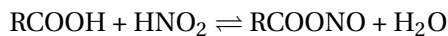
Por lo general la constante de equilibrio, K , no depende mucho de la estructura del alcohol, aunque respeta la lógica sucesión primario > secundario > terciario.¹⁰⁵ Esto se tiene que tener en cuenta a la hora de entender la efectividad de estos compuestos como agentes nitrosantes. Cuanto más ramificados, más efectivos son, aunque también más lentos.

Los alcoholes aromáticos nitrosados, del mismo modo que las nitrosaminas, también sufren la transposición de su grupo nitroso en lo que se conoce como reordenamiento de Fischer-Hepp, que parece tener un reordenamiento intramolecular, en el que el anillo se protona, formando un intermedio con forma de bote que permite la transposición del grupo nitroso (esquema 2.15).



Esquema 2.15: Mecanismo del reordenamiento de Fischer-Hepp.

Otro tipo de reacciones entre un agente nitrosante y el oxígeno son las nitrosaciones de ácidos carboxílicos para obtener carboxilatos de nitrosilo. Estos compuestos tienen características similares a las de las sales de nitrosilo y también pueden ser empleados como agentes nitrosantes. Se forman siguiendo el siguiente equilibrio:



Para sintetizar carboxilatos de nitrosilo se desplaza el equilibrio de la reacción hacia el lado del carboxilato añadiendo gran exceso de ácido nitroso.

La estructura de estos compuestos no se ha determinado experimentalmente,

pero estudios teóricos apuntan a que el grupo nitroso se encuentra situado en una posición *trans* (figura 2.7).¹³⁷

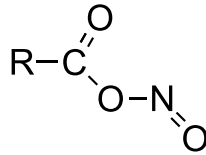


Figura 2.7: Estructura de los carboxilatos de nitrosilo.

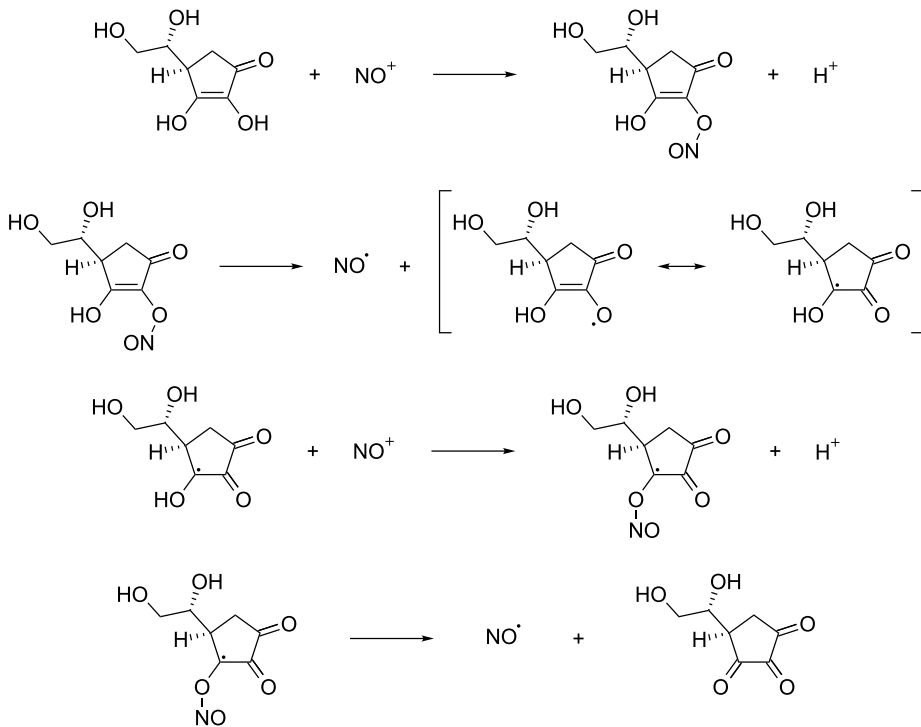
2.3.6. Inhibición de la nitrosación

Se han investigado mecanismos de inhibición de las reacciones de nitrosación para reducir la exposición de la población a nitrosocompuestos. Todas las estrategias pasan por convertir los agentes nitrosantes en compuestos no reactivos, generalmente haciendo competir a los sustratos con compuestos que reduzcan u oxiden el ion nitrosonio, la mayor parte de las veces a través de una primera etapa de O-nitrosación.

El primer compuesto que mostró inhibición de las reacciones de nitrosación fue el ácido ascórbico.^{89,138} Su estructura con tres sitios O-nitrosables aumenta su efectividad. Además es una molécula lo suficientemente fuerte para vencer el potencial de reducción del ion nitrosonio (página 67) y reducirlo en dos reacciones consecutivas (esquema 2.16).

En relación con la inhibición de las reacciones de nitrosación por ácido ascórbico, es necesaria cierta cautela en su empleo en ciencia y tecnología de los alimentos donde, con frecuencia, se manejan conjuntamente sorbato y nitrito.¹³⁹ En efecto, se sabe que en mezclas sorbato-nitrito se forman especies químicas con actividad mutágena sobre el ADN.¹⁴⁰⁻¹⁴⁵ Una de esas especies es el ácido etilnitroso (AEN),¹⁴⁰ molécula de baja actividad en el test de Ames, pero altamente activa en ensayos *rec*.¹⁴²

La molécula AEN es, como mínimo, cuarenta veces más activa que la de ácido sórbico y, como mínimo, también treinta veces más activa que el nitrito de sodio en los ensayos *rec* con bacterias;¹⁴⁰ donde ejerce acción mutágena sobre la



Esquema 2.16: Mecanismo de reducción de dos moléculas de ion nitrosacido por ácido ascórbico.

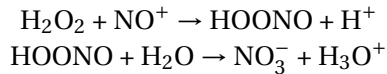
Salmonella.¹⁴⁶

Como en nuestro grupo de trabajo se ha encontrado correlación entre potencial alquilante y carcinogenicidad de especies alquilantes fuertes (lactonas) y débiles (sorbatos), se ha abordado el estudio de la posible capacidad alquilante del AEN.¹⁴⁷⁻¹⁵² Como sustrato de alquilación se ha utilizado el nucleófilo 4-(p-nitrobencil)piridina (NBP), trampa de agentes alquilantes y de nucleofilia semejante a las bases del ADN.¹⁵³ Como resultado de ese estudio cinético se ha encontrado que la especie activa, alquilante, formada en las mezclas sorbato-nitrito, es el óxido de acetonitrilo.¹⁵⁴

Se han estudiado compuestos de estructura similar a la del ácido ascórbico,

como fenoles (ácido gálico, hidroquinonas) o polifenoles (taninos, ácido clorogénico) que han demostrado ser igual de efectivos eliminando los agentes nitrosantes tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁵⁵ Además son compuestos habituales en la alimentación (zumos, vinos, café, té...). Sin embargo, existen especies fenólicas, como el propio fenol u otros fenoles simples que pueden sufrir C-nitrosación convirtiéndose en agentes nitrosantes, por lo que su uso como inhibidores es restringido.

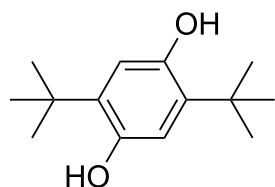
Otro inhibidor presente en medios biológicos pero peligroso es el peróxido de hidrógeno, que oxida el ion nitrosonio a nitrato.¹⁵⁶ La reacción transcurre a través de la O-nitrosación del agua oxigenada para formar ácido peroxinitroso que se isomeriza a ion nitrato:¹⁵⁷



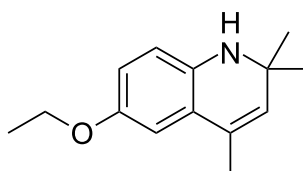
De la cinética de esta nitrosación ya se ha hablado en la sección 2.2.1 (página 58). El ácido peroxinitroso es muy venenoso y su toxicidad está relacionada el daño biológico que causa el óxido nítrico.¹⁵⁸

Algunos compuestos de azufre también inhiben las reacciones de nitrosación. El ion bisulfito se oxida a sulfato mientras reduce el ion nitrosonio a óxido nítrico y óxido de dinitrógeno. El ácido sulfámico y sus sales reducen los agentes nitrosantes a N_2 . Los tioles, como la cisteína o el glutatión, también inhiben las nitrosaciones porque son ellos quienes se nitrosan formando tionitritos. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, particularmente a un pH superior a 5, pueden actuar como agentes nitrosantes.

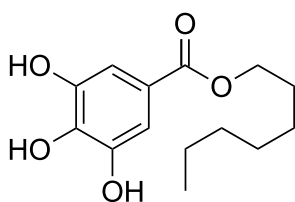
La legislación vigente obliga a añadir en la formulación de productos de riesgo como cosméticos o alimentos tratados con nitrito (embutidos, pescados) agentes antioxidantes u otros compuestos inhibidores para aumentar la seguridad. Los compuestos que se pueden emplear se clasifican según sean o no solubles en agua. Las tablas 2.7, 2.8, 2.9 y 2.10 recogen los inhibidores permitidos para uso humano.¹⁵⁹



di-*t*-butil hidroquinona

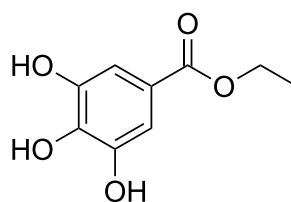


Etotoxiquina



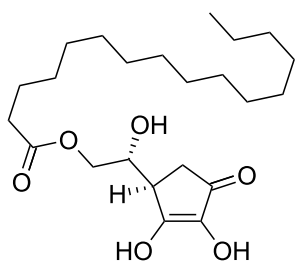
Galato de octilo

(E311)



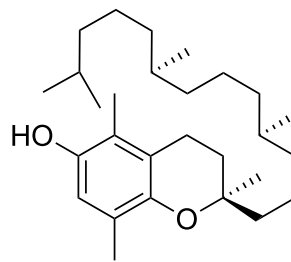
Galato de propilo

(E310)



Palmitato de ascorbilo

(E304)



Tocoferol

(E307)

Tabla 2.7: Inhibidores permitidos para uso humano solubles en aceite.

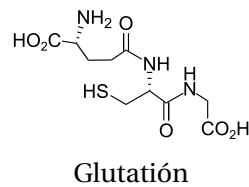
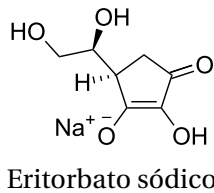
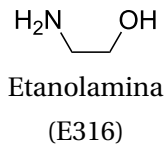
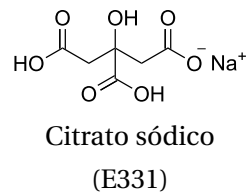
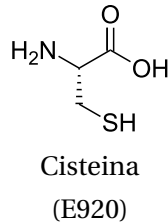
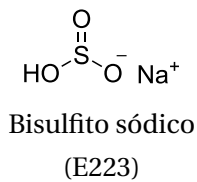
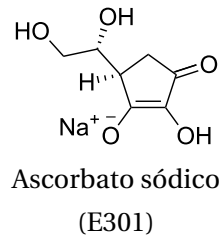
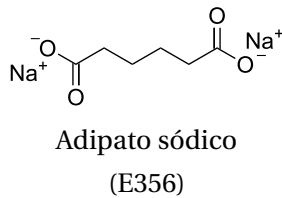
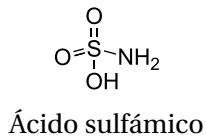
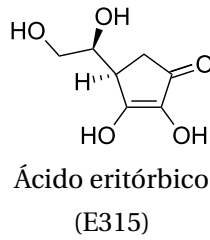
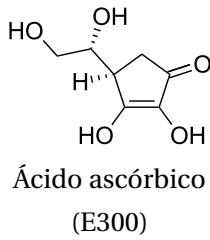
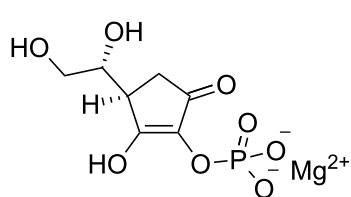
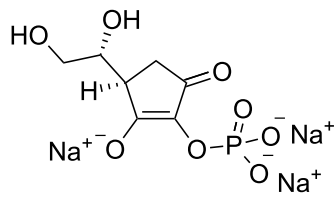


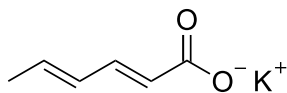
Tabla 2.8: Inhibidores permitidos para uso humano solubles en agua (I).



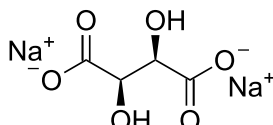
Fosfato de ascorbilo y magnesio



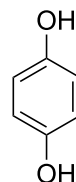
Fosfato de ascorbilo y sodio



Sorbato potásico
(E202)

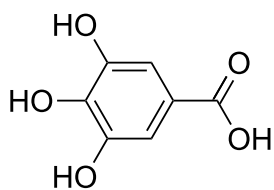


Tartrato sódico
(E335)



Hidroquinona

Tabla 2.9: Inhibidores permitidos para uso humano solubles en agua (II).

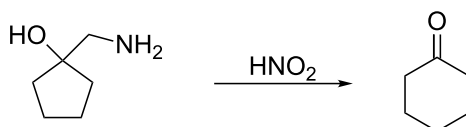


Ácido gálico

Tabla 2.10: Inhibidor permitido para uso humano soluble en aceite y en agua.

2.3.7. Reordenamiento interno

Muchas reacciones de nitrosación conllevan reordenamientos posteriores que pueden ser de dos clases. La primera son las reacciones tipo Fischer-Hepp, en las que el grupo nitroso sufre una transposición hacia una ubicación más estable. El cambio puede ser intermolecular, como ocurre con las aminas aromáticas (página 79) o intramolecular, como en el caso de los fenoles (página 82) o los ácidos carboxílicos nitrosados.¹⁶⁰ La eficiencia de estas reacciones se puede explicar en términos estereoquímicos.



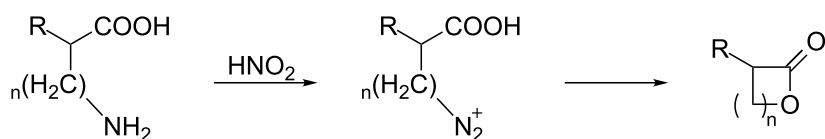
Esquema 2.17: Reordenamiento de Tiffeneau-Demjanov.

La segunda clase de reacciones de reordenamiento interno son las producidas por descomposición de las sales de diazonio en las nitrosaciones de aminas primarias. Promovidas termodinámicamente por la estabilidad del nitrógeno desprendido, estas reacciones son muy variadas.

El reordenamiento de Demjanov (esquema 1.4, página 36) es una reacción en la que, a través de la nitrosación de una amina primaria en posición β respecto a un anillo de cuatro, cinco o seis carbonos, se expande el tamaño del anillo.

Una variante de esta reacción es el reordenamiento de Tiffeneau-Demjanov (esquema 2.17), en la que existe un alcohol en el carbono en el que se unen anillo y cadena. Este alcohol cataliza la expansión del anillo transformándose posteriormente a una cicloetona.¹⁶¹ En este caso se pueden ampliar anillos desde el ciclopropano hasta el ciclooctano con algún grado de éxito.¹⁶²

Otra reacción de interés es la ciclación de aminoácidos para formar lactonas.¹³² La amina primaria se nitrosa, convirtiéndose en una sal de diazonio que sufre un ataque nucleófilo por parte del ácido carboxílico (esquema 2.18).



Esquema 2.18: Reacción de ciclación de aminoácidos.

2.3.8. S-Nitrosación

Debido a que las propiedades químicas del azufre son similares a las del oxígeno, los compuestos con átomos de dicha especie sufren reacciones con agentes nitrosantes análogos a las de la O-nitrosación.⁸² Tioles, tiocarbonilos, tioéteres o ácidos sulfanílicos pueden convertirse en S-nitrosocompuestos.^{163,164}

Generalmente, los productos de S-nitrosación son inestables y se descomponen desprendiendo óxido nítrico.¹⁶⁵ Esta reacción está relacionada con la síntesis metabólica de NO en el organismo.

2.3.9. Control por difusión

Una reacción controlada por difusión es aquella en la que los participantes reaccionan tan rápidamente que su velocidad se ve limitada por la velocidad de los procesos físicos que hacen que se encuentren los reactivos.^{166,167} Para dos moléculas solvatadas en un medio, A y B, este proceso se puede representar de la siguiente manera:¹⁶⁸



Los modelos que describen el estado líquido representan las moléculas de los reactivos rodeadas de moléculas de disolvente. Los reactivos se van moviendo por los huecos que dejan las moléculas de disolvente hasta que se encuentran adyacentes, formando el complejo de colisión. La velocidad de este proceso está caracterizada por k_c . El complejo de colisión, función de factores como la temperatura o la orientación de los reactivos, puede conducir a la reacción,

formando el estado de transición, $[ET]^\ddagger$, solvatado a una velocidad regida por k_t .

En las reacciones controladas por difusión, la energía de activación de la reacción, E_a , es menor que la energía para el flujo viscoso del disolvente y k_t es mucho mayor que k_c .

A partir de las Leyes de Flick es posible estimar la constante de velocidad de una reacción controlada por difusión en función de la distancia crítica entre las dos moléculas, d_{AB} , y los coeficiente de difusión de los reactivos, D_A y D_B :

$$k = 4\pi N_A(D_A + D_B)d_{AB} \quad (2.19)$$

Los coeficientes de difusión dependen de la viscosidad del disolvente y η , la temperatura, T :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.20)$$

k_B es la constante de Boltzmann y r es el radio efectivo de la molécula. Si la reacción transcurre entre especies iónicas, es necesario multiplicar la ecuación 2.19 por un coeficiente denominado factor electrostático f :

$$f = \frac{y}{e^y - 1} \quad (2.21)$$

donde y es una constante que engloba las cargas de los dos iones con su signo, z_A y z_B , la distancia crítica, d , la permitividad eléctrica del disolvente, ϵ , la carga de un electrón, e , y la temperatura, T :

$$y = \frac{z_A z_B e^2}{4\pi\epsilon d k_B T} \quad (2.22)$$

El factor electrostático es mayor de la unidad si los reactivos tienen cargas opuestas y menor si los reactivos tienen el mismo signo, lo que corrige la atracción o la repulsión electrostática en la ecuación de velocidad.

Muchas reacciones de nitrosación, en especial las que tienen al N_2O_3 como agente nitrosante, están controladas por difusión. Se llegó a esta conclusión tras el estudio de las constantes de velocidad de la reacción de nitrosación de

Sustrato	$k / 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Sustrato	$k / 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
morfolina	2,2	metilbencilamina	1,8
<i>o</i> -cloroanilina	0,14	etilbencilamina	3,1
<i>m</i> -cloroanilina	0,96	<i>N</i> -metilglicina	1,5
<i>p</i> -cloroanilina	2,8	2-butilamina	1,6
<i>o</i> -toluidina	4,2	propilamina	0,94
anilina	7,5	diisobutilamina	1,3
<i>m</i> -toluidina	8,2	dimetilamina	1,2
<i>N</i> -metilanilina	4,0	dietilamina	1,1
<i>p</i> -toluidina	19,0	dipropilamina	1,2
<i>p</i> -metoxianilina ^a	1,8	metilciclohexilamina	2,2
piperacina	1,3	diisopropilamina	1,3
hidroxilamina	2,0	piperidina	1,3
nitrosopiperacina	0,75	dibutilamina	1,8

^a Constante medida a 0 °C.

Tabla 2.11: Constantes de velocidad a 25 °C de nitrosaciones controladas por difusión en agua.⁹⁶

decenas de aminas. Pese a la gran variedad de estructuras analizadas, todas las constantes tenían un valor del orden de $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (tabla 2.11).⁹⁶ El hecho de que todas las reacciones tuviesen una energía de activación baja apoyó la teoría.

2.3.10. Control orbitalico

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

Generalmente, la formación de un enlace entre un electrófilo y un nucleófilo está regida por las diferencias de carga eléctrica entre los reactivos.¹⁶⁹ El nucleófilo, rico en electrones, se ve atraído por el electrófilo, comenzando la unión

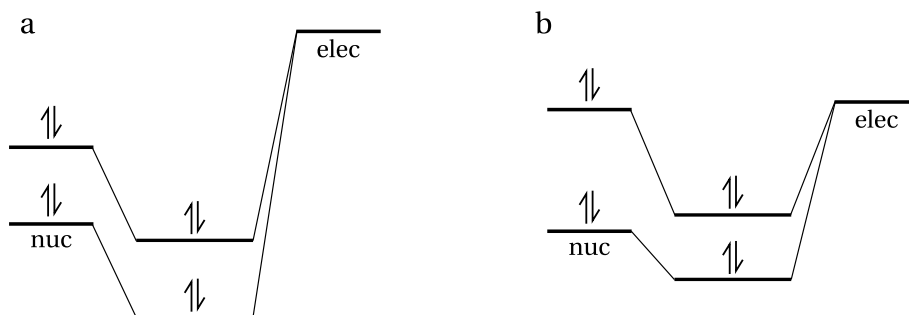


Figura 2.8: Diagramas de orbitales moleculares para una reacción con control por carga (a) y con control orbital (b).

sin apenas ceder los electrones. Según la teoría de orbitales moleculares, estas uniones, denominadas reacciones controladas por carga, se deben a la gran diferencia de energía que existe entre el orbital ocupado más alto del nucleófilo y el orbital vacío más bajo del electrófilo (figura 2.8).

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

En las nitrosaciones las reacciones de control orbital son comunes debido a la electronegatividad de los átomos de nitrógeno y oxígeno, que hacen al grupo nitroso poco electrófilo. El ejemplo más documentado son las aminolisis de los nitritos de alquilo.¹⁰⁵ Como las aminas son nucleófilos débiles, la diferencia de energías entre sus orbitales y los de los nitritos de alquilo son pequeñas y se ven regidas por el control orbital, lo que explica la diferencia de velocidad con las reacciones equivalentes de las aminolisis de los ésteres de alquilo.¹⁷⁰ La correlación entre los potenciales de ionización de las aminas con las constantes de velocidad demuestran el control orbital.

2.4. Nitrosación, mutagenia y carcinogenia

La relación entre nitrosocompuestos y cáncer aún hoy, medio siglo después del trabajo pionero de Magee y Barnes, es motivo de polémica. Pese a que se ha demostrado que producen una amplia variedad de tumores en más de 40 especies animales, incluidos primates superiores, aún no existen pruebas epidemiológicas concluyentes de que los nitrosocompuestos sean carcinogénicos para el hombre.^{171,172}

Varias nitrosaminas, como la nitrosodietilamina, nitrosodimetilamina o nitrosornicotina están clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) como compuestos probablemente carcinogénicos para los humanos (Grupo 2A).^{173,174} Existen estudios que relacionan el consumo de nitritos y nitrosaminas con el cáncer de estómago y con el riesgo de desarrollar cáncer de esófago. De igual modo, se ha encontrado una asociación positiva y significativa entre el consumo de alimentos tratados con nitrito y el cáncer nasofaríngeo.¹⁷⁵ Al interpretar estos estudios se debe tener en cuenta que, por lo general, las carnes y los pescados tratados con nitrito suelen contener también importantes cantidades de sal. La sal induce procesos inflamatorios que reducen la mucosa protectora del estómago e incrementan el riesgo de cáncer de estómago. La infección con *Helicobacter pylori* puede estar relacionada con el consumo de sal y de nitrosocompuestos, aumentando la carcinogenia tras dañar el epitelio.

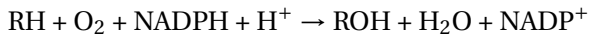
Pese a las sospechas derivadas de los ensayos con animales, no se ha encontrado una relación clara entre el consumo de nitrosocompuestos y el desarrollo de cánceres de páncreas, colon o cerebro.¹⁷⁶ Sí que se ha encontrado una relación entre la exposición durante el embarazo a *N*-nitrosocompuestos, principalmente *N*-nitrosamidas, y el riesgo de tumor cerebral infantil.¹⁷⁷

Los mecanismos químicos por los que los nitrosocompuestos provocan mutaciones en el código genético pasan por la formación de un carbocatión que alquile las bases del ADN. Este carbocatión se forma por nitrosación y posterior desaminación de una amina primaria por un agente nitrosante (página 78) o mediante la activación metabólica de una *N*-nitrosamina secundaria. Otros nitrosocompuestos no pueden ser agentes alquilantes por lo que su actividad

mutágena depende de su capacidad para nitrosar alguna amina del medio.¹⁷²

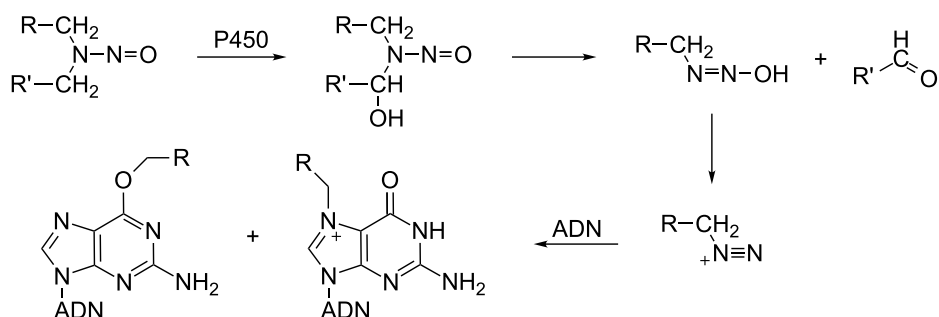
Las bases del ADN son sustratos ricos en electrones adecuados para la reacción con un carbocatión. Casi todos sus heteroátomos son susceptibles de ser alquilados, aunque el sitio preferido depende de la naturaleza del agente alquilante.¹⁷⁸ La posición N-7 de la guanosina es el punto más nucleófilo de las bases del ADN y es donde suelen reaccionar casi todos los agentes alquilantes sin impedimento estérico. Las reacciones en otros lugares dependen de la estructura del electrófilo. Los agentes alquilantes fuertes (de pequeño tamaño, carga positiva y baja polarizabilidad) como los iones diazonio reaccionan mejor con los oxígenos de los nucleófilos del ADN, mientras que los agentes alquilantes débiles tienden a reaccionar con los nitrógenos de las bases. Los productos de las reacciones de alquilación son estables para la mayor parte de las posiciones.

El proceso por el cual una *N*-nitrosamina secundaria se convierte en un agente alquilante se muestra en el esquema 2.19. La nitrosamina secundaria es estable en condiciones fisiológicas y llega sin dificultad a la célula. Ésta la procesa por medio del citocromo P450, un tipo de proteínas situado en la membranas interiores de la mitocondria o del retículo endoplasmático que metaboliza los compuestos exógenos de la célula a través de una reacción de monooxidación:



Al metabolizar la nitrosamina secundaria, el citocromo P450 la transforma en una α -hidroxilnitrosamina, que espontáneamente se divide en un aldehído y un alquildiazohidróxido. Como ocurría en los procesos de desaminación de nitrosaminas primarias, el alquildiazohidróxido se transforma en una sal de diazonio a través de la pérdida de una molécula de agua tras su protonación. La sal de diazonio obtenida es capaz de alquilar cualquier posición nucleófila de los constituyentes celulares, ya sean ácidos nucleicos o proteínas. De esta forma, los nitrosocompuestos pueden interferir y alterar los procesos celulares, considerándose, además de mutágenos y carcinógenos, compuestos citotóxicos.

Todos los organismos tienen sistemas de reparación para el daño que provoca la alquilación de su ADN.¹⁷⁹ En total, el ADN de un ser humano sufre más de 20.000 lesiones endógenas por día y por célula, siendo las principales fuentes



Esquema 2.19: Activación metabólica de *N*-nitrosocompuestos.

la depurinización y la desaminación espontáneas de las bases y la oxidación natural. La contribución relativa del daño por alquilación no se conoce con exactitud; sin embargo, la mera existencia de varios sistemas de reparación para las lesiones por alquilación indica que la exposición endógena y medioambiental debe ser significativa. De hecho, todos los mecanismos principales de reparación del ADN (reparación sobre la marcha, reparación directa, reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido, reparación de malapareamiento) están involucrados en el procesado de productos de alquilación primarios (metilaciones, cloroetilaciones) y en la corrección de los daños secundarios provocados por esos productos (rupturas de la hebra, enlace cruzado entre bases de hebras opuestas, pérdida de la basicidad).¹⁸⁰

Debido a estos sistemas de reparación y a que no todas las modificaciones en las bases son biológicamente importantes, no siempre es posible establecer una correlación entre estructura química y carcinogenia o entre las condiciones de exposición al agente alquilante y carcinogenia.¹⁸¹

2.5. Compuestos estudiados

En el presente trabajo, se han elegido seis compuestos aromáticos de complejidad creciente para el estudio cinético-mecanístico de su nitrosación (figura 2.9). A continuación se describirá cada compuesto haciendo hincapié en algunas características de interés.

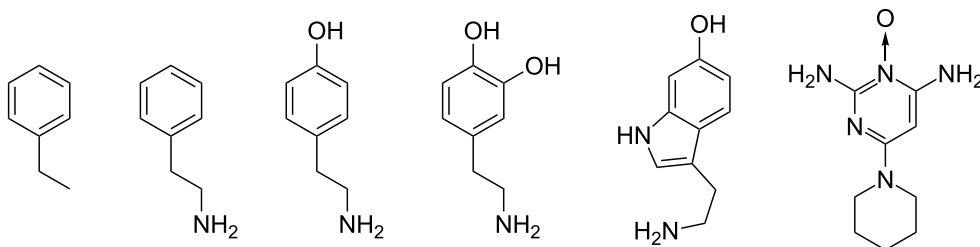
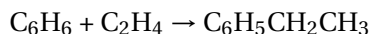


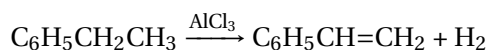
Figura 2.9: Sustratos cuya nitrosación se ha estudiado. De izquierda a derecha: etilbenceno, fenetilamina, tiramina, dopamina, serotonina y minoxidilo.

2.5.1. Etilbenceno

El etilbenceno (tabla 2.12) es un líquido incoloro, inflamable y de olor similar al de la gasolina. Se encuentra de forma natural en el petróleo y en el carbón, aunque se obtiene principalmente de la reacción entre etileno y benceno:¹⁸²



El 99% del etilbenceno producido en el mundo (28 millones de toneladas anuales en 2002) se dedica a la preparación del monómero estireno, una de las materias primas más importantes en la fabricación de plásticos.¹⁸³ El estireno se obtiene por la deshidrogenación de la cadena lateral del etilbenceno en una reacción catalizada por ácidos de Lewis:



El 1 % restante principalmente se emplea como disolvente en pinturas, lacas, tintas de impresora e insecticidas. Otro uso, mucho más minoritario, es como compuesto de partida para la síntesis industrial de acetofenona y dietilbenceno.

La reactividad del etilbenceno es baja, sin embargo puede llevar a cabo reacciones típicas de compuestos alquilaromáticos, como desalquilaciones térmicas, sustituciones electrófilas aromáticas con electrófilos fuertes u oxidación de su cadena lateral para formar acetonas y ácidos carboxílicos aromáticos.

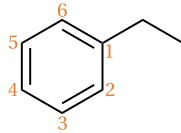
Desde el punto de vista biológico, el etilbenceno está clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer como un posible carcinógeno (Grupo 2B).¹⁸⁴ R ratones expuestos a una atmósfera enriquecida con el compuesto desarrollaron cáncer de riñón. Sin embargo, los datos que se desprenden de los test habituales de genotoxicidad *in vivo* e *in vitro* no pudieron demostrar las propiedades cancerígenas del compuesto.

El etilbenceno es metabolizado por el organismo a través de la α -hidroxilación a 1-feniletanol, que se excreta por la orina. También puede sufrir otras modificaciones metabólicas como la oxidación del carbono ω para dar 2-feniletanol, la oxidación del anillo aromático produciéndose 4-etilfenol u oxidaciones posteriores de los productos de metabolización. Todos los productos también son separados en el riñón y eliminados en la orina.

2.5.2. Fenetilamina

La fenetilamina (tabla 2.13) es un alcaloide natural monoamínico que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Su estructura, efectos farmacológicos y efectos en el comportamiento se parecen a los de la anfetamina (figura 2.10), por lo que varios investigadores han sugerido un papel significativo de la fenetilamina en la esquizofrenia y otros desórdenes psicológicos como el enamoramiento o la depresión.¹⁸⁵

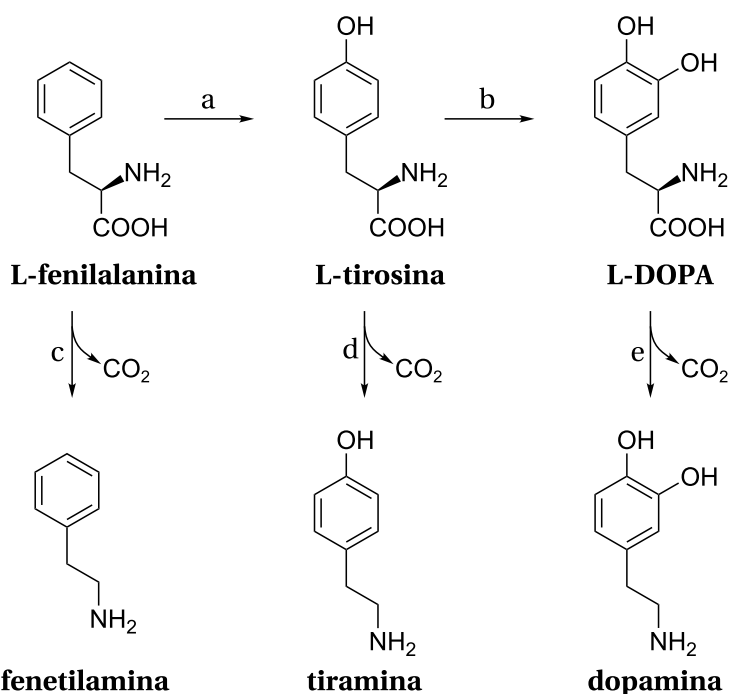
La fenetilamina se encuentra en multitud de alimentos, como legumbres, frutos secos o marisco, aunque el alimento que más fenetilamina contiene es el chocolate. Para proteger al sistema nervioso, la fenetilamina consumida via oral jamás alcanza el resto del organismo puesto que, tras ser absorbida en el sistema



Etilbenceno (ETH)

Otros nombres:	Etilbencol Feniletano
Número CAS:	100-41-4
Apariencia:	Líquido incoloro
Punto de fusión:	-95 °C
Punto de ebullición:	136 °C
Peso molecular:	106,17 g/mol
Densidad:	0,8665 kg/m ³ a 20 °C
Solubilidad:	0,015 g/100 ml agua (20 °C) Soluble en benceno
Índice de refracción:	1,493
Precauciones:	R-11: Fácilmente inflamable R-20: Nocivo por inhalación S-16: Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas - No fumar S-24/25: Evítese el contacto con los ojos y la piel S-29: No tirar los residuos por el desagüe

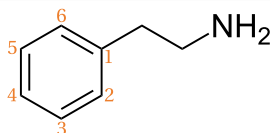
Tabla 2.12: Propiedades del etilbenceno.¹⁸⁶



Esquema 2.20: Biosíntesis de fenetilamina, tiramina y dopamina a partir de fenilalanina. a, fenilalanina hidroxilasa, b, tirosina hidroxilasa, c, fenilalanina descarboxilasa, d, tirosina descarboxilasa, e, L-DOPA descarboxilasa.

digestivo, es transportada por la vena porta al hígado, donde la mayor parte es inactivada rápidamente a través de su transformación en ácido fenilacético por las enzimas monoamina oxidasa (MAO).¹⁸⁷ Además de la hidroxilación por las enzimas MAO, la fenetilamina puede ser metabolizada por otras enzimas, como la aldehído deshidrogenasa o la dopamina β -hidroxilasa para dar productos que se eliminan por la orina.¹⁸⁸ La cantidad habitual de fenetilamina en sangre para un adulto sano es de 1,2 ng/ml.¹⁸⁹

La fenetilamina es una molécula liposoluble que atraviesa sin problemas la barrera hematoencefálica. De forma pura es un líquido corrosivo de color amarillento y un intenso olor a flores podridas causado por su grupo aromático



Fenetilamina (PHE)

Otros nombres:	β -feniletilamina 2-feniletilamina
Abreviatura:	PEA (en neurociencias)
Número CAS:	64-04-0
Apariencia:	Líquido incoloro
Punto de fusión:	-60 °C
Punto de ebullición:	198,5 °C
Peso molecular:	121,18 g/mol
Densidad:	0,962 kg/m ³ a 20 °C
Solubilidad:	2,9 g/100 ml agua (20 °C)
Índice de refracción:	1,533
Precauciones:	R-22: Nocivo por ingestión R-34: Provoca quemaduras S-26: En caso de contacto con los ojos, lávese abundantemente con agua y acuda a un médico S-36/37/39: Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara S-45: En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico

Constante de acidez (pK_a):

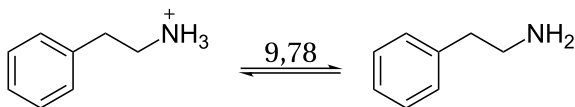


Tabla 2.13: Propiedades de la fenetilamina.¹⁹⁰

y su amina primaria. Es un molécula muy básica que forma sales estables con diversos ácidos. Con el ácido clorhídrico forma una sal que tiene un punto de fusión de 217 °C y con el dióxido de carbono del aire reacciona formando carbonato de fenetilamonio.

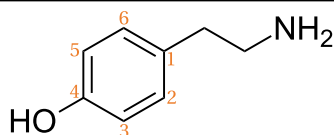
La fenetilamina es sintetizada en el cuerpo humano en la ruta de las catecolaminas a partir de la descarboxilación de la fenilalanina (esquema 2.20). Las catecolaminas son un grupo de sustancias con actividad neuronal que en principio contienen una amina y el grupo catecol (*o*-dihidroxifenilo), aunque dentro del grupo se incluyen sustancias afines de estructura similar (figura 2.10). La mayor parte de estos compuestos se produce en las glándulas suprarrenales, si tienen una función hormonal, o en las neuronas catecolaminérgicas, si se emplean como neurotransmisores. Disfunciones en el metabolismo de las catecolaminas son causa de enfermedades mentales como la esquizofrenia o trastornos bipolares o enfermedades neurológicas como el Párkinson o la migraña. Muchos medicamentos y sustancias estupefacientes tienen estructuras parecidas para actuar en el sistema nervioso.

Los productos de nitrosación de la fenetilamina no han demostrado ser ni mutágenos ni genotóxicos en dos ensayos biológicos *in vitro* realizados con el test de Ames (sección 3.2.1) y el Cromotest SOS, respectivamente.¹⁹¹

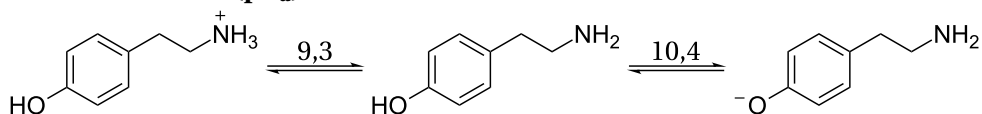
2.5.3. Tiramina

La tiramina (tabla 2.14) es una sustancia monoamínica aromática con actividad biológica. Casi todos los seres vivos son capaces de sintetizarla a través de la descarboxilación del aminoácido tirosina (esquema 2.20) y por eso aparece de forma natural en multitud de alimentos, como legumbres, frutas, frutos secos, chocolate, carnes, mariscos y pescado. En cualquier caso, los alimentos con mayor concentración de tiramina son los que su preparación favorece la descomposición de la tiramina, como son los productos fermentados (yogures, quesos, salsas de soja o bebidas alcohólicas) o envejecidos (conservas, embutidos o productos ahumados)¹⁹².

Dados los alimentos en los que se distribuye, la tiramina es un compuesto que frecuentemente aparece acompañado de nitritos, por lo que el riesgo de que se

**Tiramina (TYR)**

Otros nombres:	4-(2-aminoetil)fenol 4-hidroxifenetilamina 2-(4-hidroxifenil)etilamina
Abreviatura:	TY (en neurociencias)
Número CAS:	51-67-2
Apariencia:	Polvo beige
Punto de fusión:	160 °C
Peso molecular:	137,18 g/mol
Solubilidad:	Soluble en agua Soluble en alcohol
Precauciones:	R-36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias S-26: En caso de contacto con los ojos, lávese abundantemente con agua y acuda a un médico S-36: Úsese indumentaria protectora adecuada)

Constantes de acidez (pK_a):**Tabla 2.14:** Propiedades de la tiramina. ¹⁹³

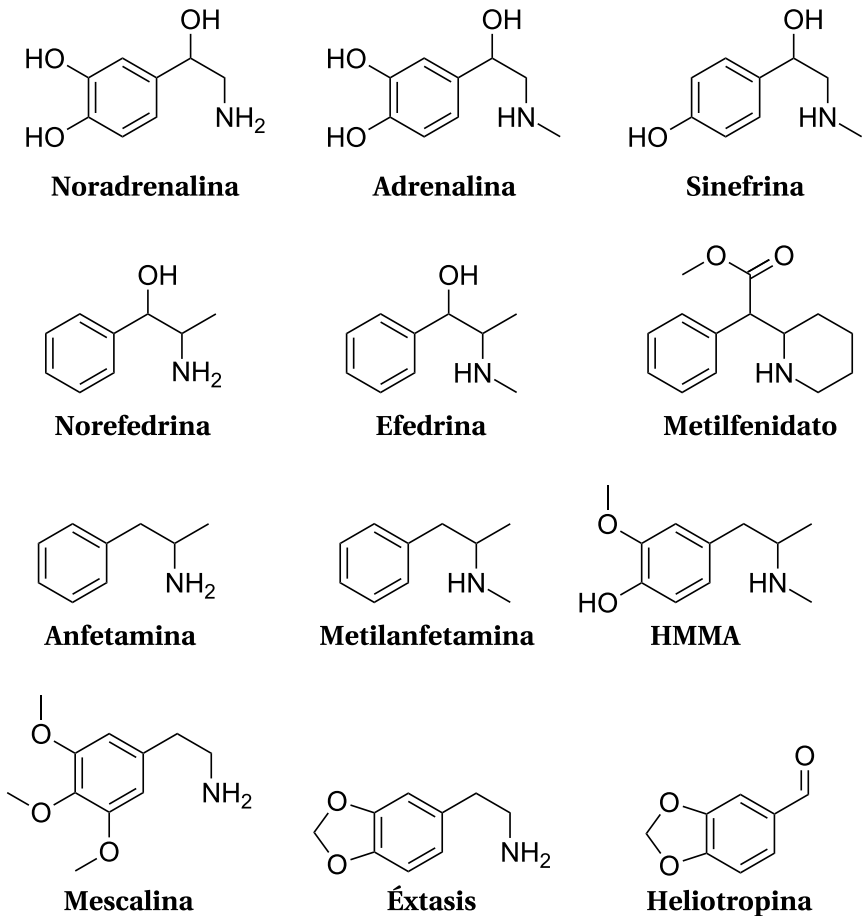


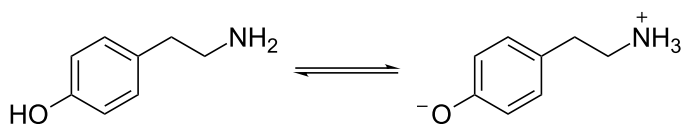
Figura 2.10: Otras catecolaminas de interés biológico.

transforme en nitrosocompuestos potencialmente peligrosos es alto. Existen varios estudios sobre la mutagenia de alimentos ricos en tiramina tratados con nitrito sódico^{191,194,195} y de la propia tiramina nitrosada.^{191,196} Todos ellos coinciden en que la tiramina nitrosada es un importante agente mutágeno. Estudios realizados *in vivo* han demostrado que la tiramina nitrosada induce la formación de cáncer en la cavidad oral que es precisamente uno de los cánceres más

comunes en zonas donde el consumo de soja fermentada es más frecuente.¹⁹⁷

La tiramina es metabolizada por las enzimas monoamina oxidasa que la oxidan a ácido 4-hidroxifenilacético. A diferencia de la fenetilamina y la mayor parte de los aminoácidos, la tiramina no puede atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que no es tan peligrosa. Sin embargo se ha demostrado que la tiramina, en el cuerpo humano, provoca la liberación de otras monoaminas almacenadas, como la dopamina o la epinefrina, lo que provoca hipertensión arterial y dolores de cabeza. Las personas que toman medicamentos antidepresivos deben evitar el consumo de alimentos ricos en tiramina, ya que inhiben las enzimas MAO, haciendo que la concentración de tiramina en el organismo aumente. Bajo estos medicamentos, el consumo de tan sólo 6 mg de tiramina provoca hipertensión y 25 mg se puede considerar una dosis letal para algunas personas.¹⁹⁸

La tiramina es un compuesto básico cuya constante de acidez es cuatro veces mayor que la de la fenetilamina. Esta diferencia se debe a que la amina también puede protonarse en la forma neutra de la molécula al formar un equilibrio con el alcohol aromático para dar su forma zwitteriónica (esquema 2.21).¹⁹⁰ Dada su basicidad, la tiramina forma sales estables con múltiples compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos.¹⁹⁹



Esquema 2.21: Protonación de la amina a la forma zwitteriónica de la tiramina.

2.5.4. Dopamina

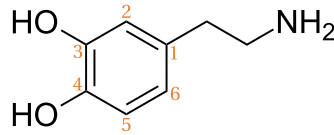
La dopamina (tabla 2.15) es un compuesto orgánico de la familia de las catecolaminas. Hasta los años 50 se pensaba que la única función que tenía la dopamina en el organismo era la de actuar como intermedio en la biosíntesis de otras catecolaminas como norepinefrina y epinefrina (figura 2.10). Esta concepción cambió con los trabajos de Kathleen Montagu, que encontró cantidades significativas de dopamina en el cerebro,²⁰⁰ y de Arvid Carlsson (premio Nóbel

de fisiología y medicina en el año 2000), quien demostró su actividad como neurotransmisor.²⁰¹

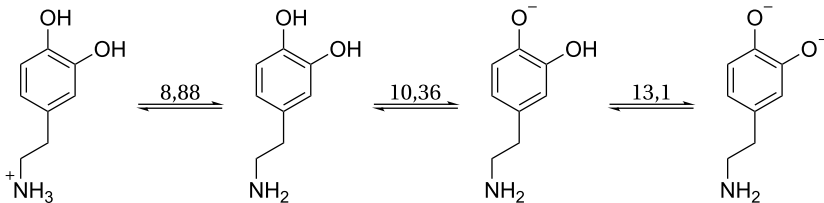
Principalmente, la dopamina es sintetizada por neuronas y células de las glándulas suprarrenales en la ruta de las catecolaminas (véase esquema 2.20).²⁰² La dopamina se sintetiza utilizando como base la tirosina acumulada en la célula, que se oxida a fenilalanina y posteriormente a 3,4-dihidroxifenilalanina (de cuyo acrónimo, DOPA, toma el nombre la dopamina). La descarboxilación de este compuesto genera la dopamina. La etapa limitante de la velocidad en este mecanismo es la generación de L-DOPA, que debido a que se descarboxila inmediatamente, su concentración en el cerebro es generalmente baja.

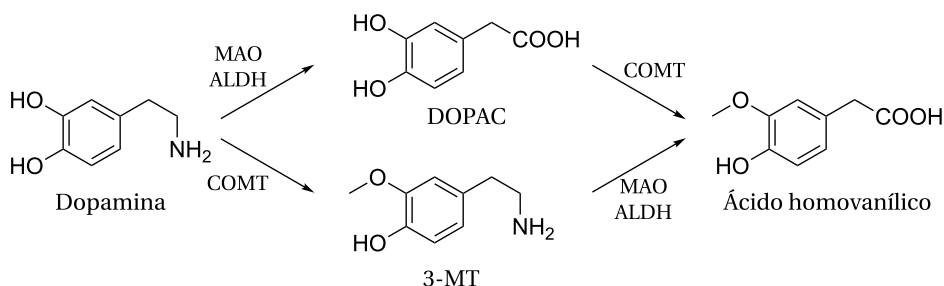
La dopamina tiene diversas funciones en el organismo. En el cerebro, existen un tipo de neuronas, denominadas dopaminérgicas, cuyo neurotransmisor principal es la dopamina. Se encuentran en la parte compacta de la sustancia negra, el área tegmental ventral y el hipotálamo y sus axones se proyectan a varias áreas del cerebro. Se cree que este sistema participa en actividades como el aprendizaje, el sueño, la memoria, la consciencia o la gratificación sexual.²⁰³ La muerte de las células dopaminérgicas en la sustancia negra y, por consiguiente, la biosíntesis insuficiente de dopamina son el origen de la enfermedad de Parkinson. Fuera del cerebro, la dopamina participa en la regulación del funcionamiento de los riñones, el sistema inmunitario y el aparato circulatorio. Como medicamento, la dopamina en forma de hidrocloreuro se emplea para aumentar la tensión sanguínea y restaurar los valores hemodinámicos por vía intravenosa tras un infarto de miocardio, una septicemia o cirugía a corazón abierto.

La degradación de la dopamina en el cuerpo humano se produce por dos vías (esquema 2.22). La primera es, como con los compuestos anteriores, con la ruta de las enzimas monoamina oxidasa, que transforman la dopamina en 3,4-dihidroxifenilacetaldehído. Casi inmediatamente, este compuesto es transformado en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH). La segunda es una ruta exclusiva de las catecolaminas en las que la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT), metila el alcohol en la posición 3 del anillo aromático para formar 3-metoxitiramina (3-MT). Los productos de ambas vías se transforman en un producto común, denominado

**Dopamina (DOP)**

Otros nombres:	3,4-dihidroxi fenetilamina 4-(2-aminoetil)-1,2-bencenodiol 2-(3,4-dihidroxi fenil)etilamina
Abreviatura:	DA (en neurociencias)
Número CAS:	51-61-6 62-31-7 (hidrocloruro)
Apariencia:	Prismas Polvo blanco (hidrocloruro)
Punto de fusión:	128 °C 248 °C (hidrocloruro)
Peso molecular:	153,18 g/mol 189,64 g/mol (hidrocloruro)
Solubilidad:	600 mg/ml de agua Soluble en agua (hidrocloruro) 20 mg/ml en alcohol (hidrocloruro, 25 °C)
Precauciones:	R-22: Nocivo por ingestión R-50/53: Muy tóxico para los organismos acuáticos S-61: Evítese su liberación al medio ambiente

Constantes de acidez (pK_a):**Tabla 2.15:** Propiedades de la dopamina.^{190,204}

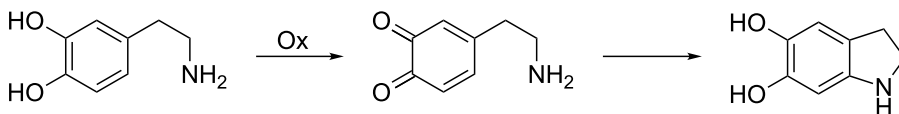


Esquema 2.22: Metabolización de la dopamina.

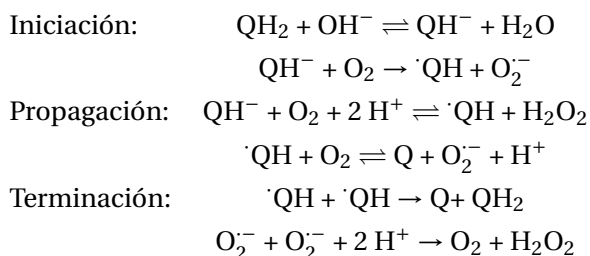
ácido homovanílico (HVA), que es el metabolito principal de descomposición de la dopamina en los seres humanos.

Desde el punto del vista químico, la dopamina es una base fuerte. De igual modo que en la tiramina, su constante de acidez es inusualmente alta (8 veces superior a la de la fenetilamina) debido al equilibrio que se crea entre la forma neutra de la molécula y su estructura zwitteriónica, en este caso estabilizada por un puente de hidrógeno con el segundo alcohol del anillo.¹⁹⁰ La dopamina forma sales con multitud de ácidos, siendo el hidrocloreuro de dopamina la forma más habitual de comercializar el compuesto. La dopamina pura se oxida con el oxígeno ambiental,²⁰⁵ en una reacción radicalaria.²⁰⁶ En disolución acuosa esta reacción se encuentra catalizada por el medio básico, con el anion superóxido como intermedio²⁰⁷ y que terminaba con la ciclación de la cadena lateral como muestra el esquema 2.23.²⁰⁸

El mecanismo de la oxidación radicalaria es el siguiente, donde la dopamina es la dihidroquinona (QH₂) y también aparece la semiquinona (·QH) y la quinona resultante (Q):²⁰⁶



Esquema 2.23: Oxidación de la dopamina a través de su quinona a leucoaminocromo.



La velocidad de autooxidación de la dopamina es importante en medios alcalinos, aunque a pHs intermedios (6-8) también se puede producir, especialmente si hay metales que catalicen la reacción radicalaria en el medio.²⁰⁹ La mayor parte de los productos de ciclación de las catecolaminas son fluorescentes. Sin embargo, no es el caso de la dopamina.

El leucoaminocromo obtenido por la oxidación de la dopamina continua oxidándose a dopaminacromo, que rápidamente polimeriza entre sí para formar un pigmento oscuro de estructura similar a la melanina.²¹⁰ Este pigmento se ha detectado en melanosomas y en células tumorales y tiene un gran poder citotóxico.

Existe un estudio en bacterias *in vitro* con el test de Ames (página 131) que ha llegado a la conclusión de que la dopamina, tras ser tratada con ácido nitroso, es mutágena, aunque no identifica cual es el producto de nitrosación que provoca la respuesta positiva en el experimento.²¹¹

2.5.5. Serotonina

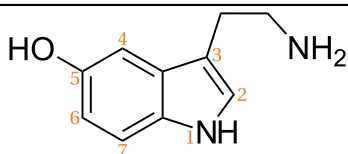
La serotonina (tabla 2.16) es un compuesto orgánico bicíclico conjugado que actúa como neurotransmisor en el cuerpo humano. Desde mediados del siglo XIX se sabía que había una sustancia en la sangre que provocaba la contracción de los músculos lisos, aunque no fue aislada hasta un siglo más tarde, en 1951, por investigadores de la Clínica Cleveland en Estados Unidos. Unos años antes, en 1938, el científico italiano Vittorio Erspamer, de la Universidad de Pavia, había aislado de las células enterocromafines del intestino una sustancia a la que denominó enteramina, que también provocaba la contracción de los músculos lisos. La purificación y la cristalización posterior de la serotonina y la enteramina

demonstraron que ambos compuestos en realidad eran la misma molécula, la 5-hidroxitriptamina. La primera compañía que sintetizó esta molécula fue la farmacéutica americana *Upjohn*, que la comercializó para investigación bajo el nombre de serotonina, por lo que la molécula se quedó con ese nombre en lugar del original italiano.²¹²

La serotonina tiene múltiples funciones en el cuerpo humano. Está relacionada con la alimentación, puesto que la liberación de serotonina aumenta el apetito. La presencia de comida en el lumen hace que las células enterocromafines del intestino, que contienen aproximadamente el 90 % de la serotonina total del cuerpo, liberen serotonina para provocar la contracción de los músculos del intestino entorno al quilo. Ante un compuesto irritante, como la capsicina, estas células aumentan la cantidad de serotonina para que los músculos se muevan más deprisa.

La serotonina también tiene un importante papel en el metabolismo de los huesos, controlando su masa, y en el sistema circulatorio, donde, ante un daño, actúa como vasoconstrictor y como factor de crecimiento para los fibrocitos. Por eso, las plaquetas son el principal almacén de la serotonina en la sangre. Como la serotonina es un indicador de sangrado, un gran aumento repentino en una zona localizada causa dolor. Como el veneno de muchos insectos (avispas y escorpiones) contiene gran cantidad de serotonina, su picadura es muy dolorosa. La mayor parte de la serotonina en el sistema nervioso central se encuentra concentrada en la glándula pineal, que aunque se encuentra junto al cerebro, está fuera de la barrera hematoencefálica, que la serotonina no puede cruzar. La serotonina en este órgano está relacionada con el metabolismo de la melatonina y la luz o la oscuridad para el control del cuerpo ante el sueño y el despertar.²⁰² En el cerebro, la mayor parte de la serotonina es secretada por las neuronas de los núcleos del rafé, cuyos axones terminan en el cerebelo y en la médula espinal. La serotonina en este caso está relacionada con los estados de ánimo, la memoria o la consciencia.

La serotonina se obtiene a partir del aminoácido esencial triptófano en la ruta representada en el esquema 2.24. La enzima triptófano hidroxilasa oxida el triptófano que casi inmediatamente se descarboxila bajo la acción de la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa. La serotonina se metaboliza de forma similar



Serotonina (SER)

Otros nombres:	3-(2-aminoetil)-5-hidroxiindol 5-hidroxitriptamina
Abreviatura:	5-HT (en neurociencias)
Número CAS:	50-67-9 153-98-0 (hidrocloruro)
Apariencia:	Polvo blanco Polvo ligeramente gris (hidrocloruro)
Punto de fusión:	121 °C 149 - 154 °C (hidrocloruro)
Punto de ebullición:	416 °C
Peso molecular:	176,215 g/mol 212,68 g/mol (hidrocloruro)
Solubilidad:	Algo soluble en agua Soluble en agua (hidrocloruro) Soluble en DMSO (hidrocloruro)
Precauciones:	R-20/21/22: Nocivo por inhalación, contacto con la piel e ingestión R-36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias S-22: No respirar el polvo S-36: Úsese indumentaria protectora adecuada

Constantes de acidez (pK_a):

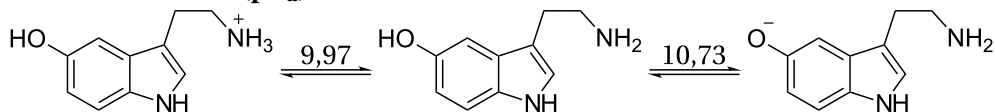
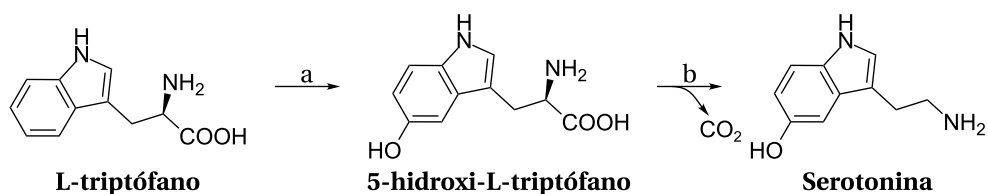


Tabla 2.16: Propiedades de la serotonina.²¹³



Esquema 2.24: Biosíntesis de serotonina a partir de triptófano. **a**, triptófano hidroxilasa, **b**, 5-hidroxitriptófano descarboxilasa.

a la de los neurotransmisores que hemos visto anteriormente. La monoamina oxidasa junto con la aldehído deshidrogenasa eliminan la amina de su cadena lateral dejando el carbono terminal oxidado en forma de ácido carboxílico. El compuesto formado, ácido 5-hidroxiindolacético, es excretado en la orina.

La serotonina es un compuesto básico por la amina que está en su cadena lateral, que pese a estar unida a la misma distancia del anillo aromático que la tiramina y la dopamina, no sufre el mismo efecto que estos compuestos y su constante de acidez es similar a la de la fenetilamina. La amina del indol que la compone no es básica, dado que tiene su par electrónico compartido en el sistema aromático y es necesario emplear ácidos fuertes muy concentrados para protonarla. Se estima que su pK_a es $-3,6$. El segundo pK_a de esta amina es muy alto, alrededor de 21, por lo que sólo es posible sustraer el protón con bases muy fuertes como hidruro sódico o butillitio en condiciones anhidras y protegiendo la amina de la cadena lateral y el alcohol. La sal creada reacciona con cualquier electrófilo aunque sea débil, que se une al nitrógeno del indol. Sin necesidad de transformarla en una sal, la serotonina sufre con facilidad sustituciones electrófilas, debido a que, como ya se ha visto en la sección 2.3.1 (página 76), los anillos conjugados estabilizan el complejo de Wheland.

Se ha realizado el test de Ames a una mezcla de serotonina, nitrito sódico y ácido acético. El resultado de este experimento indica que el producto de la nitrosación de la serotonina en estas condiciones es mutagénico.²¹⁴

2.5.6. Minoxidilo

El minoxidilo (tabla 2.17) es un compuesto formado por la unión de un óxido de diaminopirimidina y un anillo de piperidina. Fue desarrollado como antihipertensivo en los años 50, 60 y 70 por la *Upjohn Company*, la misma empresa que comercializó por primera vez la serotonina. Durante los ensayos clínicos previos a su aprobación como medicamento se administró varias dosis de minoxidilo a once pacientes con hipertensión, cuya presión arterial se redujo de forma efectiva en sólo seis días.²¹⁵ Dado el éxito del experimento, se le permitió a su director, el médico americano Charles Chidsey, realizar una nueva prueba aplicando durante más tiempo el compuesto a un grupo mayor de personas. Al pasar de las dos semanas de tratamiento, varios pacientes desarrollaron hipertrichosis, es decir, crecimiento en exceso de pelo por todo el cuerpo. Al ver esta propiedad del medicamento, se hizo una prueba aplicando el minoxidilo de forma tópica en el brazo a varios voluntarios, a los que les creció pelo en la zona tratada. El éxito de este experimento permitía evitar los efectos secundarios del consumo oral, por lo que tras muchas más pruebas para estudiar la dosis adecuada y la toxicidad, en 1979 se aprobó su uso como medicamento contra la alopecia.²¹⁶ Actualmente es uno de los medicamentos más populares del mundo con un mercado de más de 100 millones de dólares por año tan solo en los Estados Unidos.²¹⁷

La actividad hipertensiva del minoxidilo se debe a que uno de sus metabolitos, el sulfato de minoxidilo, relaja rápidamente el músculo liso vascular, lo que en la piel se traduce en un mayor riego sanguíneo en los folículos del pelo, lo que aumenta el tamaño del cabello y reduce la caída.^{218,219}

Además de su sulfuración, el minoxidilo es metabolizado por el organismo por oxidación del anillo piperidínico, aunque la principal vía de metabolización es en el hígado mediante su unión al ácido glucurónico con la enzima glucuronosil transferasa (figura 2.11). De cualquiera de estas formas el minoxidilo es expulsado por la orina.

El minoxidilo es una base débil gracias al óxido de amina de su estructura. Sus dos aminas son bases aún más débiles debido a que su par de electrones libre está cedido al anillo aromático. El óxido de amina puede reducirse en

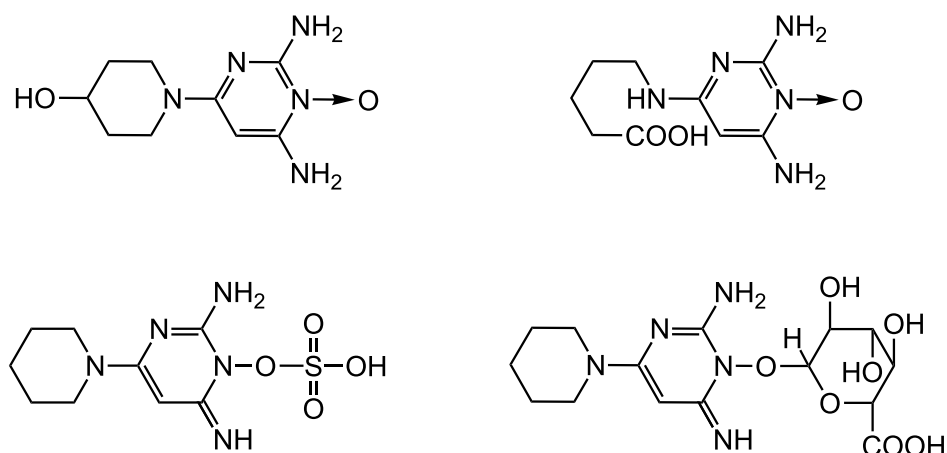
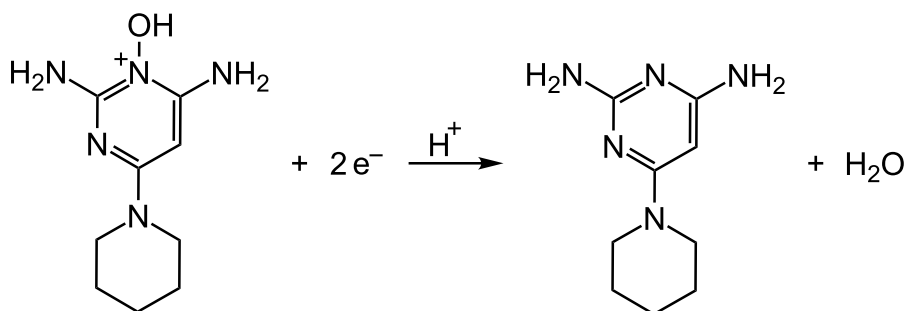


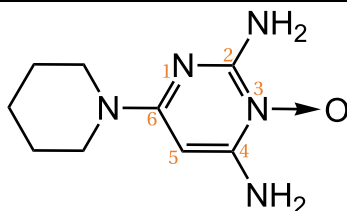
Figura 2.11: Productos del metabolismo del minoxidilo. En la primera fila, los productos de oxidación. En la segunda fila, sulfato de minoxidilo y ácido minoxidil-O-glucurónico.

medio ácido según la ecuación que muestra el esquema 2.25.

No existe en la bibliografía ningún valor de su potencial estándar de reducción debido a que depende mucho de las condiciones experimentales, especialmente del pH. Precisamente, aprovechando esta propiedad se ha determinado de forma experimental por polarografía el pK_a del óxido de amina.²²⁰



Esquema 2.25: Reacción de reducción del minoxidilo en medio ácido.



Minoxidilo (MIN)

Otros nombres:	3-óxido de 2,4-diamino-6-(piperin-1'-il)pirimidina 3-óxido de 2,4-diamino-6-piperidinopirimidina
Número CAS:	38304-91-5
Apariencia:	Polvo cristalino blanco
Punto de fusión:	128 °C 248 °C (hidrocloruro)
Peso molecular:	209,25 g/mol
Solubilidad:	0,27 g/100 ml agua (25 °C) 2,17 g/100 ml etanol (25 °C) 5,37 g/100 ml metanol (25 °C)
Precauciones:	R-22: Nocivo por ingestión R-36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias S-26: En caso de contacto con los ojos, lávese abundantemente con agua y acuda a un médico S-36: Úsese indumentaria protectora adecuada

Constantes de acidez (pK_a):

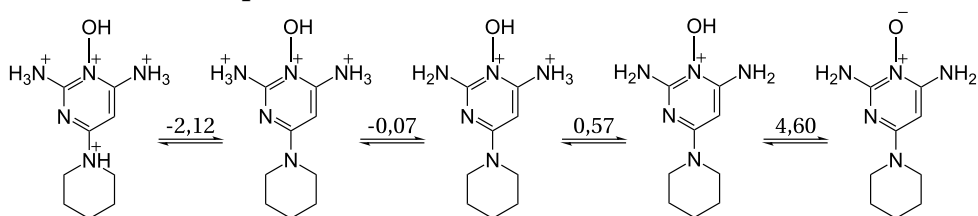


Tabla 2.17: Propiedades del minoxidilo.^{221,222}

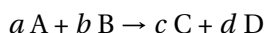
Parte experimental

3.1. Estudio químico

3.1.1. Introducción

La cinética es la parte de la química que estudia la velocidad de las reacciones químicas y los factores que en ella influyen, con objeto de determinar sus mecanismos de reacción.¹⁶⁸

La velocidad de una reacción se define como la variación en el tiempo de su grado de avance. Para la reacción:



el grado de avance, $\xi(t)$, es el cambio en el número n de moles de un reactivo en un determinado tiempo t dividido por su coeficiente estequiométrico:

$$\xi(t) = \frac{n_A^o - n_A}{a} = \frac{n_B^o - n_B}{b} = \frac{n_C}{c} = \frac{n_D}{d} \quad (3.1)$$

Así, la velocidad se define de forma general como:

$$v = \frac{d\xi(t)}{dt} = \pm \frac{1}{i} \frac{dn_I}{dt} \quad (3.2)$$

El signo es positivo si el compuesto I es un producto y negativo si se trata de un reactivo. En las reacciones en disolución el volumen de reacción generalmente es constante, por lo que su velocidad se puede expresar a través de la variación de concentración del reactivo:

$$v = \frac{1}{V} \frac{d\xi(t)}{dt} = \pm \frac{1}{i} \frac{d[I]}{dt} \quad (3.3)$$

Se denomina ecuación de velocidad de una reacción química a la relación explícita entre la velocidad de reacción y las concentraciones de las especies activas que participan en la reacción. Para la reacción anterior sería:

$$v = k[A]^\alpha [B]^\beta \quad (3.4)$$

donde k es un coeficiente de proporcionalidad denominado constante de velocidad y α y β son parámetros exponenciales que se denominan órdenes parciales de reacción y su suma, $t = \alpha + \beta$, se denomina orden total de la reacción. Los órdenes, en principio, no pueden ser calculados a priori y, como la constante de velocidad, deben ser obtenidos experimentalmente.

Existen varios métodos para determinar los parámetros cinéticos de una reacción. El método integral consiste en la integración directa de la ecuación de velocidad planteada y compararla con los datos experimentales concentración-tiempo.

El método diferencial mide directamente la velocidad de reacción cuando sólo hay un reactivo mediante la pendiente de la curva concentración-tiempo y lo compara con la concentración de reactivo.²²³ Así, tomando logaritmos la ecuación de velocidad queda linealizada:

$$\ln v = \ln k + \alpha \ln[A] \quad (3.5)$$

Cuando hay varios reactivos se puede hacer una aproximación poniendo todos los reactivos menos uno en franco exceso. De esta forma se puede considerar que la concentración de estos compuestos se mantiene constante a lo largo de la reacción, permitiendo calcular el orden parcial del que queda en defecto. Esta técnica se llama método de aislamiento de Ostwald.

Como la velocidad cambia según avanza la reacción, habitualmente se mide

la pendiente en el tramo inicial, donde ésta es máxima y así se reduce la incertidumbre de la medida. Para determinar con precisión los parámetros de la reacción se pueden medir varias reacciones, manteniendo todas las condiciones constantes excepto la concentración inicial de un reactivo, y así representar una recta de concentraciones iniciales frente a velocidades iniciales. Éste es el método de las velocidades iniciales.

Influencia de la temperatura

La temperatura es uno de los factores más influyentes en la velocidad de una reacción química. La ecuación de Arrhenius relaciona la constante de velocidad de una reacción con la temperatura T a la que transcurre:

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (3.6)$$

En esta ecuación aparecen dos constantes con significado cinético: el factor preexponencial, A , función de las características de los reactivos, y la energía de activación, E_a (figura 3.1).

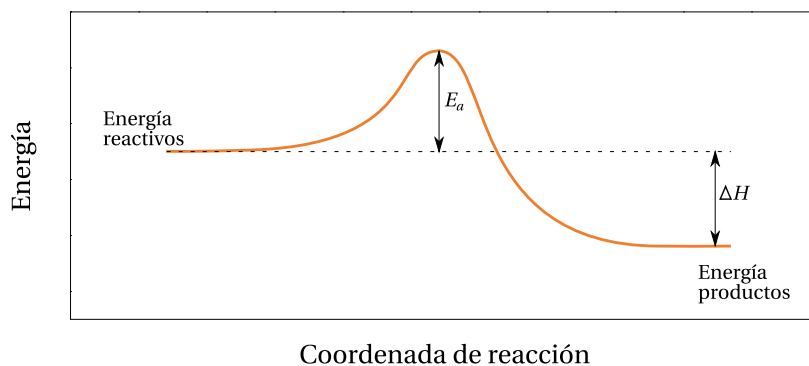


Figura 3.1: Perfil energético de una reacción química. La magnitud de la barrera de energía se denomina energía de activación, E_a y la diferencia entre las energías de los reactivos y los productos es la entalpía de la reacción, ΔH .

La teoría del estado de transición explica la velocidad de las reacciones químicas admitiendo que los reactivos, para dar lugar a los productos, tienen que pasar por una estructura intermedia inestable, denominada estado de transición o complejo activo. Como se admite que tanto los reactivos como los productos se encuentran en equilibrio con el estado de transición, a través de la energía de Gibbs para los estados de equilibrio:

$$\Delta G = -RT \ln K_e \quad (3.7)$$

se pueden calcular las propiedades termodinámicas del estado de transición:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (3.8)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann y h es la constante de Planck. Separando la energía de Gibbs en los dos términos de los que se compone ($\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta S^\ddagger T$) se obtiene la ecuación de Eyring-Wynne-Jones:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\Delta S^\ddagger / R} e^{-\Delta H^\ddagger / RT} \quad (3.9)$$

que relaciona la constante de velocidad de una reacción y su temperatura, con la entropía y la entalpía de activación.

Influencia de la fuerza iónica

La fuerza iónica es una medida de la concentración de electrolitos en una disolución y se define como:

$$I = \frac{1}{2} \sum m_i z_i^2 \quad (3.10)$$

donde m es la concentración molal y z es la carga del ion i .

De la teoría de Debye-Hückel se deduce la ecuación de Brønsted-Debye-Hückel, que relaciona la constante de velocidad de una reacción con la fuerza iónica del medio:

$$\log_{10} k = \log_{10} \frac{k_B T K^\ddagger}{h} + 1,018 z_A z_B \sqrt{I} \quad (3.11)$$

Mediante esta ecuación es posible conocer las cargas eléctricas que participan en una reacción química. Al representar varias cinéticas medidas en diferentes condiciones de fuerza iónica según la ecuación 3.11 se obtiene una recta cuya pendiente depende de los signos de carga eléctrica z_A y z_B . Si tienen el mismo signo, la pendiente será positiva, si es diferente, la pendiente será negativa y si alguno de los dos no tiene carga, la recta no tendrá pendiente.

Efecto isotópico cinético

Moléculas químicamente idénticas pero con diferentes isótopos en su composición reaccionan con diferentes velocidades. Por ejemplo, es la diferencia de las velocidades de electrolisis la que permite separar el D_2O del agua, a pesar de que la abundancia relativa D:H es 1:6.000. Este hecho se conoce como efecto isotópico cinético (KIE, *Kinetic Isotope Effect*). En una reacción química se produce efecto isotópico primario cuando se rompe un enlace con implicación de isótopos diferentes. Cuanto mayor sea la diferencia de masa de los isótopos, tanto más claro es el KIE. Por eso este efecto es muy útil en el estudio de mecanismos de ruptura de complejos de Wheland (véase sección 2.3.1).

Reacciones rápidas

Las reacciones rápidas son aquellas en las que el tiempo de mezcla de los reactivos o el tiempo de análisis son significativos respecto al tiempo de reacción y requieren técnicas experimentales especiales.

Algunos métodos están basados en reducir el tiempo de mezcla y otros provocan la reacción o modifican un sistema en equilibrio mediante una perturbación instantánea de la temperatura, la presión o por radiación electromagnética.

En esta tesis se ha empleado una técnica de flujo detenido. En las técnicas de flujo, los reactivos se colocan en recipientes aislados provistos de émbolos. Al accionar el sistema, los émbolos empujan las disoluciones hacia una cámara de mezclado, donde la reacción comienza, y las desplaza por un tubo en el que se mide la concentración a través del espacio (figura 3.2). Conociendo el caudal es posible determinar el tiempo de reacción.

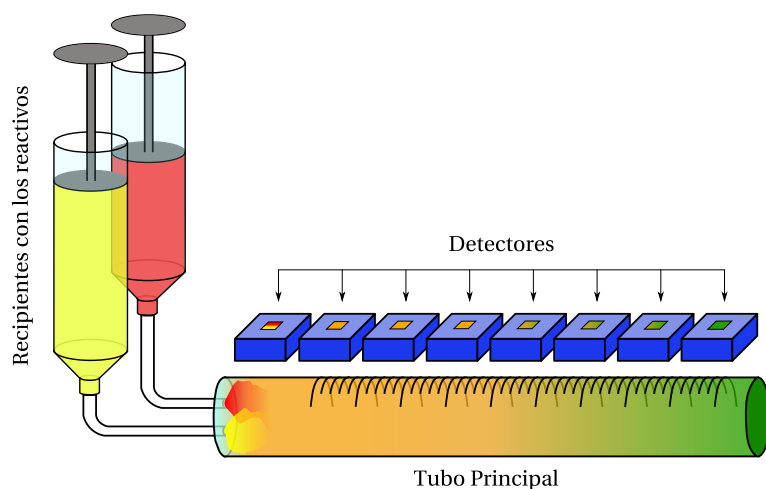


Figura 3.2: Medida de una reacción por un método de flujo.

Para evitar el consumo excesivo de reactivos se ha desarrollado el método de flujo detenido o *stopped-flow*, en el que aparece un tercer recipiente con émbolo que actúa de receptor de la disolución mezcla. Según se va llenando, el émbolo se desplaza hasta un punto en el que acciona un contacto eléctrico que detiene el avance de los dos émbolos con los reactivos y pone en marcha el detector del instrumento para el seguimiento de la reacción, que habitualmente consta de un espectrofotómetro como detector y un sistema de termostatación para el control de la temperatura. De esta forma se pueden seguir reacciones de hasta 10^{-3} segundos de vida media.

3.1.2. Procedimiento experimental

Consideraciones generales

Las técnicas experimentales para el seguimiento cinético de las reacciones estudiadas en esta tesis se han diseñado en función de factores como solubilidad, coeficiente de extinción molar de los reactivos, así como de otros factores como

la reducción de errores estadísticos, duración del experimento y minimización de desechos. Cada uno de los métodos empleados se detalla en el siguiente capítulo junto al estudio de la nitrosación de cada compuesto.

Todas las nitrosaciones se han efectuado empleando como reactivo de partida nitrito sódico en medio ácido. De esta forma el nitrito se transforma inmediatamente en diferentes especies (NO_2^- , HNO_2 , H_2NO_2^+ , N_2O_3 ...) según los equilibrios que se han mostrado en el informe bibliográfico (secciones 2.1, 2.2.1 y 2.2.2). Por ello se hablará generalmente de la suma de todas las especies reunidas bajo el término genérico *nitrito* y la abreviatura NIT:

$$[\text{NIT}] = [\text{NO}_2^-] + [\text{HNO}_2] + [\text{H}_2\text{NO}_2^+] + [\text{N}_2\text{O}_3] + \dots \quad (3.12)$$

En las condiciones de acidez en las que se ha trabajado, casi todo el nitrito se encuentra como NO_2^- y HNO_2 , por lo que la relación se simplifica:

$$[\text{NIT}] = [\text{NO}_2^-] + [\text{HNO}_2] \quad (3.13)$$

En todos los experimentos la fuerza iónica se ha controlado añadiendo al medio de reacción una disolución concentrada de perclorato sódico monohidratado. Se ha empleado esta sal debido a que, como se vio en la sección 2.2.3 (página 64), el perclorato es uno de los pocos aniones que no cataliza las reacciones de nitrosación.

Por la misma razón, en todos los estudios cinéticos se ha empleado ácido perclórico para aportar el medio ácido necesario. El pH en el que se ha trabajado siempre ha sido inferior a 5, porque por encima de este pH la concentración del ácido nitroso (página 44) es insignificante.

El medio en que se han preparado las disoluciones y en que se han seguido las reacciones ha sido siempre agua ultrapura tipo I (resistividad $>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

Las disoluciones se prepararon por pesada directa de los reactivos salvo los compuestos líquidos que se han medido con instrumentos volumétricos con la precisión adecuada.

En las reacciones de corta duración, la temperatura se ha controlado por medio del portacubetas termostataado del espectrofotómetro que funcionaba

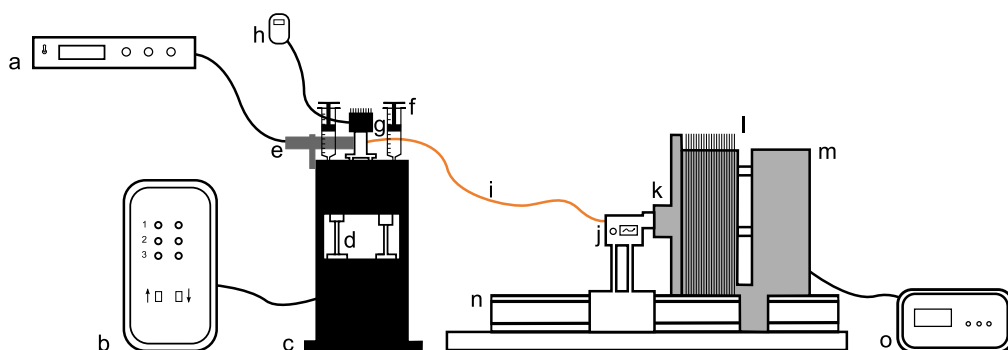


Figura 3.3: Esquema de un espectrofotómetro de flujo detenido. Donde: a, voltímetro del fotomultiplicador; b, controlador de los émbolos; c, soporte de los émbolos; d, émbolos; e, fotomultiplicador; f, jeringas; g, cámara de mezclado; h, termómetro; i, fibra óptica; j, monocromador; k, lámpara de arco; l, intercambiador de calor; m, ánodo de la lámpara; n, carro del monocromador y o, fuente de la lámpara.

mediante un sistema Peltier ($\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$). En las reacciones cuya duración es superior a 24 horas se han empleado termostatos de tanque de agua de 10 litros con unidad de refrigeración y bomba de presión para recirculación de agua termostatada. El termostato tiene un margen de error máximo de $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El pH de cada muestra se calculaba con antelación y luego se medía con un pH-metro con electrodo de Ag/AgCl y sensor de temperatura que tenía una precisión de $\pm 0,01$.

Por último, la concentración de reactivos se ha seguido por espectroscopía UV-visible con un espectrofotómetro de doble haz y cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Medida de las reacciones rápidas

Para el seguimiento de las reacciones rápidas se ha utilizado un espectrofotómetro de flujo detenido de tres émbolos como el que muestra el esquema de la figura 3.3. El equipo tiene una lámpara de arco cuya luz llega a la cámara de mezclado a través de un monocromador y una fibra óptica.

Para detectar la disminución de luminiscencia emplea un fotomultiplicador cuyas lecturas de voltaje son convertidas mediante un ordenador a medidas de absorbancia en unidades arbitrarias. Para convertir estas unidades arbitrarias en unidades de absorbancia se ha llevado a cabo un calibrado para la longitud de onda de seguimiento de la nitrososerotonina ($\lambda = 371$ nm, página 226) empleando seis disoluciones de nitrososerotonina de absorbancia conocida y se han medido con el equipo de flujo detenido durante dos minutos. Relacionando la media de esta medida con la absorbancia del compuesto se obtiene la curva de calibrado del equipo (figura 3.4).

A	A / U. A.	A	A / U. A.
0,444	0,4446	1,115	1,1310
0,624	0,6249	1,269	1,2965
0,940	0,9354	1,450	1,4039

$$y = 0,296 - 0,196x + 1,469x^2 - 0,554x^3 \tag{3.14}$$

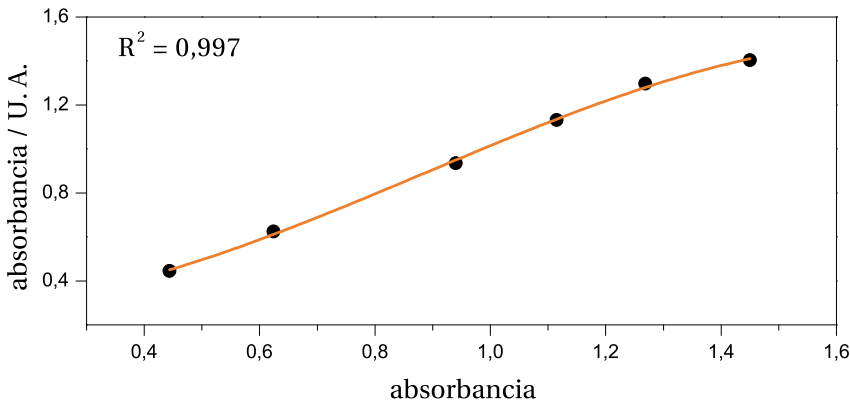


Tabla 3.1 y Figura 3.4: Curva de calibrado del espectrofotómetro de flujo detenido. $T = 25$ °C.

Todas las medidas efectuadas con este equipo se han transformado a unida-

des de absorbancia empleando la ecuación 3.14.

Estudio de la evolución de los espectros con el pH

Para medir los cambios que se producen en el espectro de absorción de un compuesto en función del pH del medio se prepara una disolución ácida ($\text{pH} = 1$) del compuesto de mucho volumen (superior a 500 ml), para hacer que la adición de pequeñas disoluciones alcalinas puedan despreciarse en el volumen total y así no varíe la concentración de sustrato. Se toma una alícuota y se mide el espectro de absorción para el medio más ácido.

A continuación se va modificando el pH añadiendo pequeñas cantidades de disoluciones de hidróxido sódico (1 M, 0,1 M y 0,01 M) mientras se agita la mezcla con un agitador magnético y se mide continuamente la acidez con una instalación como la que muestra el esquema de la figura 3.5. Cuando se alcanza el pH adecuado se toma una alícuota y se recoge su espectro de absorción. Todas las alícuotas se devuelven de nuevo al vaso para mantener la concentración de reactivo.

En el caso de que en algún paso se alcance un pH demasiado básico se puede volver hacia atrás añadiendo una disolución de ácido clorhídrico.

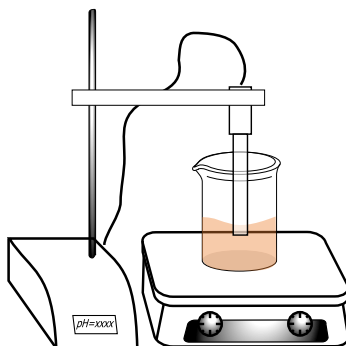
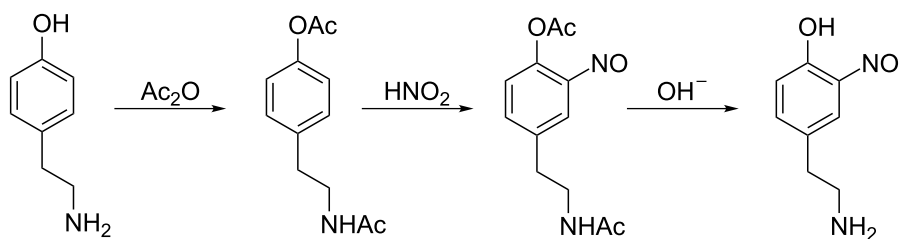


Figura 3.5: Esquema del montaje para medir la influencia del pH en los espectros.

Síntesis de los nitrosocompuestos

Esquema 3.1: Ruta de la síntesis de nitrosotiramina nitrosominoxidilo.

Síntesis de nitrosotiramina La síntesis de nitrosotiramina se ha realizado en tres pasos para evitar la diazotación del grupo amino (esquema 3.1). En primer lugar se protege ese grupo por medio de una acetilación. Para ello, se han disueltos 2 g de tiramina en 3 ml de piridina y 3 ml de anhídrido acético (2,2 equivalentes). También se ha añadido una pequeña cantidad de 4-(dimetilamino)piridina que actúa de catalizador. Esta mezcla se ha mantenido un día reaccionando en un balón cerrado, puesto que es una reacción sensible a la humedad. Después de este tiempo se ha aislado la tiramina protegida de la siguiente manera: Primero se ha transferido el medio de reacción a un embudo de decantación, se ha añadido acetato de etilo y se ha lavado tres veces con una disolución de ácido clorhídrico 1 M. De esta forma, la piridina y el acetato producido en la reacción se eliminan al retirar la fase acuosa. La fase orgánica se ha lavado con una disolución de hidrogenocarbonato sódico al 5% para neutralizar la acidez y retirar las sales que pudiesen quedar. Por último, la fase orgánica se ha lavado con una disolución saturada de cloruro sódico para retirar el agua que quedaba en ella y se ha traspasado a un erlenmeyer donde, con sulfato sódico anhidro, se ha secado completamente. Se ha filtrado la disolución para eliminar la sal y se ha evaporado el acetato de etilo en el rotavapor para obtener la tiramina protegida.

El siguiente paso fue la nitrosación de la tiramina protegida. En un balón de vidrio, se disolvió el producto en 20 ml de agua y se añadió 1 ml de ácido clorhídrico 37%. A continuación se ha incorporado, disuelta en menos de 10 ml

de agua, una cantidad equimolar de nitrito sódico. La adición se ha realizado gota a gota para evitar la descomposición del nitrito con el ácido del medio. Se ha dejado reaccionar durante dos días y se ha extraído el nitrosocompuesto producido en un embudo de decantación con acetato de etilo. La fase orgánica con el compuesto nitrosado se ha secado con sulfato sódico anhidro y se ha filtrado, para aislar el producto evaporando el disolvente en el rotavapor.

Por último se han eliminado los grupos acetato unidos al alcohol y a la amina de la nitrosotiramina. El nitrosocompuesto se ha disuelto en 10 ml de etanol y se ha añadido 1 g de NaOH disuelto en 4 ml de agua. Se ha calentado a reflujo durante 10 minutos en un baño de agua y, tras enfriar la mezcla, se ha añadido una disolución de HCl 1 M hasta pH ácido y se han transferido a un embudo de decantación, donde se ha añadido acetato de etilo para eliminar el acetato liberado. El disolvente de la fase acuosa con el compuesto nitrosado se ha evaporado y el precipitado obtenido se ha disuelto en etanol, donde el cloruro sódico formado no es soluble. Se ha separado la disolución alcohólica preparada por filtración y se ha evaporado el disolvente para obtener la nitrosotiramina deseada. Ésta se ha purificado por cristalización en etanol.

Síntesis de nitrosodopamina La nitrosodopamina se ha sintetizado siguiendo los mismos pasos que en la síntesis de la nitrosotiramina, salvo que, en el primer paso, al tener un alcohol adicional en su estructura, es necesario emplear 3,2 equivalentes de anhídrido acético (3,2 ml).

Síntesis de nitrososerotonina La síntesis de nitrososerotonina se ha realizado de la misma forma que la nitrosotiramina. Ha sido necesario tener cuidado con el proceso de separación de la serotonina protegida debido a que su estructura se parecía a la de la piridina.

Síntesis de nitrosominoxidilo El nitrosominoxidilo se ha sintetizado por reacción directa entre minoxidilo y ácido nitroso. Se han disuelto en un balón pequeño 4,9 g de minoxidilo (23 mmol) en 17 ml de tetrahidrofurano y 3 ml de ácido tetrafluorobórico (HBF_4 , 48 %) y se ha puesto a enfriar en un baño de hielo con agua y sal. A continuación se ha añadido lentamente una disolución acuosa

de 1,6 g (24 mmol en 7 ml) de nitrito sódico. Tras 24 horas de reacción se ha evaporado el tetrahidrofurano y el agua con la ayuda de un rotavapor. La masa restante se ha disuelto en acetonitrilo donde al poco tiempo precipitan unos cristales verdosos, que se han filtrado al vacío y se han lavado con acetonitrilo y éter.

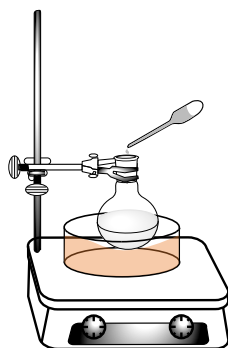


Figura 3.6: Esquema del montaje para sintetizar nitrosominoxidilo.

Difracción de Rayos X

Para recoger todos los datos sobre la estructura con un difractómetro se colocó un cristal de compuesto sobre una fibra de vidrio. Se trabajó a 0 °C utilizando radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0,154178$ nm) y la técnica de escaneo ω . A continuación se corrigieron los efectos de polarización y de Lorenz. Tanto la resolución de la estructura como el refinado y la salida de datos se llevaron a cabo con SHELXTL. Las estructuras se resolvieron por métodos directos combinados con síntesis de Fourier diferencial y refinados por procedimientos de mínimos cuadrados de matriz completa, con parámetros térmicos anisotrópicos en los últimos ciclos de refinado para todo los átomos que fuesen hidrógeno, que fueron colocados en posiciones calculadas.

3.1.3. Metodología y detalles computacionales

Los cálculos de las geometrías y energías de los compuestos del presente trabajo se han realizado con una estación de trabajo *Mountain* equipada con un procesador *Intel Core i7-980X* de 3,33 GHz y una memoria RAM de 24,0 GB.

Todas las moléculas se han computado siguiendo el mismo procedimiento: En primer lugar se preparaba con el programa de software libre *Avogadro* la matriz *Z* con las coordenadas de todos los átomos de la molécula. A continuación y con la misma aplicación, se realizaba una optimización previa de la geometría de la molécula para acortar los tiempos de cómputo y evitar la obtención de resultados erróneos.

Empleando como punto de partida la matriz *Z* perfeccionada se calculaba con el programa *Gaussian W03* la configuración molecular de menor energía, correspondiente a la estructura óptima.²²⁴ Los cálculos se realizaban empleando el modelo B3LYP de la teoría del funcional de la densidad y la base 6-31+G (d,p). Esta combinación de modelo y base se escogió por su exactitud y su potencia.^{225,226}

Por último, antes de registrar la energía de la estructura molecular calculada se comprobaba que la optimización se había realizado de forma correcta, calculando las frecuencias de vibración de la molécula y verificando que ninguna fuese imaginaria.²²⁷

Los cálculos se han realizado para moléculas en estado gaseoso, dado que las conclusiones a las que se llegan con moléculas solvatadas en las sustituciones electrófilas aromáticas son comparables.^{228,229}

Los resultados obtenidos no se han corregido posteriormente puesto que el factor de escalado empírico de la combinación B3LYP 6-31+G (d,p) es esencialmente la unidad.²³⁰

3.2. Estudio biológico

3.2.1. Mutagenia: Test de Ames

El test de Ames es uno de los ensayos biológicos más utilizados para el estudio de la mutagenia de un compuesto químico. Es una prueba sencilla, barata y rápida que tiene un gran valor predictivo en la identificación de compuestos cancerígenos en roedores²³¹. Fue desarrollado en los años 60 y 70 por el profesor de la Universidad de Berkeley Bruce Ames,²³² basándose en un test diseñado por el polaco Waclaw Szybalski que emplea bacterias de *Escherichia coli*.²³³ Ames había investigado los mecanismos biológicos por los que la *Salmonella typhimurium* sintetizaba histidina, por lo que desarrolló un método como el de Szybalski con estas bacterias.²³⁴ Con el tiempo tanto Ames^{235,236} como otros autores²³⁷ han perfeccionado la técnica probando su efectividad con múltiples compuestos carcinógenos.^{238,239}

La base del test de Ames es un cultivo de *Salmonella* modificado genéticamente para que no pueda sintetizar el aminoácido histidina a partir de nitrógeno inorgánico. Estas bacterias, mientras se encuentran en un medio de cultivo con dicho compuesto, se desarrollan con normalidad. En el caso de que la histidina del medio se agote, las bacterias de *Salmonella* fallecen al depender del aporte externo (bacterias His auxotróficas). Puede ocurrir que, espontáneamente o por el efecto de un agente mutágeno, alguna bacteria del cultivo revierta el error que la impedía sintetizar histidina a través de una mutación y cree una nueva colonia de bacterias que sobrevive incluso cuando se acaba el aminoácido (bacterias His prototróficas).

El test de Ames consiste en preparar un cultivo de estas bacterias en una placa con una cantidad muy limitada de histidina y una concentración determinada del compuesto sujeto del estudio. Si éste es mutágeno, provocará mutaciones en el código genético de las bacterias de forma aleatoria, haciendo que algunas de ellas reviertan el error que les impedía sintetizar histidina y comencen una nueva colonia. El número de colonias que se forman en un determinado periodo de tiempo está relacionado con la efectividad como mutágeno del compuesto estudiado y de su concentración en la placa.

Cepa	Mutación His	Plásmidos	Otras mutaciones
TA90	<i>hisD6610</i>		$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA92	<i>hisG46</i>	pKM101	
TA94	<i>hisD3052</i>	pKM101	
TA97	<i>hisD6610</i>	pKM101	$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA102	<i>hisG428</i>	pKM101 pAQ1	<i>rfa</i>
TA110	<i>hisD6610</i>	pKM101	
TA1534	<i>hisD3052</i>		$\Delta uvrB$
TA1535	<i>hisG46</i>		$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA1538	<i>hisD3052</i>		$\Delta uvrB$, <i>rfa</i>
TA1950	<i>hisG46</i>		$\Delta uvrB$

Tabla 3.2: Genotipos de las cepas bacterianas empleadas en el test de Ames.

Existen diversas cepas de *Salmonella* para el test de Ames (tabla 3.2).²³⁶ Cada cepa contiene un tipo diferente de mutación en el operón de la histidina que la hace sensible a un tipo específico de mutágenos. Además, a cada cepa se le ha añadido otras mutaciones en otros puntos del código genético para aumentar su habilidad para detectar mutágenos. Las dos mutaciones secundarias más comunes son dos: La primera se denomina *rfa* y causa la pérdida parcial de la barrera de lipopolisacáridos que envuelve la superficie de la bacteria, aumentando la permeabilidad de su pared a moléculas de gran tamaño que de otro modo no podrían haber cruzado a través de la pared normal. La segunda mutación se denomina $\Delta uvrB$ (Δ de delección) y consiste en la delección del gen que codifica una proteína del sistema de reparación por escisión del ADN, lo que obviamente hace que las mutaciones no se reparen correctamente, aumentando significativamente la sensibilidad del test. Por motivos técnicos, la supresión

del gen *uvrB* se extiende al gen *bio* y en consecuencia, las bacterias afectadas también dependen de un aporte externo de biotina para crecer. Además, casi todas las cepas contienen plásmidos añadidos, es decir, moléculas de ADN extracromosómico que modifican el comportamiento de la bacteria. El plásmido más común es el pKM101, que aumenta la mutagénesis química y espontánea al fomentar el sistema de reparación del ADN de síntesis por translesión, que ante un error en la cadena, para evitar la ruptura del cromosoma, continua copiando el ADN, pese al error. Este plásmido también hace que la bacteria se haga resistente al antibiótico ampicilina, lo que es muy útil en el trabajo experimental. Otro plásmido es el pAQ1, que tiene otro gen para sintetizar histidina con una mutación, la *hisG428*. Su adición aumenta las posibilidades de que la bacteria pueda volver a sintetizar histidina.

En función del tipo de mutación las cepas son más sensibles a algunos tipos de mutágenos que a otros. La mutación *hisG46* se encuentra en el gen que codifica la primera enzima de la biosíntesis de histidina. Sustituye en el código genético la secuencia –CCC– (que corresponde a prolina) por –CTC– (leucina). De esta forma las cepas que contienen esta mutación son sensibles a los mutágenos que causan sustituciones de pares de bases, como los agentes alquilantes. La mutación *hisD3052* se produce en el gen *hisD* que codifica la enzima histinol deshidrogenasa. Es una mutación por inserción de una base extra en un punto repetitivo del código de la enzima (–CGCGCGCG–). Por eso los mutágenos que provocan desplazamiento del marco de lectura hacen que el gen regrese otra vez al código original, revirtiendo la mutación.

Muy similar es la mutación *hisD6610* que añade una citosina adicional a una cadena de seis citosinas –CCCCCC– y que también detecta mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. Estas mutaciones son provocadas por compuestos que forman aductos con el ADN y mutágenos intercalantes.

La mutación *hisG428* inserta el codón de parada –ATT– en mitad del gen, provocando que la bacteria no termine de sintetizar sus enzimas. De esta forma se pueden detectar agentes mutágenos oxidativos e intercalantes, a los que las otras mutaciones son insensibles.

Un inconveniente de que el test de Ames esté basado en una bacteria es que al ser un organismo procarionta apenas tiene mecanismos para metabolizar

compuestos químicos. Como ya se vio que ocurría con las nitrosaminas (página 94), muchas sustancias inocuas se tornan peligrosos mutágenos al ser metabolizados por el organismo. Para poder imitar este proceso, al test de Ames se le puede añadir un preparado de tejido hepático de rata u otro mamífero que contiene todas las enzimas necesarias para la bioactivación de los mutágenos potenciales. El extracto más habitual es el denominado S9, que consiste en un homogenado obtenido por centrifugación de tejido hepático mürido y contiene todas las enzimas del citosol y los microsomas de sus células, como el citocromo P450 y diversas transferasas. Para aumentar la concentración de enzimas, las ratas son tratadas con bifenilos policlorados días antes de su sacrificio.

Durante el experimento algunas bacterias mutan espontáneamente y recuperan la capacidad de sintetizar histidina, formando un número de colonias característico de cada cepa (reversión). Se considera que el test de Ames ha dado un resultado positivo cuando el número de colonias que se ha formado durante el experimento es reproducible, depende linealmente de la dosis de mutágeno y la respuesta es, al menos, el doble de intensa que la de la reversión espontánea. Para que un compuesto se considere mutágeno es necesario que al menos con una cepa el test sea positivo. Sin embargo, para afirmar que un compuesto no es mutágeno, el test de Ames tiene que ser negativo al menos en cuatro cepas diferentes. Cuando la dosis del compuesto que se está probando es demasiado alta, puede ser tóxica para las bacterias de la placa, por lo que la relación dosis-número de colonias deja de ser lineal y, si se sigue aumentando la dosis, puede provocar la muerte de todas las bacterias del medio, obteniéndose la curva dosis-colonias que muestra la figura 3.7.

Procedimiento experimental

Para realizar el test de Ames por incorporación en placa en primer lugar se han tenido que preparar los medios del experimento: Se han inoculado las bacterias de las cepas TA98 y TA100. En un tubo estéril para cada cepa, se han añadido 5 ml de un preparado denominado NB (nutrient broth) que es un medio de cultivo con tampones, iones inorgánicos, extractos de levadura y péptidos, 5 μ l de una disolución del antibiótico ampicilina de

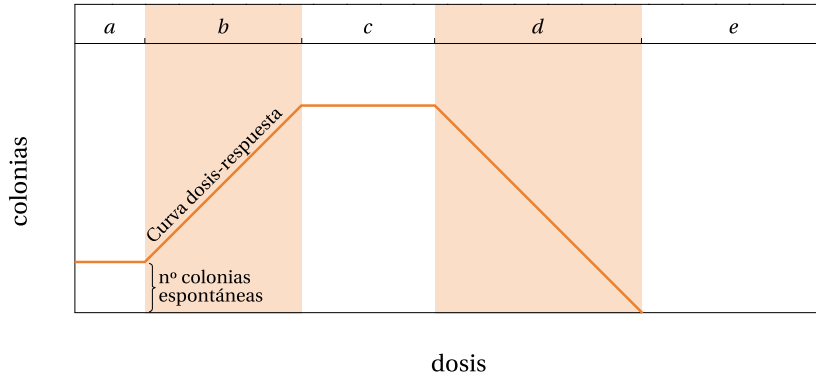


Figura 3.7: Curva dosis-colonias. En *a* no existe respuesta. En *b* se alcanzan dosis mutagénicas. A partir de *c* la dosis es tóxica para las bacterias y en *d* la toxicidad es superior a la mutagénesis. En *e* la dosis es mortal para todas las bacterias.

concentración 50 mg/ml (50% agua, 50% etanol) y 20 μ l de las reservas de las bacterias que estaban congeladas en glicerol a -70 °C. Se ha mezclado en un vórtex y se ha incubado a 37 °C bajo agitación durante 16 horas tras los cuales las bacterias están en estado estacionario.

Se preparan las placas VB que son placas petri de poliestireno de 90 mm de diámetro con 30 ml de agar VB (Vogel-Bonner). El agar VB se preparó mezclando 465 ml de agua desionizada con 7,5 g de agar nutritivo, se autoclavó para esterilizar y se añadió 25 ml de glucosa al 40% y 10 ml de medio VB. Esta mezcla se añadió a las placas mientras estaba caliente. El medio VB es una mezcla esterilizada de 5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 50 g de ácido cítrico monohidratado, 87,5 g de fosfato de disodio y amonio y 250 g de hidrógeno fosfato potásico en 500 ml de agua. Tras esto se espera que solidifique y se almacena en frío.

También se prepararon los tubos con agar de superficie histidina-biotina (Top-agar His/Bio), que se prepararon poniendo 1,5 g de agar nutritivo, 1,25 g de cloruro sódico en 225 ml de agua desionizada y se autoclava. A continuación se añaden 25 ml de una disolución estéril de histidina y biotina de concentración

$5 \cdot 10^{-4}$ M para cada nutriente. De la mezcla, y antes de que solidificara, se ponen 2 ml en cada tubo, que se cierra y se almacena en frío.

También se prepara la mezcla del extracto S9 al 10%, que se tiene que realizar en el mismo día. Consiste en una mezcla de 3,35 ml de agua, 5 ml de tampón de Ames (mezcla de hidrogenofosfato sódico y dihidrogenofosfato sódico 0,2 M, el pH es 7,4), 50 μ l de glucosa-6-fosfato 1 M, 400 μ l de NADP⁺ 0,1 M (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), 200 μ l de una disolución de sales MgCl₂ 0,4 M y KCl 1,65 M y 1 ml del extracto S9. El extracto S9 es comercial, el resto es esterilizado en autoclave excepto la glucosa-6-fosfato y el NADP⁺ que para esterilizarlos basta con filtrarlos a través de un filtro de 220 pm de tamaño de poro.

El procedimiento consiste en fundir el agar de los tubos de agar de superficie al baño María a 100 °C y posteriormente almacenarlos en un baño seco a 45 °C. Cuando el agar ha alcanzado esa temperatura se toma un tubo y se vierte en él 10 μ l del compuesto a probar, 100 μ l del preparado con las bacterias cultivadas durante toda la noche (previa agitación en vórtex) y si es el caso, 500 μ l de la mezcla S9. El tubo inmediatamente se homogeniza y se vierte sobre una placa VB. Cuando solidifica el agar de superficie, se tapa la placa, se invierte y se incuba durante 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se cuenta el número de colonias. Si el número es grande se puede utilizar un software para contabilizar las colonias a través de una foto (Labworks Software, versión 4.6, de la compañía UVP, Upland, California, EE.UU.). En este caso, la foto se toma por triplicado en tres posiciones de la placa diferentes.

El test de Ames se realizó tomando varias dosis de compuesto disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO). También se hizo un control negativo sin compuesto y un control positivo con un mutágeno probado (10 μ g de 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NPD) para la cepa TA98, 0,3 μ g de *N*-óxido de 4-nitroquinolina (4NQO) para la cepa TA100 y 0,2 μ g y 2 μ g de 2-aminoantraceno (2AA) para las cepas TA98 y TA100, respectivamente, en presencia del sistema de activación S9). También se incluye un control de esterilidad del extracto S9 en ausencia de bacterias. Todos los experimentos son realizados por duplicado y, tras comprobar que los duplicados concordaban se realizó la media y la desviación estándar del conteo.

3.2.2. Mutagenia: Test de aberraciones cromosómicas

El objetivo del test de aberraciones cromosómicas es la detección de agentes mutágenos que pueden causar anomalías en los cromosomas en cultivos de células de mamíferos. Pese a que es un test muy laborioso, tiene la ventaja de que es un método que permite conocer el efecto preciso de un mutágeno en el cromosoma y es efectivo para predecir el riesgo de cáncer del compuesto estudiado.^{240,241}

La anomalía en el cromosoma es inducida por un mutágeno que produzca la rotura de la cadena de ADN. Esta ruptura puede ser reparada por dos mecanismos de la célula: la unión de extremos no homólogos por la ADN ligasa IV, que busca en los extremos de cada porción secuencias parecidas y, cuando las encuentra, realiza la unión en ese lugar y la reparación recombinante que busca en otra molécula de ADN una secuencia idéntica o casi idéntica a la porción que se ha roto y la utiliza como plantilla para crear una cadena que luego duplica. Estos mecanismos de reparación pueden devolver el cromosoma a su estado original, unir dos extremos de forma incorrecta o no unirlos en absoluto. La célula que ha sufrido estos daños puede continuar viviendo, lo que, en ocasiones, puede tener consecuencias perjudiciales para el organismo.

El test de aberraciones cromosómicas consiste en exponer las células a un agente mutágeno durante un tiempo determinado para, a continuación, detener la reproducción de la célula en la metafase y observar en el microscopio el estado de los cromosomas. Estos pueden estar bien o presentar dos clases de aberraciones, las aberraciones simétricas, que afectan al cromosoma entero y que se deben a rupturas antes de la replicación de la célula, y las aberraciones asimétricas, que sólo afectan a una cromátida del cromosoma y que se producen durante o después de la replicación. Generalmente, las radiaciones ionizantes producen aberraciones simétricas, mientras que los mutágenos químicos producen aberraciones asimétricas.

La figura 3.8 representa los tipos de aberraciones estructurales que se pueden encontrar para un cromosoma. Estas pueden ser huecos, en las que una pequeña ruptura no afecta a la forma del cromosoma (d, e); rupturas, en las que una parte del cromosoma o la cromátida se separa del resto, aunque se man-

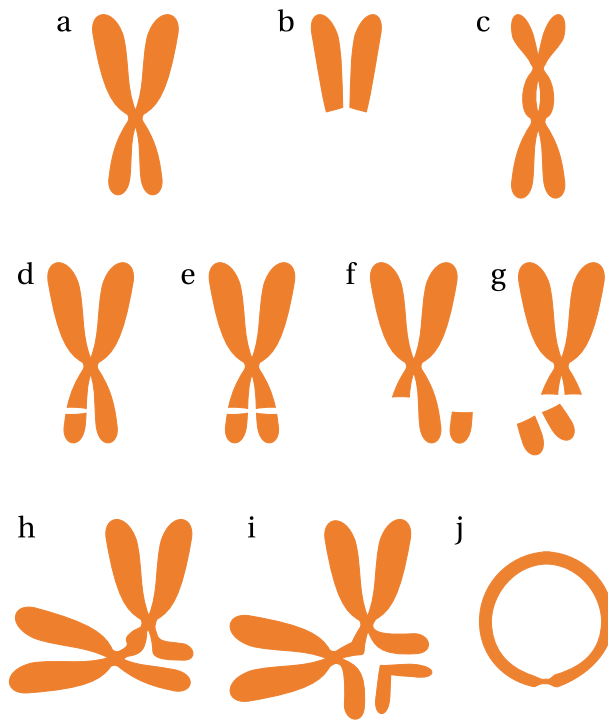


Figura 3.8: Aberraciones cromosómicas posibles. **a.** Cromosoma intacto, **b.** Fragmento acéntrico, **c.** Cromosoma dicéntrico, **d.** Hueco en la cromátida, **e.** Hueco en el cromosoma, **f.** Ruptura en la cromátida, **g.** Ruptura en el cromosoma, **h.** Cromosoma trirradial, **i.** Cromosoma tetrarradial, **j.** Cromosoma anular.

tiene unida por las proteínas que estabilizan el cromosoma (f, g); cromosomas acéntricos, cuando se ha perdido una parte del cromosoma con el centrómero (b); y los frutos de uniones de cromosomas rotos como son los cromosomas dicéntricos, cuando el sistema de reparación une dos cromosomas rotos con sus centrómeros por los extremos rotos (c); los cromosomas trirradiales, unión de dos cromosomas con ruptura en la cromátida (h); cromosomas tetrarradiales, unión de dos cromosomas con huecos en una de sus cromátidas (i) o el cromosoma anular, cuando se unen los dos extremos rotos de un mismo cromosoma (j).

Para cada compuesto y concentración se prepara una lámina con un número determinado de células.^{242,243} Los criterios para considerar un test como positivo son que el número de células con aberraciones cromosómicas aumente con la concentración de mutágeno y que este aumento sea reproducible.

Procedimiento experimental

Aunque para este test se puede utilizar cualquier célula de mamífero, hemos utilizado células V-79 debido a su excelente capacidad para fijarse y su corto periodo de reproducción (12 - 14 horas). La línea de células V-79 fue desarrollada por Denys Ford y George Yerganian en 1958 a partir de tejido pulmonar de hámster chino joven y macho (*Cricetulus griseus*).²⁴⁴ Se designó originalmente como cepa V, pero Mortimer Elkind la renombró como cepa V-79 en 1959.²⁴⁵

Se ha tomado un tubo eppendorf con 3 ml de reservas de células V-79 que estaba congelado a -70 °C en un medio con DMSO como crioprotector y tras descongelarlo en un baño a 37 °C se ha añadido a un tubo con 8 ml de medio V-79. El medio V-79 es una mezcla de 8 ml de suero fetal bovino y 72 ml de medio de Ham con mezcla de nutrientes f-10 con un 1 % de antibiótico estreptomycin. El medio de Ham f-10 es una mezcla de 10 sales inorgánicas, 19 aminoácidos, 10 vitaminas, buffers, rojo de fenol y otros compuestos esenciales para las células como glucosa y nucleósidos. Para eliminar la mayor parte de DMSO se ha centrifugado el tubo durante 5 minutos a 1.500 revoluciones por minuto, de tal forma que las células precipitan al fondo del tubo. A continuación se elimina todo el sobrenadante excepto una pequeña cantidad en la que se ponen las células en suspensión con la pipeta. Estas células se añaden a un frasco de cultivo de 75 cm² de superficie con 10 ml de medio V-79 y se añade filtrado aire enriquecido en CO₂ (Composición: CO₂ 5%, O₂ 21 %, N₂ 74 %) para formar un *buffer* con la disolución y evitar que se vuelva alcalina.

Cuando las células se fijan al frasco tras 24 horas en incubación a 37 °C se sustituye el medio de cultivo retirando el antiguo y añadiendo 10 ml de medio de Ham f-10 calentado a 37 °C y añadiendo de nuevo gas enriquecido en CO₂. Estas células continúan reproduciéndose hasta que llenan toda la superficie del frasco, lo que se denomina confluencia del cultivo. Para que pueda continuar la

reproducción es necesario proporcionar más espacio a las células. Mediante un proceso denominado tripsinización, las células se despegan de la superficie del frasco, y, si se desea aumentar el número de células, se trasladan a un frasco más grande o a un mayor número de frascos. Si, por el contrario, se desea mantener línea reproduciéndose en una superficie igual a la usada hasta entonces, se descartan parte de las células.

La tripsinización se realiza con ayuda de una enzima peptidasa denominada tripsina, que rompe mediante hidrólisis las proteínas con las que las células se unen al frasco. La tripsina es inhibida por el suero fetal bovino, por lo que antes de añadirla se retira el medio V-79 y se añaden 4 ml de verseno. El verseno es una disolución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de concentración 200 mg/L que, debido a sus propiedades quelantes, se utiliza para favorecer el proceso en el que las células se ponen en suspensión. Antes de comenzar es necesario alcalinizar el verseno con unas gotas de disolución concentrada de hidrogenocarbonato sódico para que funcione correctamente. Se puede utilizar el verseno para lavar el frasco y eliminar los últimos restos de medio V-79. A continuación se añade 1 ml de disolución de tripsina a 5 ml de verseno todo ello a 37 °C y se añaden al frasco. Se controla en el microscopio el momento en el que todas las células pierden su adherencia al frasco y entonces se añaden 10 ml de medio V-79 para evitar que la tripsina continúe atacando las células. Con la pipeta, se ponen las células en suspensión y se transfieren 10 ml de disolución a un tubo que se centrifuga durante 5 minutos a 1.500 revoluciones por minuto. Se elimina el sobrenadante y se deja aproximadamente 1 ml de disolución, donde se ponen en suspensión las células que han quedado en el fondo del tubo. Después se añade una gota de la suspensión en un nuevo frasco con 10 ml de medio V-79 y se regula su pH llenando el frasco con aire enriquecido en CO₂.

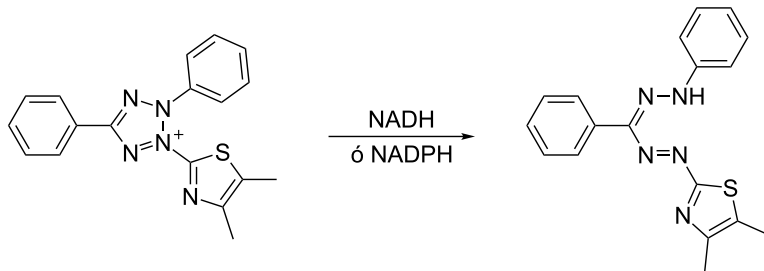
Para preparar el test de aberraciones cromosómicas se prepara un cultivo de células V-79 en un frasco grande de 175 cm² de superficie. Cuando el frasco está lleno de células se tripsiniza su contenido y las células en suspensión se dividen en 16 frascos de 25 cm² con 5 ml de medio. Se incuba durante 24 horas y, a continuación, se añade a cada frasco 50 µl del compuesto a probar. También se prepara un control negativo sin compuesto y un control positivo con 7,5 µl de MMC (mitomicina C) de concentración 1 mg/ml. Se incuban los frascos durante

otras 18 horas y se añade 10 μl de colchicina de concentración 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que detiene la división celular en la metafase. Tres horas más tarde, se tripsiniza el contenido de cada frasco y se transfiere a un tubo, que se centrifuga a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos. Se elimina el líquido sobrenadante y se añaden 8 ml de una disolución acuosa de KCl 0,56% para que, con la presión osmótica, las células se hinchen, aunque sin llegar a romperse y se calientan en un baño a 37 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifuga de nuevo, se retira el sobrenadante y se añaden 5 ml de una mezcla de 1 parte de ácido acético glacial y 3 partes de etanol 98% que estaba a -20 °C para favorecer la fijación de las células. Inmediatamente se centrifuga y, aprovechando que las células quedan fijadas en el fondo del tubo, se retira el líquido. Después, se vuelven a añadir a cada tubo 0,5 ml de la mezcla ácido acético/etanol, donde se ponen en suspensión las células agitando con un vórtex y, mediante una pipeta, se distribuye la solución con las células sobre una lámina de vidrio para microscopía. Al día siguiente, cuando se ha secado el disolvente, se tiñen las células con violeta de metilo y se cubren con láminas cubreobjetos. Por último, con la ayuda de un microscopio, se estudian 50 células que se encuentran en la metafase y se contabiliza el número de aberraciones cromosómicas que presentan según el tipo de aberración. Cada concentración de compuesto se estudia por triplicado mediante la preparación de tres láminas de vidrio diferentes.

3.2.3. Citotoxicidad: Test del MTT

El test del MTT es un ensayo colorimétrico cuantitativo para el estudio de la proliferación y supervivencia de células eucariotas. Está basado en su capacidad para detectar la proporción de células que están vivas en el medio. Fue desarrollado por el científico británico Tim Mosmann en 1983 para evitar los complicados métodos que existían hasta la fecha, que requerían de isótopos radiactivos y de complicados procesos experimentales.²⁴⁶

El fundamento del ensayo es que sólo las células metabólicamente activas son capaces de reducir a formazano el grupo tretrazolio del compuesto químico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La reducción provoca que la molécula cambie de color de amarillo a violeta (esquema 3.2),



Esquema 3.2: Reducción metabólica de MTT.

por lo que la cantidad de producto, proporcional al número de células vivas, se puede cuantificar fácilmente con un espectrofotómetro. La mayor parte de la reducción es llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasa de la superficie de las mitocondrias de la célula, aunque también pueden participar otras enzimas reductoras del citosol u otros orgánulos.²⁴⁷

Este ensayo se puede emplear para conocer la citotoxicidad de un determinado compuesto químico, aplicando diferentes concentraciones a un número determinado de células y midiendo la cantidad de ellas que sobreviven a cada concentración. Es un método muy utilizado en la investigación de medicamentos contra el cáncer, ya que permite cuantificar la efectividad del medicamento sobre las células cancerosas y también estudiar la toxicidad sobre las células normales. También es posible medir con este test la actividad biológica de un conjunto de células, puesto que reducirán más MTT cuanto más activas se encuentren.

Con el tiempo han aparecido mejoras del método y compuestos alternativos al MTT, más solubles en agua o con un coeficiente de extinción molar mayor.²⁴⁸

Procedimiento experimental

En este experimento también se han utilizado células V-79 por las mismas ventajas que presentaban para el test de aberraciones cromosómicas.

En cada pocillo de una placa de 96 pruebas se colocan 200 μ l de medio V-79

y $2 \cdot 10^4$ células V-79, excepto una columna de 8 pocillos que se deja sin células para actuar de control positivo. Las células, procedentes de la tripsinización de un cultivo previo, se contabilizan mediante una cámara de Neubauer, que indica el número de células por volumen de suspensión. A continuación, se incuba la placa durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Después de este tiempo se añaden las diferentes concentraciones de compuestos a estudiar de tal forma que haya al menos cuatro pocillos por compuesto y concentración. También se deja una columna con 8 pocillos sin añadir ningún compuesto como control negativo. Se añade el gas enriquecido en CO_2 y se vuelve a incubar durante 24 horas, tras las cuales se comprueba que no ha habido contaminación y se vacían los pozos para rellenarlos de nuevo con $200\ \mu\text{l}$ de medio V-79 y $0,010\ \text{g}$ de MTT por pozo. Se incuba la placa durante tres horas a 37°C y se retira la mezcla con MTT, quedando un poso cristalino de color violeta que es el MTT que las células han reducido.

Para medir la cantidad de MTT reducido, se lava cada pozo con $100\ \mu\text{l}$ de PBS (solución tampón fosfato $0,1\ \text{M}$) y se añaden $200\ \mu\text{l}$ de DMSO que actúa como disolvente del colorante. Se homogeneiza la disolución y con un espectrofotómetro se mide la absorbancia de cada pozo a $595\ \text{nm}$.

3.3. Equipos y reactivos utilizados

3.3.1. Estudio químico

Equipos empleados	
Purificador de agua	Wasserlab Ultramatic
Medidor de pH	Hanna Instruments pH-211
Espectrofotómetro UV-visible	Shimadzu UV-2401-PC
Portacubetas	Shimadzu CSP-240-A
Cubetas de cuarzo	Hellma 110QS
Termostato	Lauda Ecoline Re 120
Stopped-flow	Biologic SFM 300
Espectrómetro de masas	Waters ZQ4000
Espectrómetro de RMN	Bruker Avance 400 MHz
Espectrómetro GCMS	Shimadzu QP5000
Báscula	Precisa XT120A
Difractómetro RX	Seifert XRD 3003 SC
Reactivos para cinéticas	
Nitrito sódico, ultrapuro	Panreac
Perclorato sódico, para análisis	Merck
Ácido perclórico 60%	Panreac
Óxido de deuterio 99%	Aldrich
Ácido clorhídrico 37%	Panreac
Hidrogenoftalato potásico	Merck
Cloruro sódico	Panreac
Éter etílico	Panreac

Tabla 3.3: Origen de los equipos y reactivos químicos empleados (Parte I).

Sustratos de investigación	
Etilbenceno	Fluka
Fenetilamina	Fluka
Tiramina	SAFC
Hidrocloruro de dopamina	Sigma
Hidrocloruro de serotonina	Alfa Aesar
Minoxidilo	Fragon Ibérica
Reactivos para síntesis	
Ácido tetrafluorobórico 48 %	Sigma-Aldrich
Metanol	Panreac
Etanol	Panreac
Tetrahidrofurano	Panreac
Piridina	Alfa Aesar
4-(dimetilamino)piridina	Alfa Aesar
Anhídrido acético	Alfa Aesar
Acetato de etilo	Panreac
Acetonitrilo	Panreac
Hidrogenocarbonato sódico	Panreac
Sales para el método analítico	
Cloruro de aluminio hexahidratado	Panreac
Cloruro de níquel hexahidratado	Panreac
Cloruro de calcio	Merck
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	Panreac
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	Panreac
Sulfato de hierro (III) hexahidratado	Merck
Sulfato de zinc heptahidratado	Panreac
Sulfato de cromo (III)	Merck

Tabla 3.4: Origen de los reactivos químicos empleados (Parte II).

3.3.2. Estudio biológico

Equipos empleados	
Espectrofotómetro	Biochrom Anthos Zenyth 3100
Báscula	Sartorius TE64
Cámara de Neubauer	Optic Labor 0,100 mm
Microscopio	Leitz Dialux 70
Centrifugadora	Tehtnica Centric 322A
Células y bacterias	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Suministradas por el Prof. B. N. Ames Universidad de Berkeley, EE.UU.
Células V79	Suministradas por el Prof. H. R. Glatt Instituto alemán de nutrición humana
Reactivos	
Agar nutritivo	BD Bacto-Agar
Aroclor 1254 induced S9	Molecular Toxicology, Inc.
Nutrient broth (NB)	Oxoid
4NQO	Sigma
2-aminoantraceno	Sigma
NPD	Sigma
NADP ⁺	Sigma
Glucosa-6-fosfato	Sigma
Medio de Ham f-10	Sigma
Colchicina	Sigma
MTT 97,5 %	Sigma
Suero fetal bovino	Sigma
Gas 5 % CO ₂	Air liquide

Tabla 3.5: Origen del material empleado en el estudio biológico.

Resultados experimentales

4.1. Nitrosación del etilbenceno

4.1.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico

Aunque la solubilidad del etilbenceno en agua es baja (página 99), la concentración máxima que se puede alcanzar a 20 °C, $1,4 \cdot 10^{-3}$ M, es suficiente para realizar el estudio cinético de su reacción de nitrosación.

En la práctica, empleando ultrasonidos para disolver el etilbenceno, se han conseguido mezclar 0,016 ml del compuesto en 100 ml de agua a 20 °C, lo que equivale a una concentración de $1,3 \cdot 10^{-3}$ M. El etilbenceno es un compuesto volátil y menos denso que el agua, por lo que se tuvo precaución de que no se evaporase al tratar de disolverlo a temperaturas superiores.

Se ha obtenido el espectro de absorción UV-visible de la disolución anterior entre 190 y 700 nm (figura 4.1). El etilbenceno en disolución acuosa sólo muestra dos bandas de absorción en la zona ultravioleta del espectro. Una muy intensa entre 190 y 225 nm, que corresponde a una transición permitida $\pi \rightarrow \pi^*$, y otra débil entre 230 y 275 nm, característica de los compuestos bencénicos alquilmonosustituídos, que se debe a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida (figura 4.2).²⁴⁹

Ninguna de estas dos bandas resulta de interés para el seguimiento de la reacción

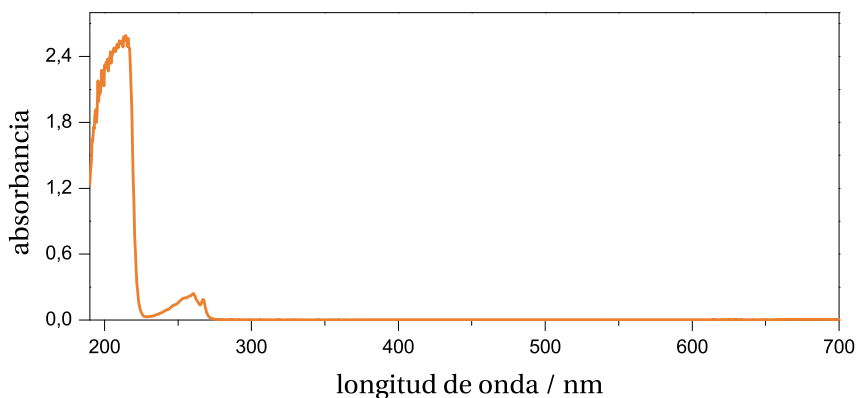


Figura 4.1: Espectro de absorción UV-visible del etilbenceno. $[\text{ETH}] = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

de nitrosación.

4.1.2. Reacción entre etilbenceno y nitrito

Debido a la escasa activación del anillo aromático del etilbenceno, se ha estudiado su posible reacción con el ácido nitroso en las condiciones experimentales más favorables para la nitrosación. Esto es: concentración en amplio exceso de nitrito (20 veces superior) y $\text{pH} = 3,0$.^{132,250}

Desde el punto de vista espectroscópico, incluso en las condiciones descritas, no se puede afirmar que haya reacción química entre el ácido nitroso y el etilbenceno. La figura 4.3 muestra la evolución temporal del espectro de absorción de una mezcla de ambos reactivos. No aparece ninguna nueva banda de absorción y tan sólo se observa la descomposición normal del ácido nitroso (banda 300-400 nm).

La ausencia de reacción para un tiempo significativo se ha confirmado mediante cromatografía de gases - espectrometría de masas. Una mezcla de reacción como la de la figura 4.3 se ha mantenido a temperatura constante de $T = 30,0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. A continuación se ha realizado una extracción

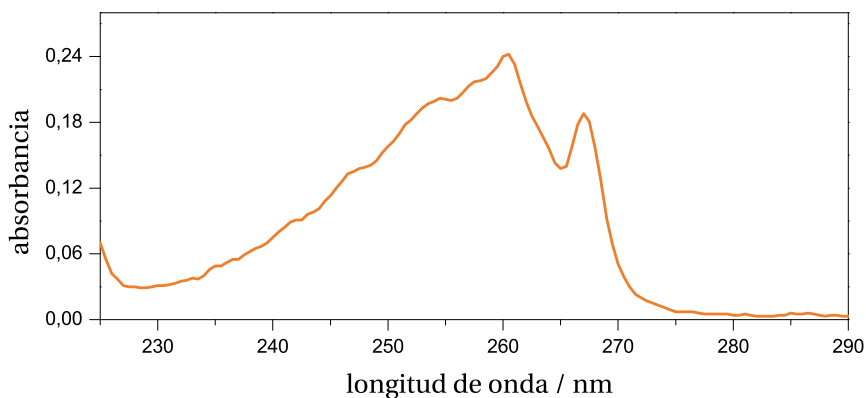


Figura 4.2: Banda de absorción ultravioleta del etilbenceno. $[\text{ETH}] = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

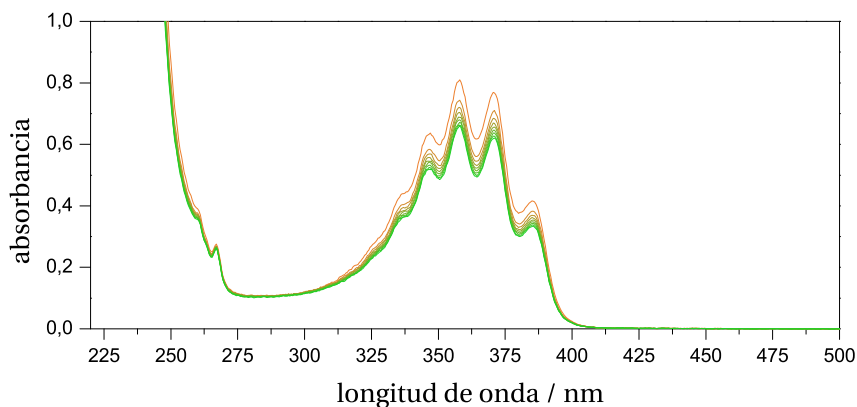


Figura 4.3: Variación del espectro de absorción de la mezcla etilbenceno - ácido nitroso con el tiempo. Espectros tomados cada 6 horas desde $t = 0$ (naranja) hasta $t = 54$ horas (verde). $[\text{ETH}]_0 = 1,04 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 2,09 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,07$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

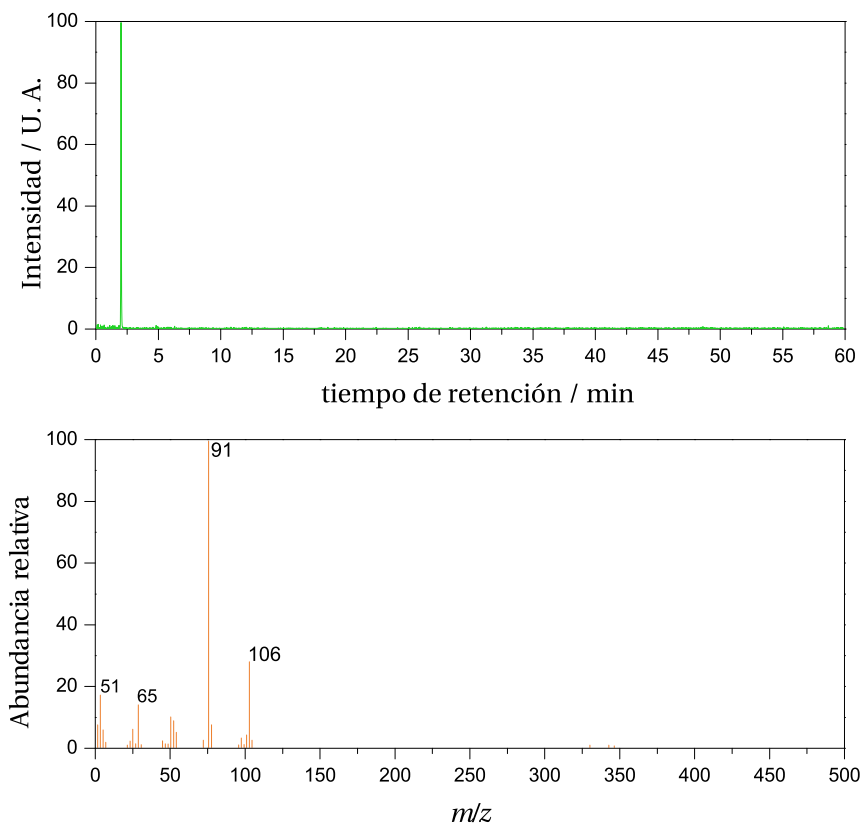


Figura 4.4: Cromatograma de gases y espectro de masas por impacto electrónico positivo del etilbenceno realizados bajo las condiciones de la tabla 4.1.

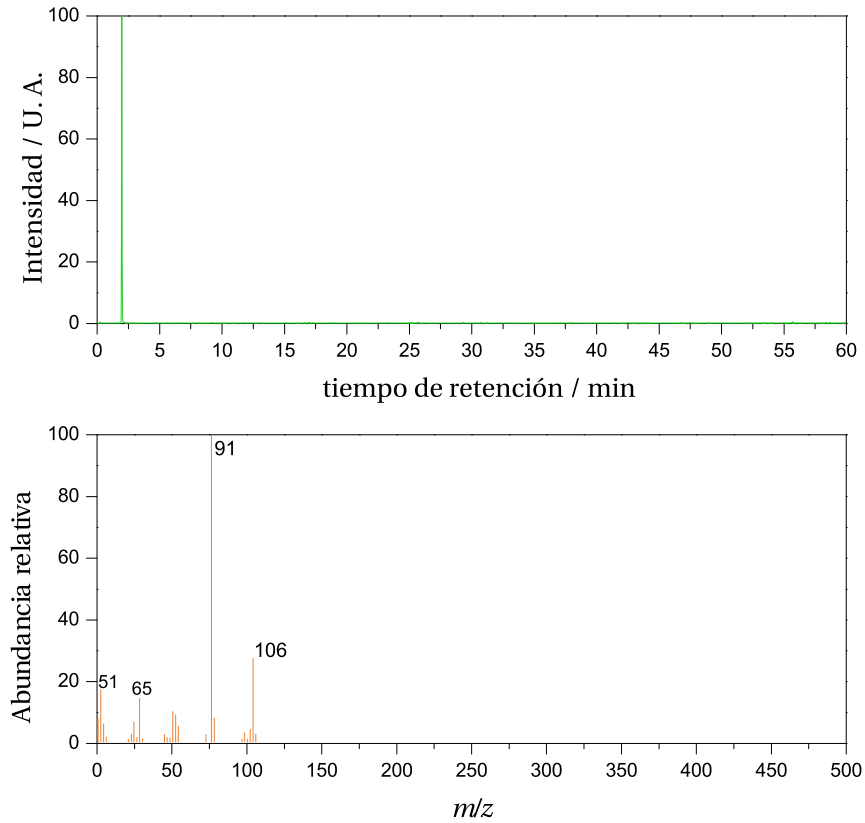


Figura 4.5: Cromatograma de gases y espectro de masas por impacto electrónico positivo de la mezcla de etilbenceno y ácido nítrico realizados bajo las condiciones de la tabla 4.1.

líquido-líquido de 20 ml de disolución mezcla con 10 ml de éter etílico. La fase orgánica se ha cromatografiado y ha aparecido un pico a un tiempo de retención de 2 minutos. El cromatograma y el espectro de masas de esta experiencia se muestra en la figura 4.5. Estas gráficas se han comparado con el resultado de analizar en las mismas condiciones una disolución de etilbenceno $1,04 \cdot 10^{-3}$ M (figura 4.4). Ambas presentan sólo un pico en el mismo tiempo de retención y espectros de masas idénticos, lo que confirma la ausencia de reacción entre el ácido nitroso y el etilbenceno en un periodo de 48 horas, a pesar de las condiciones de temperatura, acidez y exceso de nitrito favorables a la nitrosación.

Las características experimentales de los cromatogramas - espectros de masas de las figuras 4.4 y 4.5 se encuentran recogidas en la tabla 4.1.

Propiedad	Valor
<i>T</i> inyector	270 °C
<i>T</i> interfase	270 °C
<i>T</i> horno inicial	50 °C (durante 5 min.)
Gradiente temperatura	7 °C/min
<i>T</i> horno final	270 °C (durante 22 min.)
Gas portador	Helio
Caudal	1,2 ml/min
Relación Split	8/1
Espectrómetro de masas	Cuadrupolo
Rango de masas	50-400

Tabla 4.1: Condiciones experimentales de los cromatogramas - espectros de masas.

4.2. Nitrosación de la fenetilamina

4.2.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico

La solubilidad de la fenetilamina (PHE) en agua es relativamente buena (página 101). En medios ácidos y neutros la amina se encuentra protonada confiriendo a la fenetilamina carácter iónico. Sin embargo, a 20 °C y concentraciones superiores a 1 ml/100 g de agua ($8 \cdot 10^{-2}$ M), la fenetilamina tiende a formar micelas en el seno del medio. Estos agregados son fáciles de romper por tratamiento con ultrasonidos.

El espectro de absorción UV-visible de la fenetilamina se muestra en la siguiente figura:

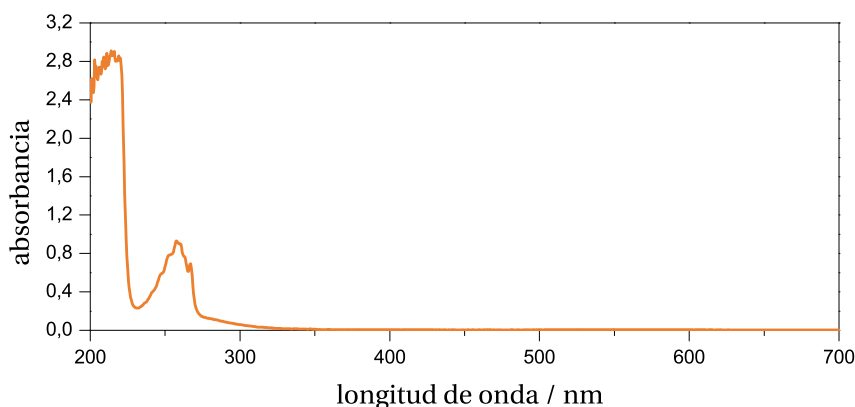


Figura 4.6: Espectro de absorción UV-visible de la fenetilamina. $[PHE] = 4 \cdot 10^{-3}$ M, pH = 10,6, $T = 20,0$ °C.

Las bandas de absorción de la fenetilamina son más intensas que las del etilbenceno. La primera se encuentra entre 190 y 235 nm y la segunda entre 235 y 275 nm. Se ha estudiado el coeficiente de absorción molar de esta última banda midiendo los espectros de absorción de la fenetilamina para diferentes concentraciones de la misma (figura 4.7). De acuerdo con la ley de Lambert-Beer,

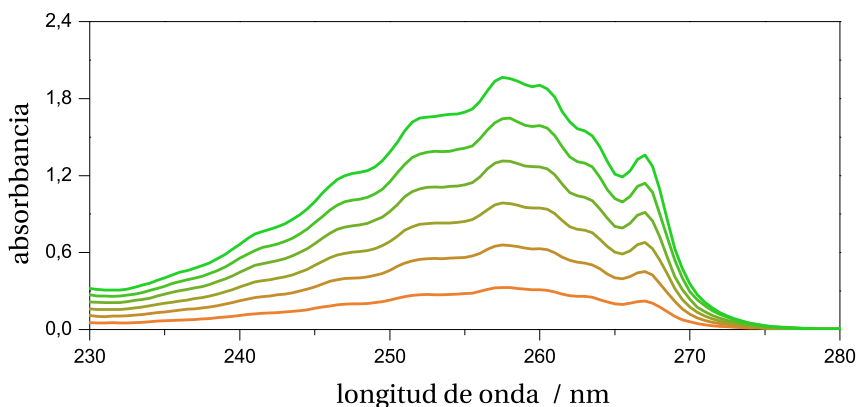


Figura 4.7: Espectros de absorción de seis disoluciones de fenetilamina con distintas concentraciones. $[PHE] = 1,59 \cdot 10^{-3} - 9,53 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 10,6$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

la absorbancia A es directamente proporcional a la concentración c (ecuación 4.1, donde l es el paso óptico de la cubeta de muestra y ϵ el coeficiente de absorción molar).

$$A = \epsilon l c \quad (4.1)$$

La figura 4.8 muestra los valores de absorbancia del máximo de la banda (258 nm) para cada concentración de fenetilamina y el ajuste de estos datos a la ecuación de Lambert-Beer. Como se ha utilizado una cubeta de 1 cm de paso óptico, el coeficiente de absorción molar para la fenetilamina en estas condiciones, a 258 nm, es:

$$\epsilon_{PHE, 258 \text{ nm}} = 206 \pm 1 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

La figura 4.9 muestra la variación del espectro de absorción de la fenetilamina con el pH, dibujado según se ha descrito en la sección 3.1.2.3. Como el grupo $-\text{NH}_2$ se encuentra separado del anillo aromático por dos carbonos alifáticos, el espectro apenas se modifica. Llama la atención el pico en 268 nm que, de ser el más definido en medio básico, casi desaparece en medio ácido.

[PHE] / M	A_{258}	[PHE] / M	A_{258}
$1,59 \cdot 10^{-3}$	0,326	$6,35 \cdot 10^{-3}$	1,311
$3,18 \cdot 10^{-3}$	0,655	$7,94 \cdot 10^{-3}$	1,647
$4,76 \cdot 10^{-3}$	0,982	$9,53 \cdot 10^{-3}$	1,956

$$y = (6,67 \pm 0,01) + (206 \pm 1)x \quad (4.2)$$

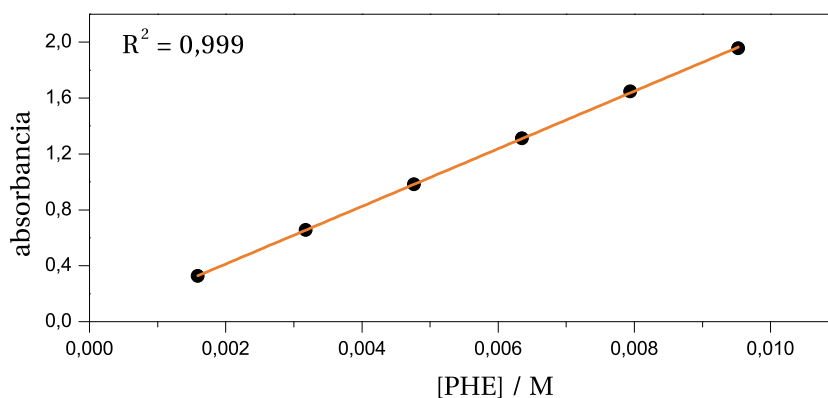


Tabla 4.2 y Figura 4.8: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la fenetilamina. $\lambda = 258$ nm, pH = 10,6, $T = 20,0$ °C.

4.2.2. Reacción entre fenetilamina y nitrito

Conocido el comportamiento espectroscópico de la fenetilamina, se han estudiado los cambios que se producen al hacerla reaccionar con nitrito sódico en medio acuoso y ácido (figura 4.10).

La banda de absorción del sistema nitrito/ácido nitroso (310 - 400 nm) desciende con el tiempo, mientras que sobre los picos de la fenetilamina, que apenas cambian de forma aparece una nueva banda de absorción. El descenso de la absorbancia del nitrito no se puede explicar exclusivamente por la descomposición del ácido nitroso (sección 4.2.6), lo que muestra que el nitrito reacciona

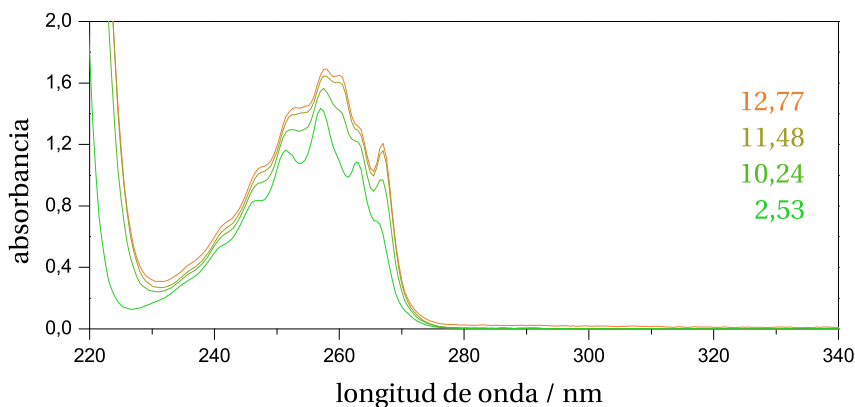


Figura 4.9: Variación del espectro de absorción UV-visible de la fenetilamina con el pH. $[PHE] = 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

con el sustrato.

Como el pico de la fenetilamina no cambia de forma sensiblemente y en las longitudes de onda inferiores a 250 nm absorben muchas disoluciones reguladoras y los productos de descomposición del ácido nitroso, se siguió la reacción a través de la banda de absorción del nitrito/ácido nitroso.

4.2.3. Efecto de la presión en la velocidad

Tanto en las reacciones de N-nitrosación (sección 2.3.3), como en la descomposición del ácido nitroso (sección 2.1), alguno de los productos es gaseoso. Por ello, la presión es un factor más a tener en cuenta en este tipo de reacciones. La reacción de la figura 4.10 se estudió a presión constante, sin tapar ni el matraz de reacción ni la cubeta de muestra durante el ensayo. Se ha repetido el mismo experimento cerrando los recipientes de reacción de tal forma que la presión aumenta con el tiempo según se acumulan los gases en el espacio libre del recipiente. El resultado se muestra en la figura 4.11.

La comparación de esta figura con la del experimento a presión constante demuestra que la presión inhibe tanto la reacción de nitrosación de la fenetilamina

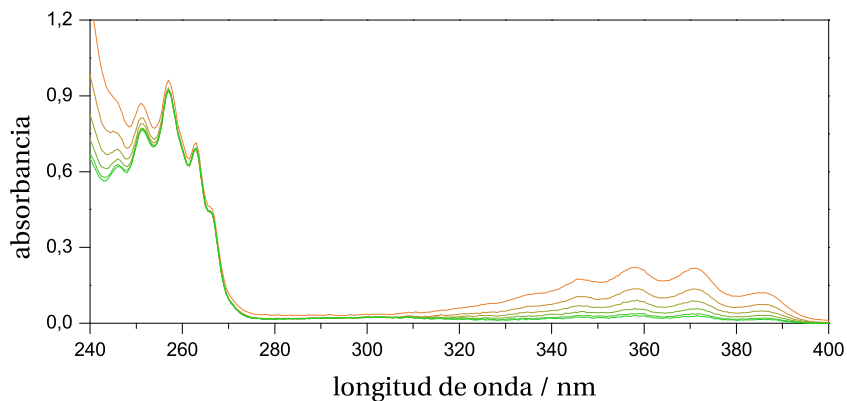


Figura 4.10: Variación con el tiempo del espectro de absorción de la fenetilamina durante su nitrosación. Espectros tomados cada 10 horas desde el naranja al verde. $[PHE]_0 = 4,21 \cdot 10^{-3}$ M, $[NIT]_0 = 5,31 \cdot 10^{-3}$, pH = 3,01, $T = 25,0$ °C.

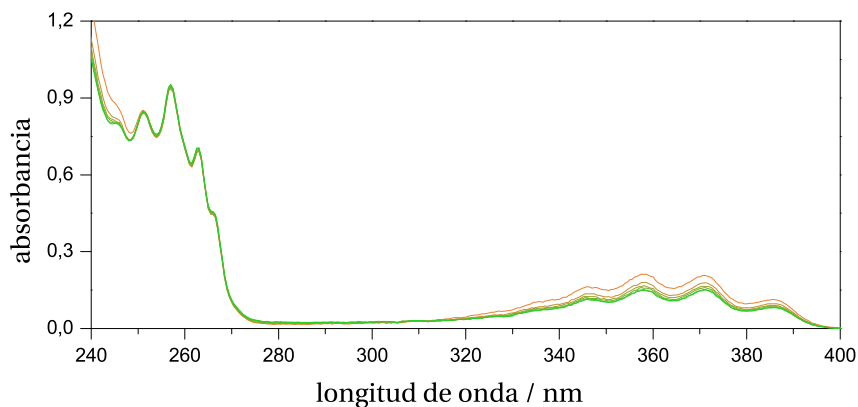


Figura 4.11: Influencia de la presión en la velocidad de reacción. Espectros tomados cada 10 horas desde el naranja al verde. $[PHE]_0 = 4,21 \cdot 10^{-3}$ M, $[NIT]_0 = 5,31 \cdot 10^{-3}$, pH = 3,01, $T = 25,0$ °C.

como la descomposición del ácido nitroso. Por ello, como no se puede controlar de forma exacta la presión de los gases desprendidos, se decidió realizar todos los experimentos de este trabajo a presión constante.

4.2.4. Estudio espectrofotométrico del nitrito

El inconveniente de seguir una reacción a través de la disminución en la absorbancia del sistema nitrito - ácido nitroso es que sus bandas de absorción varían mucho con la acidez. La figura 4.12 muestra cómo cambian los espectros de absorción de una disolución de nitrito sódico en función del pH.

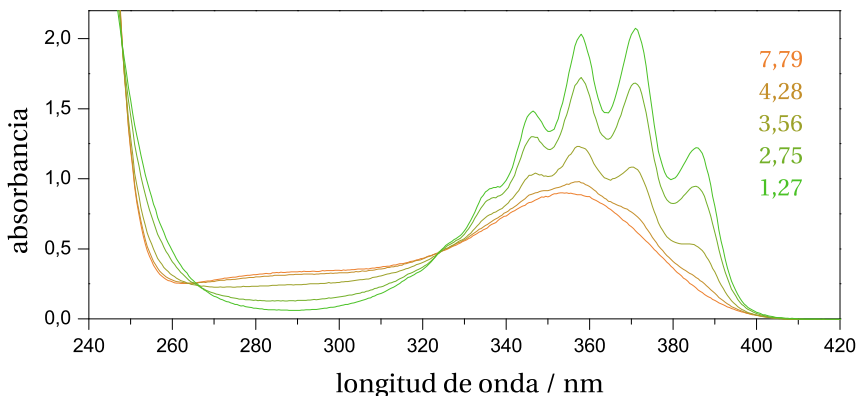


Figura 4.12: Variación del espectro de absorción UV-visible del nitrito con el pH. El color de los espectros varía según el pH desde el más básico (naranja) al más ácido (verde). $[\text{NIT}] = 3,94 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se observan dos bandas características del grupo $-\text{NO}$. La primera centrada en $\lambda \approx 355$ nm corresponde a una transición $n \rightarrow \pi^*$, la segunda, mucho más intensa, corresponde a una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ centrada en $\lambda \approx 371$ nm. El sistema tiene tres puntos isobásticos en 249, 265 y 323 nm.

Para seguir la reacción de nitrosación se ha elegido el máximo de absorción de la banda en la zona visible del ácido nitroso ($\lambda = 371$ nm) en lugar de los

puntos isobésticos, para evitar interferencias con la fenetilamina y por su mayor absorbancia. Para calcular el coeficiente de absorción molar en esta longitud de onda hay que tener en cuenta que la absorbancia total A_T se debe a la suma de la absorbancia de las dos especies mezcladas, el ácido nitroso y el nitrito:

$$A_T = A_{\text{HNO}_2} + A_{\text{NO}_2^-} \quad (4.3)$$

De modo que la ley de Lambert-Beer (ecuación 4.1, página 154) se escribir así:

$$A_T = \varepsilon_{\text{HNO}_2} l[\text{HNO}_2] + \varepsilon_{\text{NO}_2^-} l[\text{NO}_2^-] \quad (4.4)$$

La proporción de nitrito y ácido nitroso en función del pH se conoce a través de la constante del equilibrio ácido-base entre las dos especies:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{NO}_2^-]}{[\text{HNO}_2]} \quad (4.7)$$

Combinando las ecuaciones 4.4 y 4.7 se obtiene:

$$A_T = \varepsilon_{\text{HNO}_2} l \frac{[\text{H}^+][\text{NO}_2^-]}{K_a} + \varepsilon_{\text{NO}_2^-} l[\text{NO}_2^-] \quad (4.8)$$

Simplificando la ecuación anterior obtenemos la expresión:

$$A_T = \frac{\varepsilon_{\text{NO}_2^-} K_a + \varepsilon_{\text{HNO}_2} [\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} l[\text{NIT}] \quad (4.9)$$

donde [NIT] es la suma de las concentraciones de las dos especies. Así, para el pico responsable de estas dos especies podemos definir un coeficiente de extinción molar global, ε_{NIT} :

$$\varepsilon_{\text{NIT}} = \frac{\varepsilon_{\text{NO}_2^-} K_a + \varepsilon_{\text{HNO}_2} [\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (4.10)$$

Los coeficientes de extinción molar del ácido nitroso (figura 4.13) y del nitrito (figura 4.14) se han determinado experimentalmente. Para ello se han preparado distintas concentraciones de estas especies a pH = 1,5, donde la proporción ácido nitroso/nitrito es de 35:1 y a pH = 6, donde la proporción de nitrito/ácido nitroso es de 850:1, obteniéndose el valor de ε_{NIT} :

$$\varepsilon_{\text{NIT}} = \frac{(16,37 \pm 0,06) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} K_a + (52,3 \pm 0,5) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} [\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (4.11)$$

$[\text{HNO}_2] / \text{M}$	A_{HNO_2}	$[\text{HNO}_2] / \text{M}$	A_{HNO_2}
$3,77 \cdot 10^{-3}$	0,227	$2,261 \cdot 10^{-2}$	1,197
$7,54 \cdot 10^{-3}$	0,446	$2,638 \cdot 10^{-2}$	1,401
$1,130 \cdot 10^{-2}$	0,610	$3,015 \cdot 10^{-2}$	1,626
$1,507 \cdot 10^{-2}$	0,840	$3,768 \cdot 10^{-2}$	2,014
$1,884 \cdot 10^{-2}$	1,018		

$$y = (0,03 \pm 0,01) + (52,3 \pm 0,5)x \quad (4.5)$$

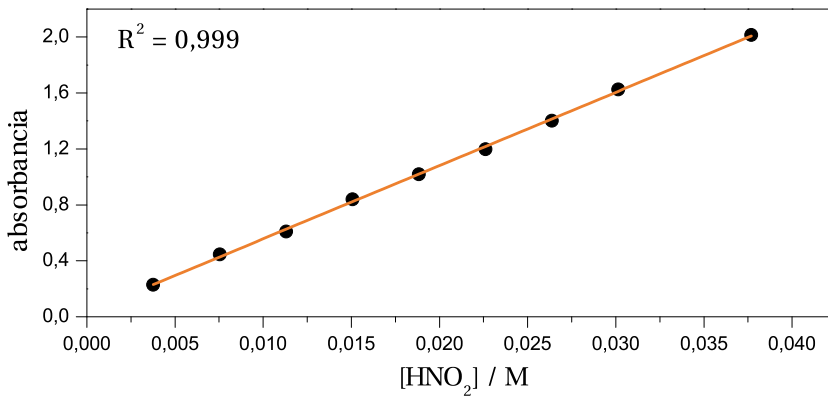


Tabla 4.3 y Figura 4.13: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por el ácido nitroso. $\lambda = 371 \text{ nm}$, $\text{pH} = 1,49$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$[\text{NO}_2^-] / \text{M}$	$A_{\text{NO}_2^-}$	$[\text{NO}_2^-] / \text{M}$	$A_{\text{NO}_2^-}$
$9,39 \cdot 10^{-3}$	0,164	$5,633 \cdot 10^{-2}$	0,923
$1,878 \cdot 10^{-2}$	0,309	$6,572 \cdot 10^{-2}$	1,084
$2,817 \cdot 10^{-2}$	0,464	$7,511 \cdot 10^{-2}$	1,241
$3,756 \cdot 10^{-2}$	0,624	$9,388 \cdot 10^{-2}$	1,540
$4,694 \cdot 10^{-2}$	0,775		

$$y = (0,006 \pm 0,003) + (16,37 \pm 0,06)x \quad (4.6)$$

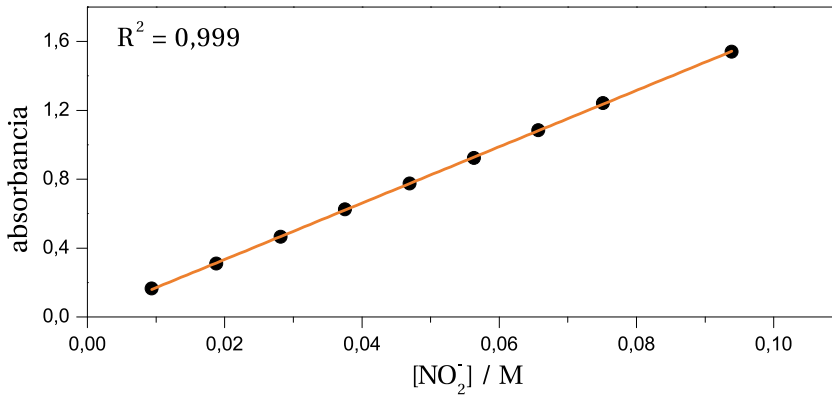


Tabla 4.4 y Figura 4.14: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por el nitrito. $\lambda = 371$ nm, pH = 6,05, $T = 25,0$ °C.

4.2.5. Órdenes parciales de reacción

El método cinético para la determinación de los órdenes parciales de reacción se eligió cuidadosamente en función de varios factores. En primer lugar se eligió el método de velocidades iniciales para soslayar en la medida de lo posible la descomposición del ácido nitroso. Por la misma razón se han llevado a cabo los experimentos a $\text{pH} = 3,8$. Además, esta acidez tiene la ventaja de que la absorbancia del sistema ácido nitroso - nitrito es suficiente para que las medidas tengan poca incertidumbre. Uno de los reactivos tiene que estar en exceso para calcular el orden parcial del otro compuesto. El nitrito no puede ser el reactivo en exceso porque su absorbancia no debe ser superior a 2, que es hasta donde el espectrofotómetro empleado puede medir sin error significativo. Por lo que tiene que ser la fenetilamina la que esté en exceso, aunque debido a su solubilidad y, para mantener las condiciones adecuadas para el método de aislamiento, la concentración de nitrito debe ser baja, lo que ha provocado que la absorbancia sea pequeña y la reacción lenta. Por ello, para reducir la incertidumbre, se han repetido los experimentos por triplicado.

De esta forma, la ecuación de velocidad depende exclusivamente del nitrito y de la pseudoconstante de velocidad q :

$$v = k_{\text{obs}}[\text{PHE}]^m[\text{NIT}]_0^n \quad (4.12)$$

$$q = k_{\text{obs}}[\text{PHE}]^m \quad (4.13)$$

$$v = q[\text{NIT}]_0^n \quad (4.14)$$

La figura 4.15 muestra cómo, variando la concentración de nitrito inicial y midiendo la velocidad, se obtiene el orden parcial n según la ecuación linealizada:

$$\ln v_0 = \ln q + n \ln[\text{NIT}]_0 \quad (4.15)$$

De la pendiente de la recta obtenida se obtiene un orden dos respecto a la concentración de nitrito.

Repetiendo los experimentos mientras se varía la concentración de fenetilamina en exceso (figura 4.16) se determina el orden del reactivo a partir de la pseudoconstante q :

$$\ln q = \ln k_{\text{obs}} + m \ln[\text{PHE}] \quad (4.18)$$

$[\text{NIT}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$	$[\text{NIT}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$
$3,442 \cdot 10^{-2}$	$1,747 \cdot 10^{-6}$	$3,029 \cdot 10^{-2}$	$1,375 \cdot 10^{-6}$
$3,304 \cdot 10^{-2}$	$1,592 \cdot 10^{-6}$	$2,891 \cdot 10^{-2}$	$1,214 \cdot 10^{-6}$
$3,167 \cdot 10^{-2}$	$1,536 \cdot 10^{-6}$		

$$y = -(6,5 \pm 0,6) + (2,0 \pm 0,2)x \quad (4.16)$$

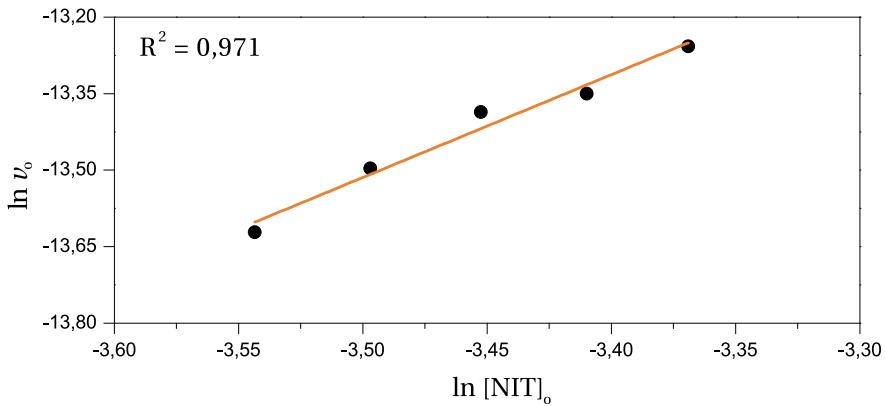


Tabla 4.5 y Figura 4.15: Influencia de la concentración de nitrito en la velocidad inicial de nitrosación. $[\text{PHE}] = 0,168 \text{ M}$, $\text{pH} = 3,81$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

[PHE] / M	$q / M^{-1} s^{-1}$	[PHE] / M	$q / M^{-1} s^{-1}$
0,180	$1,653 \cdot 10^{-3}$	0,156	$1,466 \cdot 10^{-3}$
0,168	$1,564 \cdot 10^{-3}$	0,147	$1,362 \cdot 10^{-3}$
0,163	$1,477 \cdot 10^{-3}$	0,138	$1,258 \cdot 10^{-3}$

$$y = -(4,6 \pm 0,2) + (1,01 \pm 0,08)x \quad (4.17)$$

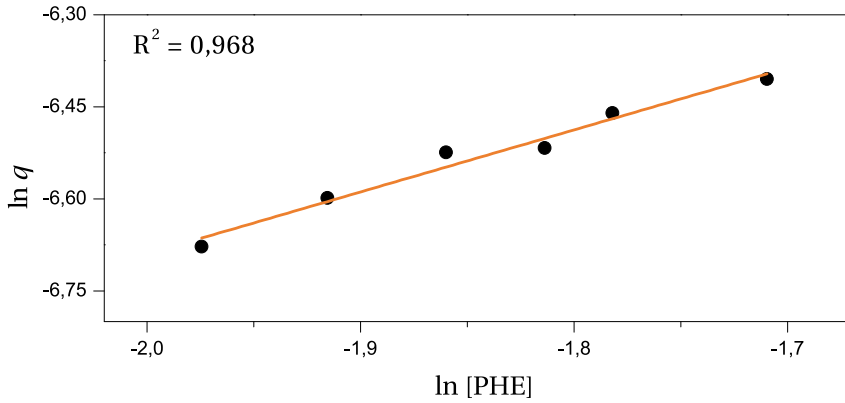


Tabla 4.6 y Figura 4.16: Influencia de la concentración de fenetilamina en el parámetro q . $[NIT]_0 = 3,44 \cdot 10^{-2} - 2,891 \cdot 10^{-2} M$, $pH = 3,81$, $T = 20,0 \text{ } ^\circ C$.

El orden parcial respecto a la concentración del sustrato fenetilamina es uno.

4.2.6. Velocidad de descomposición del nitrito

Una consecuencia de seguir la reacción de nitrosación a través de la desaparición de la banda de absorción del nitrito es que la velocidad experimental medida es en realidad la suma de la velocidad de desaparición del nitrito por la nitrosación, v_n , y la velocidad de descomposición del nitrito, v_d .

$$v_{\text{exp}} = v_n + v_d \quad (4.19)$$

Como se vio en la sección 2.1, la velocidad de la reacción de descomposición del ácido nitroso es proporcional a la cuarta potencia de la concentración de esta especie.

Se hizo un experimento en el que se determinó v_d en diferentes condiciones de acidez (figura 4.17). Para ello se empleó la misma concentración de nitrito

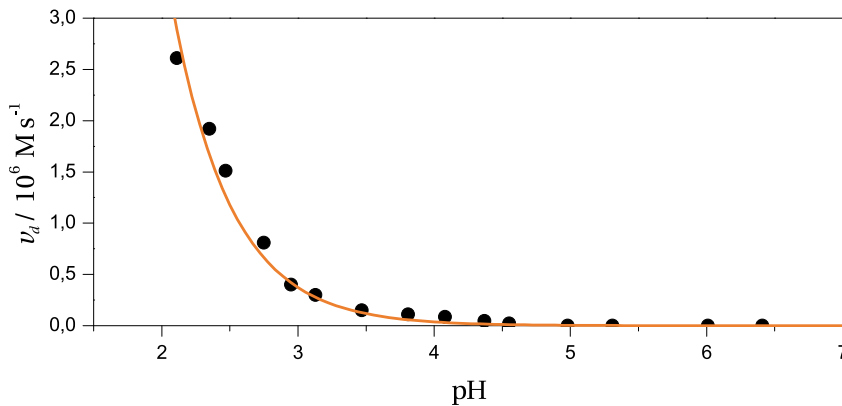


Figura 4.17: Influencia del pH en velocidad de descomposición del nitrito. $[\text{NIT}]_0 = 4,95 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{FTA}] = 5,00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $I = 0,31 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$. De color naran-ja se muestra la curva de la concentración de ácido nitroso según el pH para una concentración de nitrito + ácido nitroso fija.

que en las experiencias para medir la constante de velocidad. Se observa que la curva v_d/pH tiene la misma forma que la curva $[\text{HNO}_2]/\text{pH}$.

4.2.7. Influencia de la acidez del medio

Conocidos los órdenes parciales de reacción, la ecuación 4.12 permite calcular inmediatamente el valor de k_{obs} . Se ha medido ésta constante de velocidad en varios experimentos en los que se ha variado la concentración de protones, manteniendo constante la de los demás reactivos, así como la temperatura y la fuerza iónica. La figura 4.18 recoge los resultados. Se observa que al aumentar la acidez del medio lo hace la velocidad de nitrosación hasta llegar a un máximo en $\text{pH} = 3$, a partir del cual la velocidad comienza a descender.

El perfil de esta curva es característico de las reacciones de N-nitrosación de aminas primarias, en las que según aumenta la acidez, la velocidad de reacción aumenta debido a la mayor concentración de ácido nitroso. Sin embargo, también al aumentar la acidez, la amina se protona, perdiendo su carga negativa que permite la reacción de nitrosación. El esquema 4.1 muestra el mecanismo de nitrosación propuesto, basado en el que se ha aplicado en múltiples trabajos de nuestro grupo.^{132,251} El agente nitrosante se ha considerado que es el trióxido de dinitrógeno, debido al orden parcial dos respecto a la concentración de nitrito.

A partir del mecanismo planteado, se puede deducir la ecuación de velocidad teórica a la que se deben de ajustar los datos. Considera que la etapa limitante de la velocidad es la nitrosación de la fenetilamina con la amina desprotonada, luego la ecuación de velocidad de este paso es:

$$v = k_a[\text{N}_2\text{O}_3][\text{PHEN}] \quad (4.21)$$

La concentración de trióxido de dinitrógeno se puede conocer aplicando los sucesivos equilibrios químicos que llevan a su formación desde el nitrito y que dependen de la concentración de protones. En primer lugar su formación a partir del ion nitrosacidio:

$$K_3 = \frac{[\text{N}_2\text{O}_3]}{[\text{H}_2\text{NO}_2^+][\text{NO}_2^-]} \quad (4.22)$$

pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
2,5	$1,561 \cdot 10^{-2}$	3,7	$1,013 \cdot 10^{-2}$
2,8	$1,740 \cdot 10^{-2}$	4,0	$5,80 \cdot 10^{-3}$
2,9	$2,012 \cdot 10^{-2}$	4,4	$1,92 \cdot 10^{-3}$
3,15	$1,932 \cdot 10^{-2}$	5,6	0
3,5	$1,360 \cdot 10^{-2}$		

$$y = (8,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \frac{10^{-x}}{((1,09 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} + 10^{-x})^2} \quad (4.20)$$

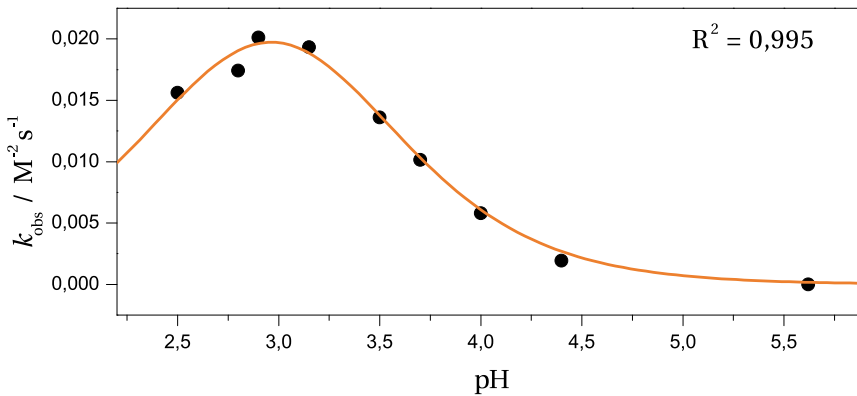
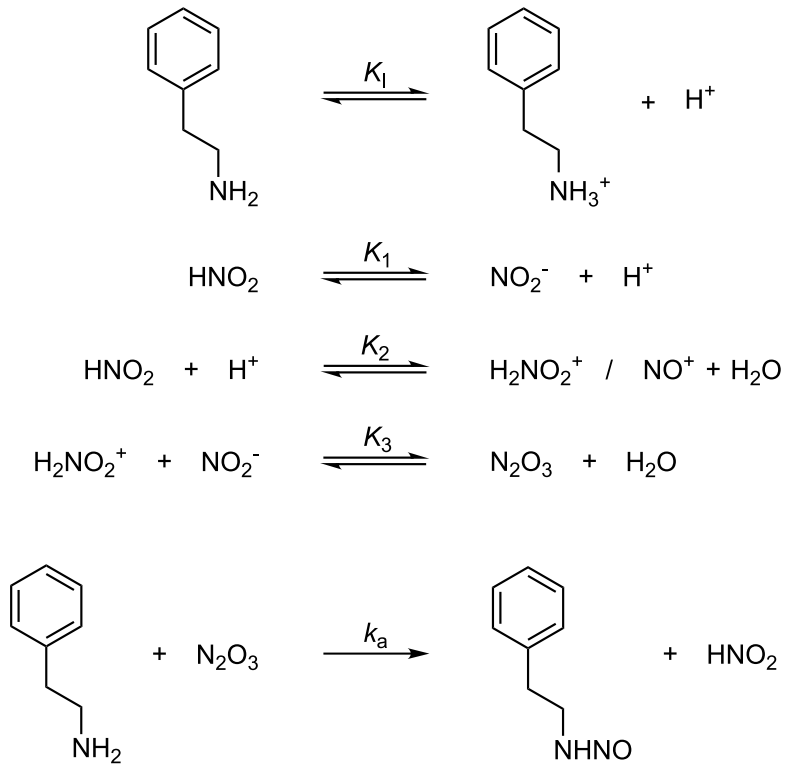


Tabla 4.7 y Figura 4.18: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad. $[\text{PHE}]_0 = 6,311 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 2,7 \cdot 10^{-2} - 5,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{FTA}] = 5,00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $I = 0,34 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.



Esquema 4.1: Mecanismo propuesto para la nitrosación de la fenetilamina.

$$v = k_a K_3 [\text{H}_2\text{NO}_2^+] [\text{NO}_2^-] [\text{PHEN}] \quad (4.23)$$

A continuación se deduce la concentración de ion nitrosacido a partir de su equilibrio con el ácido nitroso:

$$K_2 = \frac{[\text{H}_2\text{NO}_2^+]}{[\text{HNO}_2][\text{H}^+]} \quad (4.24)$$

$$v = k_a K_3 K_2 [\text{HNO}_2] [\text{H}^+] [\text{NO}_2^-] [\text{PHEN}] \quad (4.25)$$

Y por último, se simplifica la ecuación a través del equilibrio ácido - base entre

el ácido nitroso y el nitrito:

$$K_1 = \frac{[\text{NO}_2^-][\text{H}^+]}{[\text{HNO}_2]} \quad (4.26)$$

$$v = k_a K_3 K_2 K_1 [\text{HNO}_2]^2 [\text{PHEN}] \quad (4.27)$$

Como se indicó en la página 122, por [NIT] se entiende la suma de las concentraciones de nitrito y ácido nitroso:

$$[\text{NIT}] = [\text{HNO}_2] + [\text{NO}_2^-] \quad (4.28)$$

$$[\text{HNO}_2] = \frac{[\text{NIT}][\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_1} \quad (4.29)$$

Llevando la ecuación 4.29 a la 4.27:

$$v = k_a K_3 K_2 K_1 \frac{[\text{NIT}]^2 [\text{H}^+]^2 [\text{PHEN}]}{([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (4.30)$$

De igual modo ocurre con la fenetilamina, [PHE], que en el medio de reacción puede estar como base, [PHEN], o como su ácido conjugado, [PHENH]:

$$[\text{PHE}] = [\text{PHENH}] + [\text{PHEN}] \quad (4.31)$$

$$K_1 = \frac{[\text{PHEN}][\text{H}^+]}{[\text{PHENH}]} \quad (4.32)$$

$$[\text{PHEN}] = \frac{K_1 [\text{PHE}]}{[\text{H}^+] + K_1} \quad (4.33)$$

Llevando la ecuación 4.33 a la 4.30 se obtiene la ecuación teórica de velocidad de nitrosación de la fenetilamina:

$$v = k_a K_3 K_2 K_1 K_1 \frac{[\text{NIT}]^2 [\text{H}^+]^2 [\text{PHE}]}{([\text{H}^+] + K_1)([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (4.34)$$

que, comparada con la ecuación experimental:

$$v = k_{\text{obs}} [\text{NIT}]^2 [\text{PHE}] \quad (4.35)$$

conduce a la relación entre la constante de velocidad observada, k_{obs} y la concentración de protones.

$$k_{\text{obs}} = k_a K_3 K_2 K_1 K_I \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_I)([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (4.36)$$

Como $K_I = 1,65 \cdot 10^{-10}$ M y la concentración de protones es superior a 10^{-5} M (figura 4.18), los resultados experimentales se han ajustado a la siguiente ecuación:

$$k_{\text{obs}} = \alpha \frac{[\text{H}^+]}{([\text{H}^+] + \beta)^2} \quad (4.37)$$

La figura 4.18 muestra el buen ajuste de los datos experimentales a la ecuación 4.36 con los parámetros:

$$\begin{aligned} \alpha &= (8,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \\ \beta &= (1,09 \pm 0,05) \cdot 10^{-3} \text{ M} \end{aligned}$$

El valor de β sirve como comprobación de que el ajuste es correcto desde el punto de vista químico, ya que se trata de la constante de equilibrio K_I . El valor negativo de su logaritmo conduce a un $\text{p}K_a$ de $2,98 \pm 0,05$, cercano al bibliográfico (3,17, tabla 2.1).

Con el parámetro α se calcula la constante de velocidad de la reacción de nitrosación k_a :

$$k_a = \frac{\alpha}{K_3 K_2 K_1 K_I} \quad (4.38)$$

El valor del producto $K_1 K_2 K_3 = (3,03 \pm 0,23) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ es conocido (sección 2.2.2).⁹³ Como la constante de acidez de la fenetilamina también es conocida ($K_I = 1,65 \cdot 10^{-10}$ M):

$$k_a = (1,72 \pm 0,08) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

La magnitud de k_a es propia de una reacción controlada por difusión (tabla 2.11, página 92).

4.2.8. Influencia de la fuerza iónica

Se midió la velocidad de nitrosación de la fenetilamina con diferentes concentraciones de perclorato sódico y manteniendo constante el resto de variables. La figura 4.19 recoge el resultado de aplicar la ecuación de Brønsted (ecuación 3.11, página 120) a estos experimentos:

I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-2} s^{-1}$	I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-2} s^{-1}$
0,15	$6,96 \cdot 10^{-3}$	0,34	$5,80 \cdot 10^{-3}$
0,21	$6,60 \cdot 10^{-3}$	0,40	$7,02 \cdot 10^{-3}$
0,28	$7,73 \cdot 10^{-3}$	0,45	$7,20 \cdot 10^{-3}$

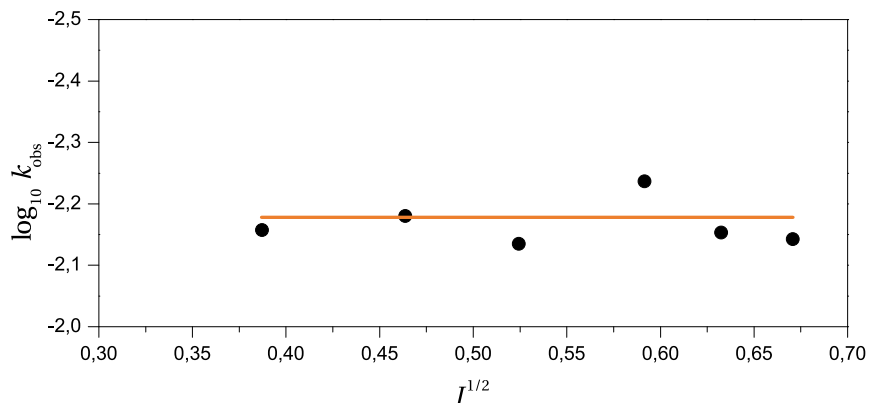


Tabla 4.8 y Figura 4.19: Influencia de la fuerza iónica en la constante de velocidad. $[PHE]_0 = 6,311 \cdot 10^{-2} M$, $[NIT]_0 = 2,7 \cdot 10^{-2} - 5,5 \cdot 10^{-2} M$, $[FTA] = 5,00 \cdot 10^{-2} M$, $pH = 4,0$, $T = 20,0 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Como era de esperar, la variación en la fuerza iónica del medio no influye en la velocidad de reacción, lo que apoya el mecanismo propuesto en el que ninguno de los dos reactivos de la etapa limitante de velocidad es iónico.

4.2.9. Influencia de la temperatura

Se ha analizado cómo cambia la velocidad de nitrosación de la fenetilamina con la temperatura, haciendo variar ésta entre 20,0 y 37,5 °C. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
20,0	$7,21 \cdot 10^{-3}$	32,5	$1,910 \cdot 10^{-2}$
22,5	$8,67 \cdot 10^{-3}$	35,0	$2,302 \cdot 10^{-2}$
25,0	$1,029 \cdot 10^{-2}$	37,5	$2,658 \cdot 10^{-2}$
30,0	$1,398 \cdot 10^{-2}$		

Tabla 4.9: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad. $[\text{PHE}]_0 = 6,31 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 2,7 \cdot 10^{-2} - 5,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{FTA}] = 5,00 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,80$, $I = 0,34 \text{ M}$

A partir de estos datos y utilizando la forma linealizada de la ecuación de Arrhenius (ecuación 3.6, página 119):

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (4.39)$$

se ha determinado la energía de activación, $E_a = 58 \pm 5 \text{ kJ mol}^{-1}$. La figura 4.20 muestra el resultado del ajuste.

Con la ecuación de Eyring (ecuación 3.9, página 120) se han determinado los parámetros de activación. Ajustando los datos de la tabla 4.9 a la forma lineal de dicha ecuación:

$$\ln \frac{k_{\text{obs}}}{T} = \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (4.42)$$

se obtienen los valores $\Delta H^\ddagger = 56 \pm 4 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $\Delta S^\ddagger = -104 \pm 16 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. La figura 4.21 muestra el resultado del ajuste.

El valor de la entalpía de activación ΔH^\ddagger está asociado a la constante α de la ecuación 4.38. Para conocer el valor de la entalpía asociada a la constante k_a es necesario sustraer el calor a presión constante de los dos procesos que

$$y = (18 \pm 2) + (58 \pm 5) \cdot 10^3 x \quad (4.40)$$

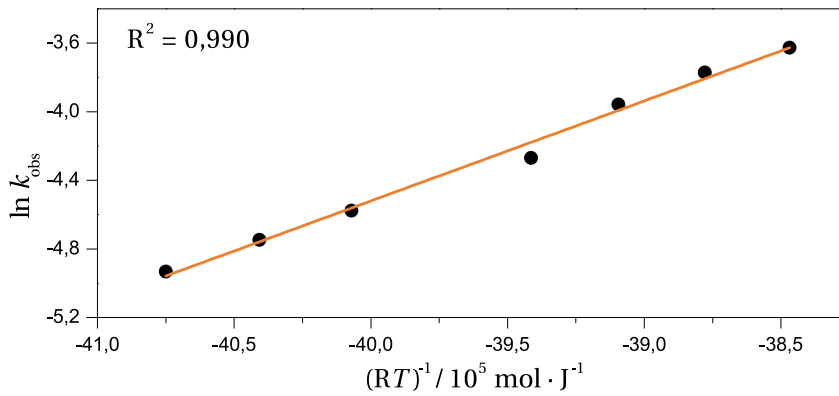


Figura 4.20: Cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por los resultados de la tabla 4.9.

$$y = (12 \pm 2) + (56 \pm 4) \cdot 10^3 x \quad (4.41)$$

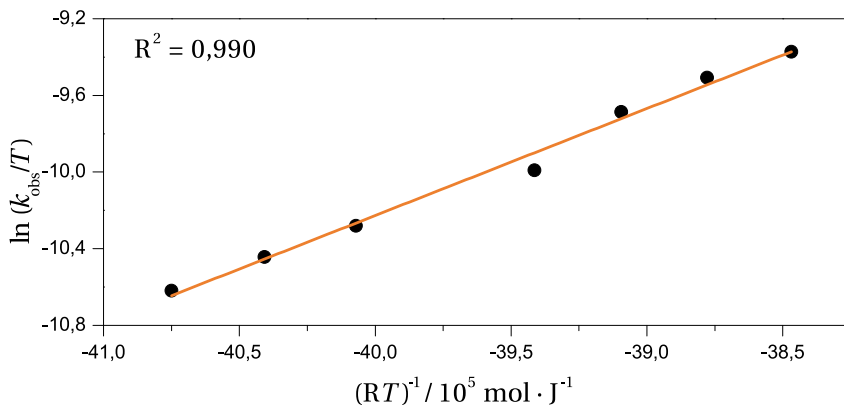


Figura 4.21: Cumplimiento de la ecuación de Eyring por los resultados de la tabla 4.9.

también intervienen: la entalpía de formación de N_2O_3 , ΔH_m , y la entalpía de protonación de la amina, ΔH_p :

$$\Delta H_k^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta H_m - \Delta H_p \quad (4.43)$$

El valor $\Delta H_m = 6,8 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ha sido determinado por nuestro grupo.⁹⁶ Como el valor exacto de la entalpía de protonación de la amina no se conoce, se ha manejado el de una molécula análoga, L-fenilalanina, $\Delta H_p = 42,0 \text{ kJ mol}^{-1}$.²⁵² Así ha encontrado el valor $\Delta H_k^\ddagger \approx 7 \text{ kJ mol}^{-1}$ para la entalpía del paso limitante de velocidad, que está dentro del margen de valores asociados a procesos controlados por difusión, lo que apoya el mecanismo propuesto.⁸²

4.2.10. Determinación del producto de reacción

El mecanismo propuesto para la nitrosación de la fenetilamina concuerda con el desprendimiento de burbujas observado durante la reacción. Para confirmar el producto de nitrosación se ha dibujado el espectro de masas de la fenetilamina, comparándolo con el de una muestra tomada al final de la reacción de nitrosación.

La gráfica superior de la figura 4.22 muestra el espectro de masas de una disolución acuosa de fenetilamina. Se observa el pico de su masa molecular en 121,9 y un fragmento de su estructura en 105,9, producido por la electroionización del compuesto, en la que se ha producido la fisión del enlace alquílico del carbono unido al nitrógeno de la amina para formar el carbocatión $C_6H_5(CH_2)_2^+$.

El espectro de masas inferior corresponde a la fenetilamina tras la reacción de nitrosación. Existe el inconveniente de que el producto de nitrosación corresponde a la sustitución de la amina por un alcohol (reacción de Piria, página 34) que, al perder su protón, tiene igual masa que aquella. A pesar de ello, el descenso en la intensidad de ese pico y el cambio de la proporción con el pico de 122,7 respecto al 10% de la fenetilamina sugiere la presencia de un oxígeno. Aparece también un pico en $m/z = 144,7$ debido al aducto formado entre el anión del feniletanol con el sodio del nitrito. Por último, no aparece ningún pico relacionado con una C-nitrosación, que debería aparecer en 135 o 151.

Todo ello confirma que el tipo de nitrosación que se produce en la molécula de fenetilamina es N-nitrosación.

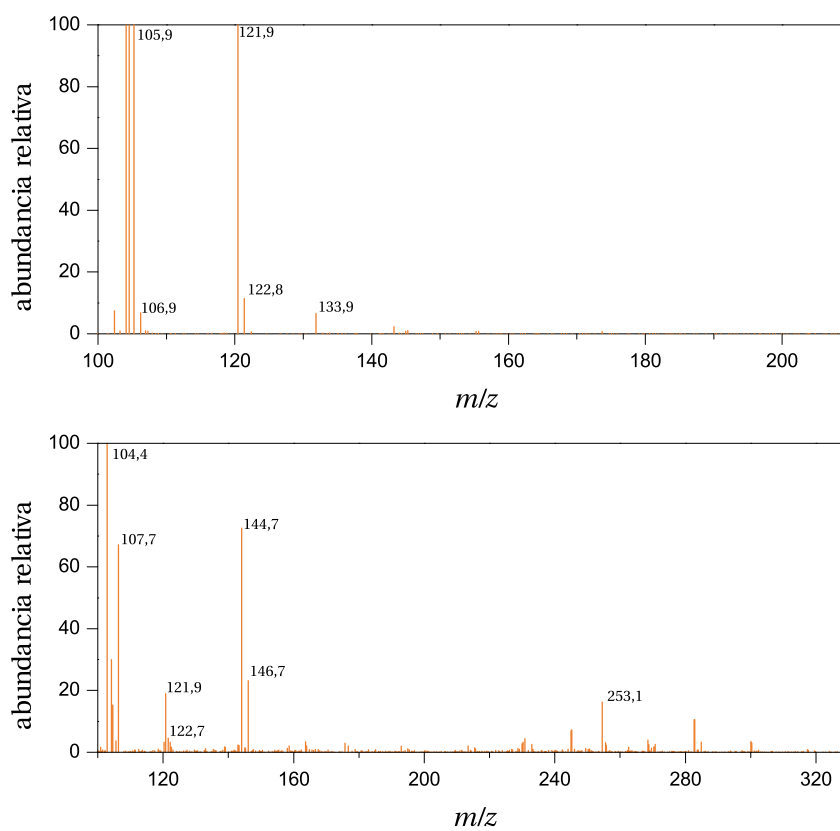


Figura 4.22: Espectros de masas por impacto electrónico positivo de la fenetilamina (gráfica superior) y de la mezcla de fenetilamina y ácido nitroso.

4.3. Nitrosación de la tiramina

4.3.1. Estudio espectrofotométrico

El espectro UV-visible de varias disoluciones con diferentes concentraciones de tiramina (TYR) se muestra en la figura 4.23. Se pueden ver dos bandas de absorción diferenciadas. Una de gran intensidad, entre 190 y 260 nm, con tres picos, que se debe a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida de los electrones de su estructura aromática y otra banda comprendida entre 260 y 320 nm que se debe a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida, por lo que es más débil.²⁴⁹

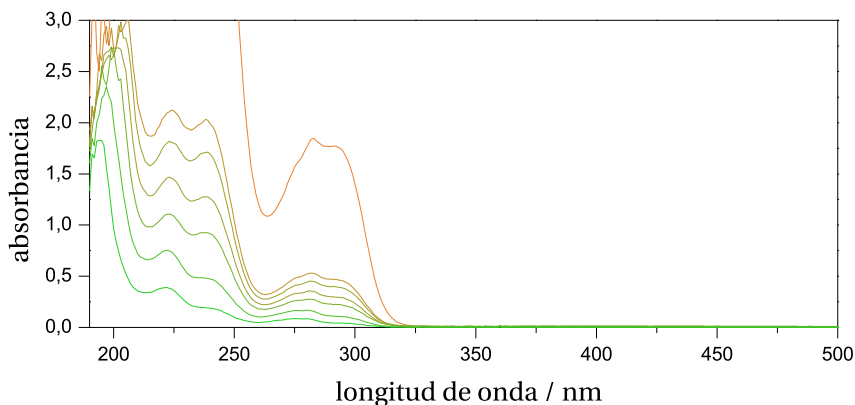


Figura 4.23: Espectros de absorción de varias disoluciones de tiramina. $[\text{TYR}] = 7,42 \cdot 10^{-3} - 1,48 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 10,15$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se ha estudiado la forma en la que cambia el espectro de absorción de la tiramina según el pH del medio (figura 4.24). Los fenoles al perder el protón se quedan con una carga negativa que se deslocaliza en el anillo aromático y que provoca un incremento de la longitud de onda y del coeficiente de absorción del compuesto, tanto en la banda que corresponde a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida como a la prohibida. La tiramina, con sus pK_a s de 9,3 y 10,4 (página 103), cambia la forma de su espectro en la zona de pH comprendida entre 7,33 y 11,50, que

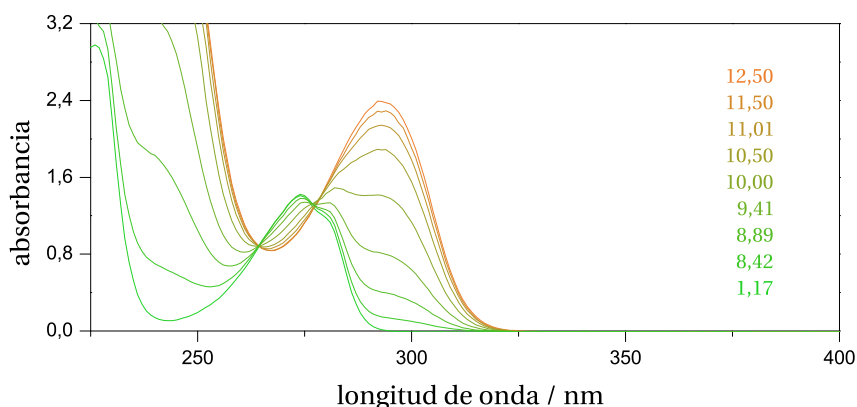


Figura 4.24: Variación del espectro de absorción de la tiramina con el pH. $[\text{TYR}] = 1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

queda muy alejada de la zona donde se estudian las reacciones de nitrosación.

Según varía el pH aparecen dos puntos isobéuticos en 264 y 277 nm. Con los datos de la figura 4.23 se han calculado sus coeficientes de extinción molar, ya que el segundo punto tenía una absorbancia muy cercana al máximo de absorción en medio ácido. La figura 4.25 muestra el ajuste de los datos a la ecuación de Lambert-Beer (página 154). Los coeficientes de absorción de la tiramina son:

$$\varepsilon_{\text{TYR}, 264 \text{ nm}} = 360 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{\text{TYR}, 277 \text{ nm}} = 550 \pm 10 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

4.3.2. Reacción entre tiramina y nitrito

Después de conocer el comportamiento espectroscópico de la tiramina se ha investigado cómo se puede seguir la reacción de nitrosación de la misma mediante espectroscopía UV-visible. Se ha preparado una disolución acuosa y ácida de tiramina y nitrito sódico y se ha seguido la evolución temporal del espectro (figura 4.26).

[TYR] / M	A_{277}	A_{264}	[TYR] / M	A_{277}	A_{264}
$8,90 \cdot 10^{-4}$	0,492	0,326	$4,45 \cdot 10^{-4}$	0,265	0,181
$7,42 \cdot 10^{-4}$	0,419	0,279	$2,96 \cdot 10^{-4}$	0,164	0,111
$5,93 \cdot 10^{-4}$	0,335	0,225	$1,48 \cdot 10^{-4}$	0,084	0,056

$$y = (0,005 \pm 0,007) + (550 \pm 10)x \quad (4.44)$$

$$y = (0,006 \pm 0,007) + (360 \pm 10)x \quad (4.45)$$

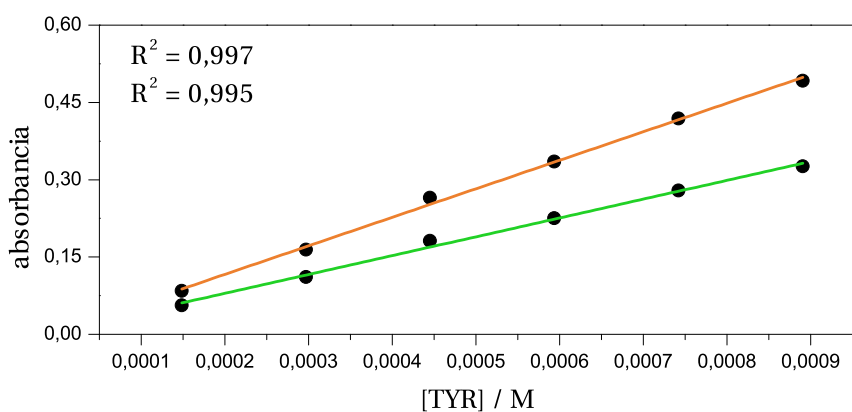


Tabla 4.10 y Figura 4.25: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la tiramina en sus puntos isobécticos. $\lambda = 264$ nm (verde), $\lambda = 277$ nm (naranja), pH = 10,15, $T = 20,0$ °C.

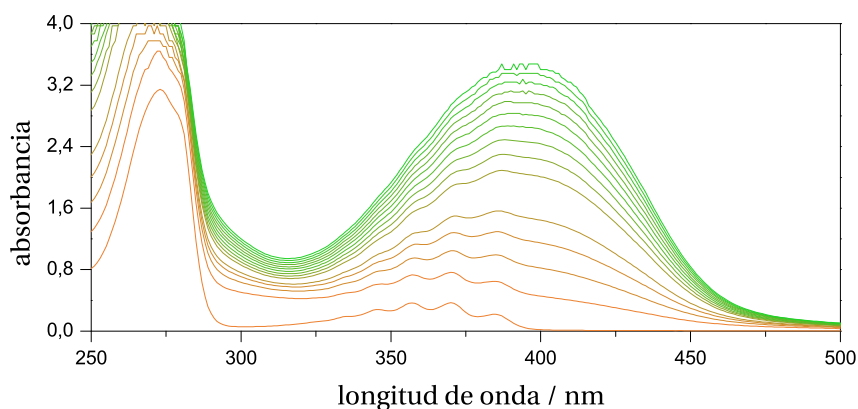


Figura 4.26: Variación del espectro de absorción de la mezcla de tiramina y ácido nitroso durante la nitrosación. Espectros tomados cada 2 horas y media. Entre 12,5 y 17,5 h falta un espectro. $[\text{TYR}] = 2,45 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 7,03 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 2,45$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

En esta figura se puede ver cómo la banda de absorción del sistema nitrito - ácido nitroso desaparece con el tiempo mientras aparece una banda intensa de absorción entre 325 y 475 nm con el máximo en 398 nm. La reacción de nitrosación también modifica la absorbancia en la zona de mayor energía del espectro. El pico de absorción entre 260 y 320 nm incrementa su intensidad y su anchura.

Teniendo en cuenta las características espectroscópicas de reactivos y productos se seleccionó la longitud de onda $\lambda = 405 \text{ nm}$ para seguir la reacción de nitrosación. Esta longitud de onda se ha elegido debido a la gran variación en su absorbancia, dada su cercanía al máximo de la banda y a que el nitrito presenta una absorbancia prácticamente nula en esa zona del espectro (figura 4.12, página 158).

El coeficiente de absorción molar del producto de reacción, nitrosotiramina, se determinó preparando disoluciones acuosas ácidas de diferentes concentraciones de tiramina y añadiendo gran exceso de nitrito sódico. Cuando la reacción alcanzaba la meseta —toda la tiramina se había convertido en nitrosotiramina— se registraba la absorbancia para ajustarla a la ley de Lambert-Beer (figura 4.27).

[NTYR] / M	A_{405}	[NTYR] / M	A_{405}
$2,009 \cdot 10^{-4}$	0,110	$4,018 \cdot 10^{-4}$	0,382
$3,014 \cdot 10^{-4}$	0,259	$5,022 \cdot 10^{-4}$	0,461
$3,014 \cdot 10^{-4}$	0,252	$6,027 \cdot 10^{-4}$	0,605

$$y = -(0,10 \pm 0,02) + (1.180 \pm 50)x \tag{4.46}$$

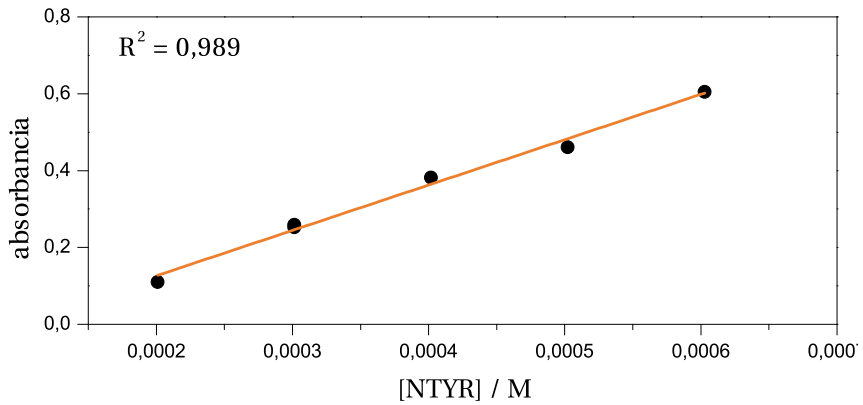


Tabla 4.11 y Figura 4.27: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la nitrosotiramina. $\lambda = 405 \text{ nm}$, $[\text{NIT}] = 4,6 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,08$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

A partir del ajuste de los datos experimentales se encontró que

$$\varepsilon_{\text{NTYR}, 405 \text{ nm}} = 1.180 \pm 50 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

4.3.3. Órdenes parciales de reacción

Los órdenes parciales de reacción se han obtenido utilizando el método de velocidades iniciales junto al método de aislamiento. Se ha escogido un pH = 3,4 para que la reacción fuese más rápida. El nitrito ha sido el reactivo en exceso. De esta forma, la ecuación de velocidad

$$v = k_{\text{obs}}[\text{TYR}]^m[\text{NIT}]^n \quad (4.47)$$

se simplifica al introducir la pseudoconstante p

$$p = k_{\text{obs}}[\text{NIT}]^n \quad (4.48)$$

de modo que:

$$v = p[\text{TYR}]^m \quad (4.49)$$

que en forma linealizada, y teniendo en cuenta el método de velocidades iniciales, resulta:

$$\ln v_0 = \ln p + m \ln[\text{TYR}]_0 \quad (4.50)$$

La figura 4.28 muestra el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 4.50. Su pendiente tiene un valor de $1,004 \pm 0,008$, revelando que el orden parcial respecto a la concentración de tiramina es uno.

A continuación, modificando los excesos de nitrito se ha calculado el orden parcial respecto a la concentración de esta especie, a través de la forma lineal de la ecuación 4.48:

$$\ln p = \ln k_{\text{obs}} + n \ln[\text{NIT}] \quad (4.51)$$

que se encuentra representada en la figura 4.29. El orden parcial respecto a la concentración de nitrito es uno.

[TYR] _o / M	v_o / M s ⁻¹	[TYR] _o / M	v_o / M s ⁻¹
$0,45 \cdot 10^{-3}$	$3,076 \cdot 10^{-8}$	$1,50 \cdot 10^{-3}$	$1,025 \cdot 10^{-7}$
$0,60 \cdot 10^{-3}$	$4,102 \cdot 10^{-8}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$1,230 \cdot 10^{-7}$
$0,90 \cdot 10^{-3}$	$6,153 \cdot 10^{-8}$	$2,40 \cdot 10^{-3}$	$1,641 \cdot 10^{-7}$
$1,20 \cdot 10^{-3}$	$8,205 \cdot 10^{-8}$	$3,00 \cdot 10^{-3}$	$2,051 \cdot 10^{-7}$

$$y = -(9,56 \pm 0,05) + (1,004 \pm 0,008)x \quad (4.52)$$

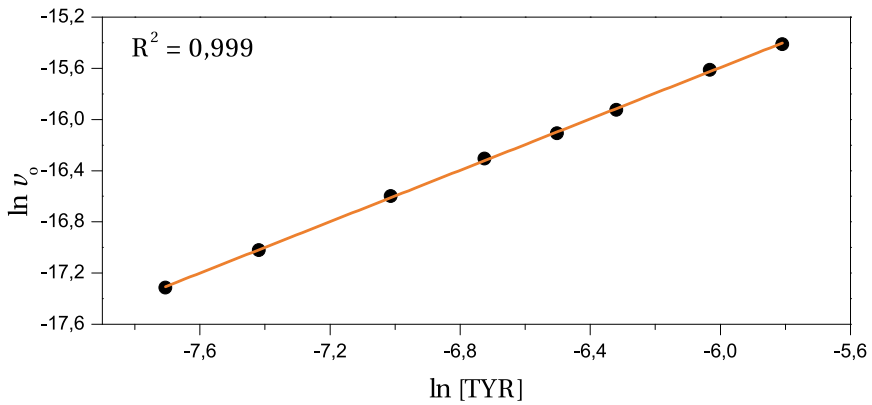


Tabla 4.12 y Figura 4.28: Influencia de la concentración de tiramina en la velocidad inicial de reacción. [NIT] = 0,04 M, pH = 3,4, I = 0,2 M, T = 20,0 °C.

[NIT] / M	p / s^{-1}	[NIT] / M	p / s^{-1}
0,03	$4,75 \cdot 10^{-5}$	0,07	$1,095 \cdot 10^{-4}$
0,04	$7,01 \cdot 10^{-5}$	0,09	$1,496 \cdot 10^{-4}$
0,05	$7,75 \cdot 10^{-5}$		

$$y = -(6,4 \pm 0,2) + (0,99 \pm 0,06)x \quad (4.53)$$

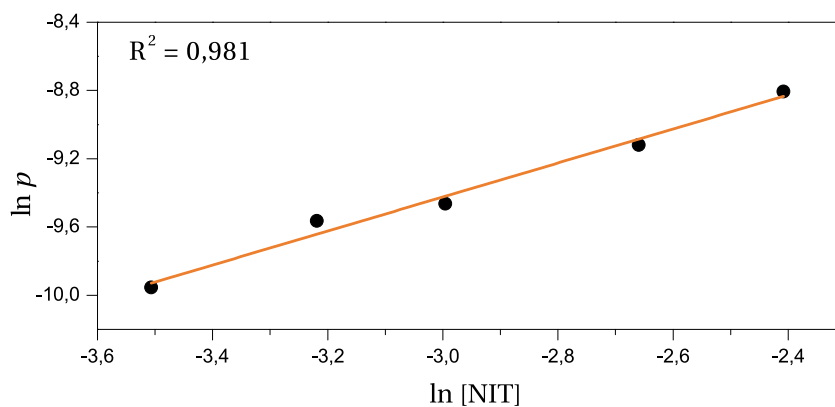


Tabla 4.13 y Figura 4.29: Influencia de la concentración de nitrito en el parámetro p .
 $[TYR]_0 = 0,45 \cdot 10^{-3} - 3,00 \cdot 10^{-3}$ M, pH = 3,4, $I = 0,2$ M, $T = 20,0$ °C.

4.3.4. Influencia de la acidez del medio

Se ha medido la constante de velocidad en varios experimentos en los que se ha variado la concentración de protones, manteniendo constantes las de los demás reactivos, así como la temperatura y la fuerza iónica. La figura 4.30 recoge los resultados. Se observa un aumento progresivo de la velocidad de nitrosación según aumenta la acidez del medio en una curva sigmoidea.

El perfil de esta curva es semejante a los de mecanismos de C-nitrosación en los que la etapa limitante de velocidad es la ruptura del complejo de Wheland (sección 2.3.1),^{253,254} observados con anterioridad en nuestro grupo de trabajo.^{250,255,256}

Del mecanismo propuesto (esquema 4.2), acorde con los órdenes parciales unitarios respecto a las concentraciones de cada reactivo, se deduce fácilmente la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = \frac{k_a K_2 [\text{TYR}] [\text{NIT}] [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.55)$$

Al comparar las ecuaciones teórica (4.55) y experimental:

$$v = k_{\text{obs}} [\text{TYR}] [\text{NIT}] \quad (4.56)$$

se desprende inmediatamente que:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_a K_2 [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.57)$$

La ecuación 4.57 se ha ajustado en la forma:

$$k_{\text{obs}} = \frac{\alpha [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) (1 + \beta [\text{H}^+])} \quad (4.58)$$

obteniéndose los siguientes valores de α y β :

$$\alpha = 47 \pm 9 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$\beta = 7.800 \pm 700 \text{ M}^{-1}$$

pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,7	$4,264 \cdot 10^{-3}$	3,4	$1,618 \cdot 10^{-3}$
2,8	$4,106 \cdot 10^{-3}$	3,5	$1,361 \cdot 10^{-3}$
3,0	$3,193 \cdot 10^{-3}$	3,8	$7,44 \cdot 10^{-4}$
3,1	$2,740 \cdot 10^{-3}$	3,8	$7,73 \cdot 10^{-4}$
3,3	$2,017 \cdot 10^{-3}$	4,2	$3,92 \cdot 10^{-4}$

$$y = \frac{(47 \pm 9)(10^{-x})^2}{(10^{-x} + 6,65 \cdot 10^{-4})(1 + (7.800 \pm 700)10^{-x})} \quad (4.54)$$

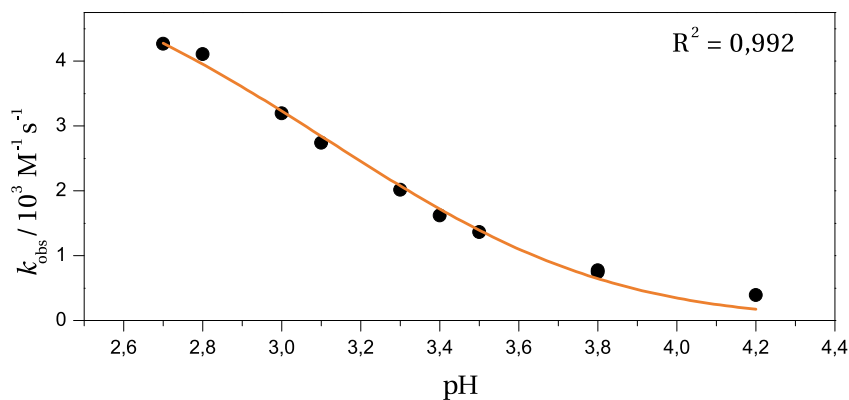
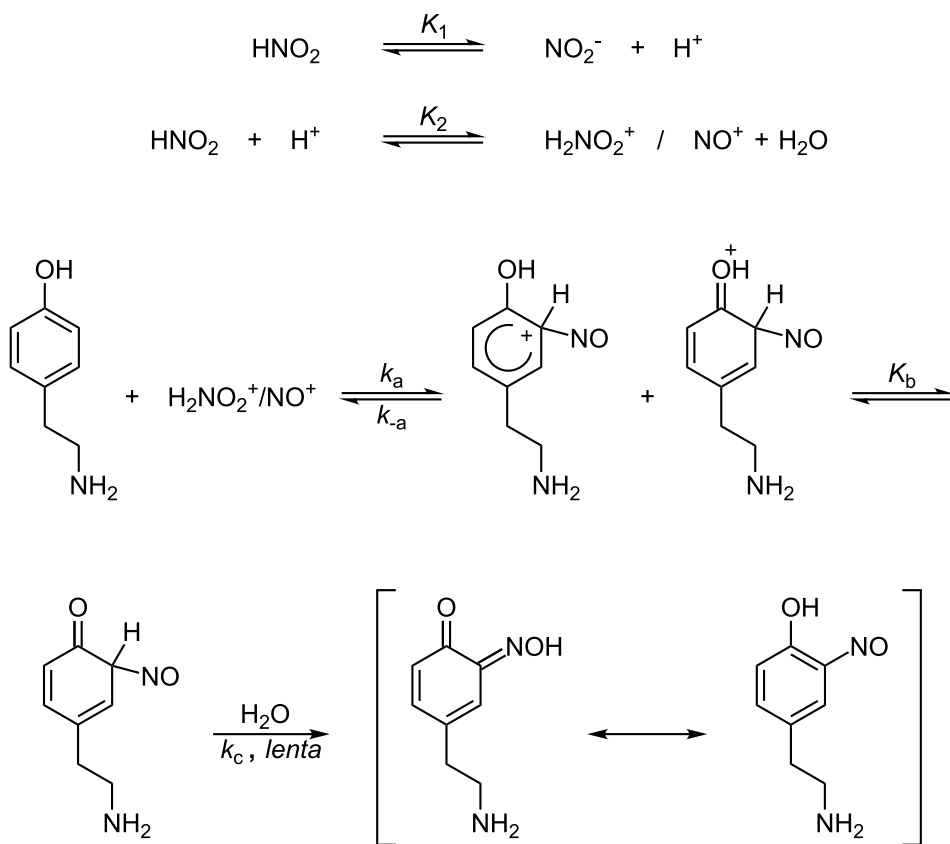


Tabla 4.14 y Figura 4.30: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad. $[\text{TYR}]_0 = 3 \cdot 10^{-4} - 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 3 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.



Esquema 4.2: Mecanismo propuesto para la nitrosación de la tiramina.

β corresponde al cociente $k_{-a}/K_b k_c$. Como el valor de K_2 se conoce ($K_2 = 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$),⁸¹ con el valor de α se ha calculado el de k_a :

$$k_a = (1,6 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Estos valores son del mismo orden que los obtenidos con otras moléculas que reaccionan con este mismo mecanismo (sección 5.1).

4.3.5. Influencia de la fuerza iónica

Se ha medido la velocidad de nitrosación de la tiramina con diferentes concentraciones de perclorato sódico, manteniendo constante el resto de variables para determinar la influencia de la fuerza iónica. La figura 4.31 recoge el resultado de aplicar la ecuación de Brønsted-Debye-Hückel (ecuación 3.11, página 120) a estos experimentos.

I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-1} s^{-1}$	I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-1} s^{-1}$
0,0234	$1,188 \cdot 10^{-3}$	0,1834	$1,170 \cdot 10^{-3}$
0,1059	$1,055 \cdot 10^{-3}$	0,2634	$1,162 \cdot 10^{-3}$
0,1434	$1,111 \cdot 10^{-3}$		

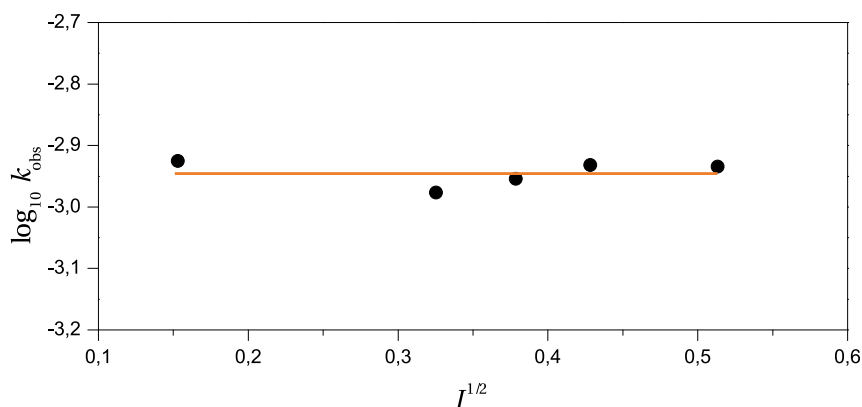


Tabla 4.15 y Figura 4.31: Influencia de la fuerza iónica en la constante de velocidad. $[TYR]_0 = 3 \cdot 10^{-4} - 3,0 \cdot 10^{-3} M$, $[NIT]_0 = 3 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2} M$, $pH = 3,4$, $T = 20,0 \text{ } ^\circ C$.

Se puede ver cómo la fuerza iónica no influye en la constante de velocidad de esta reacción. Esto concuerda con el mecanismo propuesto, en el que la etapa limitante es la ruptura del complejo σ o de Wheland.

4.3.6. Efecto isotópico cinético

Una consecuencia del mecanismo propuesto es que debido a que, la etapa limitante de la velocidad depende de la pérdida de un protón por parte del complejo de Wheland, la reacción debe mostrar un efecto isotópico cinético (sección 3.1.1.3, página 121). Para comprobar si este efecto se produce en la nitrosación de la tiramina se han preparado dos cinéticas a pH = 2,1, una realizada utilizando como disolvente agua y otra empleando agua pesada. A este pH ocurre que $(k_a/K_b k_c)[H^+] \gg 1$ y $[H^+] \gg K_1$, y así la ecuación 4.57 se simplifica de la siguiente manera:

$$k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}} = \frac{k_a^{\text{H}_2\text{O}} K_2^{\text{H}_2\text{O}} K_b^{\text{H}_2\text{O}} k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{-a}^{\text{H}_2\text{O}}} \quad (4.59)$$

El superíndice H_2O indica que esta ecuación está realizada en agua normal. Si utilizamos agua pesada, los deuterones del medio inmediatamente sustituirán a los protones de las moléculas que intervienen en la reacción, transformándose la ecuación anterior en:

$$k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}} = \frac{k_a^{\text{D}_2\text{O}} K_2^{\text{D}_2\text{O}} K_b^{\text{D}_2\text{O}} k_c^{\text{D}_2\text{O}}}{k_{-a}^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.60)$$

El cociente entre ambas ecuaciones nos permite calcular el efecto isotópico asociado a la reacción:

$$\frac{k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}}} = \frac{K_2^{\text{H}_2\text{O}} k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{K_2^{\text{D}_2\text{O}} k_c^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.61)$$

Algunos términos de la ecuación han desaparecido debido a que el efecto isotópico no afecta a las constantes de equilibrio sin participación de hidrógeno, luego $k_a^{\text{H}_2\text{O}}/k_{-a}^{\text{H}_2\text{O}} = k_a^{\text{D}_2\text{O}}/k_{-a}^{\text{D}_2\text{O}}$ y $K_b^{\text{H}_2\text{O}} = K_b^{\text{D}_2\text{O}}$.

Se ha llevado a cabo la cinética al pH indicado en H_2O y se ha obtenido una k_{obs} de $0,551 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A continuación se ha repetido el experimento en D_2O , donde la constante de velocidad ha sido $0,515 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Sabiendo que $K_2^{\text{D}_2\text{O}}/K_2^{\text{H}_2\text{O}}$ es 2,7 se obtiene un efecto isotópico de:²⁵⁷

$$\frac{k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{k_c^{\text{D}_2\text{O}}} = 2,91 \quad (4.62)$$

Este efecto isotópico es análogo al observado en la nitrosación de otros fenoles (sección 5.1, página 291).

4.3.7. Influencia de la temperatura

Midiendo la constante de velocidad a diferentes temperaturas se han calculado los parámetros de activación de la reacción de nitrosación de la tiramina. La tabla 4.16 muestra los resultados de los diferentes experimentos entre 20 y 40 °C.

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
20,0	$2,945 \cdot 10^{-3}$	30,0	$7,230 \cdot 10^{-3}$
22,5	$3,449 \cdot 10^{-3}$	32,5	$8,994 \cdot 10^{-3}$
25,0	$4,836 \cdot 10^{-3}$	35,0	$1,261 \cdot 10^{-2}$
27,5	$5,878 \cdot 10^{-3}$	40,0	$1,894 \cdot 10^{-2}$

Tabla 4.16: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad. $[\text{TYR}]_0 = 3 \cdot 10^{-4} - 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 3 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,1$.

Las figuras 4.32 y 4.33 muestran el buen ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones de Arrhenius y Eyring. A partir de ellas, se obtuvieron los siguientes valores para los parámetros de activación:

$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
73 ± 2	70 ± 2	-54 ± 8

Tabla 4.17: Parámetros de activación de la reacción de nitrosación de la tiramina a partir de los datos de la tabla 4.16.

$$y = (23,9 \pm 0,8) + (70 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.63)$$

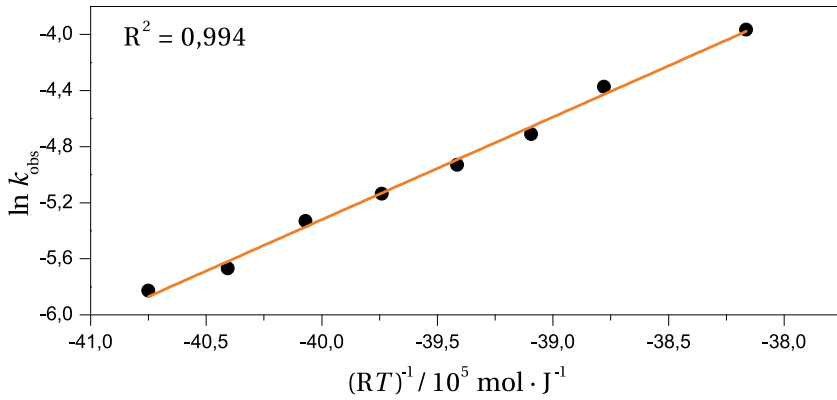


Figura 4.32: Cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por los resultados de la tabla 4.16.

$$y = (17 \pm 1) + (71 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.64)$$

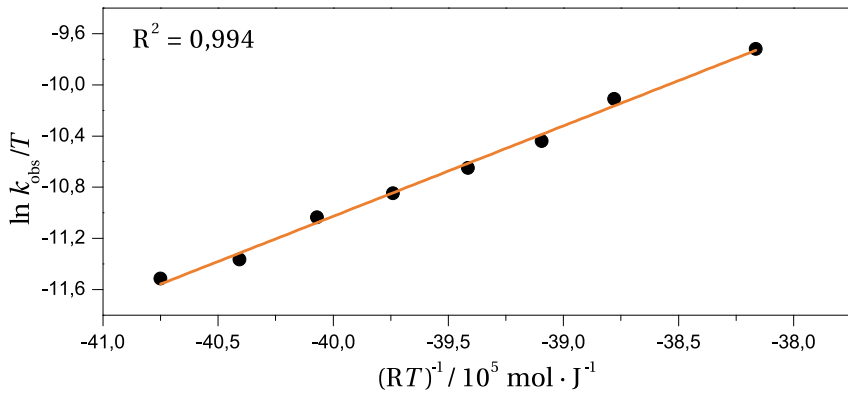


Figura 4.33: Cumplimiento de la ecuación de Eyring por los resultados de la tabla 4.16.

4.3.8. Estructura y reactividad de la tiramina

La figura 4.34 muestra la estructura optimizada mediante un cálculo *ab initio* (DFT-B3LYP 6-31+G (d,p)) de la tiramina. Para predecir la orientación preferida de la nitrosación se ha calculado, empleando el mismo método y la misma base, la superficie de densidad electrónica de la tiramina y la energía de los dos posibles complejos σ o de Wheland que pueden aparecer en la reacción entre el ácido nitroso y la tiramina.

La superficie de densidad electrónica (figura 4.35) muestra que la zona de mayor potencial negativo de la estructura es el alcohol (coloreado en rojo). Sin embargo, a la hora de ajustar los datos experimentales a un mecanismo, no se ha observado ninguna participación de este grupo funcional en la reacción de nitrosación, quizás porque la posición en *para* al alcohol está ocupada para sufrir una reacción de Fisher-Hepp (página 82). Las otras dos zonas con más densidad de carga negativa de la molécula y, por tanto, más nucleófilas son los átomos de carbono del anillo aromático y la amina. Se puede ver, que pese a la cercanía del hidrógeno altamente polarizado del alcohol, los átomos de carbono en *orto* muestran mayor densidad electrónica que los que se encuentran en la

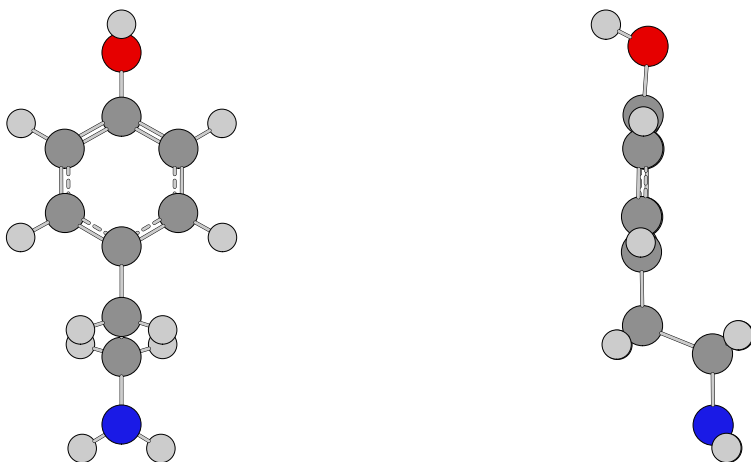


Figura 4.34: Estructura calculada de la tiramina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

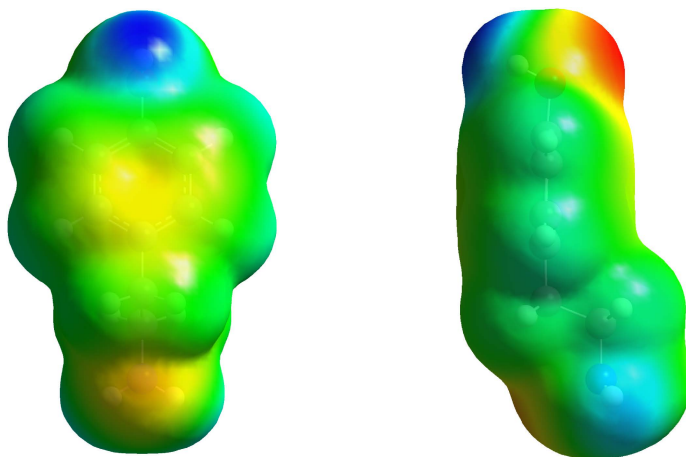


Figura 4.35: Mapa de densidad electrónica de la tiramina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

posición en *meta*.

La tiramina puede C-nitrosarse en dos posiciones diferentes debido a su simetría: en *orto* y en *meta*. Por medio de los cálculos descritos se ha estimado la estabilidad de los dos posibles complejos de Wheland sustituidos. La figura 4.36 muestra las diferencias de energía de cada uno de los compuestos, tomando como referencia la energía del sistema tiramina + ion nitrosonio. Se puede ver que el complejo de Wheland en *orto* es más estable que la tiramina nitrosada en la posición *meta*, por lo que, junto a la evidencia que se desprende del mapa de densidad electrónica, se puede afirmar que la nitrosación de la tiramina ocurrirá preferentemente en la posición *orto*, especialmente sabiendo que la etapa limitante de la velocidad es la ruptura del complejo.

4.3.9. Determinación del producto de reacción

Para caracterizar el producto de nitrosación de la tiramina se ha realizado un espectro de masas de una disolución acuosa y ácida de tiramina y nitrito tras un día de reacción.

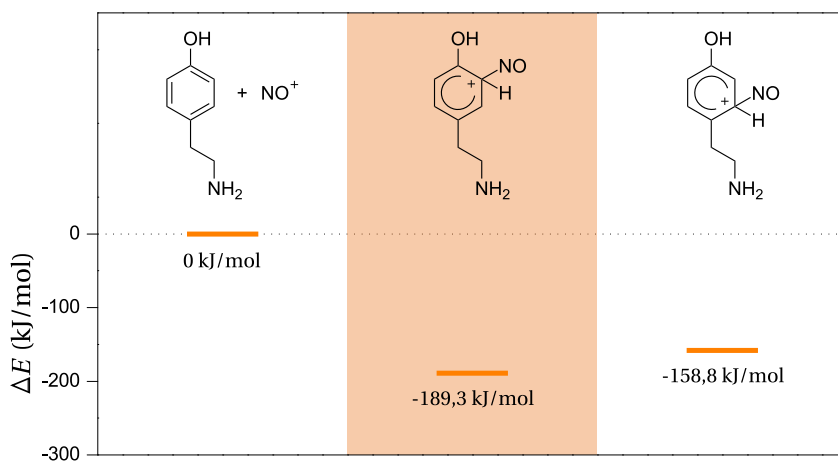


Figura 4.36: Diferencias de energía calculadas para los posibles complejos σ de la nitrosación de la tiramina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

El espectro obtenido (figura 4.37) muestra dos picos de gran intensidad. El primero, en $m/z = 138$ corresponde a la tirosina que aún no ha reaccionado. El segundo pico en 165,9, de abundancia relativa 100%, coincide con la tiramina nitrosada. Este espectro indica que la nitrosación se está produciendo principalmente en el anillo aromático de la estructura, puesto que las nitrosaminas primarias, aunque tienen la misma masa que el C-nitrosocompuesto, son inestables y no pueden aparecer en un pico tan intenso como el que muestra la figura 4.37.

Para estudiar el producto de nitrosación se añadió una disolución de sulfato de cobre (II) a la mezcla de reacción de nitrito y tiramina cuando la reacción de nitrosación había acabado, de tal forma que el cobre estuviese en exceso. El cambio de color producido en esta mezcla, tras dos días a temperatura ambiente, confirmó la presencia de tiramina nitrosada en *orto*, por la formación de un compuesto de coordinación con el cobre que no se produce con la tiramina sin nitrosar (esquema 4.3).

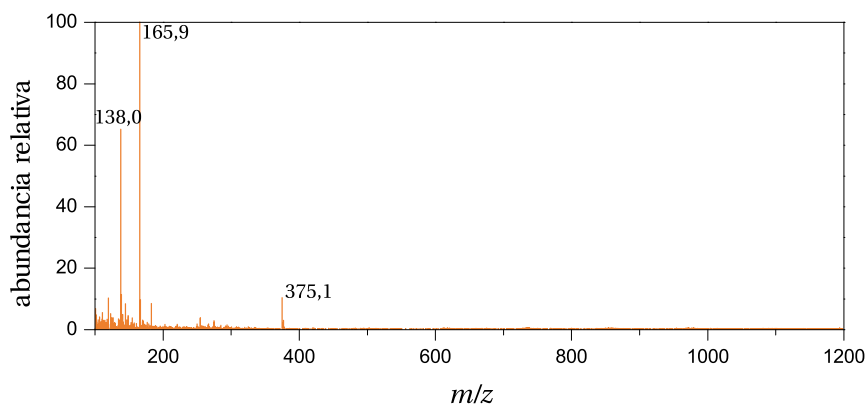
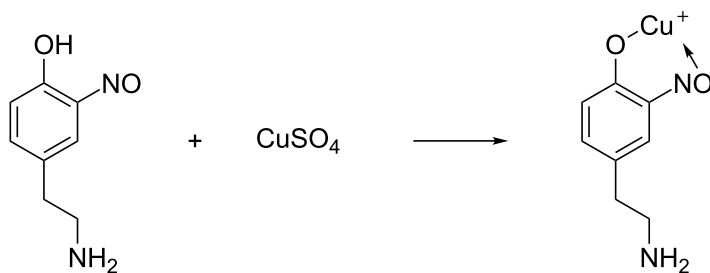


Figura 4.37: Espectro de masas por impacto electrónico positivo de la tiramina nitrosada.



Esquema 4.3: Reacción de complejación de la nitrosotiramina.

4.3.10. Actividad biológica de la nitrosotiramina

Test de Ames

La mutagenia de la nitrosotiramina se ha estudiado mediante el test de Ames en las cepas TA98 y TA100, en ausencia y presencia de complejo de activación metabólica S9 según se ha descrito antes (página 134). Las cantidades empleadas se han escogido de forma que aumenten logarítmicamente hasta la solubilidad máxima del nitrosocompuesto en DMSO. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 4.18 y se muestran representados en las figuras 4.38 para las bacterias TA98 y 4.39 para las bacterias TA100.

μg NTYR / placa	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
control negativo	14 \pm 2	25 \pm 1	203	81,5
6,8	13 \pm 1	24 \pm 2	203 \pm 6	84 \pm 2
17	14 \pm 1	21	210 \pm 20	94 \pm 6
68	17 \pm 1	25	396	141
170	17 \pm 1	28 \pm 1	438	240,5
680	42 \pm 2	39 \pm 4	620 \pm 90	400 \pm 10
control positivo	340 \pm 10	426	1.900 \pm 200	740 \pm 10

Tabla 4.18: Test de Ames aplicado a la nitrosotiramina. Controles positivos: TA98: 10 μg NPD, TA98 + S9: 2 μg 2AA, TA100: 0,6 μg 4NQO y TA100 + S9 2 μg 2AA.

En ambas cepas se observa que, al aumentar la dosis de nitrosotiramina, el número de colonias en cada placa se incrementa, indicando que existe una respuesta positiva en el test. Se aprecia que las bacterias de la cepa TA100 son más sensibles a la nitrosotiramina, puesto que muestran, a partir de dosis más bajas de compuesto, un aumento mayor de revertientes que en la cepa TA98. Esto es señal de que la nitrosotiramina actúa como un leve mutágeno que produce la sustitución de pares de bases en el código genético. El complejo S9 no ejerce una influencia significativa sobre las muestras.

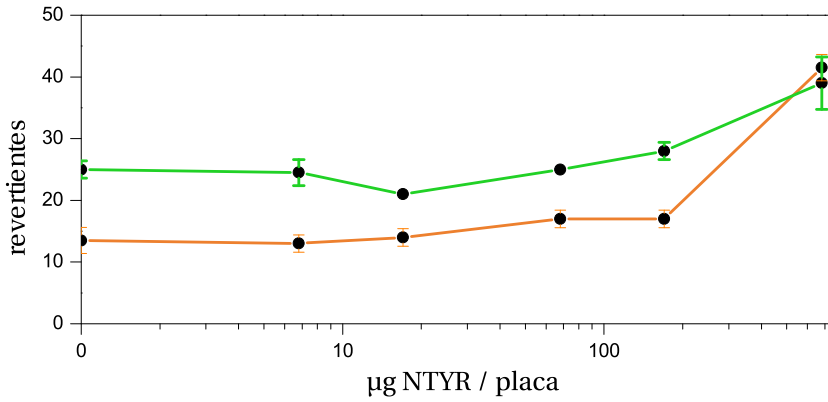


Figura 4.38: Resultados del Test de Ames con la cepa TA98 aplicado a la nitrosotiramina. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

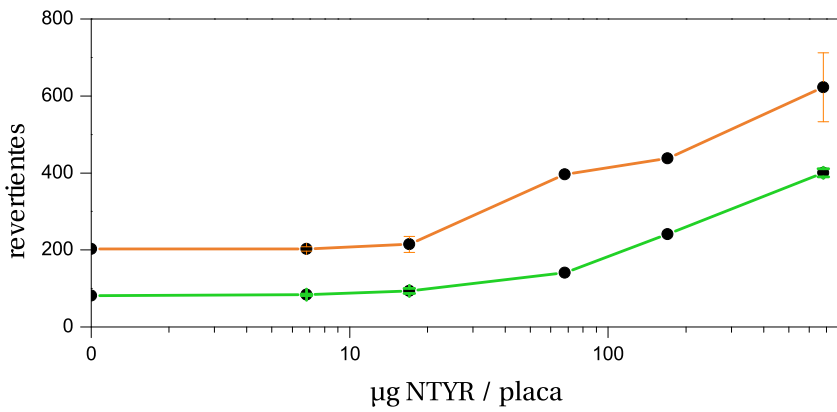


Figura 4.39: Resultados del Test de Ames con la cepa TA100 aplicado a la nitrosotiramina. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

Test de aberraciones cromosómicas

Para estudiar si la nitrosotiramina es un agente mutágeno que causa anomalías en los cromosomas de células eucariotas, se ha realizado el test de aberraciones cromosómicas según el procedimiento descrito en la página 139. La tabla 4.19 muestra el número de células con aberraciones cromosómicas según el tipo de aberración entre las 180 (60×3) células estudiadas para cada concentración.

[NTYR] / μM	CTG	CSG	CTB	CSB	ACENT	DIC
control negativo	0	0	0	0	0	0
4,1	0	0	0	0	0	0
41	1	0	0	0	0	1
410	1	0	0	0	0	0
4.100	Concentración tóxica para las células					
control positivo	8	4	28	14	0	0
[NTYR] / μM	TRI	TET	OTRO	RING	MA	% AC
control negativo	0	0	0	0	0	0
4,1	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	1
410	0	0	0	0	0	0
4.100	Concentración tóxica para las células					
control positivo	16	2	0	4	0	42

Tabla 4.19: Aberraciones cromosómicas inducidas por la nitrosotiramina en células eucariotas V-79. Las abreviaturas son: CTG, hueco en la cromátida; CSG, hueco en el cromosoma; CTB, ruptura en la cromátida; CSB, ruptura en el cromosoma; ACENT, fragmento acéntrico; DIC, cromosoma dicéntrico; TRI, cromosoma trirradial; TETRA, cromosoma tetrarradial, OTRO, otra aberración; RING, cromosoma anular; MA, metafase multiaberrante; % AC, % de células aberrantes, excluyendo CTG y CSG. Control positivo: MMC 1,5 μM .

Se puede ver que la nitrosotiramina muestra una pequeña respuesta en el test que, sin embargo, no se puede considerar significativa para calificar la molécula de genotóxica. La concentración más alta de nitrosocompuesto ha resultado ser tóxica para las células, por lo que no se ha podido comprobar la mutagenia de la nitrosotiramina en esa concentración.

Test del MTT

Se ha estudiado la citotoxicidad de la nitrosotiramina mediante el ensayo de proliferación celular MTT. Tras exponer durante 24 horas las células V-79 a distintas concentraciones del compuesto se ha medido la supervivencia de las células mediante el procedimiento descrito en la página 142. La figura 4.40 muestra el resultado de la experiencia.

Se puede comprobar que para las dosis empleadas de nitrosotiramina, la supervivencia celular ha sido alta. Sólo en las células expuestas a la disolución más concentrada de nitrosocompuesto, $2 \cdot 10^{-3}$ M, la citotoxicidad ha sido significativa, donde 1 de cada 5 células había muerto. Estos resultados concuerdan con los del test de aberraciones cromosómicas, donde la concentración más alta empleada ($4,1 \cdot 10^{-3}$ M) había provocado que muchas células de la lámina muriesen y no se pudiesen observar el suficiente número de células en la metafase para realizar el conteo de aberraciones.

	[NTYR] / μM	Supervivencia
a	62	(104 \pm 6) %
b	200	(95 \pm 11) %
c	615	(90 \pm 11) %
d	2.000	(83 \pm 9) %

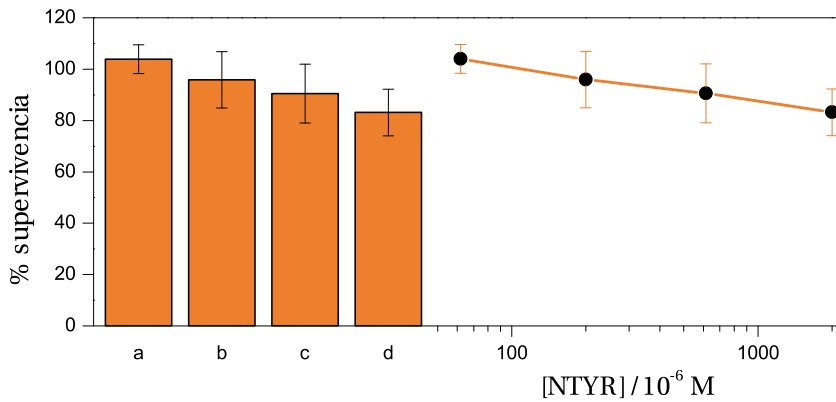


Tabla 4.20 y Figura 4.40: Supervivencia celular de V-79 en función de la concentración de nitrosotiramina.

4.4. Nitrosación de la dopamina

4.4.1. Estudio espectrofotométrico

Para el estudio cinético de la nitrosación de la dopamina (DOP) se ha empleado como reactivo hidrocloreuro de dopamina que es muy soluble en agua. Su espectro de absorción se muestra en la figura 4.41. La dopamina, al tener dos grupos que aportan densidad electrónica al anillo aromático, tiene las bandas de absorción menos energéticas de toda la serie de moléculas investigadas. Su banda de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida aparece entre 180 y 245 nm y $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida entre 255 y 300 nm. Esta última tiene un máximo en 279 nm donde se ha determinado el coeficiente de absorción molar (figura 4.42).

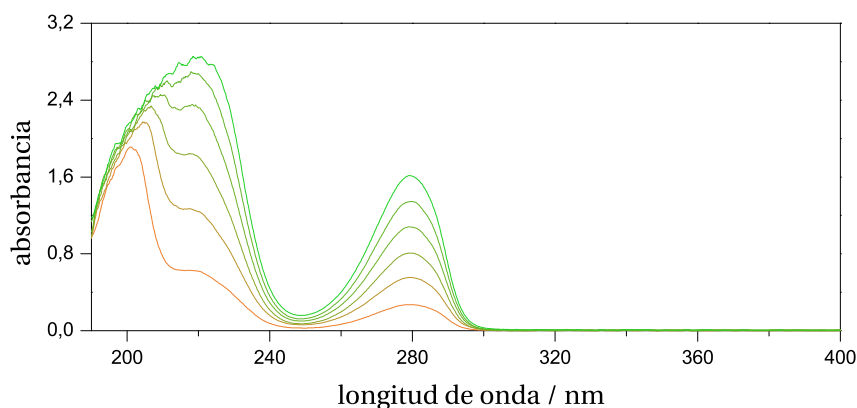


Figura 4.41: Espectro de absorción UV-visible de la dopamina. [DOP] = $1,0 \cdot 10^{-3}$ M - $6,0 \cdot 10^{-3}$ M, pH = 3,15, $T = 20,0$ °C.

La magnitud de su coeficiente de absorción molar

$$\epsilon_{\text{DOP}, 279 \text{ nm}} = 266 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

está en el intervalo de valores de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibidas.²⁴⁹

[DOP] / M	A_{279}	[DOP] / M	A_{279}
$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,2702	$4,0 \cdot 10^{-3}$	1,0802
$2,0 \cdot 10^{-3}$	0,5532	$5,0 \cdot 10^{-3}$	1,3421
$3,0 \cdot 10^{-3}$	0,8067	$6,0 \cdot 10^{-3}$	1,6133

$$y = (0,008 \pm 0,005) + (266 \pm 2)x \quad (4.65)$$

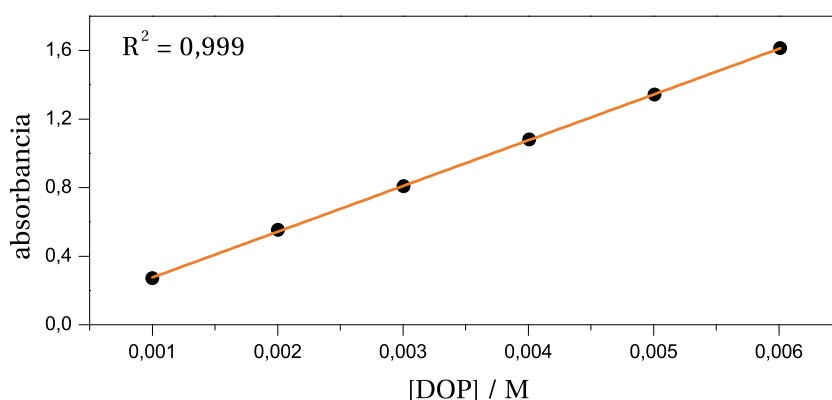


Tabla 4.21 y Figura 4.42: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la dopamina. $\lambda = 279$ nm, pH = 3,15, $T = 25,0$ °C.

No se ha podido estudiar la influencia del pH en el espectro de absorción de la dopamina porque este compuesto se degrada en medios básicos rápidamente.

4.4.2. Autooxidación de la dopamina

La dopamina se oxida rápidamente en disolución acuosa alcalina con el oxígeno de la atmósfera (figura 2.23, página 108). El polímero que se forma en esta reacción hace que el color de la disolución torne a un intenso color negro con destellos rojizos. La figura 4.43 muestra el espectro de absorción de una disolución de dopamina oxidada. Se puede ver cómo la banda de absorción es

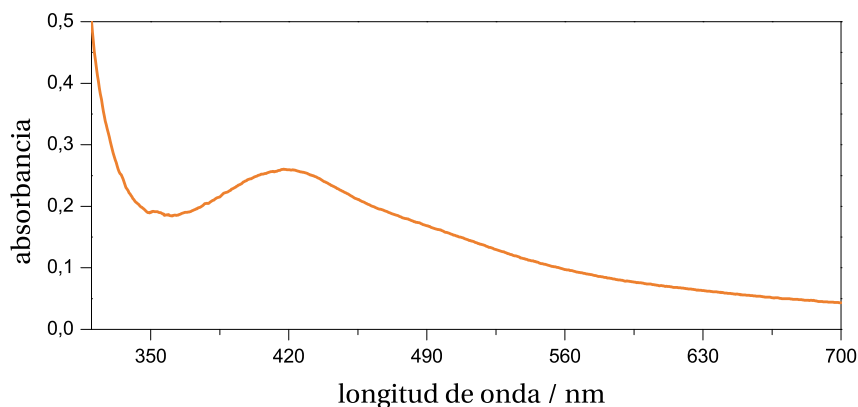


Figura 4.43: Espectro de absorción UV-visible de una disolución de dopamina 10 minutos después de su preparación. $[DOP] = 1,52 \cdot 10^{-2}$ M, $\text{pH} = 9,37$, $T = 20,0$ °C.

muy ancha, cubriendo todo el espectro visible, con un máximo sobre 420 nm, que con el tiempo se desplaza hasta 490 nm (figura 4.44), lo que justifica los colores descritos.

Se ha cuantificado la velocidad de autooxidación de la dopamina para ver hasta que punto podría afectar al seguimiento de la cinética de su nitrosación. Para ello se prepararon varias disoluciones de dopamina a pHs ácidos cercanos a la neutralidad. Se comprobó que sólo a partir de un $\text{pH} > 7,5$ la velocidad de autooxidación puede ser un inconveniente para el estudio cinético.

Las disoluciones de dopamina son ácidas debido a que se trabajó con su hidrocloreuro. Se hicieron ensayos con disoluciones de varias concentraciones a fin de seleccionar las de pH más idóneos para evitar la autooxidación de la dopamina. La figura 4.45 muestra que, a concentraciones superiores a 0,5 M, las disoluciones no requieren adición de ácido para su estabilización.

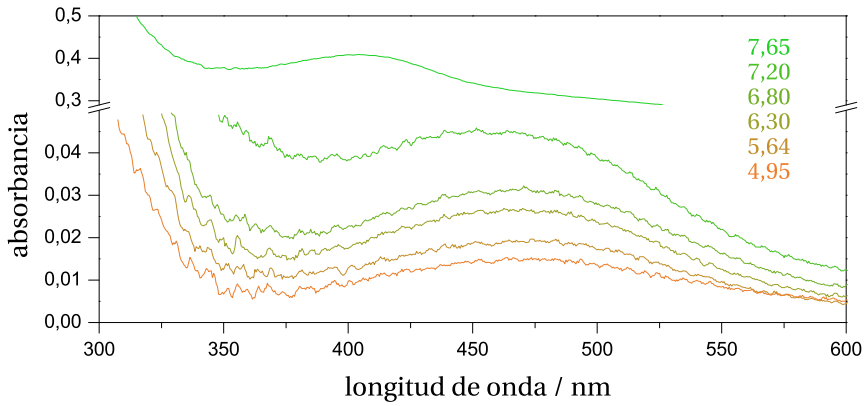


Figura 4.44: Espectros de absorción de la dopamina a diferentes pHs, 96 horas después de su preparación. El espectro a pH = 7,65 se midió 16 horas después de la preparación. $[DOP] = 5,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

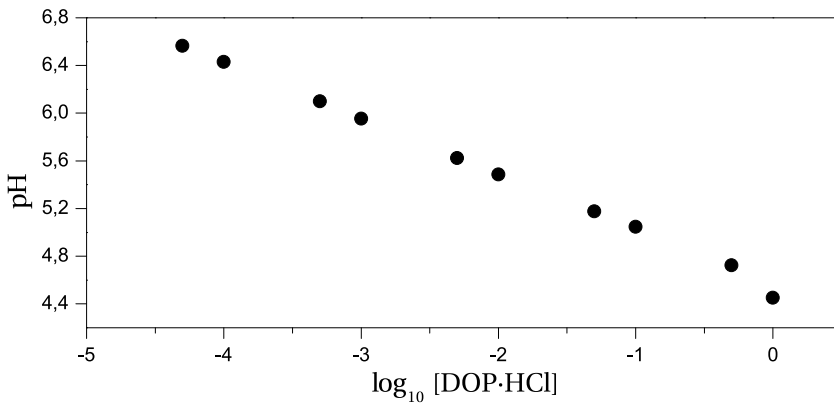


Figura 4.45: pH de diferentes disoluciones de hidrocloreto de dopamina en función de su concentración. $T = 23,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.4.3. Reacción de nitrosación de la dopamina

Después de estudiar el espectro de la dopamina se preparó una disolución ácida de nitrito sódico para comprobar que, al mezclarla con la dopamina, existe reacción de nitrosación y medir la absorción del producto resultante.

La figura 4.46 muestra cómo varían en el tiempo los espectros de absorción de la disolución mezcla. Se observa la aparición de una amplia banda con un máximo en 347 nm y de un pico mucho más estrecho en la zona de los 250 nm. Los picos de la dopamina apenas cambian de forma y tamaño.

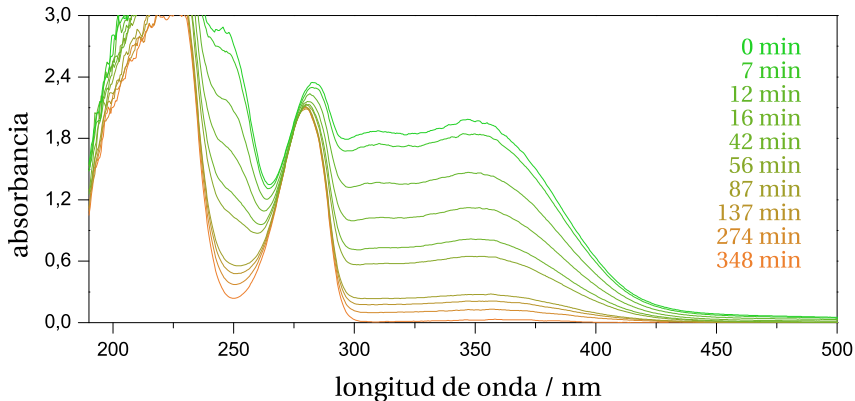


Figura 4.46: Variación con el tiempo del espectro de absorción de la dopamina durante su nitrosación. $[DOP] = [NIT] = 8 \cdot 10^{-3}$ M, pH = 4,08, $T = 25,0$ °C.

El máximo de la banda de absorción del producto de nitrosación en $\lambda = 347$ nm es idóneo para el seguimiento cinético de la reacción de nitrosación (la diferencia de absorbancia con el nitrito, cuyas bandas aparecen en esa zona, es grande).

Para medir el coeficiente de absorción molar de la nitrosodopamina en esa longitud de onda, se hizo reaccionar disoluciones de dopamina de diferentes concentraciones con un exceso de nitrito. Una vez alcanzada la meseta de saturación (toda la dopamina se ha convertido en nitrosodopamina) en cada

[NDOP] / M	A_{347}	[NDOP] / M	A_{347}
$3,51 \cdot 10^{-5}$	0,2179	$1,401 \cdot 10^{-4}$	0,7524
$7,03 \cdot 10^{-5}$	0,4288	$1,757 \cdot 10^{-4}$	0,9655
$1,054 \cdot 10^{-4}$	0,5912	$2,109 \cdot 10^{-4}$	1,1600

$$y = (0,04 \pm 0,01) + (5.200 \pm 100)x \quad (4.66)$$

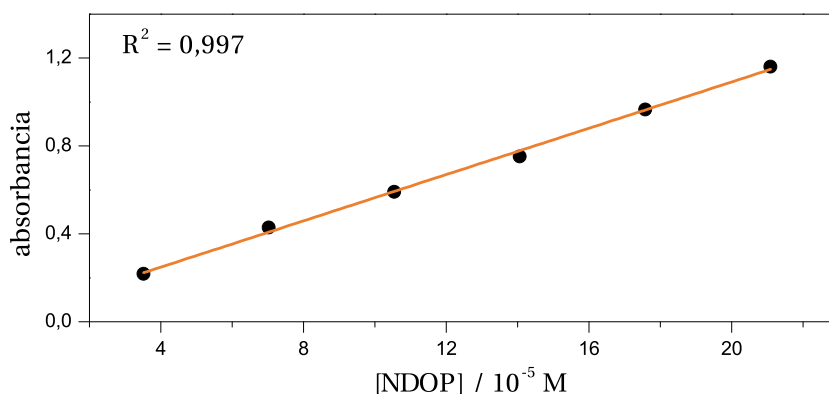


Tabla 4.22 y Figura 4.47: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la nitrosodopamina. $\lambda = 347$ nm, $[\text{NIT}] = 5,2 \cdot 10^{-2}$ M, $\text{pH} = 4,16$, $T = 25,0$ °C.

uno de esos casos, los valores de las absorbancias se representaban frente a las respectivas concentraciones (figura 4.47), encontrándose así que:

$$\epsilon_{\text{NDOP}, 347 \text{ nm}} = 5.200 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

4.4.4. Influencia de la concentración de iones cloruro

Como se indicó en la sección 2.2.3, los iones cloruro catalizan la reacción de nitrosación a través de la formación de cloruro de nitrosilo. Hasta ahora se ha evitado la presencia de este ion o cualquier otro agente catalizador en los

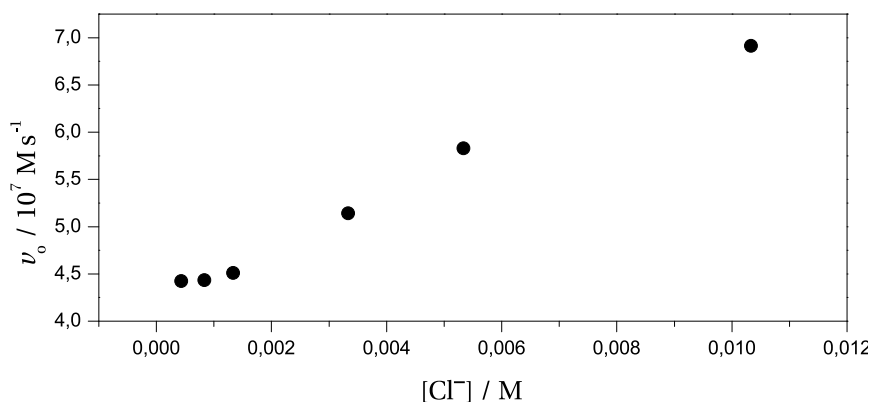


Figura 4.48: Influencia de la concentración de iones cloruro en la velocidad inicial de reacción. $[\text{DOP}]_0 = 3,33 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}]_0 = 6,03 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,08$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

estudios cinéticos pero, debido al uso de dopamina en forma de hidrocloruro, en esta cinética de nitrosación puede que exista catálisis.

Para estudiar la influencia del ion cloruro en la reacción, se hicieron varias cinéticas con diferentes concentraciones de cloruro añadido en forma de cloruro sódico.

La figura 4.48 muestra el resultado de este experimento. Se puede ver que el aumento de velocidad sólo es significativo en concentraciones de cloruro superiores a $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Como la concentración de dopamina y, por ende, de cloruro en las cinéticas de este trabajo se encuentran por debajo de esta cantidad, se ha despreciado el efecto que puede tener este en los estudios cinéticos.

4.4.5. Órdenes parciales de reacción

Para averiguar los órdenes de reacción parciales se utilizó el método de velocidades iniciales. Se trabajó siempre en las mismas condiciones de pH y de fuerza iónica. Para determinar el orden parcial respecto a la concentración de dopamina, se prepararon seis disoluciones de concentraciones diferentes, mantenida constante la concentración de nitrito. La figura 4.49 muestra el buen

ajuste de los resultados a la ecuación:

$$\ln v_o = \ln p + m \ln[\text{DOP}]_o \quad (4.67)$$

el valor de cuya pendiente $m = 1,02 \pm 0,04$, indica orden uno de reacción.

De igual forma, variando las concentraciones de nitrito y mantenida constante la concentración de dopamina se calculó el orden parcial respecto a la concentración de nitrito, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\ln v_o = \ln q + n \ln[\text{NIT}]_o \quad (4.68)$$

La figura 4.50 muestra la aplicación de esta ecuación a los resultados experimentales. La pendiente de esta recta, que corresponde al orden parcial del nitrito, n , es uno.

4.4.6. Influencia de la acidez del medio

Se midió la constante de velocidad en varios experimentos en los que se mantuvieron constantes todos los parámetros cinéticos, excepto el pH. La figura 4.51 muestra las constantes de velocidad según la acidez del medio. La forma de curva sigmoidea hace pensar que la dopamina sigue el mismo mecanismo que la tiramina, lo que sugiere un mecanismo equivalente (esquema 4.4).

La ecuación teórica de velocidad que se deduce de dicho mecanismo es:

$$v = \frac{K_2 k_a [\text{H}^+]^2 [\text{NIT}] [\text{DOP}]}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.72)$$

Este mecanismo concuerda con los órdenes parciales y el orden total de reacción que determinados con anterioridad. Al comparar la ecuación de velocidad teórica (4.72) con la experimental:

$$v = k_{\text{obs}} [\text{NIT}] [\text{DOP}] \quad (4.73)$$

se obtiene que:

$$k_{\text{obs}} = \frac{K_2 k_a [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.74)$$

$[\text{DOP}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$	$[\text{DOP}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$
$5,98 \cdot 10^{-5}$	$9,37 \cdot 10^{-9}$	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-8}$
$7,98 \cdot 10^{-5}$	$1,24 \cdot 10^{-8}$	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$2,57 \cdot 10^{-8}$
$9,97 \cdot 10^{-5}$	$1,60 \cdot 10^{-8}$	$1,99 \cdot 10^{-4}$	$3,19 \cdot 10^{-8}$

$$y = -(8,5 \pm 0,3) + (1,02 \pm 0,04)x \quad (4.69)$$

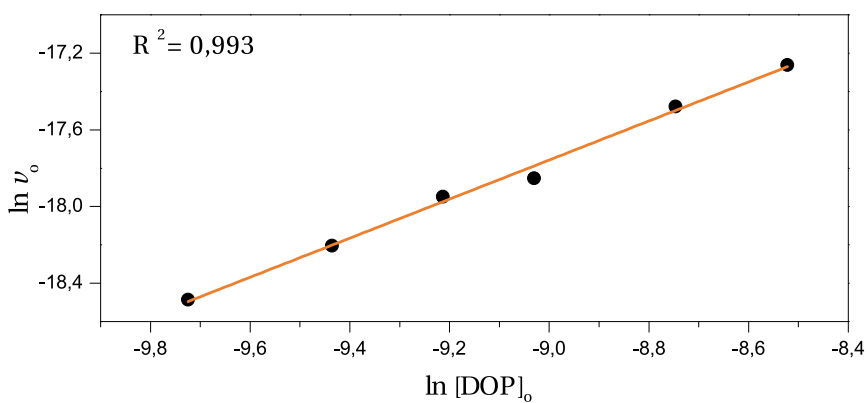


Tabla 4.23 y Figura 4.49: Influencia de la concentración de dopamina en la velocidad inicial de nitrosación. $[\text{NIT}]_0 = 1,20 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,01$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$[\text{NIT}]_0 / \text{M}$	$v_0 / \text{M s}^{-1}$	$[\text{NIT}]_0 / \text{M}$	$v_0 / \text{M s}^{-1}$
$1,66 \cdot 10^{-4}$	$3,37 \cdot 10^{-8}$	$3,31 \cdot 10^{-4}$	$7,05 \cdot 10^{-8}$
$2,08 \cdot 10^{-4}$	$4,18 \cdot 10^{-8}$	$4,15 \cdot 10^{-4}$	$8,22 \cdot 10^{-8}$
$2,49 \cdot 10^{-4}$	$5,13 \cdot 10^{-8}$		

$$y = -(8,4 \pm 0,3) + (1,00 \pm 0,04)x \quad (4.70)$$

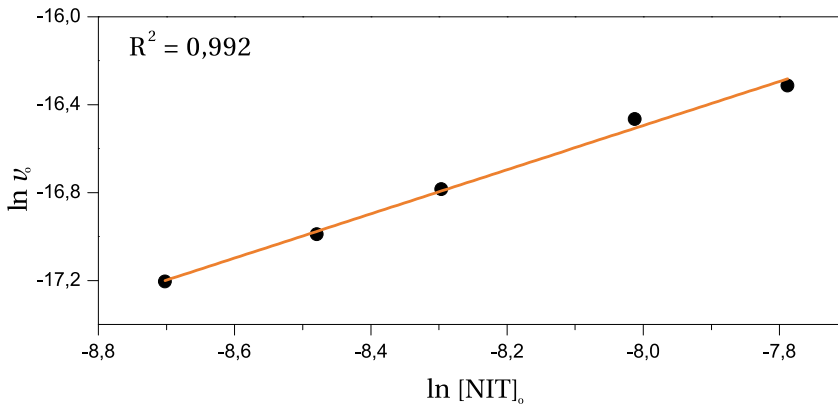


Tabla 4.24 y Figura 4.50: Influencia de la concentración de nitrito en la velocidad inicial de reacción. $[\text{DOP}]_0 = 1,32 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,98$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,6	0,3218	3,5	0,0869
2,8	0,2625	3,7	0,0328
3,0	0,1998	3,9	0,0115
3,1	0,1677	4,0	0,0046
3,3	0,0991	4,1	0,0017

$$y = \frac{(1.100 \pm 100)(10^{-x})^2}{(10^{-x} + 6,65 \cdot 10^{-4})(1 + (2.400 \pm 400)10^{-x})} \quad (4.71)$$

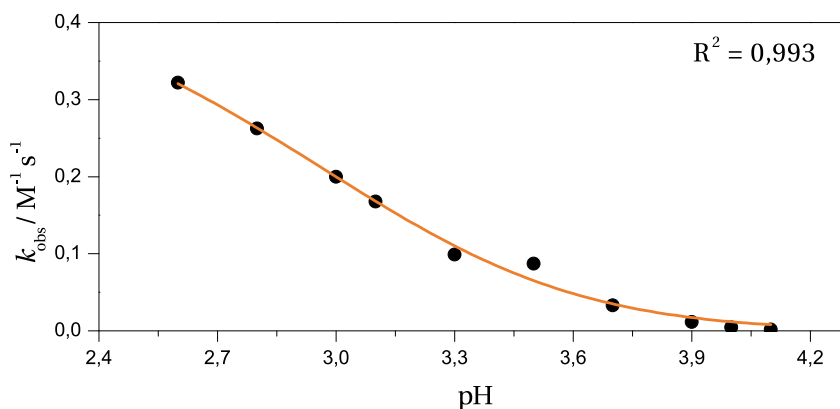


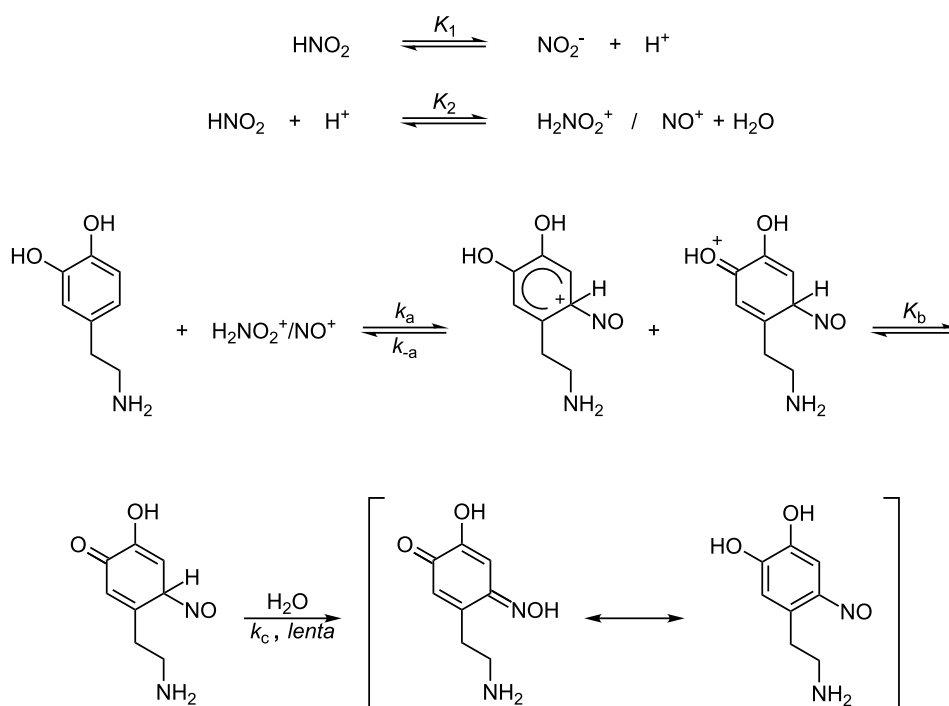
Tabla 4.25 y Figura 4.51: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad. $[\text{DOP}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4} - 2,02 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

La figura 4.51 muestra el ajuste de esta ecuación a los datos experimentales. Como con la tiramina, con él se han determinado los parámetros α y β :

$$k_{\text{obs}} = \frac{\alpha[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1)(1 + \beta[\text{H}^+])} \quad (4.75)$$

Por mínimos cuadrados se ha calculado que:

$$\alpha = 1.100 \pm 100 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$$



Esquema 4.4: Mecanismo propuesto para la nitrosación de la dopamina.

$$\beta = 2.400 \pm 400 \text{ M}^{-1}$$

Se observa un valor de β inferior al de la tiramina y dos órdenes de magnitud mayor para α . Como $K_2 = 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, resulta que:⁸¹

$$k_a = (3,66 \pm 0,03) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Este valor es coherente con un ataque del ion nitrosonio/nitrosacido a la dopamina controlado por difusión. En la sección 5.1 se discuten estos resultados.

4.4.7. Influencia de la fuerza iónica

La figura 4.52 muestra los resultados de experimentos cinéticos con la fuerza iónica como variable. La no influencia de la misma, sugiere que en la etapa determinante de velocidad no intervienen especies con carga.

I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-1} s^{-1}$	I / M	$k_{\text{obs}} / M^{-1} s^{-1}$
0,003	$6,852 \cdot 10^{-3}$	0,205	$4,625 \cdot 10^{-3}$
0,060	$5,148 \cdot 10^{-3}$	0,401	$5,291 \cdot 10^{-3}$
0,099	$7,145 \cdot 10^{-3}$		

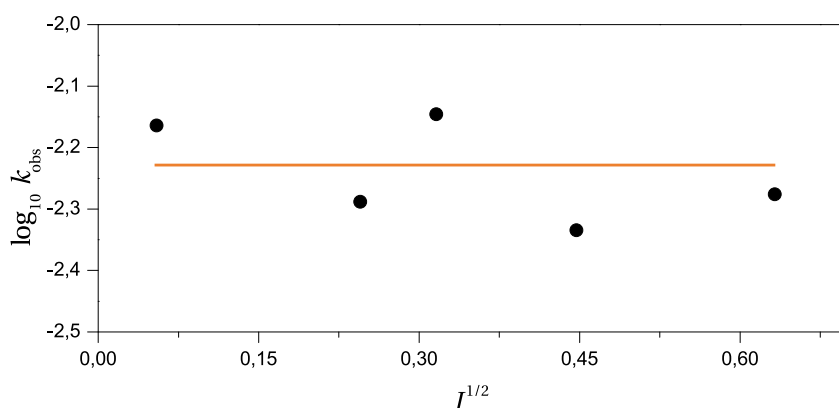


Tabla 4.26 y Figura 4.52: Influencia de la fuerza iónica en la constante de velocidad. $[\text{DOP}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4} - 2,02 \cdot 10^{-3} M$, $\text{pH} = 4,1$, $T = 20,0 \text{ } ^\circ\text{C}$.

4.4.8. Efecto isotópico cinético

Con objeto de verificar el mecanismo propuesto (figura 4.4), que incluye como etapa limitante una transferencia protónica con ruptura del complejo sigma, se programaron experimentos cinéticos paralelos en H_2O y D_2O para comprobar la existencia de un efecto cinético isotópico.

Se trabajó a pH muy ácido, de modo que $(k_a/K_b k_c)[\text{H}^+] \gg 1$ y $[\text{H}^+] \gg K_1$, lo

que implica que la ecuación 4.74 se simplifica en la forma:

$$\frac{k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}}} = \frac{K_2^{\text{H}_2\text{O}}}{K_2^{\text{D}_2\text{O}}} \frac{k_{\text{c}}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{c}}^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.76)$$

A pH = 2,1, los valores de la constante de velocidad $k_{\text{c}}^{\text{H}_2\text{O}} = 0,4202 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{c}}^{\text{D}_2\text{O}} = 0,3264 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como $K_2^{\text{D}_2\text{O}}/K_2^{\text{H}_2\text{O}}$ se conoce (página 188), resulta que:

$$\frac{k_{\text{c}}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{c}}^{\text{D}_2\text{O}}} = 3,47 \quad (4.77)$$

lo que apoya el mecanismo propuesto.

4.4.9. Influencia de la temperatura

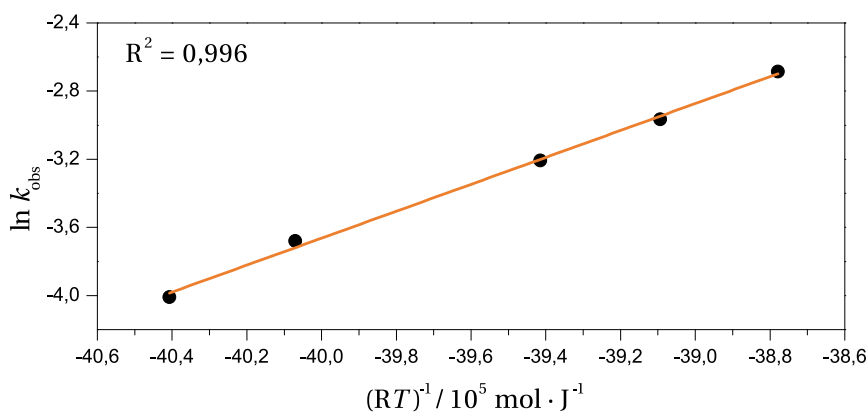
Como en el caso de la fenetilamina (sección 4.2.9) y tiramina (sección 4.3.7) se estudió la influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad k_{obs} . Se trabajó en el intervalo $T = 22,5$ y $35,0$ °C en las condiciones que se indican en la tabla 4.27.

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
22,5	$1,812 \cdot 10^{-2}$	32,5	$5,149 \cdot 10^{-2}$
25,0	$2,523 \cdot 10^{-2}$	35,0	$6,811 \cdot 10^{-2}$
30,0	$4,048 \cdot 10^{-2}$		

Tabla 4.27: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad. $[\text{DOP}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 6,0 \cdot 10^{-4} - 2,01 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, pH = 3,76, $I = 0,2 \text{ M}$

Como muestra la figura 4.53, los resultados se ajustan bien a las ecuaciones de Arrhenius y Eyring. Se obtuvieron los siguientes valores para los parámetros de activación.

$$y = (27 \pm 1) + (79 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.78)$$



$$y = (21 \pm 1) + (76 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.79)$$

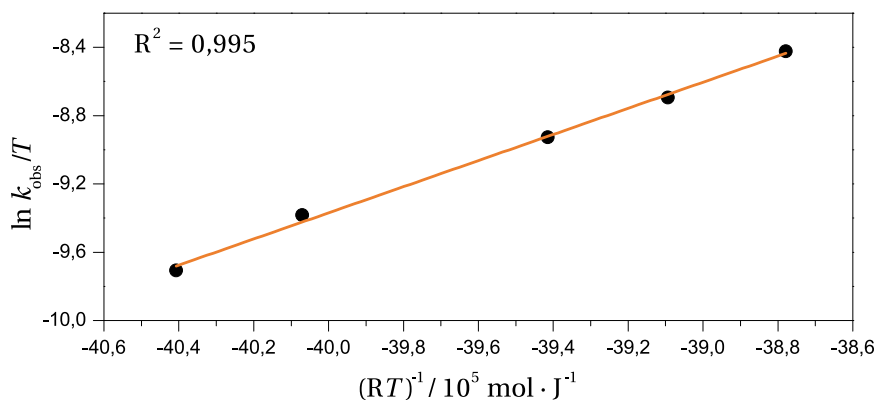


Figura 4.53: Cumplimiento de las ecuaciones de Arrhenius (gráfica superior) y Eyring por los resultados de la tabla 4.27.

$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
79 ± 2	76 ± 2	-20 ± 8

Tabla 4.28: Parámetros de activación de la reacción de nitrosación de la dopamina a partir de los datos de la tabla 4.16

4.4.10. Estructura y reactividad de la dopamina

De igual modo que con la tiramina (página 191), se ha optimizado mediante cálculos *ab initio* (DFT-B3LYP 6-31+G (d,p)) la estructura de la dopamina (figura 4.54) para determinar a continuación el mapa de densidad electrónica de la molécula (figura 4.55) con el fin de estimar la posición más favorable para la nitrosación.

Como puede observarse en la figura 4.55, de las tres posiciones en las que se puede nitrosar la dopamina, la que tiene mayor densidad electrónica es el carbono 5 del anillo aromático, situado en posición *orto* respecto a la cadena lateral del aminoetilo, posición *para* respecto al alcohol del carbono 2 y posición *meta* con el alcohol del carbono 1.

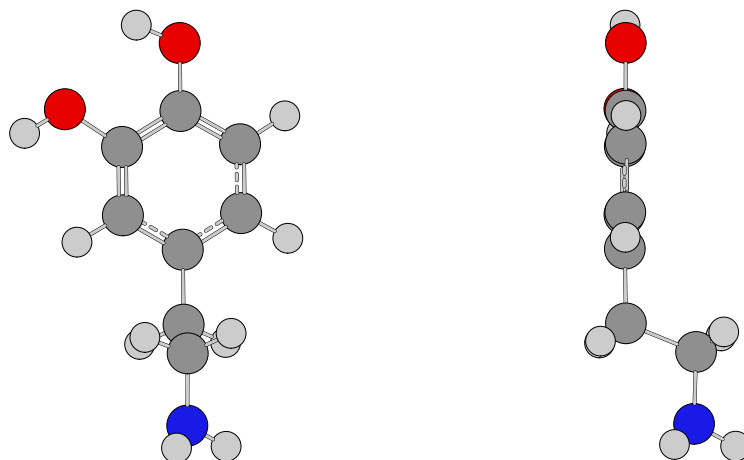


Figura 4.54: Estructura calculada de la dopamina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

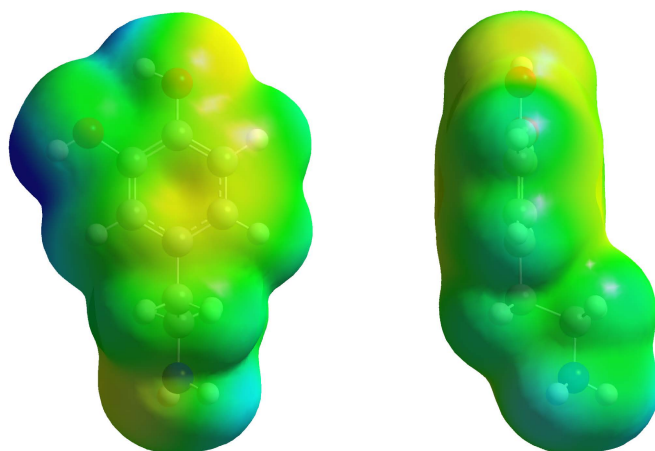


Figura 4.55: Mapa de densidad electrónica de la dopamina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

También se calculó qué complejo de Wheland de los tres posibles es el más estable, tomando como referencia la energía de las moléculas de dopamina y del ion nitrosonio. La figura 4.56 muestra que también la posición 5 es la más favorecida, ya que su complejo σ es el de menor energía, por lo que es de esperar que la nitrosación de la dopamina se produzca mayoritariamente en esta posición.

4.4.11. Determinación del producto de reacción

Mediante espectrometría de masas se ha determinado el producto de la reacción de nitrosación de la dopamina. La figura 4.57 muestra el espectro de masas realizado a una mezcla de dopamina y nitrito sódico tras 24 horas de reacción. Se puede ver cómo el producto mayoritario de la reacción coincide con el peso de la dopamina nitrosada ($m/z = 182,1$). Los picos restantes se deben a impurezas puesto que no se pueden asociar a la masa de ningún reactivo ni producto, ni a ningún fragmento de los mismos. No aparece el pico de masa-carga asociado a la masa de la dopamina, 153,08 g/mol, de lo que se deducen dos cosas: en primer lugar, que toda la dopamina ha reaccionado; y en segundo lugar, que la

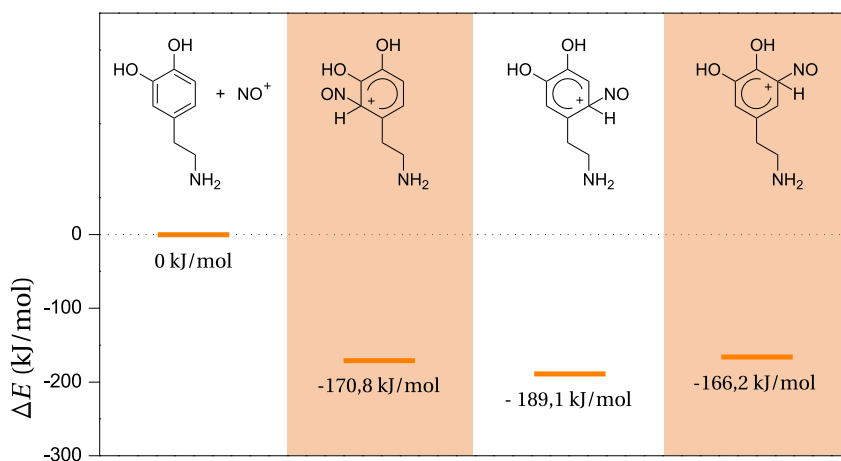


Figura 4.56: Diferencias de energía calculadas para los posibles complejos σ de la nitrosación de la dopamina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

reacción de N-nitrosación es despreciable puesto que en esa misma relación masa/carga se encontraría el alcohol producido en esta clase de nitrosaciones.

4.4.12. Actividad biológica de la nitrosodopamina

Test de Ames

Mediante el test de Ames se ha estudiado si la nitrosodopamina sintetizada es un compuesto mutágeno. Se han utilizado las cepas TA98 y TA100, en ausencia y presencia de complejo de activación metabólica S9 según se ha descrito en la página 134. Los resultados que se muestran en la tabla 4.29 y representados en las figuras 4.58 y 4.59 apuntan a que la nitrosodopamina no tiene propiedades mutagénicas. En la figura 4.58 se puede ver cómo en el test de Ames para TA98 sin activación aparece un punto sobre 30 μg de nitrosodopamina por placa que puede ser significativo y representar una dosis mutagénica. Se ha repetido el test de Ames en las mismas condiciones y con unas dosis cercanas a las de ese

punto para refutar esta suposición. El resultado de este experimento se muestra en la tabla 4.30 y la figura 4.60, donde se puede ver que la nitrosodopamina, en ese intervalo de dosis, no tiene una respuesta significativa para el test de Ames.

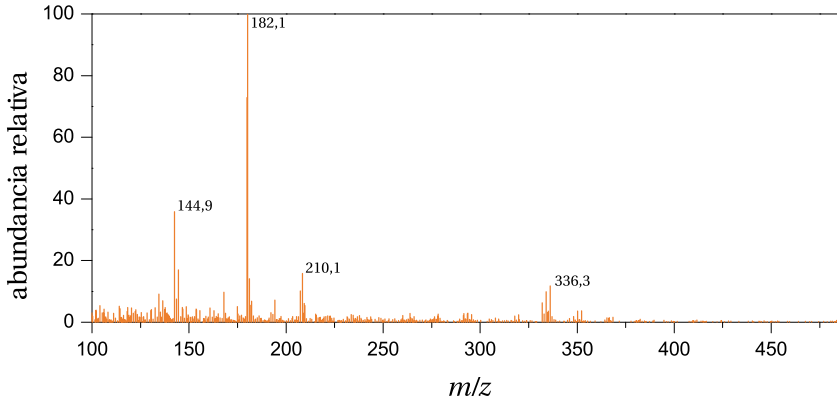


Figura 4.57: Espectro de masas por impacto electrónico positivo de la dopamina nitrosada.

$\mu\text{g NDOP / placa}$	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
control negativo	12 ± 2	28 ± 2	194 ± 9	80 ± 10
10	17	29 ± 0	197 ± 16	79 ± 2
30	24	28 ± 2	200 ± 27	80 ± 4
100	18	29	175	75
300	18 ± 4	28 ± 2	203	82
1000	19 ± 0	31 ± 4	170 ± 5	79 ± 6
control positivo	404 ± 2	426	1.209	740 ± 10

Tabla 4.29: Resultados del test de Ames aplicado a la nitrosodopamina. Controles positivos: TA98: 10 μg NPD, TA98 + S9: 2 μg 2AA, TA100: 0,3 μg 4NQO y TA100 + S9 2 μg 2AA.

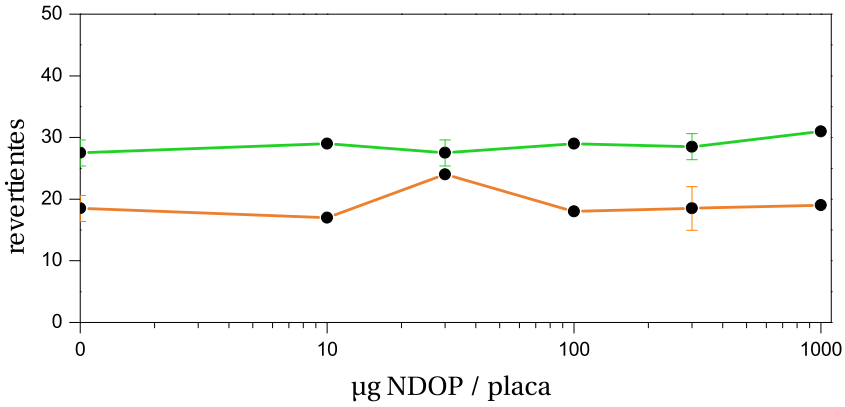


Figura 4.58: Test de Ames de la nitrosodopamina TA98. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

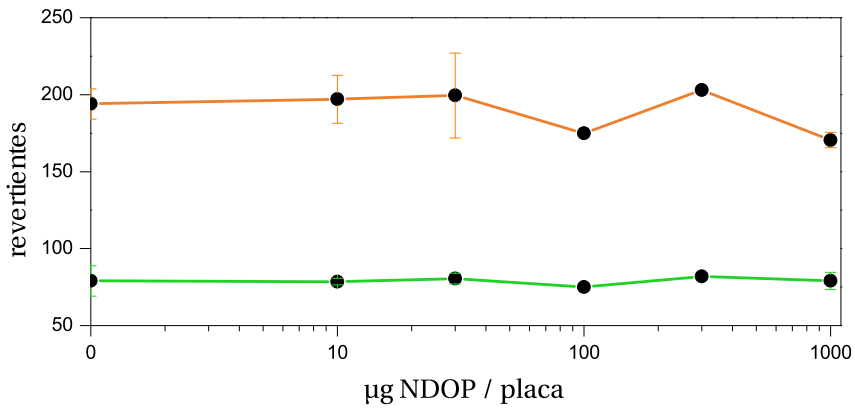


Figura 4.59: Test de Ames de la nitrosodopamina TA100. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

$\mu\text{g NDOP / placa}$	TA98
control negativo	$17,5 \pm 0,7$
20	17
40	20
60	19
80	18 ± 1
control positivo	365

Tabla 4.30: Test de Ames de la nitrosodopamina. Control positivo: TA98: 10 $\mu\text{g NPD}$.

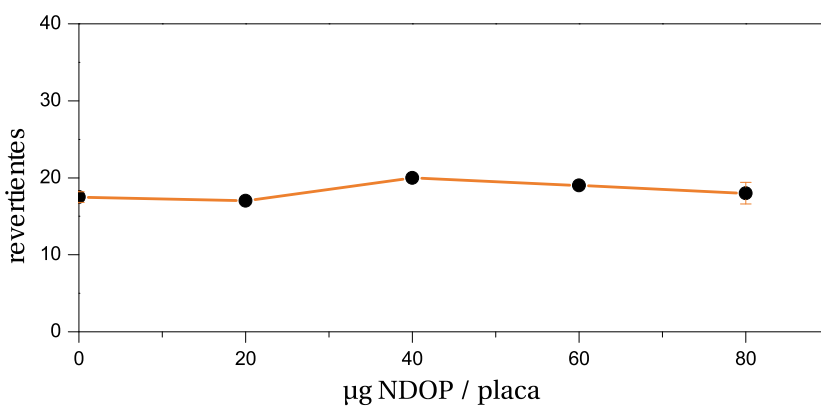


Figura 4.60: Test de Ames de la nitrosodopamina TA98.

Test de aberraciones cromosómicas

En la tabla 4.31 se puede ver cómo la nitrosodopamina ha sido incapaz de crear alguna aberración cromosómica en las células V-79 tras seguir el procedimiento descrito en la página 139. Esto quiere decir que la nitrosodopamina no es un compuesto genotóxico, al menos hasta la concentración que la solubilidad del compuesto en DMSO ha permitido medir ($5,5 \cdot 10^{-3}$ M).

[NDOP] / μ M	CTG	CSG	CTB	CSB	ACENT	DIC
control negativo	0	0	0	0	0	0
5,5	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0
5.500	Concentración tóxica para las células					
control positivo	8	4	28	14	0	0

[NDOP] / μ M	TRI	TET	OTRO	RING	MA	% AC
control negativo	0	0	0	0	0	0
5,5	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0
5.500	Concentración tóxica para las células					
control positivo	16	2	0	4	0	42

Tabla 4.31: Aberraciones cromosómicas inducidas por la nitrosodopamina en células eucariotas V-79. Las abreviaturas son: CTG, hueco en la cromátida; CSG, hueco en el cromosoma; CTB, ruptura en la cromátida; CSB, ruptura en el cromosoma; ACENT, fragmento acéntrico; DIC, cromosoma dicéntrico; TRI, cromosoma trirradial; TETRA, cromosoma tetrarradial, OTRO, otra aberración; RING, cromosoma anular; MA, metafase multiaberrante; % AC, % de células aberrantes, excluyendo CTG y CSG. Control positivo: MMC 1,5 μ M.

Test del MTT

La figura 4.61 muestra la supervivencia de las células V-79 tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de nitrosocompuesto. Se puede ver que este compuesto es más citotóxico que la nitrosotiramina, ya que a concentraciones similares de compuesto, la nitrosodopamina puede provocar la muerte en el 40% de las células del frasco. Gracias a los datos obtenidos ha sido posible calcular extrapolando la concentración que mataría a la mitad de las células del experimento, denominada concentración inhibitoria media (IC_{50}). Para la nitrosodopamina, en estas condiciones, el valor aproximado de IC_{50} es $3,4 \cdot 10^{-3}$ M.

	[NDOP] / μ M	Supervivencia
a	82,5	(102 \pm 4) %
b	275	(97 \pm 6) %
c	825	(85 \pm 8) %
d	2.800	(60 \pm 5) %

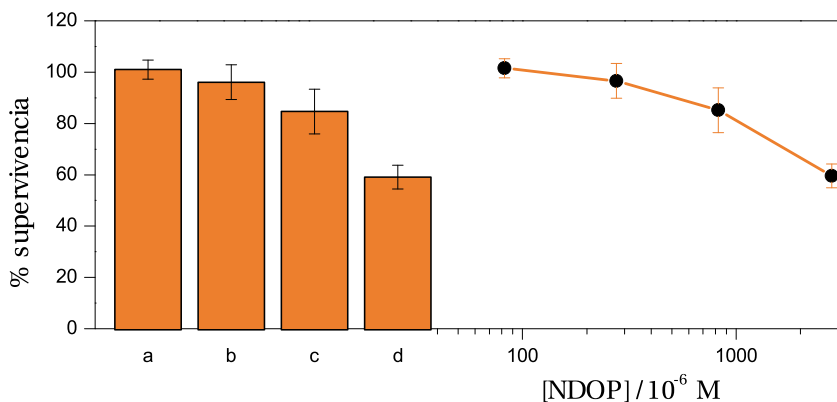


Tabla 4.32 y Figura 4.61: Supervivencia celular de V-79 en función de la concentración de nitrosodopamina.

4.5. Nitrosación de la serotonina

4.5.1. Estudio espectrofotométrico

El hidrocloreuro de serotonina es la forma comercial de este neurotransmisor. Se ha comprobado que su solubilidad es muy adecuada para un estudio cinético de nitrosación. La figura 4.62 muestra los espectros de absorción de diferentes concentraciones de este compuesto.

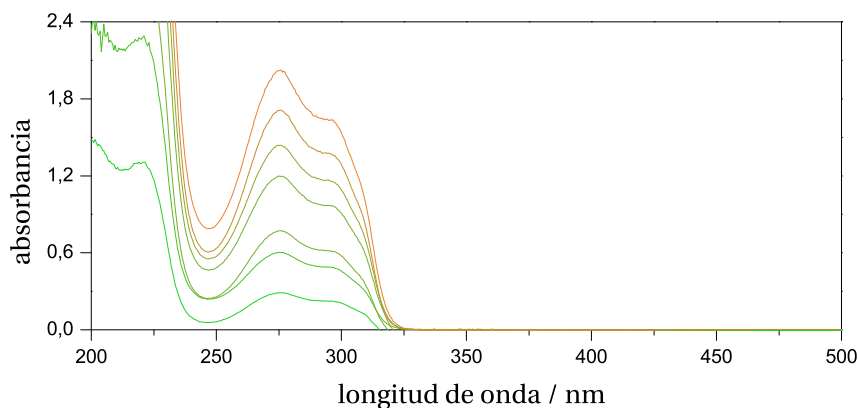


Figura 4.62: Espectro de absorción de la serotonina. $[\text{SER}] = 6,43 \cdot 10^{-5} - 3,64 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,2$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las dos bandas de absorción que presenta la disolución de serotonina (SER) entre 250 y 325 nm una, y otra, más energética, con una banda que llega hasta 245 nm, son características de los indoles, aunque la presencia de un alcohol en su estructura desplaza las bandas hacia posiciones menos energéticas. A pH ácido la segunda banda muestra dos picos diferenciados y solapados con máximos en 275 nm, el más intenso y en 296 nm el más débil. Los coeficientes de extinción molar de estos picos se han calculado mediante la ecuación de Lambert-Beer (página 154) según muestra la figura 4.63.

$$\epsilon_{\text{SER}, 275 \text{ nm}} = 5.600 \pm 200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

[SER] / M	A_{275}	A_{296}	[SER] / M	A_{275}	A_{296}
$6,43 \cdot 10^{-5}$	0,287	0,225	$2,57 \cdot 10^{-4}$	1,435	1,158
$1,07 \cdot 10^{-4}$	0,603	0,489	$3,21 \cdot 10^{-4}$	1,709	1,369
$1,50 \cdot 10^{-4}$	0,771	0,614	$3,64 \cdot 10^{-4}$	2,020	1,633
$2,14 \cdot 10^{-4}$	1,198	0,968			

$$y = -(0,04 \pm 0,03) + (5.600 \pm 200)x \quad (4.80)$$

$$y = -(0,03 \pm 0,03) + (4.500 \pm 100)x \quad (4.81)$$

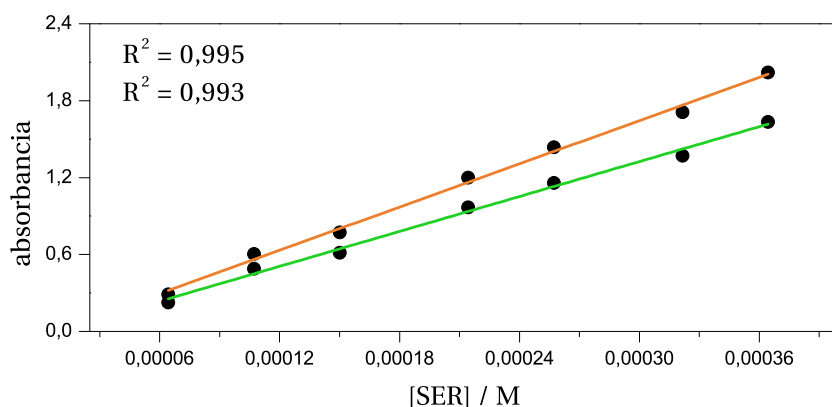


Tabla 4.33 y Figura 4.63: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por la serotonina. $\lambda = 296$ nm (verde), $\lambda = 275$ nm (naranja), pH = 3,2, $T = 20,0$ °C.

$$\epsilon_{\text{SER}, 296 \text{ nm}} = 4.500 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

El alcohol de la serotonina, unido a un grupo aromático, tiene un $\text{pK}_a = 10,73$. Al aumentar la basicidad del medio, su protón se pierde, haciendo que la carga negativa del grupo alcoxi se distribuya por el indol desplazando sus bandas de absorción, debidas a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, hacia posiciones menos energéticas. Como la amina se encuentra alejada del anillo aromático por dos carbonos alifáticos, apenas tiene influencia en la forma en la que la molécula

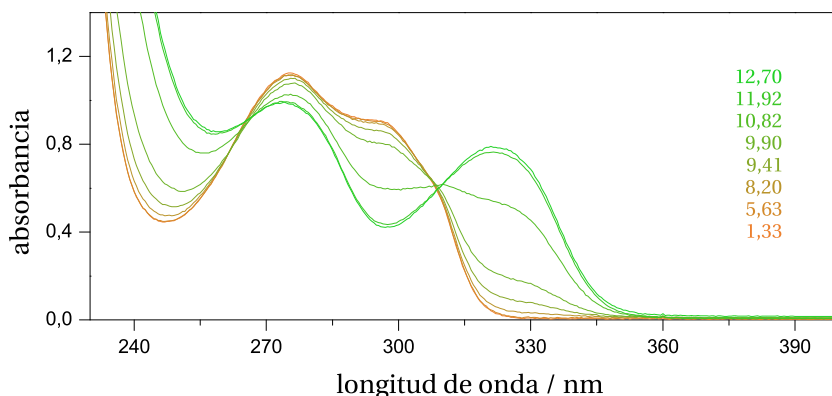


Figura 4.64: Variación del espectro de absorción de la serotonina según el pH. [SER] = $2,14 \cdot 10^{-4}$ M, $T = 20,0$ °C.

absorbe.

Mediante el procedimiento descrito en la sección 3.1.2.3, se estudió la variación en el espectro de la serotonina con el pH (figura 4.64). Al aumentar el pH, el pico con el máximo en 275 nm no cambia, el pico en 296 nm desaparece y aparece un nuevo pico centrado en 322 nm. También se desplaza hacia posiciones menos energéticas la banda ultravioleta del espectro. El espectro de absorción tiene dos puntos isobésticos en 265 nm y 308 nm, que no son interesantes desde el punto de vista cinético, puesto que no existe un cambio en el espectro hasta un pH superior a 8.

4.5.2. Reacción entre serotonina y nitrito

El seguimiento de los espectros de absorción de una mezcla serotonina-nitrito sódico en medio ácido muestra que la reacción que se produce entre ambos es muy rápida. La figura 4.65 ilustra los cambios de esos espectros a lo largo del tiempo de reacción (a los 60 minutos ya ha transcurrido el 80% de la misma).

La reacción se ha seguido cinéticamente (figura 4.66) en $\lambda = 371$ nm, que

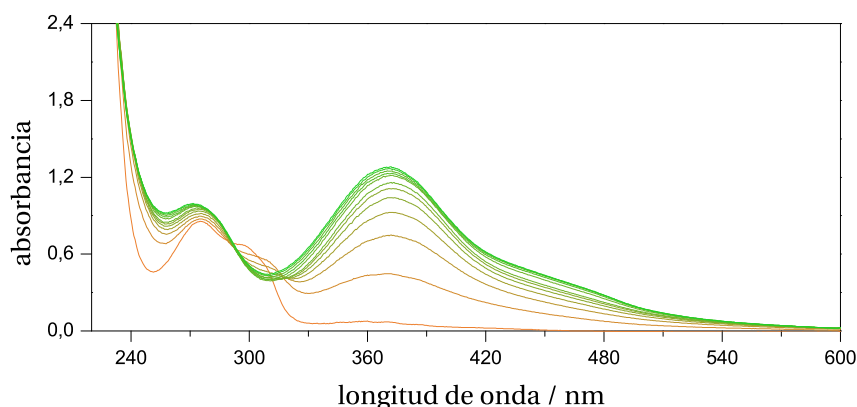
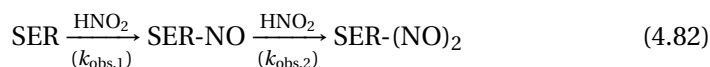


Figura 4.65: Variación con el tiempo del espectro de absorción de la fenetilamina durante su nitrosación. Los primeros seis espectros han sido tomados cada 10 minutos. El resto cada 40 minutos. $[SER] = 3,03 \cdot 10^{-4}$ M, $[NIT] = 3,01 \cdot 10^{-3}$, pH = 3,90, $T = 20,0$ °C.

corresponde al máximo de absorción del producto de nitrosación, por su gran intensidad y porque coincide con la longitud de onda del sistema ácido nitroso/nitrito, estudiado con anterioridad (sección 4.2.4).

Para determinar el coeficiente de absorción molar de la nitrososerotonina (figura 4.66) se trabajó con disoluciones de seis concentraciones de serotonina. Se observa que, aunque la absorbancia crece rápidamente, no se alcanza una meseta sino que continúa creciendo, aunque lentamente. Como este comportamiento sugiere un mecanismo de reacciones consecutivas, ello se ha interpretado a través de una segunda nitrosación (véase sección 4.5.11):



4.5.3. Tratamiento cinético de reacciones consecutivas

El tratamiento cinético de reacciones consecutivas es de cierta complejidad desde el punto de vista matemático, especialmente en reacciones de orden dos o tres, como son las de nitrosación en las que el agente nitrosante es el ion

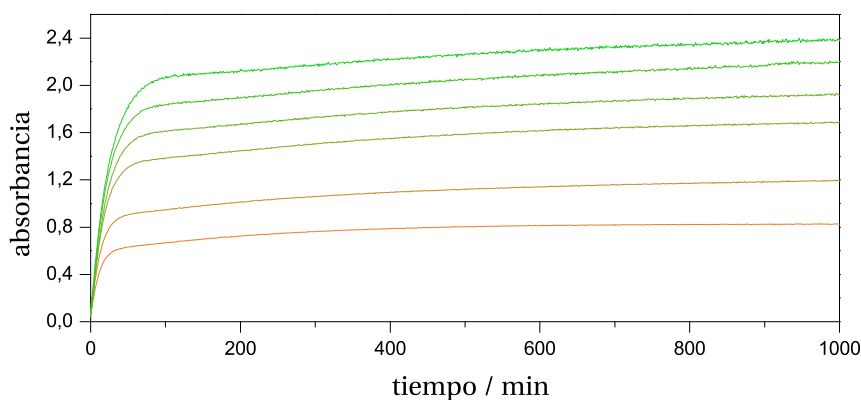
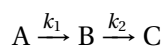


Figura 4.66: Variación de la absorbanza con el tiempo durante la nitrosación de la serotonina. $\lambda = 371 \text{ nm}$, $[\text{SER}] = 3,78 \cdot 10^{-5} - 1,28 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,01 \cdot 10^{-3}$, $\text{pH} = 3,92$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

nitrosonio/nitrosacido o el trióxido de dinitrógeno (páginas 55 y 59).

La forma más común de solventar este problema consiste en aumentar la concentración de uno de los reactivos para, mediante el método de aislamiento, crear una sucesión de reacciones de pseudoorden uno.²⁵⁸ En el caso de la serotonina, el nitrito ha sido el reactivo que se ha puesto en exceso, ya que al comienzo del estudio cinético no se conocía su orden parcial. Con esta simplificación, el tratamiento matemático de dos reacciones consecutivas de orden uno es asequible. Por simplicidad, se muestra la secuencia de la ecuación 4.82 de la siguiente forma:



Para calcular los parámetros cinéticos de estas reacciones, en primer lugar hay que conocer las velocidades de formación y desaparición de cada uno de los compuestos que en ellas participan.

La velocidad de desaparición de la serotonina, A, está regida por la constante de velocidad k_1 :

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A] \quad (4.83)$$

La serotonina mononitrosada, B, después de formarse, puede volver a nitrosarse y desaparecer:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A] - k_2[B] \quad (4.84)$$

En esta ecuación, $k_1[A]$ representa la formación de B a partir de A y el término $k_2[B]$ representa la transformación de B en C. La velocidad de formación de la dinitrososerotonina, C, se calcula mediante la ecuación:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k_2[B] \quad (4.85)$$

La ecuación 4.83 representa un proceso de primer orden. Reordenando la ecuación e integrando

$$\int -\frac{d[A]}{[A]} = \int k_1 dt \quad (4.86)$$

se obtiene cómo varía la concentración de serotonina en el tiempo:

$$[A] = [A]_0 e^{-k_1 t} \quad (4.87)$$

donde $[A]_0$ es la concentración inicial de serotonina, que se convertirá en los distintos compuestos:

$$[A]_0 = [A] + [B] + [C] \quad (4.88)$$

Para conocer la concentración de B se puede utilizar la solución de la ecuación 4.83:

$$\frac{d[B]}{dt} = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} - k_2[B] \quad (4.89)$$

Reordenando los términos de esta ecuación se observa que se trata de una ecuación diferencial lineal de primer orden:

$$\frac{d[B]}{dt} + k_2[B] = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} \quad (4.90)$$

Para resolverla se puede multiplicar en ambos lados de la ecuación por el factor integrador $e^{k_2 t}$

$$\left(\frac{d[B]}{dt} + k_2[B] \right) e^{k_2 t} = k_1[A]_0 e^{-k_1 t} e^{k_2 t} \quad (4.91)$$

y simplificar:

$$\frac{d[B]}{dt} e^{k_2 t} + k_2 [B] e^{k_2 t} = k_1 [A]_0 e^{(k_2 - k_1) t} \quad (4.92)$$

La parte izquierda de la ecuación es igual a:

$$\frac{d([B] e^{k_2 t})}{dt} = \frac{d([B] e^{k_2 t})}{dt} \quad (4.93)$$

Así que sustituyendo en la ecuación 4.92:

$$\frac{d([B] e^{k_2 t})}{dt} = k_1 [A]_0 e^{(k_2 - k_1) t} \quad (4.94)$$

e integrando:

$$\int \frac{d([B] e^{k_2 t})}{dt} dt = \int k_1 [A]_0 e^{(k_2 - k_1) t} dt \quad (4.95)$$

se obtiene la solución de la ecuación:

$$[B] e^{k_2 t} = \frac{k_1}{k_2 - k_1} [A]_0 e^{(k_2 - k_1) t} + D \quad (4.96)$$

Donde D es una constante de integración. Para calcular su valor, tras despejar la concentración de B,

$$[B] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} [A]_0 + D e^{-k_2 t} \quad (4.97)$$

se calcula la concentración inicial de B a tiempo cero. De esta forma, la ecuación anterior queda de la siguiente manera:

$$[B]_0 = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} + D \quad (4.98)$$

Despejando D y sustituyendo en 4.97:

$$[B] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} [A]_0 (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + [B]_0 e^{-k_2 t} \quad (4.99)$$

En esta ecuación, el primer término del lado derecho representa la mononitrososerotonina que hay en el medio tras su formación a través de la nitrosación de

la serotonina y la posterior desaparición por otra nitrosación, mientras que el segundo término describe la mononitrososerotonina que está presente inicialmente. Como esta cantidad es cero, la expresión anterior se puede simplificar:

$$[B] = \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (4.100)$$

Para la segunda reacción, la formación de dinitrososerotonina (C) a partir de mononitrososerotonina, la ecuación vuelve a ser la de un proceso de primer orden, por lo que su solución es inmediata:

$$[C] = [A]_0 \left(1 - \frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right) \quad (4.101)$$

Calculadas las concentraciones de cada uno de los compuestos de las reacciones consecutivas se procedió a ajustar estas ecuaciones a los resultados experimentales. En λ 371 nm, sólo absorben los compuestos B y C. Como:

$$A_B = \epsilon_B l [B] \quad (4.102)$$

$$A_C = \epsilon_C l [C] \quad (4.103)$$

se puede deducir la absorbancia a lo largo del tiempo de la reacción:

$$A = \epsilon_B l \frac{k_1 [A]_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + \epsilon_C [A]_0 \left(1 - \frac{1}{k_2 - k_1} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right) \quad (4.104)$$

Para comprobar que el mecanismo de reacciones consecutivas propuesto encaja con las curvas cinéticas medidas en la nitrosación de la serotonina, se realizaron varios experimentos a diferentes pHs, ajustándolos a la ecuación 4.104. Las figuras 4.67, 4.68 y 4.69 muestran el ajuste de los datos experimentales y la absorbancia de los compuestos B y C a lo largo del tiempo. Como el ajuste es excelente, se decidió seguir las reacciones de nitrosación por este método de trabajo.

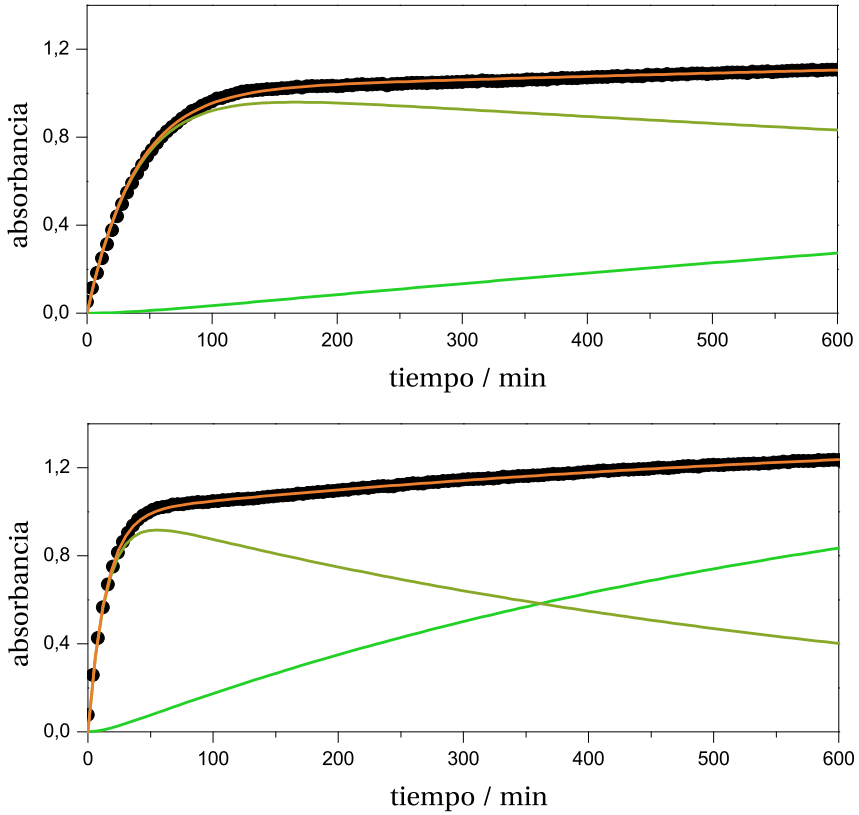


Figura 4.67: Ajuste de las cinéticas a la ecuación 4.104. La absorbancia total, A , se muestra de color naranja, A_B de color pardo y A_C de color verde. pH = 4,05 (gráfica superior) y 3,77 (gráfica inferior), $[SER] = 1,31 \cdot 10^{-4}$ M, $[NIT] = 3,02 \cdot 10^{-3}$, $T = 20,0$ °C.

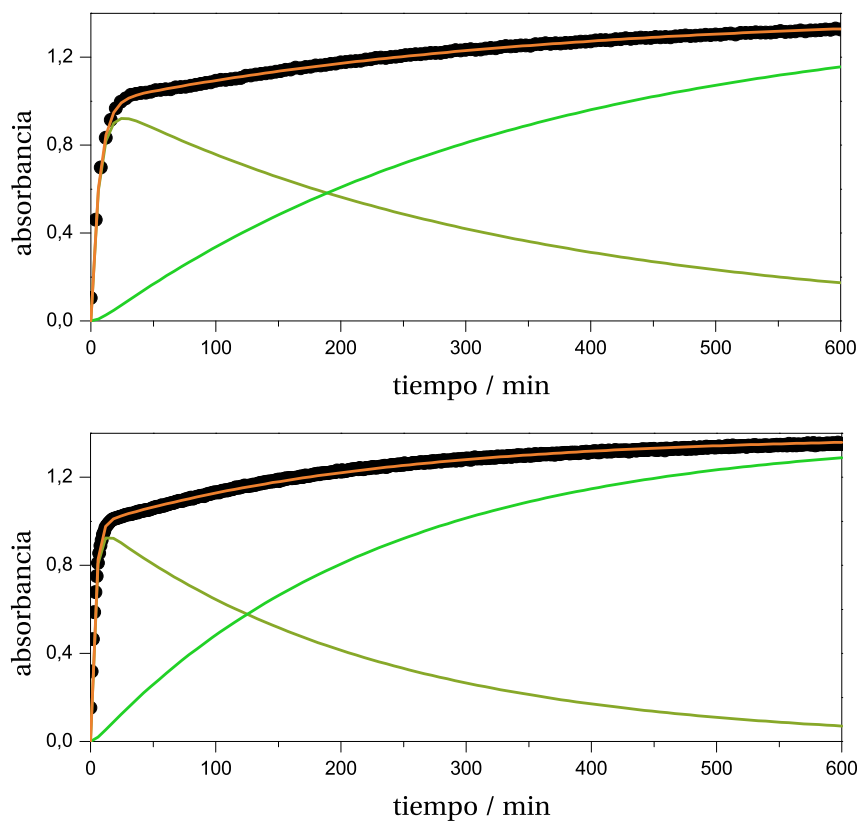


Figura 4.68: Ajuste de las cinéticas a la ecuación 4.104. La absorbancia total, A , se muestra de color naranja, A_B de color pardo y A_C de color verde. pH = 3,54 (gráfica superior) y 3,32 (gráfica inferior), $[SER] = 1,31 \cdot 10^{-4}$ M, $[NIT] = 3,02 \cdot 10^{-3}$, $T = 20,0$ °C.

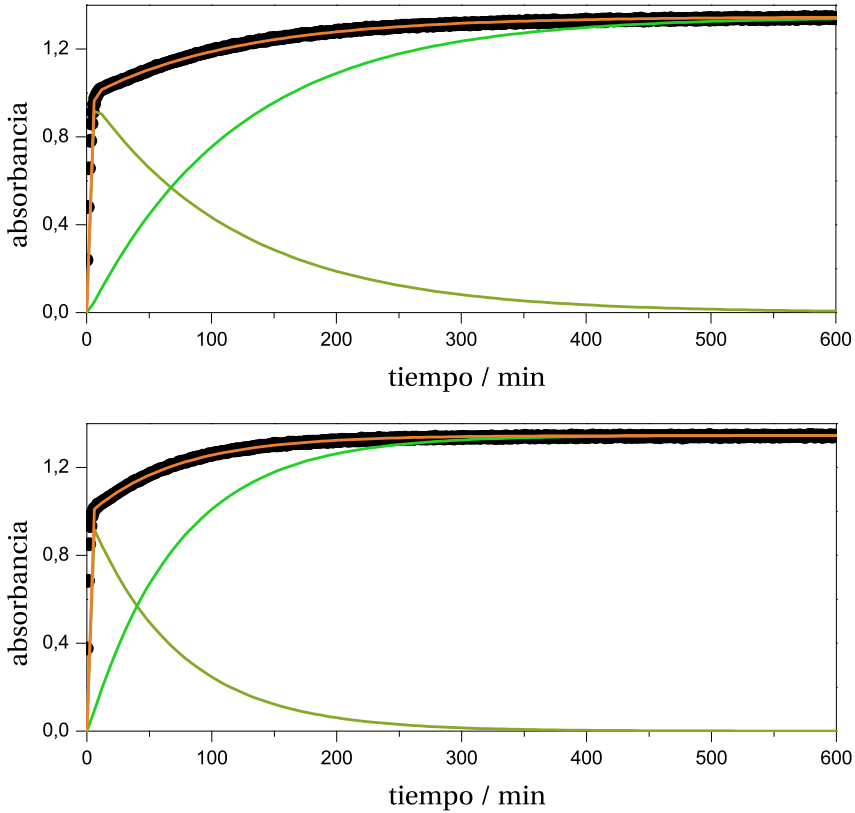


Figura 4.69: Ajuste de las cinéticas a la ecuación 4.104. La absorbancia total, A , se muestra de color naranja, A_B de color pardo y A_C de color verde. pH = 3,12 (gráfica superior) y 2,88 (gráfica inferior), [SER] = $1,31 \cdot 10^{-4}$ M, [NIT] = $3,02 \cdot 10^{-3}$, $T = 20,0$ °C.

4.5.4. Coeficientes de absorción molar

La ecuación 4.104 tiene cuatro variables: ε_B , ε_C , k_1 ($k_{\text{obs},1}$) y k_2 ($k_{\text{obs},2}$). Los ajustes matemáticos permiten calcular con una incertidumbre moderada sus valores. Para simplificar los cálculos y reducir el número de variables y el error de los ajustes posteriores, se han determinado los coeficientes de extinción molar preparando seis experimentos en los que se modificaron las concentración de serotonina mientras se mantenían constantes la concentración de nitrito y el resto de los parámetros termodinámicos como pH, fuerza iónica y temperatura.

[SER] / M	A_B	A_C	[SER] / M	A_B	A_C
$9,02 \cdot 10^{-5}$	0,6545	0,9384	$1,805 \cdot 10^{-4}$	1,3478	1,8479
$1,203 \cdot 10^{-4}$	0,8830	1,2515	$2,106 \cdot 10^{-4}$	1,5567	2,1435
$1,504 \cdot 10^{-4}$	1,0951	1,5328	$2,407 \cdot 10^{-4}$	1,7790	2,4795

$$y = -(0,02 \pm 0,01) + (7.500 \pm 80)x$$

$$y = (0,02 \pm 0,02) + (10.100 \pm 100)x$$

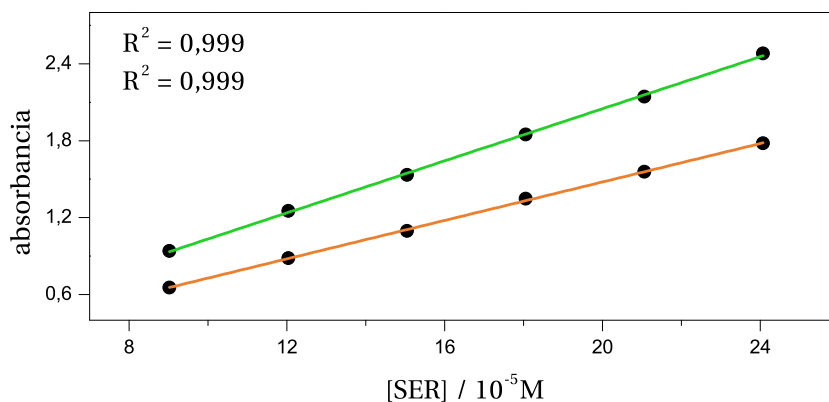


Tabla 4.34 y Figura 4.70: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por los compuestos B (naranja) y C (verde). $[\text{NIT}] = 6,028 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,02$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

De esta forma, ajustando los datos experimentales al mecanismo de reacciones consecutivas, se ha determinado la absorbancia que correspondería a cada producto, para, a continuación, mediante la ley de Lambert-Beer determinar los coeficientes de absorción representando estas absorbancias frente a la concentración inicial de serotonina. Los resultados de esta experiencia, representados en la figura 4.70, muestran que los coeficientes de absorción molar de la mononitrososerotonina y la dinitrososerotonina son:

$$\varepsilon_{B, 371 \text{ nm}} = 7.500 \pm 80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (4.105)$$

$$\varepsilon_{C, 371 \text{ nm}} = 10.100 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \quad (4.106)$$

4.5.5. Influencia de la concentración de nitrito

Para conocer los órdenes parciales respecto a la concentración de nitrito se diseñaron varios experimentos en los que se modificó la concentración de nitrito en exceso en cada caso. Como las constantes determinadas son pseudoconstantes de orden uno, la verdadera constante de velocidad de reacción se encuentra multiplicada por la concentración de nitrito elevada a su orden parcial:

$$k_{\text{obs}} = k[\text{NIT}]^n \quad (4.107)$$

Tomando logaritmos se obtiene la ecuación de una recta a la que se ajustaron los datos experimentales (figura 4.71)

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln k + n \ln[\text{NIT}] \quad (4.108)$$

A partir de las pendientes de las rectas ajustadas de las ecuaciones 4.111 y 4.112 se encontraron órdenes parciales dos y uno respecto a la primera y segunda reacciones de nitrosación, respectivamente, lo que sugiere distintos mecanismos:

$$v_1 = k_{\text{obs},1}[\text{NIT}]^2[\text{SER}] \quad (4.109)$$

$$v_2 = k_{\text{obs},2}[\text{NIT}][\text{SER}] \quad (4.110)$$

[NIT] / M	$k_{\text{obs},1} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs},2} / \text{s}^{-1}$	[NIT] / M	$k_{\text{obs},1} / \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs},2} / \text{s}^{-1}$
$3,014 \cdot 10^{-3}$	$1,755 \cdot 10^{-3}$	$7,025 \cdot 10^{-5}$	$5,727 \cdot 10^{-3}$	$6,798 \cdot 10^{-3}$	$1,329 \cdot 10^{-4}$
$3,919 \cdot 10^{-3}$	$3,097 \cdot 10^{-3}$	$9,812 \cdot 10^{-5}$	$6,632 \cdot 10^{-3}$	$8,276 \cdot 10^{-3}$	$1,673 \cdot 10^{-4}$
$4,823 \cdot 10^{-3}$	$4,316 \cdot 10^{-3}$	$1,163 \cdot 10^{-4}$	$7,536 \cdot 10^{-3}$	$1,162 \cdot 10^{-2}$	$1,828 \cdot 10^{-4}$

$$y = (5,4 \pm 0,4) + (2,02 \pm 0,06)x \quad (4.111)$$

$$y = -(3,6 \pm 0,3) + (1,03 \pm 0,04)x \quad (4.112)$$

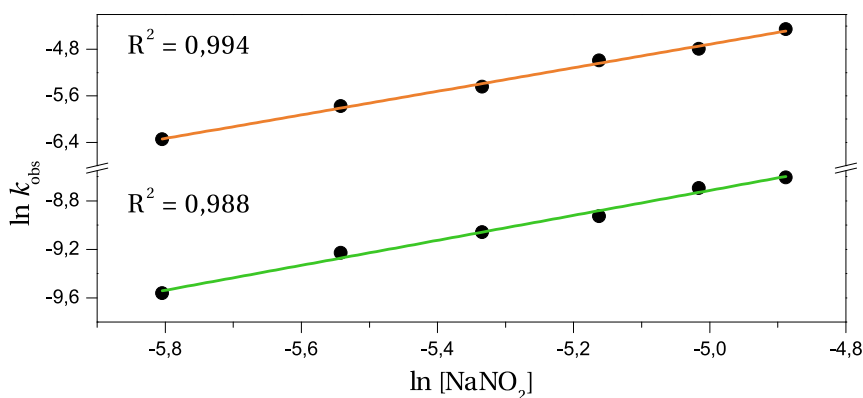


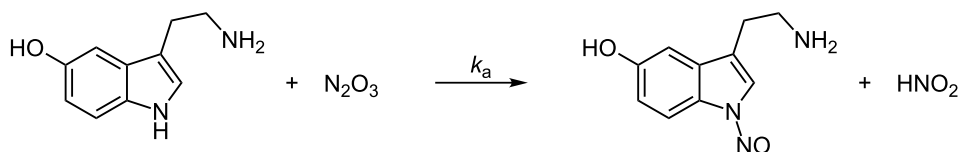
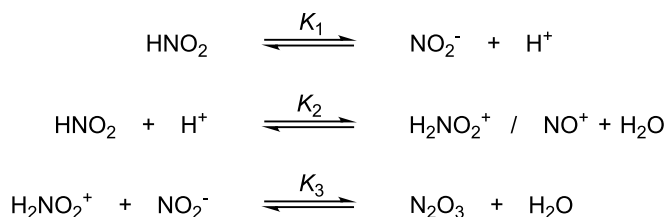
Tabla 4.35 y Figura 4.71: Influencia de la concentración de nitrito en las constantes de velocidad $k_{\text{obs},1}$ (naranja) y $k_{\text{obs},2}$ (verde). $[\text{SER}]_0 = 1,53 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,00$, $I = 0,24 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ \text{C}$.

4.5.6. Influencia de la acidez del medio

Para investigar las dos etapas del mecanismo de nitrosación de la serotonina, el primer objetivo fue determinar las correspondientes constantes de velocidad. Se utilizó para ello el ajuste a la ecuación 4.104 de los resultados de varios experimentos cinéticos a distintos pHs, mantenidos constantes los demás parámetros. Las figuras 4.72 y 4.73 muestran los resultados obtenidos.

Para la primera nitrosación se ha propuesto un mecanismo basado en las

reacciones de N-nitrosación, como el de la nitrosación de fenetilamina (sección 4.2.7). En él, la etapa limitante de velocidad es el ataque del trióxido de dinitrógeno sobre el nitrógeno del anillo indólico (esquema 4.5).



Esquema 4.5: Mecanismo propuesto para la primera nitrosación de la serotonina.

Del mecanismo propuesto se deduce la ecuación de velocidad 4.113, similar a la encontrada con la fenetilamina (ecuación 4.34, página 169).

$$v_1 = k_a K_3 K_2 K_1 \frac{[\text{NIT}]^2 [\text{H}^+]^2 [\text{SER}]}{([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (4.113)$$

Sin embargo, dada su condición de heteroátomo aromático, el nitrógeno indólico sólo se protona en condiciones de extrema acidez, por lo que hay que descartar su paso a nitrógeno cuaternario que inhibiría la reacción de nitrosación.²⁵⁹ Con ello, la ecuación de velocidad se simplifica, no dependiendo de la constante de acidez de la amina (en la ecuación 4.34, $K_I \gg [\text{H}^+]$).

De la comparación de las ecuaciones de velocidad experimental y teórica se desprende inmediatamente que:

$$k_{\text{obs},1} = k_a K_3 K_2 K_1 \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (4.114)$$

pH	$k_{\text{obs},1} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs},1} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
2,81	910,8	3,71	161,3
3,12	590,3	3,77	129,2
3,32	417,3	3,98	65,7
3,54	260,4	4,05	47,5
3,55	233,1	4,53	10,7

$$y = \frac{(1.430 \pm 30)(10^{-x})^2}{((40 \pm 1) \cdot 10^{-5} + 10^{-x})^2} \quad (4.115)$$

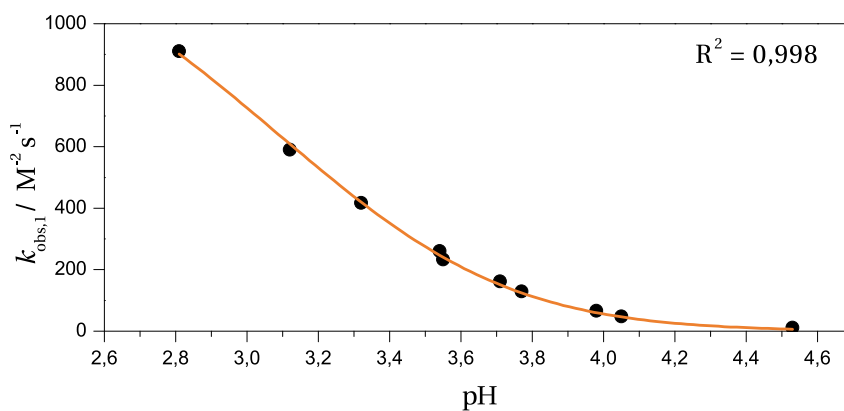


Tabla 4.36 y Figura 4.72: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad $k_{\text{obs},1}$. $[\text{SER}]_0 = 1,31 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,02 \cdot 10^{-3}$, $I = 0,24 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	$k_{\text{obs},2} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs},2} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,81	$4,685 \cdot 10^{-2}$	3,71	$1,267 \cdot 10^{-2}$
3,12	$3,308 \cdot 10^{-2}$	3,77	$9,95 \cdot 10^{-3}$
3,32	$2,703 \cdot 10^{-2}$	3,98	$5,96 \cdot 10^{-3}$
3,54	$1,911 \cdot 10^{-2}$	4,05	$3,56 \cdot 10^{-3}$
3,55	$1,768 \cdot 10^{-2}$	4,53	$1,5 \cdot 10^{-4}$

$$y = \frac{(1.300 \pm 200)(10^{-x})^2}{(10^{-x} + 6,65 \cdot 10^{-4})(1 + (18.000 \pm 3.000)10^{-x})} \quad (4.116)$$

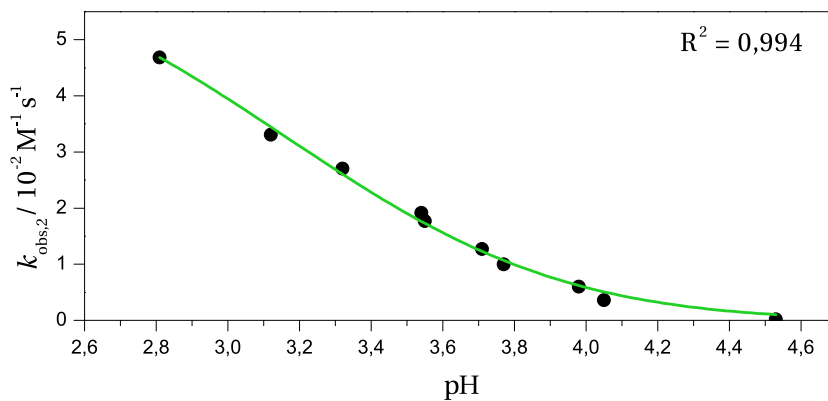


Tabla 4.37 y Figura 4.73: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad $k_{\text{obs},2}$. $[\text{SER}]_0 = 1,31 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,02 \cdot 10^{-3}$, $I = 0,24 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

La ecuación 4.114 se ha ajustado a los datos experimentales para determinar los parámetros α y β de la relación:

$$k_{\text{obs},1} = \alpha \frac{[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + \beta)^2} \quad (4.117)$$

Los valores de estos parámetros, según los ajustes que se muestran en la figura 4.72, son:

$$\begin{aligned} \alpha &= 1.430 \pm 30 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1} \\ \beta &= (40 \pm 1) \cdot 10^{-5} \text{ M} \end{aligned}$$

De nuevo, el valor del parámetro β sirve como comprobación de que el ajuste es correcto desde el punto de vista químico, ya que se trata de la constante de equilibrio K_1 . El valor de su logaritmo negativo proporciona un $\text{p}K_a$ de $3,3 \pm 0,2$, que es consecuente con el valor real 3,17 (tabla 2.1).

Con el parámetro α se calcula la constante de velocidad de la reacción de nitrosación k_a :

$$k_a = \frac{\alpha}{K_3 K_2 K_1} \quad (4.118)$$

Como el valor de $K_1 K_2 K_3$ es, precisamente, la constante de Markovits (sección 2.2.2) cuyo valor se conoce:⁹³ $K_M = 3,03 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, el valor de k_a es inmediato:

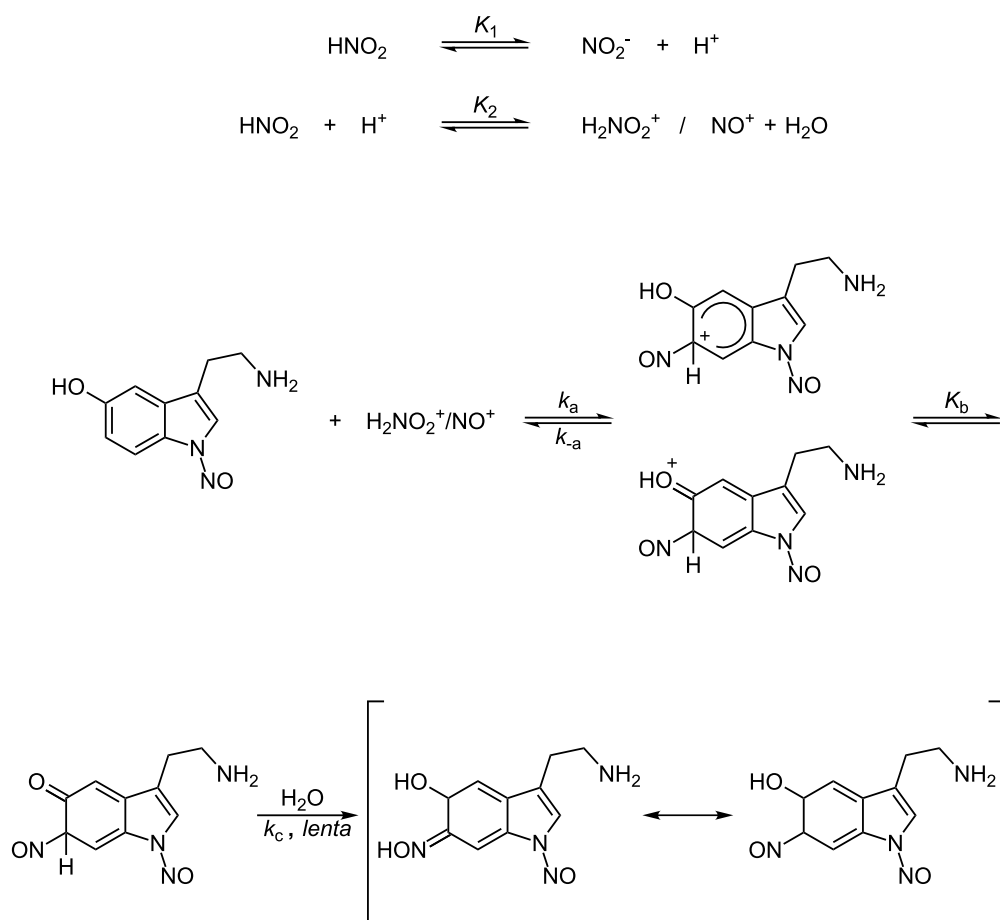
$$k_a = (4,8 \pm 0,1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

El valor de la constante k_a es muy alto, pero es dos órdenes de magnitud más pequeño que el límite para que la reacción se considere controlada por difusión.²⁶⁰

Para la segunda reacción de nitrosación se ha comprobado que el mecanismo de C-nitrosación que se ha utilizado para la tiramina y la dopamina se ajusta bien a los datos experimentales de la figura 4.73. El esquema 4.6 muestra el mecanismo propuesto.

A partir de este mecanismo se deduce la ecuación de velocidad:

$$v_2 = \frac{k_a K_2 [\text{SER}] [\text{NIT}] [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.119)$$



Esquema 4.6: Mecanismo propuesto para la segunda nitrosación de la serotonina.

que concuerda con los resultados experimentales de orden uno para cada uno de los reactivos. Para ajustar los datos experimentales con la ecuación de velocidad teórica se compara la ecuación experimental (página 235) con la ecuación 4.119,

de la que se deduce el valor teórico de la constante de velocidad observada:

$$k_{\text{obs},2} = \frac{k_a K_2 [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (4.120)$$

El ajuste de esta ecuación a los datos experimentales también se muestra en la figura 4.73. Con este ajuste se han determinado los parámetros α y β :

$$k_{\text{obs},2} = \frac{\alpha [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) (1 + \beta [\text{H}^+])} \quad (4.121)$$

donde:

$$\begin{aligned} \alpha &= 1.300 \pm 200 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1} \\ \beta &= 18.000 \pm 3.000 \text{ M}^{-1} \end{aligned}$$

A partir de α se puede conocer k_a , puesto que K_2 es un valor conocido ($K_2 = 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$).⁸¹

$$k_a = (4,3 \pm 0,3) \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Este valor de k_a es del mismo orden de magnitud que las constantes de nitrosación de otros compuestos C-nitrosados (sección 5.1).

4.5.7. Influencia de la fuerza iónica

Como en el caso de los demás sustratos, se ha investigado la nitrosación de serotonina en medios de fuerza iónica variable. Para ello se programaron experimentos cinéticos en los que, mantenidos constantes los demás parámetros, se añadían diferentes concentraciones de perclorato sódico. La figura 4.74 ilustra el resultado de aplicar la ecuación de Brønsted-Debye-Hückel (página 120) a las velocidades específicas de reacción encontradas en cada caso.

La no influencia de la fuerza iónica es coherente con el mecanismo propuesto en el sentido de que en ninguna de las reacciones limitantes implicadas en el mecanismo propuesto participan reactivos iónicos.

I / M	$k_{\text{obs},1}$ / $\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs},2}$ / $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	I / M	$k_{\text{obs},1}$ / $\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs},2}$ / $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
0,0863	247,93	0,0309	0,3263	252,50	0,0223
0,1663	244,10	0,0293	0,4064	262,12	0,0200
0,2464	241,36	0,0217	0,4864	271,80	0,0210

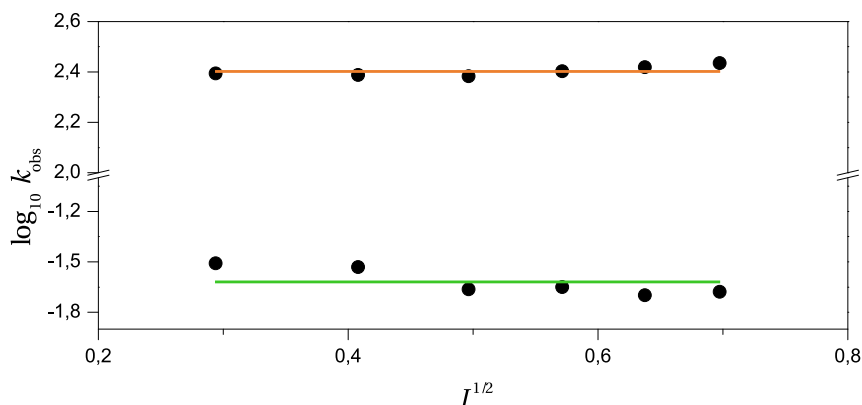


Tabla 4.38 y Figura 4.74: Influencia de la fuerza iónica en las constantes de velocidad k_1 (naranja) y k_2 (verde). $[\text{SER}]_0 = 1,53 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 6,028 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,50$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.8. Efecto isotópico cinético

En esta fase de nuestra investigación se trabajó a $\text{pH} = 2,2$, donde la ecuación 4.114 (página 237) se transforma en:

$$k_{\text{obs},1} = k_a K_3 K_2 K_1 \quad (4.122)$$

A su vez, la ecuación 4.120 (página 188) se reduce a:

$$k_{\text{obs},2} = \frac{k_a K_2 K_b k_c}{k_{-a}} \quad (4.123)$$

Como en el pH de trabajo la reacción es muy rápida, el seguimiento cinético de la nitrosación se hizo mediante técnica de flujo detenido (*Stopped-Flow*; ver

apartado 3.1.1.4).

La comparación de los valores de k_{obs} en agua y agua deuterada (97%) conduce, para la primera nitrosación, a la ecuación 4.124:

$$\frac{k_{\text{obs},1}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{obs},1}^{\text{D}_2\text{O}}} = \frac{k_a^{\text{H}_2\text{O}} K_2^{\text{H}_2\text{O}} K_1^{\text{H}_2\text{O}}}{k_a^{\text{D}_2\text{O}} K_2^{\text{D}_2\text{O}} K_1^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.124)$$

y, para la segunda, a la ecuación 4.125:

$$\frac{k_{\text{obs},2}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{obs},2}^{\text{D}_2\text{O}}} = \frac{K_2^{\text{H}_2\text{O}} k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{K_2^{\text{D}_2\text{O}} k_c^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.125)$$

Los valores de las constantes de velocidad experimentales, medidas por triplicado, se muestran en la tabla 4.39.

	$k_{\text{obs},1} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$k_{\text{obs},2} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
H ₂ O	1.232,4	$5,485 \cdot 10^{-2}$
D ₂ O	1.516,1	$6,314 \cdot 10^{-2}$

Tabla 4.39: Constantes de velocidad de la nitrosación de la serotonina según el disolvente empleado.

Como $K_1^{\text{D}_2\text{O}} / K_1^{\text{H}_2\text{O}} = 0,647$ y que $K_2^{\text{D}_2\text{O}} / K_2^{\text{H}_2\text{O}} = 2,7$, para la primera nitrosación se encuentra que:^{257,261}

$$\frac{k_a^{\text{H}_2\text{O}}}{k_a^{\text{D}_2\text{O}}} = 1,42 \quad (4.126)$$

Este valor, pequeño para corresponder a la desprotonación del complejo de Wheland, es próximo al que, en procesos controlado por difusión, corresponde a la relación de viscosidades entre el agua y el agua deuterada, que es 1,25 aproximadamente, a 25 °C.²⁶²

Para la segunda reacción de nitrosación, el efecto isotópico derivado de la ruptura del complejo σ es:

$$\frac{k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{k_c^{\text{D}_2\text{O}}} = 2,35 \quad (4.127)$$

El valor obtenido es consistente con el mecanismo propuesto.

4.5.9. Influencia de la temperatura

Como en el caso del efecto isotópico cinético, para la determinación de los parámetros cinéticos se utilizó la técnica de flujo detenido que ofrece la ventaja adicional de que, al estar termostatadas las jeringas de inyección, la mezcla transcurre a la temperatura prefijada (figura 3.3, d). En el caso de la segunda nitrosación, las medidas cinéticas se hicieron por partida doble: flujo detenido y espectrografía UV-visible convencional, debido a que el *stopped-flow* no permite seguir tiempos muy largos de reacción.

La figura 4.75 muestra los perfiles cinéticos de las reacciones de nitrosación

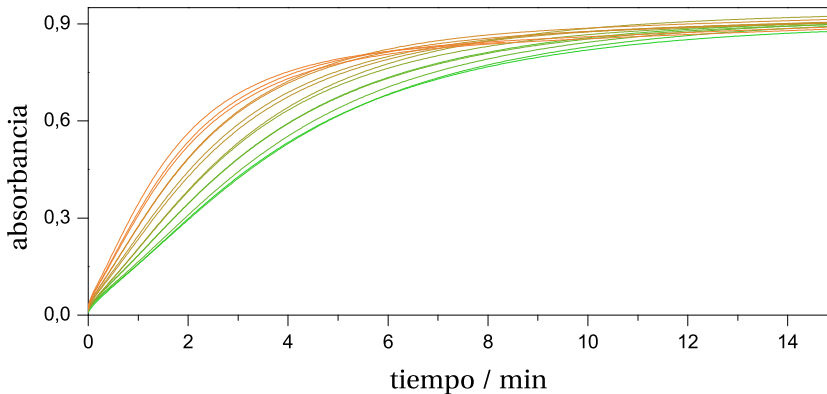


Figura 4.75: Variación de la absorbanza con el tiempo durante la nitrosación de la serotonina a diferentes temperaturas. $\lambda = 371 \text{ nm}$, $[\text{SER}]_0 = 3,78 \cdot 10^{-5} - 1,28 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,00 \cdot 10^{-3}$, $\text{pH} = 3,65$, $T = 20,32$ (verde) - $33,87$ (naranja) $^\circ\text{C}$.

de la serotonina a diferentes temperaturas. Se observa cómo, al subir la temperatura, aumenta más rápidamente la pendiente del tramo inicial, asociado a $k_{\text{obs},1}$, que la del tramo final, relacionada con $k_{\text{obs},2}$.

Los datos experimentales obtenidos a cada temperatura se han ajustado a la ecuación 4.104 que permite conocer las constantes de velocidad. Las tablas 4.40 y 4.41 muestran los valores de $k_{\text{obs},1}$ y $k_{\text{obs},2}$, respectivamente.

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs},1} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs},1} / \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$
20,32	392,85	27,09	583,91
20,32	395,51	27,11	561,37
20,32	421,38	29,33	649,55
22,55	458,24	29,33	629,24
22,55	453,08	29,33	629,25
24,95	505,46	31,86	699,74
24,95	531,70	33,87	758,50

Tabla 4.40: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad $k_{\text{obs},1}$. $[\text{SER}]_0 = 3,78 \cdot 10^{-5} - 1,28 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,65$.

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs},2} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs},2} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
22,55	0,0458	27,11	0,0676
23,03	0,0484	28,38	0,0710
24,95	0,0573	29,33	0,0782
24,97	0,0556	30,93	0,0865
27,09	0,0675	31,86	0,0903

Tabla 4.41: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad $k_{\text{obs},2}$. $[\text{SER}]_0 = 3,78 \cdot 10^{-5} - 1,28 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 3,00 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 3,65$.

Las figuras 4.76 y 4.77, para $k_{\text{obs},1}$, y 4.78 y 4.79, para $k_{\text{obs},2}$, muestran el buen ajuste a las ecuaciones de Arrhenius y Eyring-Wynne-Jonnes.

$$y = (20,7 \pm 0,5) + (36 \pm 1) \cdot 10^3 x \quad (4.128)$$

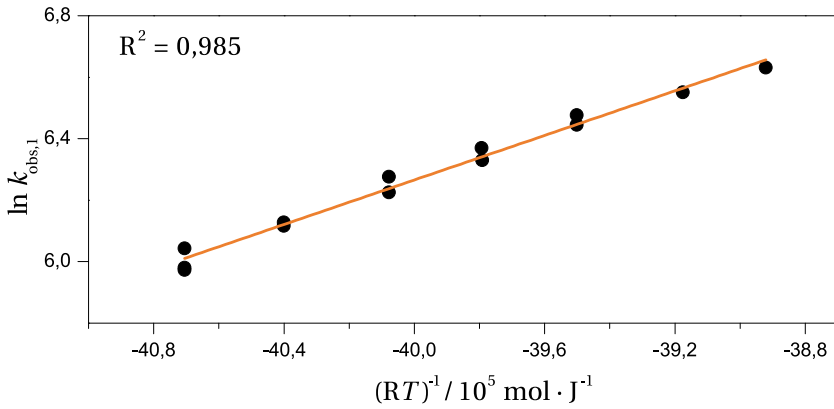


Figura 4.76: Cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por los resultados de la tabla 4.40.

$$y = (14,0 \pm 0,5) + (33 \pm 1) \cdot 10^3 x \quad (4.129)$$

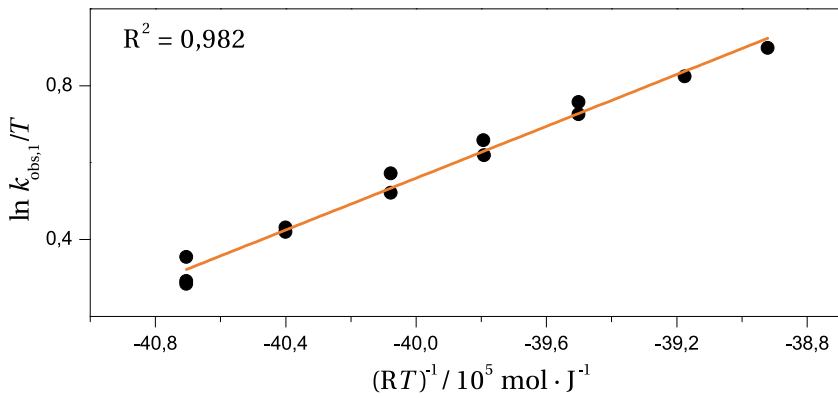


Figura 4.77: Cumplimiento de la ecuación de Eyring por los resultados de la tabla 4.40.

$$y = (19,3 \pm 0,6) + (55 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.130)$$

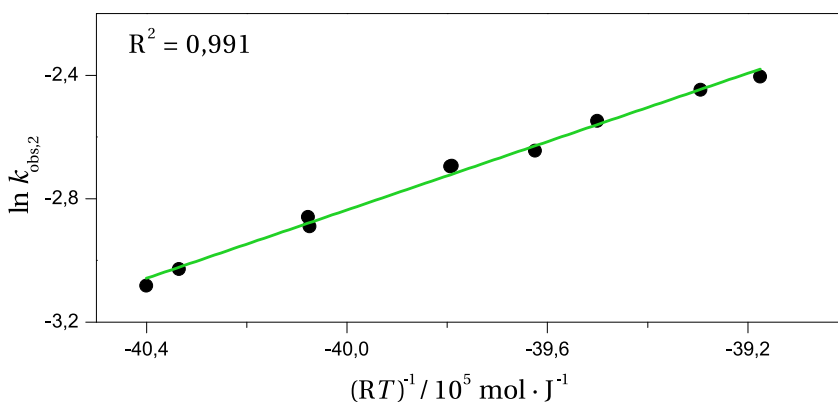


Figura 4.78: Cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por los resultados de la tabla 4.41.

$$y = (12,6 \pm 0,7) + (53 \pm 2) \cdot 10^3 x \quad (4.131)$$

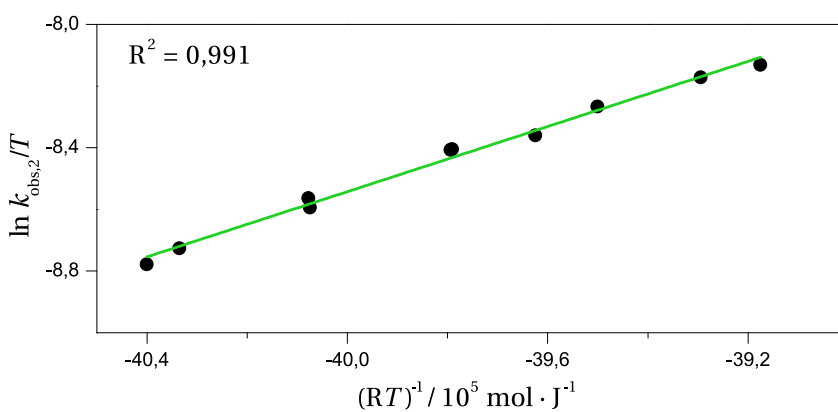


Figura 4.79: Cumplimiento de la ecuación de Eyring por los resultados de la tabla 4.41.

La siguiente tabla resume los parámetros cinéticos encontrados:

	$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
$k_{\text{obs},1}$	36 ± 2	33 ± 2	-81 ± 3
$k_{\text{obs},2}$	55 ± 2	53 ± 2	-92 ± 5

Tabla 4.42: Parámetros termodinámicos calculados para las reacciones de nitrosación de la serotonina.

Para tratar de profundizar en el mecanismo de la primera nitrosación se calculó el valor de la entalpía de activación asociada a la constante k_a como diferencia entre la entalpía de activación ΔH^\ddagger y la entalpía de formación ΔH_m del trióxido de dinitrógeno:

$$\Delta H_k^\ddagger = \Delta H^\ddagger - \Delta H_m \quad (4.132)$$

Cómo $\Delta H_m = 6,8 \pm 0,6 \text{ kJ mol}^{-1}$, resulta que $\Delta H_k^\ddagger = 26 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$.⁹⁶ De nuevo se obtiene un valor cercano al límite de una reacción controlada por difusión (20 kJ mol^{-1}).²⁶⁰

4.5.10. Estructura y reactividad de la serotonina

De todas las moléculas estudiadas en este trabajo, la serotonina es la que tiene más sitios potencialmente nitrosables, puesto que su estructura indólica tiene cinco posiciones libres para reaccionar, todas ellas lo suficientemente activadas por el nitrógeno del anillo y el grupo alcohólico de la posición 5. Por ello se ha estimado, por medio de cálculos computacionales, cuál es la posición más favorecida para ser nitrosada. En primer lugar, se ha optimizado la estructura de la molécula (figura 4.80) para, a continuación, calcular la distribución de carga en su estructura. La reacción de sustitución es electrófila, por lo que es más probable que se produzca en las posiciones con mayor densidad de carga negativa (de color rojo). La figura 4.81 muestra el mapa de distribución de cargas. Se observa que el oxígeno es el átomo con mayor carga negativa. Sin embargo, como ocurrió con la tiramina, los datos experimentales no se ajustaban a

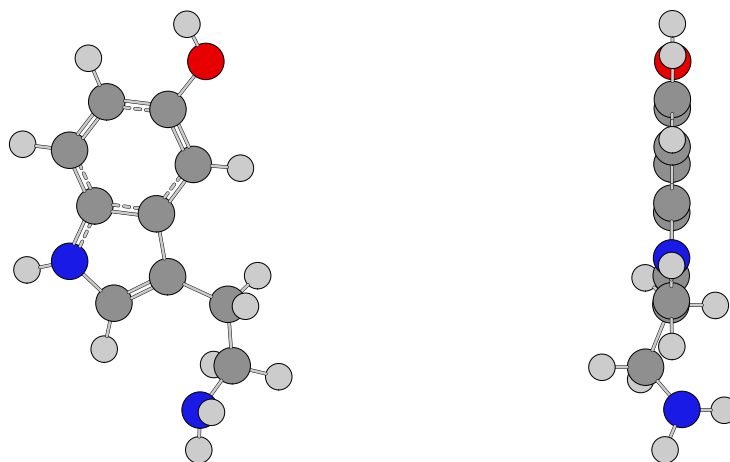


Figura 4.80: Estructura calculada de la serotonina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

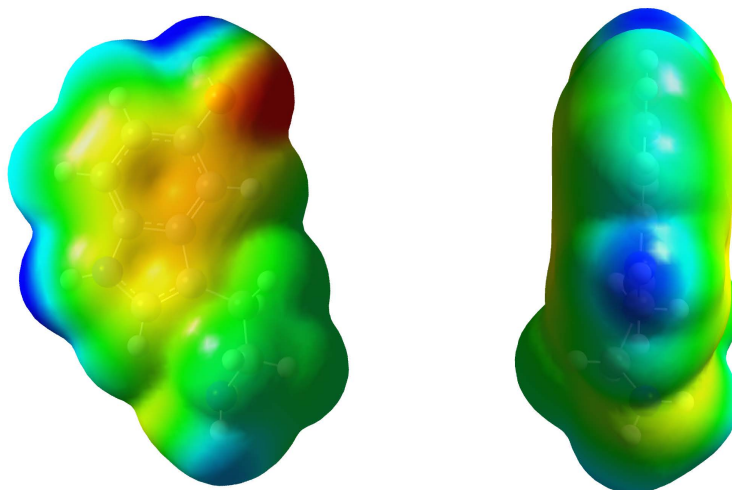


Figura 4.81: Mapa de densidad electrónica de la serotonina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

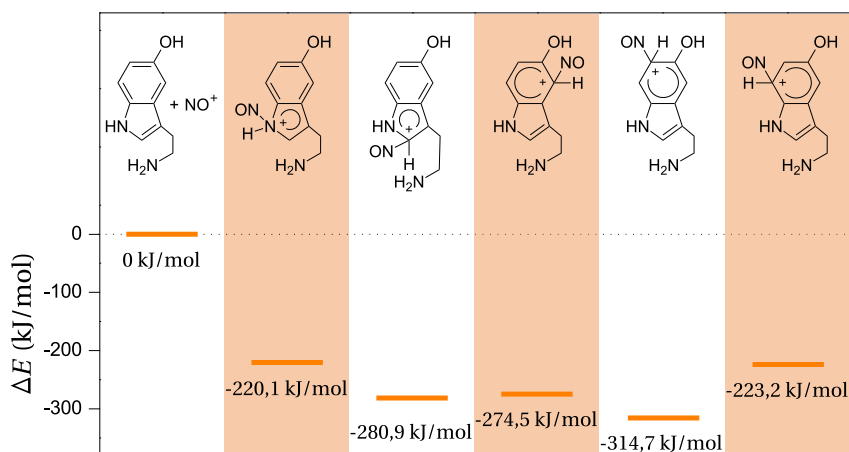


Figura 4.82: Diferencias de energía calculadas para los posibles complejos σ de la nitrosación de la serotonina. DFT-B3LYP 6-31+G (d,p).

un posible mecanismo de catálisis por la reacción de Fischer-Hepp. También se puede ver que la densidad electrónica en el anillo de seis miembros de la serotonina es mayor que la densidad en el otro anillo, por lo que es de esperar que la reacción esté favorecida en esos lugares.

Se ha calculado las energías de los cinco posibles complejos de Wheland que puede formar la serotonina al nitrosarse respecto a la energía de la serotonina y el ion nitrosonio por separado. La figura 4.82 muestra que el compuesto más estable con mucha diferencia es el complejo σ nitrosado en el carbono 6. El siguiente compuesto más estable, el nitrosado en el carbono 2, es poco probable debido al impedimento estérico de la cadena lateral adyacente. Se observa que el complejo de Wheland en la posición *meta* respecto al alcohol se encuentra desfavorecido y que la nitrosación en el heteroátomo de nitrógeno también está desfavorecida. Este resultado no está en contraposición con el mecanismo propuesto para la primera reacción de nitrosación de la serotonina, en el que el agente nitrosante es el trióxido de dinitrógeno, mucho más electrófilo que el ion nitrosonio empleado en este experimento *in silico*.

4.5.11. Determinación del producto de reacción

Hora y media después de preparar una disolución ácida y acuosa de serotonina y nitrito sódico se hizo un espectro de masas. El espectro obtenido, que se muestra en la figura 4.83, corrobora el mecanismo de doble nitrosación propuesto en este trabajo. Se observa cómo el pico que corresponde a la masa de la serotonina muestra una abundancia relativa baja, mientras que el compuesto más abundante tiene una masa/carga 205,0, correspondiente a la de la serotonina nitrosada, consecuente con la rápida nitrosación que se produce nada más mezclar la serotonina con el ácido nitroso. Además, aparece un pico en $m/z = 234,1$ con una abundancia relativa del 23 % acorde con la masa de la serotonina doblemente nitrosada.

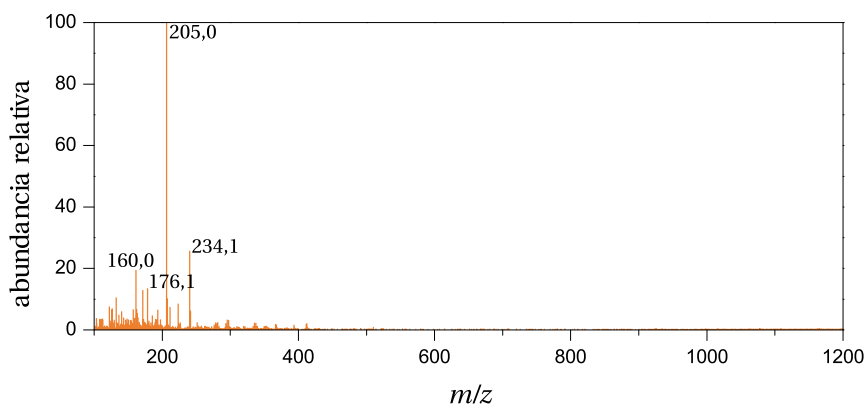
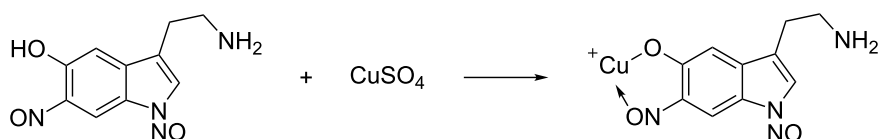


Figura 4.83: Espectro de masas por impacto electrónico positivo de la serotonina nitrosada.

Según los cálculos computacionales, las posiciones más favorecidas para la nitrosación de la serotonina son las de los carbonos adyacentes al grupo alcohólico de su estructura. De igual modo que se hizo con la tiramina, se ha comprobado la presencia de los compuestos nitrosados en esas posiciones mediante la formación de un compuesto de coordinación con cobre (II). A una disolución acuosa y ácida con serotonina y nitrito, al acabar la reacción

entre estos dos compuestos, se añadió una cantidad en exceso de sulfato de cobre (II). Tras dos días, la mezcla creada había cambiado de color, confirmando la presencia de los compuestos de nitrososerotonina calculados (esquema 4.7).



Esquema 4.7: Reacción de complejación de la nitrososerotonina.

4.5.12. Actividad biológica de la nitrososerotonina

Test de Ames

El test de Ames sugiere que la nitrososerotonina no es mutágena. Tras realizar el test según el procedimiento descrito en la página 134, en bacterias de las cepas TA98 y TA100, con y sin complejo de activación metabólica S9, ninguna de las dosis de nitrososerotonina empleadas induce la aparición de un número

$\mu\text{g NSER} / \text{placa}$	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
control negativo	19 ± 1	28 ± 2	180 ± 10	80 ± 10
7	16	24 ± 2	150 ± 3	84 ± 4
23	17	26 ± 2	158	83
70	16	28	194	77
230	18 ± 4	30 ± 2	160 ± 10	82
700	22 ± 5	26 ± 1	154 ± 2	82 ± 2
control positivo	390 ± 10	426	1.080 ± 80	740 ± 10

Tabla 4.43: Resultados del test de Ames aplicado a la nitrososerotonina. Controles positivos: TA98: $10 \mu\text{g NPD}$, TA98 + S9: $2 \mu\text{g 2AA}$, TA100: $0,3 \mu\text{g 4NQO}$ y TA100 + S9 $2 \mu\text{g 2AA}$

de revertientes significativamente mayor que el que se produce de forma espontánea en el control negativo. La tabla 4.43 y las figuras 4.84 y 4.85 recogen los resultados del ensayo.

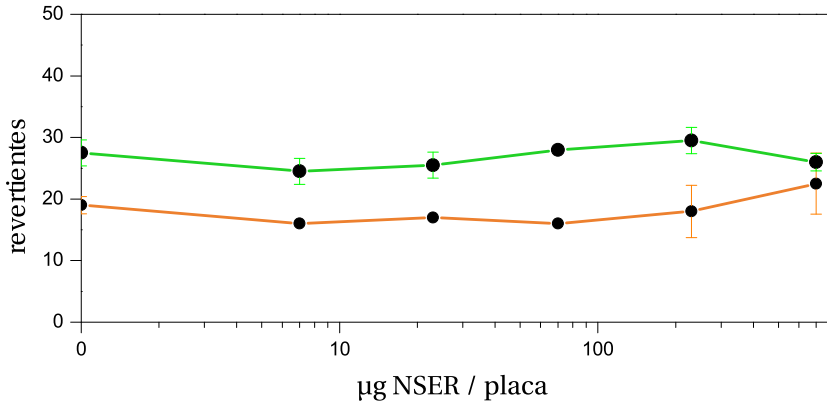


Figura 4.84: Test de Ames de la nitrososerotonina TA98. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

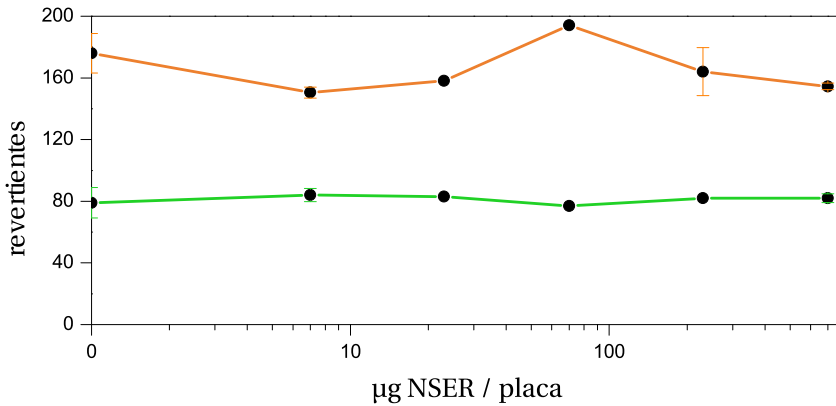


Figura 4.85: Test de Ames de la nitrososerotonina TA100. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

Test de aberraciones cromosómicas

El test de aberraciones cromosómicas ha demostrado que, en concordancia con los resultados del test de Ames, la nitrososerotonina tampoco es un compuesto que provoque anomalías en los cromosomas de las células V-79. La tabla 4.44 muestra los resultados del experimento realizado según el procedimiento descrito en la página 139. En una de las placas de las células expuestas durante 24 horas a una concentración 3,4 μM de nitrososerotonina se observó una célula con un hueco en una de sus dos cromátidas. Sin embargo esta aberración no es significativa.

[NSER] / μM	CTG	CSG	CTB	CSB	ACENT	DIC
control negativo	0	0	0	0	0	0
3,4	1	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0
3.400	Concentración tóxica para las células					
control positivo	8	4	28	14	0	0
[NSER] / μM	TRI	TET	OTRO	RING	MA	% AC
control negativo	0	0	0	0	0	0
3,4	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
340	0	0	0	0	0	0
3.400	Concentración tóxica para las células					
control positivo	16	2	0	4	0	42

Tabla 4.44: Aberraciones cromosómicas inducidas por la nitrososerotonina en células eucariotas V-79. Control positivo: MMC 1,5 μM .

Test del MTT

La serotonina, pese a que parece no ser mutágena, ha demostrado ser muy citotóxica en el test del MTT. Mediante el procedimiento descrito en la página 142 se midió la supervivencia de las células V-79 a diferentes concentraciones de nitrososerotonina tras una exposición de 24 horas al nitrosocompuesto. La figura 4.86 muestra el resultado de la experiencia.

Se puede ver cómo, incluso en la dosis más baja de compuesto, se produce una mortalidad del 10% entre las células V-79. Con una concentración 10 veces superior a la dosis más baja mueren todas las células del medio de cultivo. En función de los datos obtenidos, se ha calculado la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de nitrososerotonina en estas condiciones: $IC_{50} = 3,7 \cdot 10^{-4}$ M.

	[NSER] / μ M	Supervivencia
a	51	(90 \pm 9) %
b	170	(76 \pm 7) %
c	510	(0,0 \pm 0,2) %
d	1.700	(0,7 \pm 0,3) %

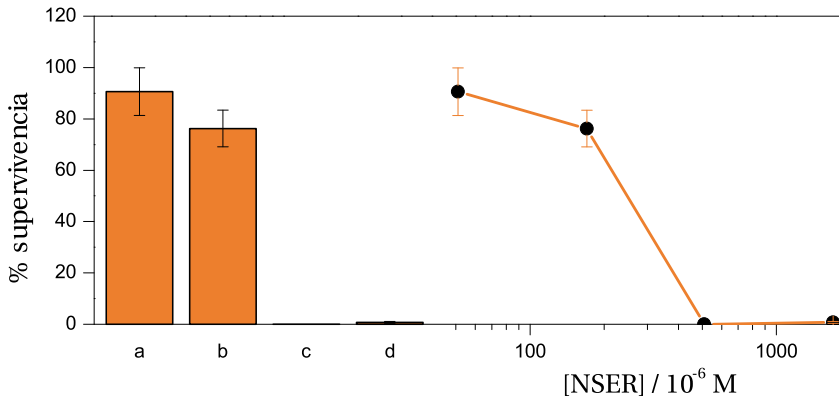


Tabla 4.45 y Figura 4.86: Supervivencia celular de V-79 en función de la concentración de nitrososerotonina.

4.6. Nitrosación del minoxidilo

4.6.1. Solubilidad y estudio espectrofotométrico

El resto piperidinil unido al anillo aromático de la pirimidina hace que el minoxidilo (MIN) se disuelva con dificultad en agua, pese a la polaridad que le confieren sus grupos funcionales (página 115).

En medio neutro, a 20,0 °C, se ha conseguido disolver 0,1540 g de minoxidilo en 100 ml de agua. En medios ácidos, donde el óxido de amina se encuentra protonado, la solubilidad de este compuesto iónico aumenta significativamente.

El espectro de absorción del minoxidilo tiene tres bandas de gran intensidad con máximos en 230, 262 y 288 nm (figura 4.87).

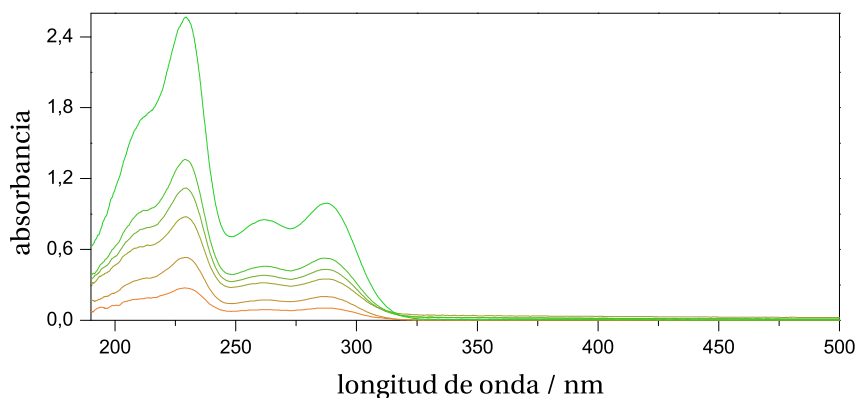


Figura 4.87: Espectro de absorción UV-visible del minoxidilo. $[\text{MIN}] = 7,99 \cdot 10^{-6} - 7,99 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $\text{pH} = 6,8$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por su interés cinético, se han determinado los coeficientes de absorción molar de las dos bandas más intensas (figura 4.88):

$$\epsilon_{\text{MIN}, 230 \text{ nm}} = 34.300 \pm 900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{MIN}, 288 \text{ nm}} = 13.400 \pm 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

[MIN] / M	A_{230}	A_{288}	[MIN] / M	A_{230}	A_{288}
$7,99 \cdot 10^{-6}$	0,1042	0,2714	$3,19 \cdot 10^{-5}$	0,4299	1,1134
$1,59 \cdot 10^{-5}$	0,1997	0,5319	$3,99 \cdot 10^{-5}$	0,5242	1,3537
$2,39 \cdot 10^{-5}$	0,3252	0,8494			

$$y = (0,00 \pm 0,02) + (34.300 \pm 900)x \quad (4.133)$$

$$y = (0,00 \pm 0,01) + (13.400 \pm 400)x \quad (4.134)$$

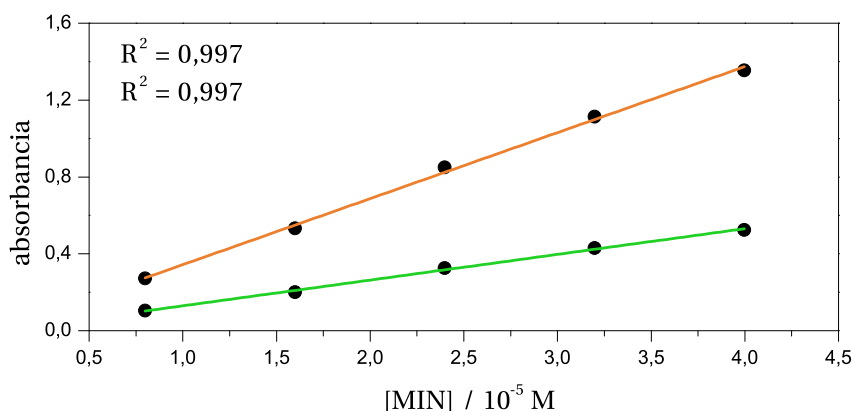


Tabla 4.46 y Figura 4.88: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por el minoxidilo. $\lambda = 288$ nm (verde), $\lambda = 230$ nm (naranja), pH = 6,8, $T = 20,0$ °C.

Se observa cómo los átomos que aportan electrones a la estructura aromática del minoxidilo hacen que sus bandas de absorción tengan coeficientes muy altos.

Debido al pK_a de la reacción de protonación del óxido de amina, el espectro de absorción del minoxidilo cambia cuando el pH es cercano a 4,6. Se ha determinado cómo la variación de pH modifica la forma de los espectros, ya que puede ser significativo en el seguimiento cinético de la reacción de nitrosación del compuesto. La figura 4.89 muestra el resultado del experimento realizado según se indica en la sección 3.1.2.3.

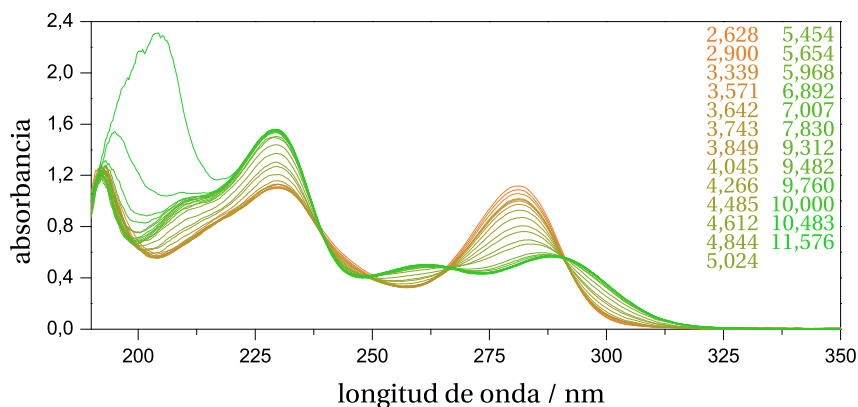


Figura 4.89: Variación del espectro de absorción del minoxidilo según el pH. [MIN] = $5,01 \cdot 10^{-5}$ M, $T = 20,0$ °C.

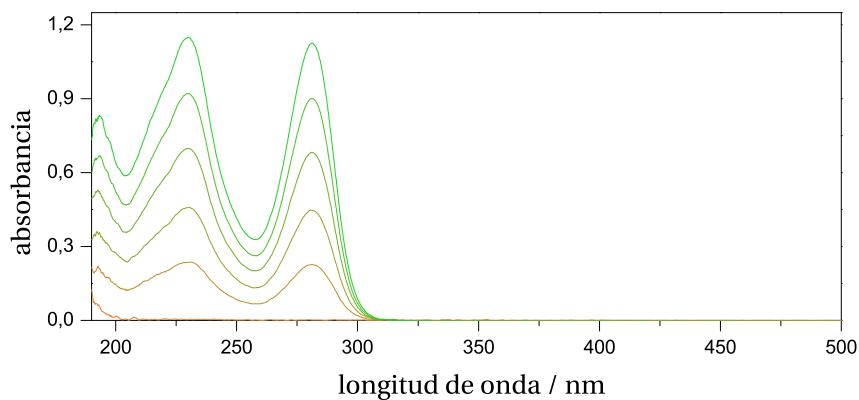
Al aumentar la acidez del medio, el oxígeno con carga negativa del óxido de amina se protona, rompiendo el enlace dativo por el que cedía su carga negativa al anillo aromático. Este efecto se aprecia en el espectro de absorción del compuesto, en el que según se reduce el pH, la banda con máximo en 288 nm se desplaza hacia una posición más energética centrada en $\lambda = 280$ nm. La figura 4.89 muestra que el equilibrio ácido-base del minoxidilo tiene cuatro puntos isobésticos en $\lambda = 198, 239, 265$ y 290 nm.

También se ha determinado el coeficiente de extinción molar de la banda menos energética del minoxidilo a pH = 3,1 y pH = 4,1 (figuras 4.90 y 4.91, respectivamente):

$$\epsilon_{\text{MIN}, 282 \text{ nm}, \text{pH} = 3,1} = 22.400 \pm 100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{MIN}, 282 \text{ nm}, \text{pH} = 4,1} = 19.800 \pm 400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Como era de esperar, su intensidad se incrementa al aumentar la acidez.



[MIN] / M	A_{282}	[MIN] / M	A_{282}
$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,2253	$4,0 \cdot 10^{-5}$	0,8971
$2,0 \cdot 10^{-5}$	0,4445	$5,0 \cdot 10^{-5}$	1,1203
$3,0 \cdot 10^{-5}$	0,6785		

$$y = (0,000 \pm 0,004) + (22.400 \pm 100)x \quad (4.135)$$

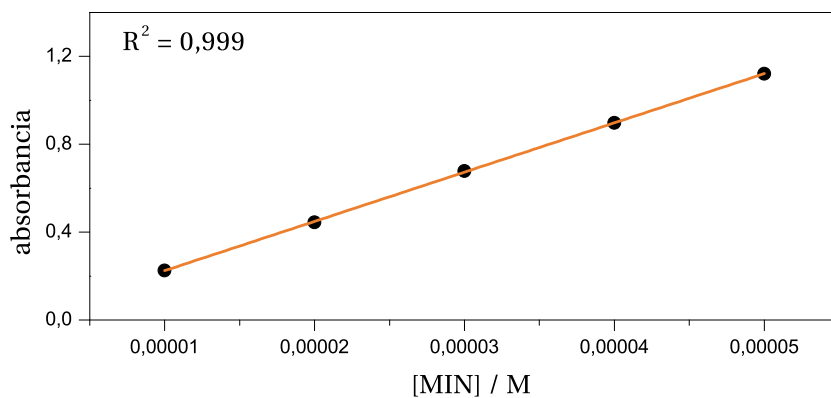
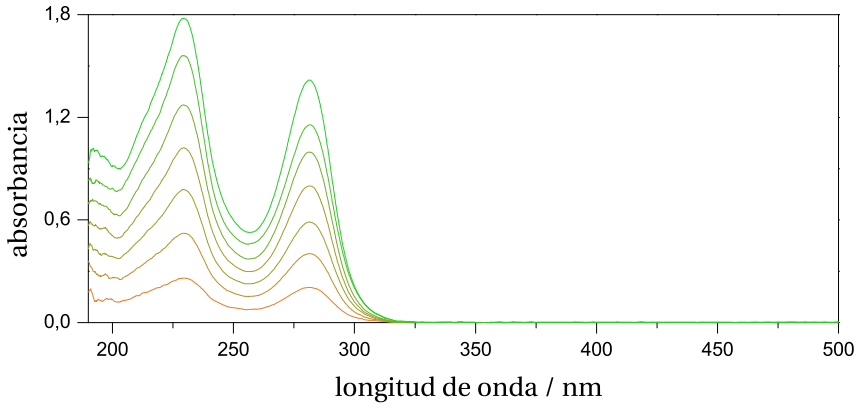


Tabla 4.47 y Figura 4.90: Coeficiente de absorción molar del minoxidilo a pH = 3,1. $\lambda = 282$ nm, $T = 20,0$ °C.



[MIN] / M	A_{282}	[MIN] / M	A_{282}
$1,0 \cdot 10^{-5}$	0,2058	$5,0 \cdot 10^{-5}$	0,9952
$2,0 \cdot 10^{-5}$	0,4024	$6,0 \cdot 10^{-5}$	1,1549
$3,0 \cdot 10^{-5}$	0,5868	$7,0 \cdot 10^{-5}$	1,4150
$4,0 \cdot 10^{-5}$	0,7980		

$$y = (0,00 \pm 0,02) + (19.800 \pm 400)x \quad (4.136)$$

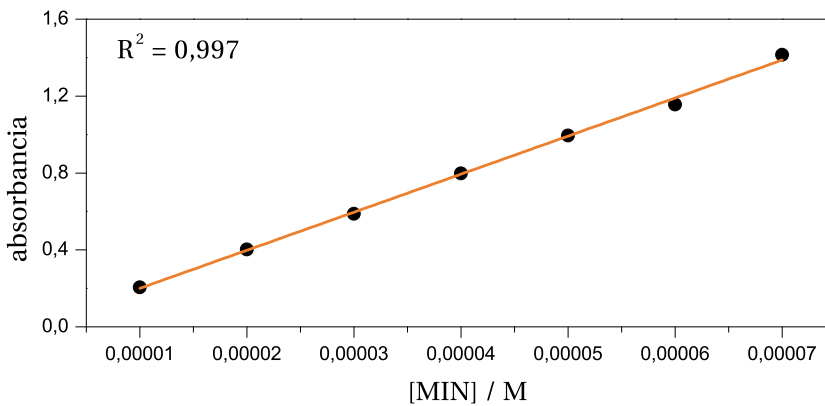


Tabla 4.48 y Figura 4.91: Coeficiente de absorción molar del minoxidilo a pH = 4,1. $\lambda = 282$ nm, $T = 20,0$ °C.

4.6.2. Reacción entre minoxidilo y nitrito

Para averiguar la mejor forma de seguir cinéticamente la reacción de nitrosación del minoxidilo, se preparó una disolución de ambos reactivos en medio ácido y se obtuvieron sus espectros de absorción a lo largo del tiempo. La figura 4.92 muestra los resultados.

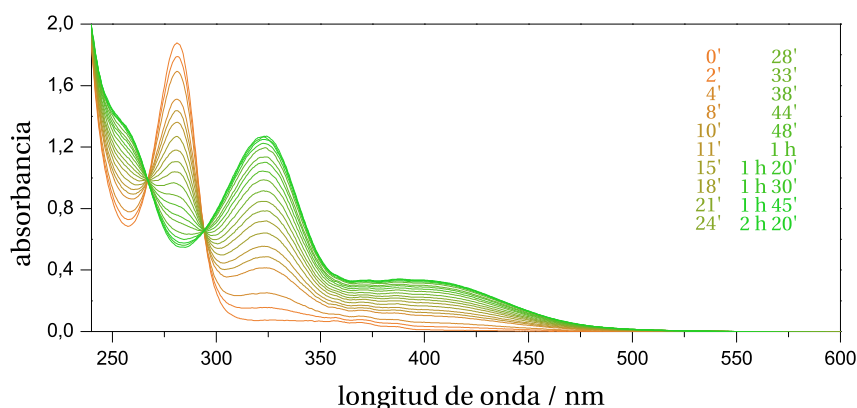


Figura 4.92: Variación con el tiempo del espectro de absorción del minoxidilo durante su nitrosación. $[\text{MIN}]_0 = 5,81 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $[\text{NIT}] = 1,83 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,0$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

Se observa que, sobre la banda de absorción característica del sistema nitroso/nitrito del primer espectrograma (en torno a $\lambda = 350 \text{ nm}$) van apareciendo dos bandas de absorción asociadas al producto de nitrosación nitrosominoxidilo, al mismo tiempo que disminuye la intensidad de la banda centrada en $\lambda = 282 \text{ nm}$. Las dos nuevas bandas tienen sus máximos de absorción en $\lambda = 321$ y 400 nm . La figura 4.93 muestra los resultados obtenidos para medir sus coeficientes de absorción molar, trabajando siempre con exceso de nitrito. Se encontró así que:

$$\epsilon_{\text{NMIN}, 321 \text{ nm}} = 14.070 \pm 80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{NMIN}, 400 \text{ nm}} = 4.180 \pm 30 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Los resultados obtenidos aconsejaron seguir la reacción de nitrosación del

[NMIN] / M	A_{321}	A_{400}	[NMIN] / M	A_{321}	A_{400}
$1,62 \cdot 10^{-5}$	0,2058	0,0648	$9,70 \cdot 10^{-5}$	1,3524	0,4030
$3,23 \cdot 10^{-5}$	0,4294	0,1277	$1,13 \cdot 10^{-4}$	1,5475	0,4602
$4,85 \cdot 10^{-5}$	0,6587	0,1976	$1,29 \cdot 10^{-4}$	1,7983	0,5355
$8,09 \cdot 10^{-5}$	1,1150	0,3319	$1,46 \cdot 10^{-4}$	2,0324	0,6074

$$y = -(0,02 \pm 0,007) + (14,070 \pm 80)x \quad (4.137)$$

$$y = -(0,005 \pm 0,003) + (4,180 \pm 30)x \quad (4.138)$$

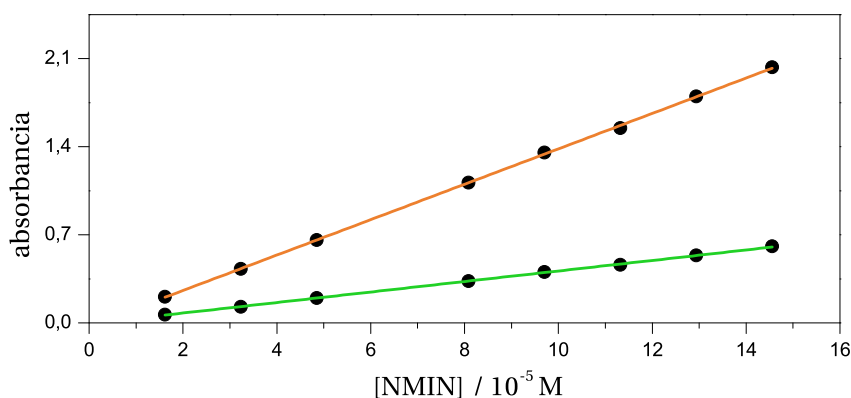


Tabla 4.49 y Figura 4.93: Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer por el nitrosominoxidilo. $\lambda = 321$ nm (naranja), $\lambda = 400$ nm (verde), pH = 4,0, $T = 20,0$ °C.

minoxidilo en $\lambda = 321$ nm, debido a la gran intensidad de esta banda y a la ausencia de otros picos que pudieran interferir.

4.6.3. Órdenes parciales de reacción

Para encontrar los órdenes parciales de reacción se ha utilizado los métodos de velocidades iniciales y aislamiento, trabajando con exceso de nitrito. De este

modo, la ecuación de velocidad

$$v = k_{\text{obs}}[\text{MIN}]^m[\text{NIT}]^n \quad (4.139)$$

puede escribirse así:

$$v = p[\text{MIN}]^m \quad (4.140)$$

siendo p la pseudoconstante:

$$p = k_{\text{obs}}[\text{NIT}]^n \quad (4.141)$$

La forma logarítmica de la ecuación 4.140:

$$\ln v_o = \ln p + m \ln[\text{MIN}]_o \quad (4.142)$$

se ha representado en la figura 4.94 que revela un orden parcial unitario respecto a la concentración de minoxidilo.

Trabajando con diferentes concentraciones en exceso de minoxidilo, se ha manejado la forma logarítmica de la ecuación 4.142:

$$\ln p = \ln k_{\text{obs}} + n \ln[\text{NIT}] \quad (4.143)$$

La figura 4.95 muestra que también es unitario el orden respecto a la concentración de nitrito.

4.6.4. Determinación de las constantes de velocidad

Para conocer la constante de velocidad de la reacción de nitrosación del minoxidilo se ha manejado el método de integración, con la misma concentración a de ambos reactivos, de modo que:

$$v = -\frac{d(a-x)}{dt} = k(a-x)^2 \quad (4.144)$$

La forma integrada de esa ecuación de velocidad es:

$$\frac{1}{a-x} - \frac{1}{a} = kt \quad (4.145)$$

$[\text{MIN}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$	$[\text{MIN}]_0 / \text{M}$	$\nu_0 / \text{M s}^{-1}$
$2,99 \cdot 10^{-5}$	0,02339	$8,99 \cdot 10^{-5}$	0,07189
$4,49 \cdot 10^{-5}$	0,03760	$1,044 \cdot 10^{-4}$	0,08209
$5,99 \cdot 10^{-5}$	0,04980	$1,198 \cdot 10^{-4}$	0,09430
$7,49 \cdot 10^{-5}$	0,06149		

$$y = (6,8 \pm 0,2) + (0,98 \pm 0,03)x \quad (4.146)$$

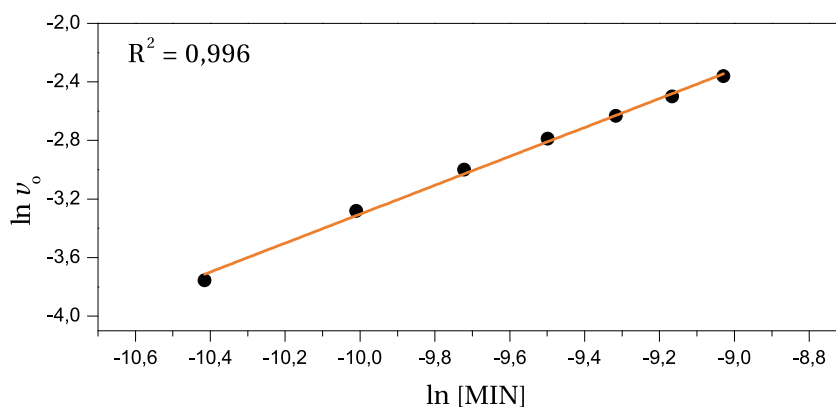


Tabla 4.50 y Figura 4.94: Influencia de la concentración de minoxidilo en la velocidad inicial de reacción. $[\text{NIT}] = 0,02 \text{ M}$, $\text{pH} = 4,00$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

[NIT] / M	p / s^{-1}	[NIT] / M	p / s^{-1}
$2,35 \cdot 10^{-2}$	$3,58 \cdot 10^{-3}$	$6,37 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$
$3,41 \cdot 10^{-2}$	$5,35 \cdot 10^{-3}$	$6,57 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$
$4,54 \cdot 10^{-2}$	$6,72 \cdot 10^{-3}$	$6,71 \cdot 10^{-2}$	$1,001 \cdot 10^{-2}$
$5,48 \cdot 10^{-2}$	$8,34 \cdot 10^{-3}$		

$$y = (1,9 \pm 0,1) + (1,00 \pm 0,02)x \quad (4.147)$$

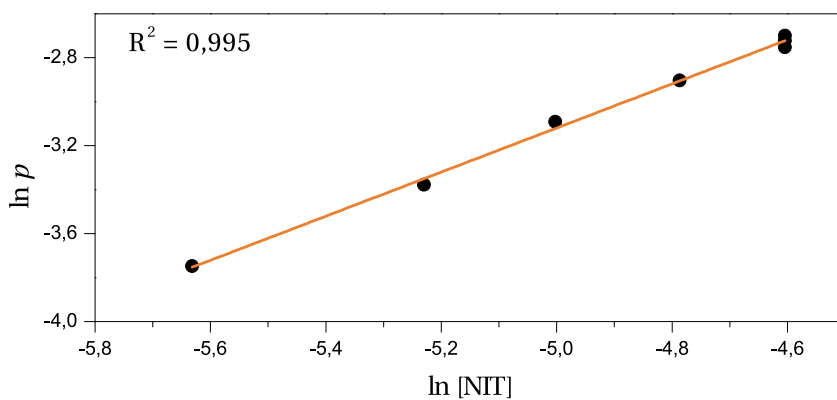


Tabla 4.51 y Figura 4.95: Influencia de la concentración de nitrito en el parámetro p .
 pH = 4,00, $I = 0,2$ M, $T = 20,0$ °C.

$$y = (5042 \pm 2) + (1,818 \pm 0,009)x \quad (4.148)$$

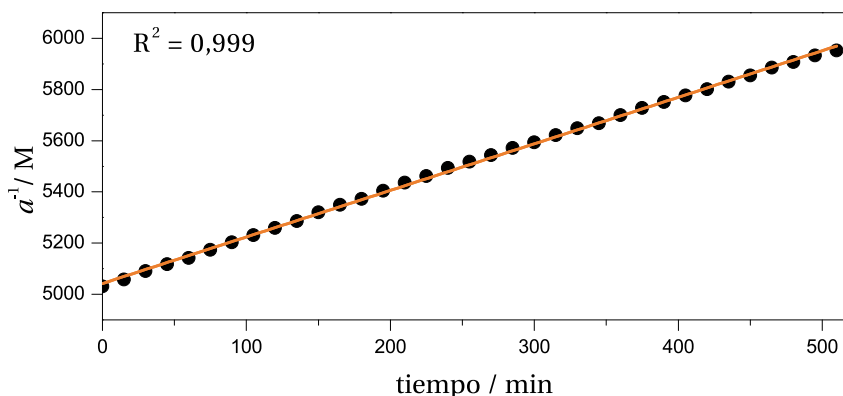


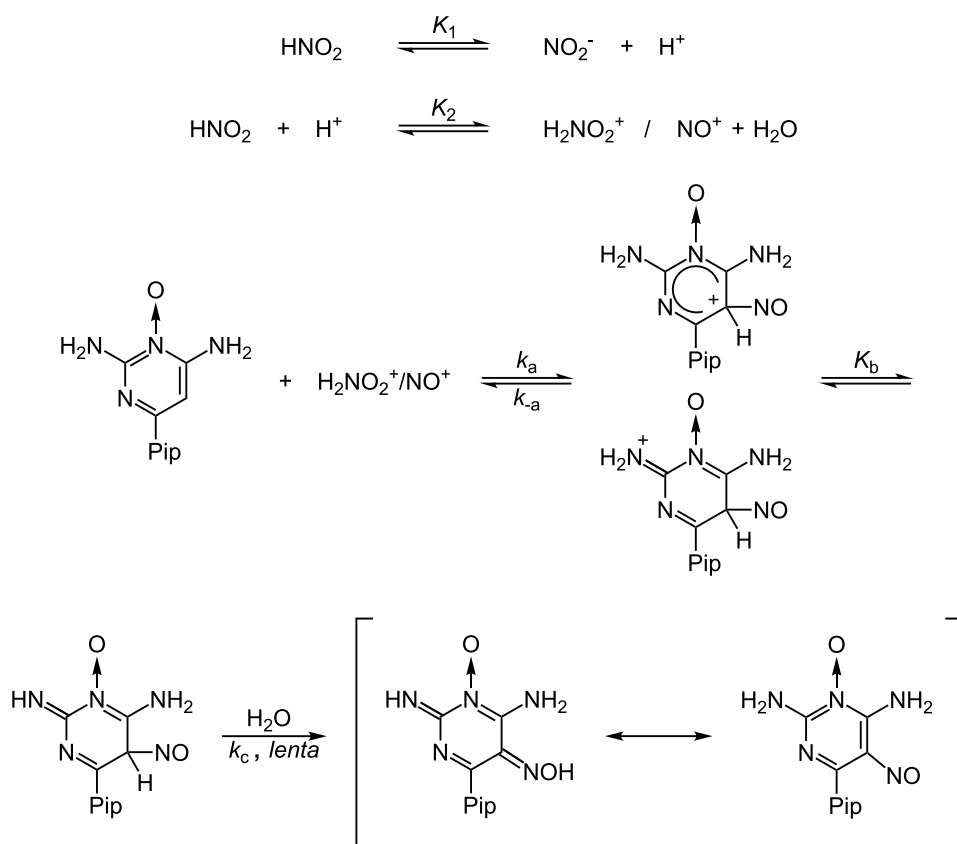
Tabla 4.52 y Figura 4.96: Ajuste de los datos experimentales a la forma integrada de la ecuación de velocidad de segundo orden. $[MIN]_0 = [NIT]_0 = a_0 = 2,00 \cdot 10^{-4} M$, $pH = 4,00$, $I = 0,2 M$, $T = 20,0 ^\circ C$.

La figura 4.96 muestra el excelente ajuste de los resultados a la ecuación de velocidad de orden dos. La pendiente de la recta corresponde directamente a la constante de velocidad. El valor inverso de la ordenada en el origen a^{-1} es, en efecto, la concentración inicial de reactivos, lo que supone una sanción favorable del método de trabajo utilizado.

4.6.5. Influencia de acidez del medio

Del mecanismo de reacción propuesto (esquema 4.8) se deduce con facilidad la ecuación 4.149. Con objeto de verificar la validez de este mecanismo, se programó una serie de experimentos cinéticos a diferentes pHs. La figura 4.97 muestra los resultados obtenidos.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_a K_2 [H^+]^2}{([H^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [H^+]\right)} \quad (4.149)$$



Esquema 4.8: Mecanismo propuesto para la nitrosación del minoxidilo.

De la misma forma que se procedió con los demás sustratos nitrosables, el ajuste de la ecuación 4.149 se ha hecho manejándola en la forma:

$$k_{\text{obs}} = \frac{\alpha[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1)(1 + \beta[\text{H}^+])} \quad (4.151)$$

obteniendo, para los parámetros ajustables α y β los valores:

$$\alpha = 4.500 \pm 300 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
2,32	2,0563	3,63	0,2676
2,48	1,8607	3,68	0,2276
2,57	1,7210	3,68	0,1754
2,71	1,4922	3,72	0,1877
2,86	1,2240	3,75	0,1451
2,99	1,0243	3,78	0,1933
3,19	0,6168	3,83	0,1066
3,27	0,5342	4,05	0,1137
3,27	0,5390	4,61	0,0208
3,39	0,4002	4,62	0,0168
3,47	0,3256		

$$y = \frac{(4.500 \pm 300)(10^{-x})^2}{(10^{-x} + 6,65 \cdot 10^{-4})(1 + (1.700 \pm 100)10^{-x})} \quad (4.150)$$

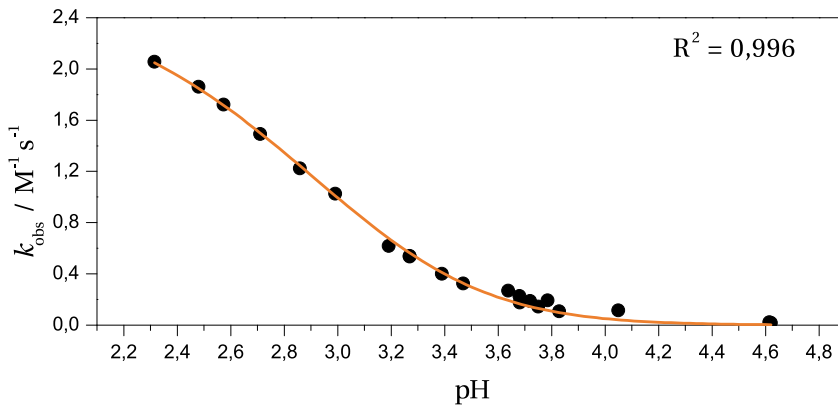


Tabla 4.53 y Figura 4.97: Influencia de la acidez del medio en la constante de velocidad observada. $[\text{MIN}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 2,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $I = 0,2 \text{ M}$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$\beta = 1.700 \pm 100 \text{ M}^{-1}$$

Con el valor del parámetro α se ha calculado el de k_a , constante de velocidad de la reacción de nitrosación del minoxidilo (esquema 4.8). Como $K_2 = 3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ se obtiene que:⁸¹

$$k_a = (1,5 \pm 0,1) \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

El orden de magnitud de la constante de velocidad sugiere que la reacción de nitrosación del minoxidilo se encuentra controlada por difusión.

4.6.6. Influencia de la fuerza iónica

Como con los demás sustratos de nitrosación investigados en este trabajo, se realizaron experimentos cinéticos con distintos valores de la fuerza iónica I , regulada con NaClO_4 (que no da lugar a la formación de compuestos de nitrosilo). La figura 4.98 muestra que, también como en los casos anteriores, la fuerza iónica no ejerce influencia sobre la constante de velocidad k_{obs} , coherentemente con el mecanismo propuesto.

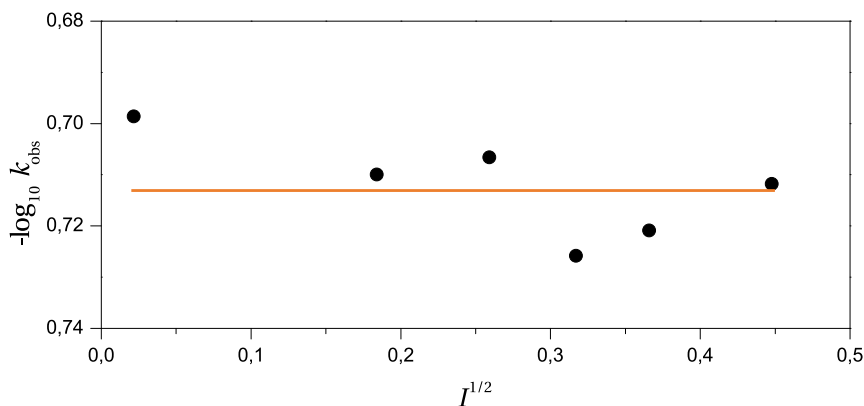


Figura 4.98: Influencia de la fuerza iónica en la constante de velocidad. $[\text{MIN}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 2,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,00$, $T = 20,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.6.7. Efecto isotópico cinético

Realizando la misma reacción en dos medios diferentes, uno con agua y otro con agua pesada, se ha determinado el efecto isotópico cinético que aparece en la reacción de nitrosación del minoxidilo. A $\text{pH} = 2,0$, $(k_a/K_b k_c)[\text{H}^+] \gg 1$ y $[\text{H}^+] \gg K_1$, la ecuación 4.149 se simplifica, obteniéndose el siguiente cociente entre las constantes en los dos medios:

$$\frac{k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}}}{k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}}} = \frac{K_2^{\text{H}_2\text{O}}}{K_2^{\text{D}_2\text{O}}} \frac{k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{k_c^{\text{D}_2\text{O}}} \quad (4.152)$$

El estudio cinético de las reacciones de nitrosación en agua y agua deuterada condujo a los valores: $k_{\text{obs}}^{\text{H}_2\text{O}} = 2,29 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{obs}}^{\text{D}_2\text{O}} = 0,73 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Como el coeficiente $K_2^{\text{D}_2\text{O}}/K_2^{\text{H}_2\text{O}} = 2,7$, resulta que:²⁵⁷

$$\frac{k_c^{\text{H}_2\text{O}}}{k_c^{\text{D}_2\text{O}}} = 8,41 \quad (4.153)$$

El efecto isotópico así encontrado es coherente con la desprotonación del intermedio de Wheland en la etapa determinante de velocidad (esquema 4.8).

4.6.8. Influencia de la temperatura

Como con los demás sustratos nitrosables, se estudió la influencia de la temperatura sobre la constante k_c de la reacción de nitrosación de minoxidil. La tabla 4.54 recoge los resultados obtenidos al trabajar en el intervalo $T = 20\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$.

$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$T / ^\circ\text{C}$	$k_{\text{obs}} / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
20,0	0,1905	35,0	0,2850
25,0	0,2246	40,0	0,3298
30,0	0,2638		

Tabla 4.54: Influencia de la temperatura en la constante de velocidad. $[\text{MIN}]_0 = [\text{NIT}]_0 = 2,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, $\text{pH} = 4,00$, $I = 0,2 \text{ M}$.

$$y = (6,8 \pm 0,5) + (20 \pm 1) \cdot 10^3 x \quad (4.154)$$

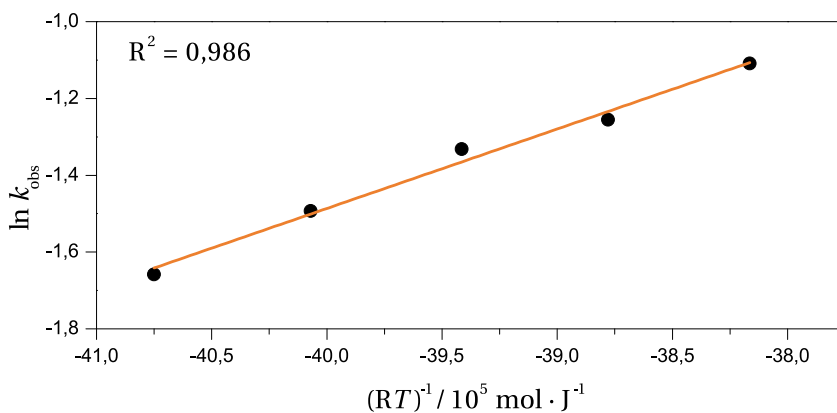


Figura 4.99: Cumplimiento de la ecuación de Arrhenius por los resultados de la tabla 4.54.

$$y = (0,068 \pm 0,004) + (18 \pm 1) \cdot 10^3 x \quad (4.155)$$

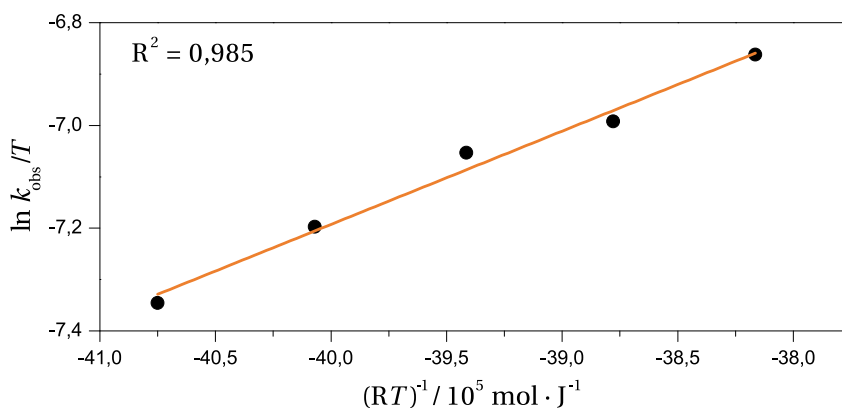


Figura 4.100: Cumplimiento de la ecuación de Eyring por los resultados de la tabla 4.54.

Mediante las ecuaciones de Arrhenius y Eyring-Wynne-Jones (figuras 4.99 y 4.100) se obtuvieron los valores de los parámetros de activación:

$E_a / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta S^\ddagger / \text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$
20 ± 1	18 ± 1	-163 ± 20

Tabla 4.55: Parámetros de activación de la reacción de nitrosación del minoxidilo a partir de los datos de la tabla 4.54.

4.6.9. Determinación del producto de reacción

En principio, el minoxidilo tiene cinco centros nitrosables en su estructura: el oxígeno del óxido de amina, el carbono 5 del anillo pirimidínico, los dos grupos amino primarios y uno terciario. Para averiguar cuál es el principal producto de reacción, se sintetizó el minoxidilo nitrosado (véase página 128), comprobando que es el mismo que se obtiene en los experimentos cinéticos y se ha caracterizado mediante diferentes técnicas, como se describe a continuación.

En primer lugar se obtuvo el espectro de masas del producto obtenido en un experimento cinético (figura 4.101). Junto al pico del minoxidilo (210,0) se observa otro asignable al minoxidilo nitrosado (210,0 + 39), lo que permite descartar una doble nitrosación del sustrato. Sin embargo, este resultado no aclara en qué sitio tiene lugar la nitrosación.

Los espectros de RMN de protón y carbono (páginas 276 y siguientes) han facilitado esa información. En el espectro de protón del minoxidilo (figura 4.103) se puede ver cómo aparecen dos bandas con varios picos casi solapadas en 1,46 y 1,54 ppm, correspondientes a los protones en *meta* y *para* del anillo de piperidina unido al anillo aromático. Sobre 3,34 aparecen los protones en *orto* del mismo anillo, desplazados por la influencia del nitrógeno adyacente a su carbono. Más desapantallado aparece un pico en 6,79 ppm, correspondiente al protón del carbono 5 aromático. En el espectrograma de ^1H RMN del nitrosominoxidilo se observa que ese pico desaparece (por eso el software del espectrómetro amplía la escala hasta el primer pico), lo que confirma que el protón correspondiente ha sido sustituido por el grupo nitroso.

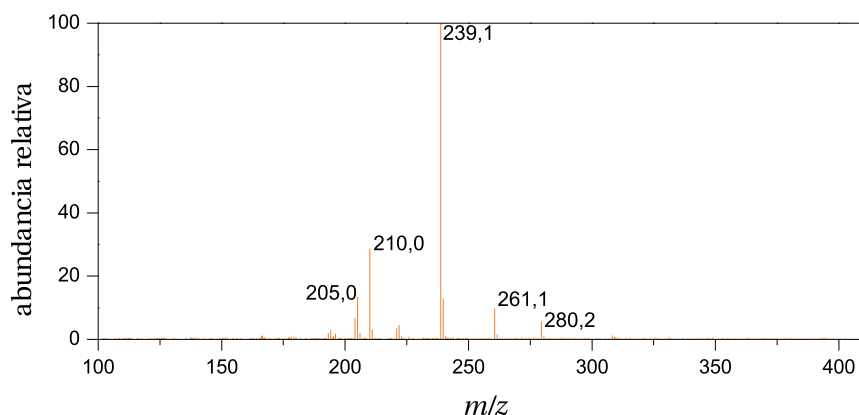


Figura 4.101: Espectro de masas por impacto electrónico positivo del nitrosominoxidilo.

Los espectros de resonancia magnética de carbono realizados a ambos compuestos también apuntan a que la nitrosación se produce en el carbono aromático. En el espectro realizado al minoxidilo se observan los picos correspondientes a los carbonos apantallados del anillo de piperidina (24,1 y 24,6 ppm) y los carbonos adyacentes al nitrógeno del mismo anillo (44,9 ppm). Los carbonos unidos a aminas del anillo de pirimidina aparecen desapantallados en 153,9, 152,9 y 151,7 ppm, mientras que el carbono 5 libre aparece más apantallado en 73,2 ppm. En el espectro de nitrosominoxidilo, se observa cómo este pico se ha desplazado hasta 139 ppm, lo que sugiere que ese carbono ha reaccionado con un grupo que le ha sustraído densidad electrónica y lo ha desapantallado.

La prueba definitiva de el minoxidilo sufre C-nitrosación se ha obtenido por difracción de rayos X (figura 4.102). Los cristales de nitrosominoxidilo conseguidos por cristalización en metanol se han estudiado mediante esta técnica y se ha obtenido la celda unidad que se muestra en la figura 4.107. El nitrosominoxidilo se agrupa en celdas de cuatro moléculas de nitrosominoxidilo y cuatro moléculas de agua unidas por puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y las aminas y el óxido del nitrosominoxidilo. Los datos fundamentales del cristal y del refinado de la estructura se muestran en la tabla 4.56. Este difractograma confirma la estructura de la molécula nitrosada en el carbono aromático 5 del

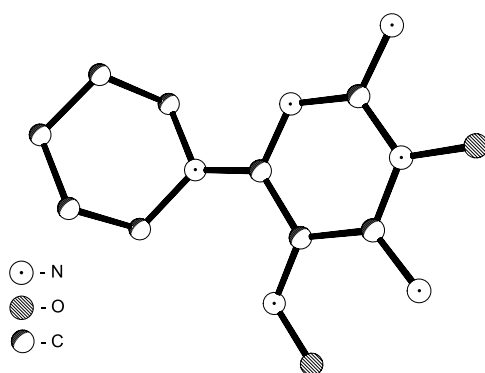


Figura 4.102: Detalle de una de las moléculas de nitrosominoxidilo en la celda unidad.

Propiedad	Valor
Fórmula empírica	$4(\text{C}_9 \text{H}_{14} \text{N}_6 \text{O}_2) \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Masa total de la celda	1007,10 g/mol
Temperatura	293,2 K
Longitud de onda	1,54178 Å
Sistema cristalino, grupo espacial	Triclínico, P-1
Dimensiones de la celda unidad	$a = 10,2884(3) \text{Å}$ $\alpha = 110,437(2)^\circ$ $b = 13,6490(3) \text{Å}$ $\beta = 95,594(2)^\circ$ $c = 18,6062(5) \text{Å}$ $\gamma = 91,674(2)^\circ$
Coefficiente de absorción	$0,886 \text{ mm}^{-1}$
Tamaño del cristal	0,10 x 0,08 x 0,06 mm
Reflexiones medidas / singulares	9.880 / 4.834

Tabla 4.56: Propiedades de la celda y del difractograma.

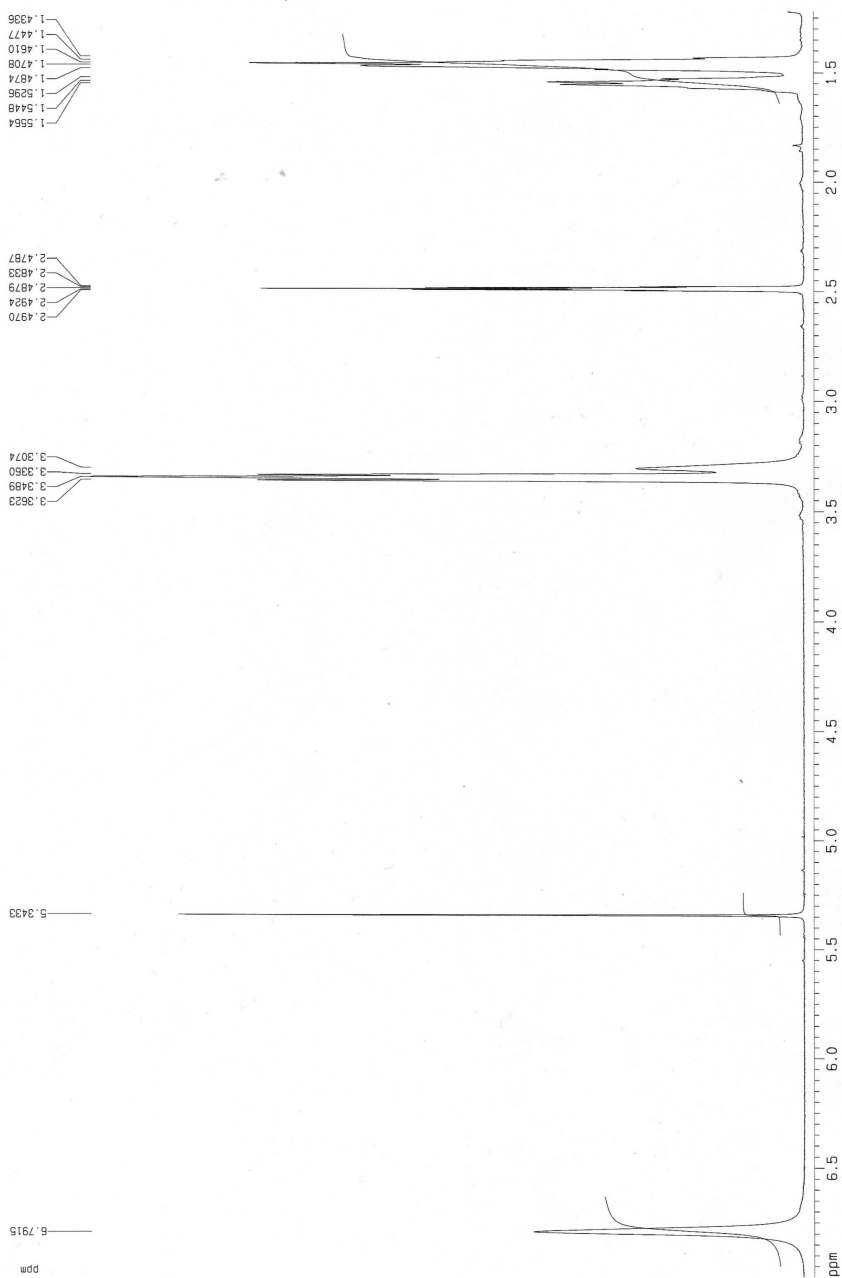


Figura 4.103: RMN ^1H del minoxidilo disuelto en DMSO deuterado.

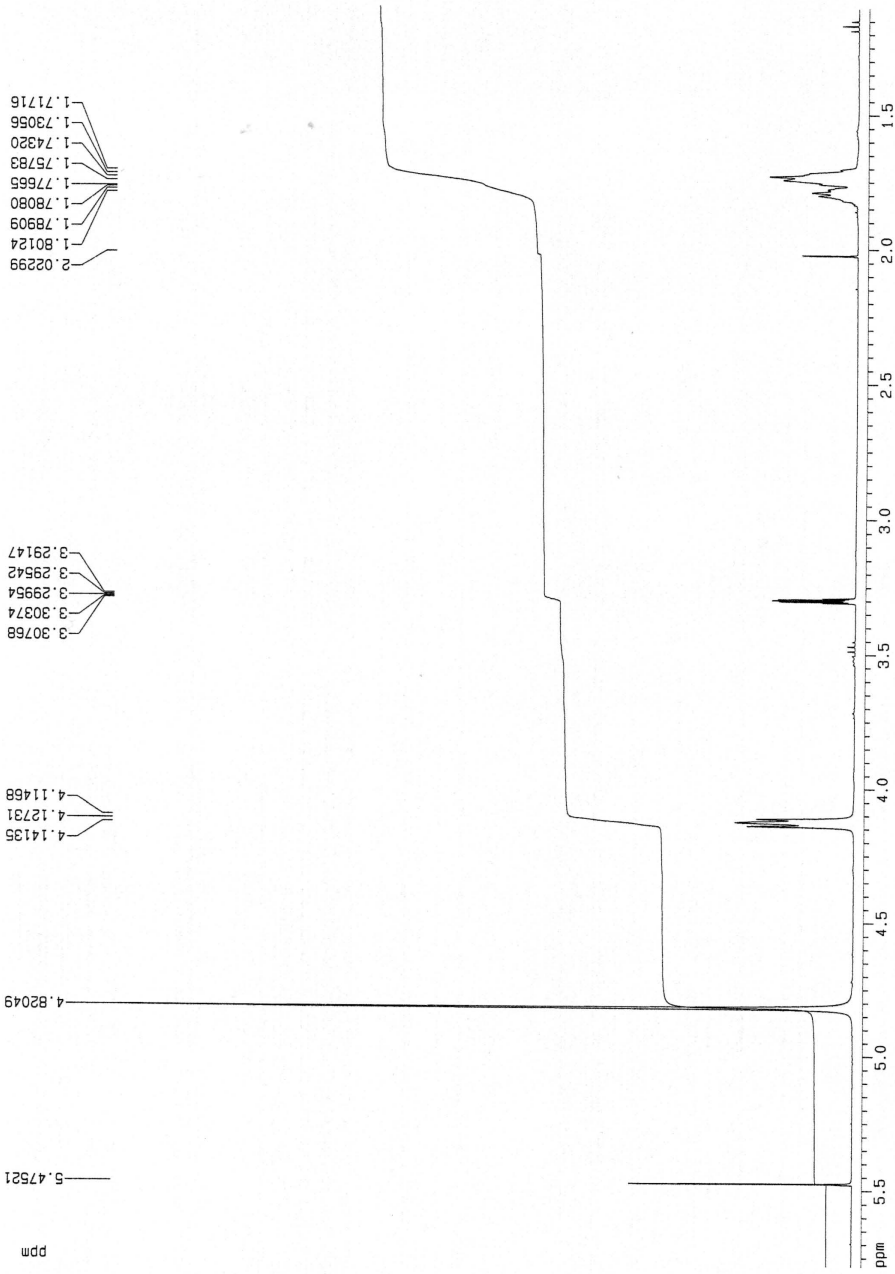


Figura 4.104: RMN ^1H del nitrosaminóxido disuelto en CD_3OD .

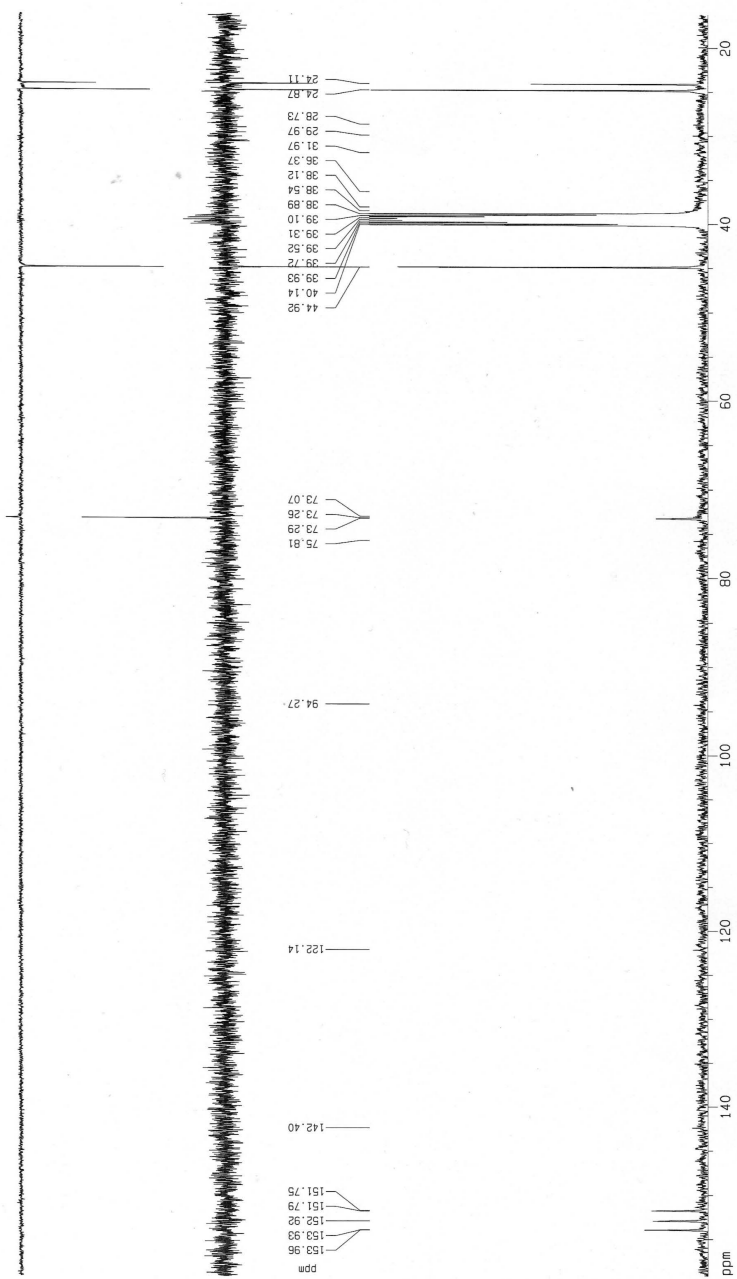


Figura 4.105: RMN ^{13}C del minoxidilo disuelto en DMSO deuterado.

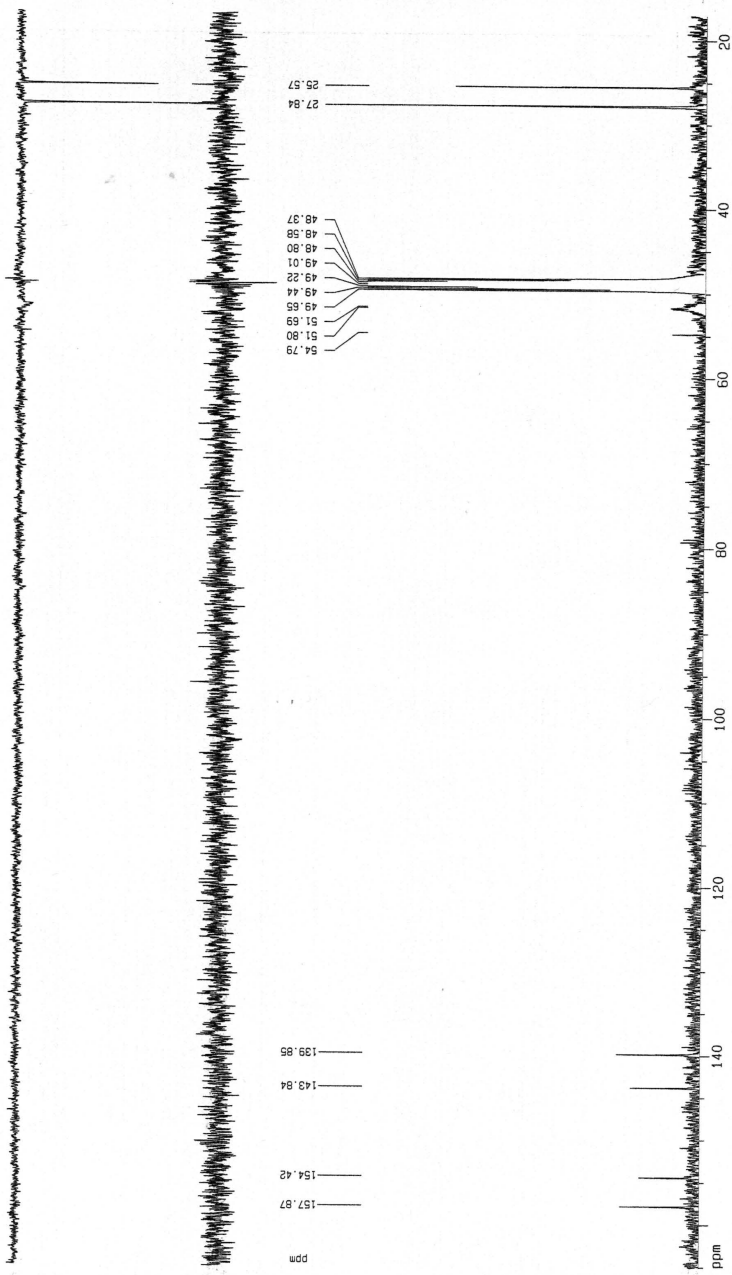


Figura 4.106: RMN ^{13}C del nitrosomimido disuelto en CD_3OD .

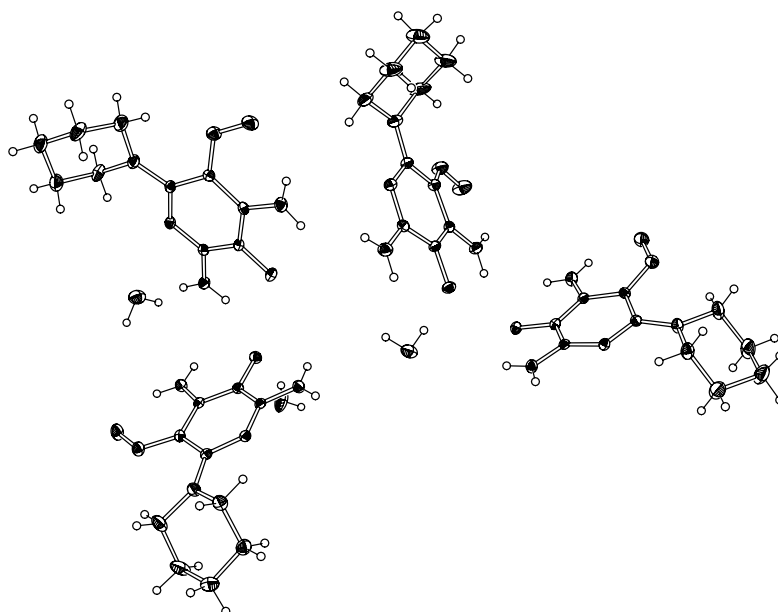


Figura 4.107: Geometría de la celda unidad de un cristal de nitrosominoxidilo.

anillo de pirimidina. Los cristales obtenidos de nitrosominoxidilo fundían a $T = 180\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6.10. Actividad biológica del nitrosominoxidilo

Test de Ames

La mutagenia del nitrosominoxidilo se ha determinado mediante el test de Ames. Los resultados obtenidos (tabla 4.57, figuras 4.108 y 4.109) demuestran que el nitrosominoxidilo no es un compuesto mutágeno en las dosis y cepas empleadas. Tanto en la cepa TA98, como en la TA100, con y sin activación con el sistema S9, no se produce para ninguna dosis un número de revertientes significativo con respecto a las placas a las que no se les añadía ningún compuesto (control negativo). Para descartar por completo la mutagenia del minoxidilo

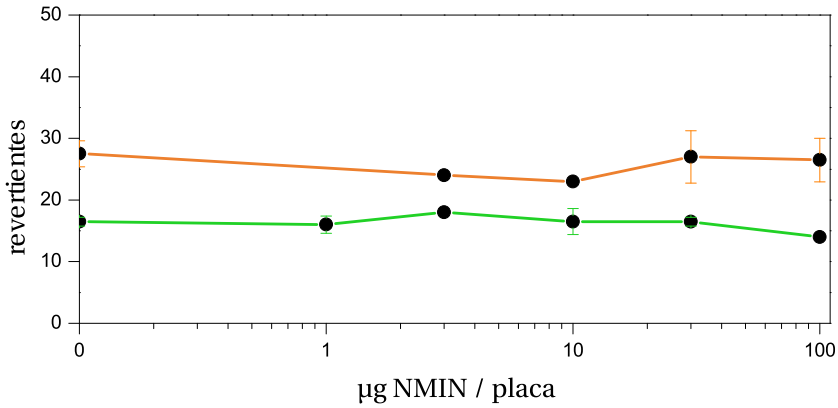


Figura 4.108: Resultados del Test de Ames con la cepa TA98 aplicado al nitrosaminodilo. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

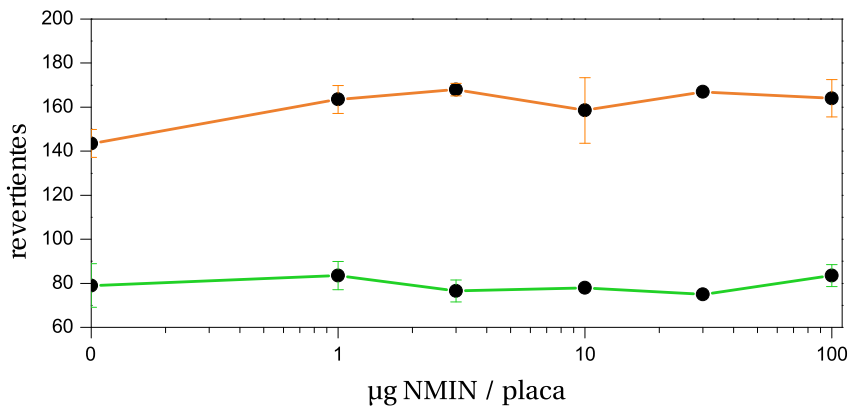


Figura 4.109: Resultados del Test de Ames con la cepa TA100 aplicado al nitrosaminodilo. Los resultados sin extracto S9 se muestran de color naranja y los resultados con extracto S9, de color verde.

sería necesario repetir las experiencias con otras cepas de *Salmonella typhimurium*, como TA97 o TA102, y comprobar que tampoco las produce mutaciones.

μg NMIN / placa	TA98	TA98 + S9	TA100	TA100 + S9
control negativo	28 \pm 2	16,5 \pm 0,7	144 \pm 6	80 \pm 10
1		16 \pm 1	164 \pm 6	84 \pm 6
3	24	18	168 \pm 3	76 \pm 5
10	23	16 \pm 2	160 \pm 10	78
30	27 \pm 4	16,5 \pm 0,7	167	75
100	26 \pm 3	14 \pm 0	164 \pm 8	84 \pm 5
control positivo	365	426	1.050 \pm 50	730 \pm 10

Tabla 4.57: Resultados del test de Ames aplicado al nitrosominoxidilo. Controles positivos: TA98: 10 μg NPD, TA98 + S9: 2 μg 2AA, TA100: 0,3 μg 4NQO y TA100 + S9 2 μg 2AA

Test del MTT

Se ha estudiado la citotoxicidad del nitrosominoxidilo mediante el ensayo de proliferación celular MTT. Se han expuesto células V-79 durante 24 horas a cinco concentraciones diferentes del compuesto sintetizado y se ha medido la supervivencia de las células comparando la cantidad de MTT que reducen las células expuestas al compuesto con la cantidad reducida por células cultivadas en las mismas condiciones sin exposición a nitrosominoxidilo. Para todas las concentraciones, la supervivencia de las células ha sido aproximadamente del 100%, por lo que se ha concluido que el nitrosominoxidilo, hasta una concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M, no es un compuesto citotóxico.

	[NMIN] / μM	Supervivencia
a	0,1	(99 \pm 15) %
b	1	(97 \pm 7) %
c	10	(98 \pm 5) %
d	100	(99 \pm 5) %
e	1.000	(97 \pm 6) %

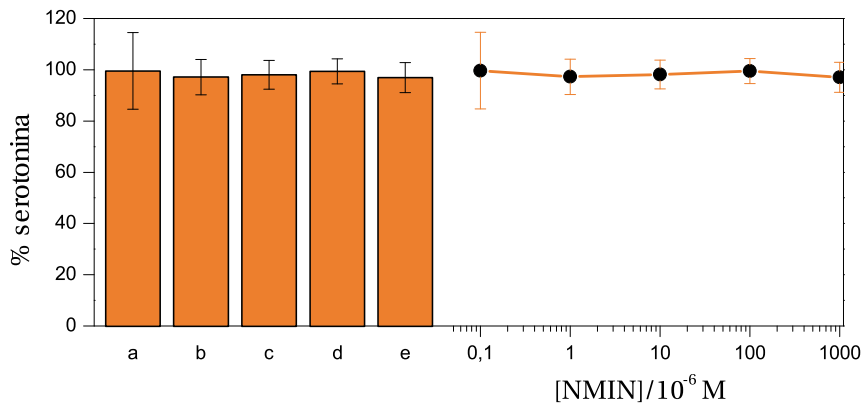


Tabla 4.58 y Figura 4.110: Supervivencia celular de V-79 en función de la concentración de nitrosominoxidilo.

4.7. Determinación de nitrito con minoxidilo

Como se ha descrito en páginas anteriores de esta Memoria, los nitritos son compuestos ubicuos en el medio ambiente, lo que supone un peligro potencial, debido a su capacidad para formar complejos con la hemoglobina y para reaccionar con sustratos nitrosables presentes en los alimentos y formar nitrosocompuestos, muchos de los cuales son mutágenos y cancerígenos. Por ello, numerosos organismos internacionales recomiendan controlar la concentración de nitrito en los alimentos y en el agua (véase página 45).

Existen numerosos métodos para la detección y determinación de nitrito (véase página 51). Sin embargo, con frecuencia hay necesidad (sobre todo en el medio rural) de disponer de métodos sencillos y baratos que permitan la determinación de nitritos en aguas de pozos, manantiales, etc. Por ello, en este trabajo se propone un nuevo método colorimétrico que utiliza como reactivo la molécula de minoxidilo, que se puede adquirir a bajo precio en cualquier farmacia. La rapidez de la reacción minoxidilo-nitrito y el elevado coeficiente de absorción molar del nitrosominoxidilo simplifican notablemente las condiciones de experimentación.

El método que se propone también puede ser base de una práctica de laboratorio en currículos de medio ambiente o de grado en Química.²⁶⁶

4.7.1. Descripción del método

El método consiste en la preparación de un medio de reacción básico formado por minoxidilo como reactivo principal, ácido clorhídrico y cloruro sódico como catalizador que favorece la formación de cloruro de nitrosilo (página 62) y reduce el tiempo de reacción. Para ello se preparan disoluciones estándar de HCl ($3,4 \cdot 10^{-2}$ M), NaCl (4,1 M) y minoxidilo ($3,9 \cdot 10^{-3}$ M). Esta última disolución puede prepararse por pesada directa de minoxidilo o por dilución de un preparado farmacéutico de uso habitual contra la caída del cabello, que generalmente se comercializa en forma de disolución al 2 ó 5 % de minoxidilo en una mezcla de agua, etanol y propilenglicol (20 %, 68-65 %, 10 %, respectivamente). Con esas disoluciones estándar se prepara el reactivo base con 10 ml de mino-

xidilo, 1 ml de NaCl y 1 ml de HCl. El exceso de minoxidilo hace innecesario el empleo de tampón.

A continuación, el reactivo básico se mezcla con 10 ml de la muestra a analizar y se mide la absorbancia en $\lambda = 325$ nm, donde la banda del nitrosominoxidilo es muy intensa (figura 4.92, página 262). Cuando el perfil cinético alcanza la meseta, se mide la absorbancia y se calcula la concentración de nitrito.

4.7.2. Curva de calibrado

Para obtener la curva de calibrado se preparan seis disoluciones de NaNO_2 de concentraciones entre $5,0 \cdot 10^{-5}$ y $3,00 \cdot 10^{-4}$ M, a partir de una disolución madre $1,0 \cdot 10^{-3}$ M. Con el método descrito en la sección anterior, se mezclan 10 ml de cada disolución con 12 ml del reactivo base y se miden las absorbancias en $\lambda = 325$ nm (figura 4.111). Se comprobó que el pH de las disoluciones así preparadas se encontraba en el margen $\text{pH} = 4,01 - 4,03$.

Se medía la absorbancia una vez alcanzada la meseta y, con las concentraciones iniciales de nitrito, se dibujó la curva de calibrado. La ordenada en el origen

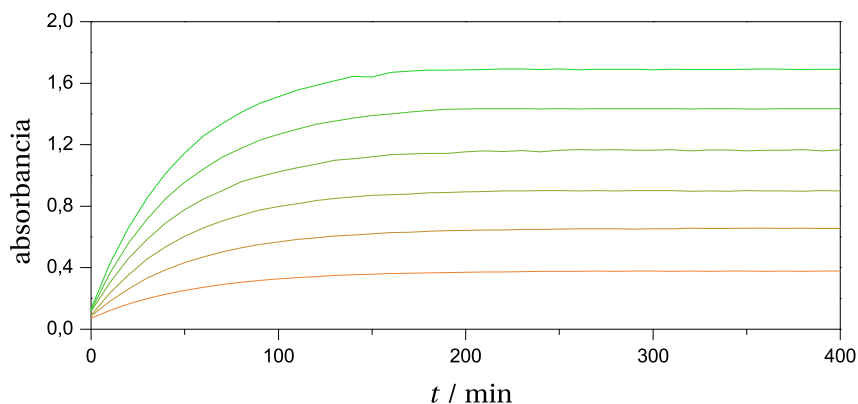


Figura 4.111: Perfiles cinéticos de las reacciones preparadas para el cálculo de la curva de calibrado. $\lambda = 325$ nm, $[\text{MIN}] = 1,74 \cdot 10^{-3}$ M, $[\text{NaNO}_2] = 2,37 \cdot 10^{-5} - 1,42 \cdot 10^{-4}$ M, $[\text{NaCl}] = 0,18$ M, $\text{pH} = 4,01 - 4,03$, $T = 25,0$ °C.

[NaNO ₂] / M	A ₃₂₅	[NaNO ₂] / M	A ₃₂₅
2,37·10 ⁻⁵	0,3760	9,48·10 ⁻⁵	1,1654
4,74·10 ⁻⁵	0,6550	1,18·10 ⁻⁴	1,4337
7,11·10 ⁻⁵	0,9001	1,42·10 ⁻⁴	1,6890

$$y = (0,119 \pm 0,007) + (11,040 \pm 70)x \quad (4.156)$$

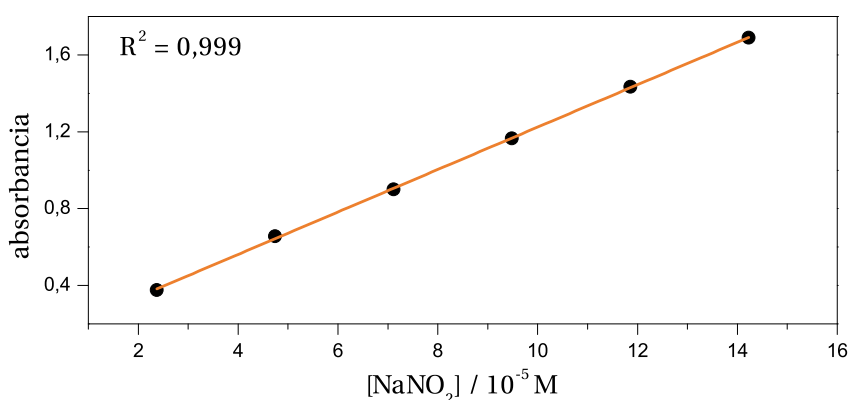


Tabla 4.59 y Figura 4.112: Curva de calibrado del nitrosominoxidilo. $\lambda = 325$ nm, [MIN] = $1,74 \cdot 10^{-3}$ M, [NaCl] = 0,18 M, pH = 4,01 - 4,03, $T = 25,0$ °C.

no es cero porque, aunque muy poco, el minoxidil absorbe ligeramente en la longitud de onda de trabajo ($\epsilon = 29,0 \pm 0,5$ M⁻¹ cm⁻¹).

4.7.3. Catálisis por el ion cloruro

Para estudiar el efecto de la catálisis en la reacción de nitrosación del minoxidilo se repitió el experimento con la concentración $1,42 \cdot 10^{-4}$ M y se sustituyó en el reactivo base 1 ml de disolución estándar de NaCl por 1 ml de agua (figura 4.113).

La presencia de cloruro en el medio de reacción no afectó a la respuesta del

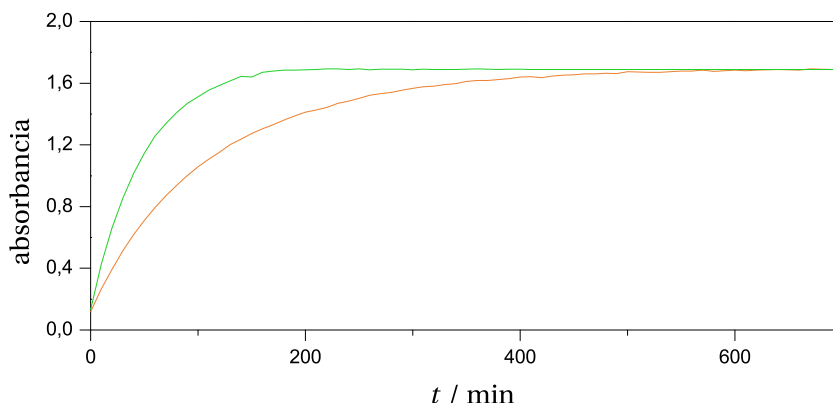


Figura 4.113: Efecto catalítico de los iones Cl^- en el tiempo de reacción. La cinética sin NaCl se muestra de color naranja y la cinética con NaCl (0,18 M) se muestra de color verde. $\lambda = 325 \text{ nm}$, $[\text{MIN}] = 1,74 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NaNO}_2] = 1,42 \cdot 10^{-4}$, $\text{pH} = 4,01$, $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

método y la reacción fue tres veces más rápida.

4.7.4. Efecto de iones metálicos

Se estudió el efecto de la presencia de iones metálicos en el medio debido a la posibilidad de que el minoxidilo o el nitrosominoxidilo formen complejos de coordinación con ellos.

Se prepararon disoluciones estándar de Al (III), Ca (II), Cr (III), Cu (II), Fe (II), Fe (III), Ni (II) y Zn (II) con concentración $2,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$. Para cada metal 1 ml de la disolución se han mezclado con 12 ml del reactivo base y 9 ml de la disolución estándar de nitrito $3,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

La mayor parte los iones no forman complejos de coordinación con el minoxidilo o el nitrosominoxidilo. Sólo el cobre (II) y el hierro (III) mostraron interferencias en la banda de absorción. El hierro (III) interfería con concentraciones superiores a $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y el cobre (II) con concentraciones superiores a $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

4.7.5. Precisión del método

Se repitió doce veces la reacción entre 12 ml del reactivo base y 10 ml de la disolución estándar de nitrito ($3 \cdot 10^{-4}$ M) para verificar la reproducibilidad del método. La tabla 4.60 muestra los resultados obtenidos.

Absorbancias medidas		
1,072	1,058	1,049
1,030	1,068	1,058
1,063	1,027	1,036
1,055	1,053	1,046

Tabla 4.60: Absorbancias medidas en diferentes experimentos para determinar la precisión del método.

La desviación estándar y la desviación estándar relativa han sido de $\pm 2 \cdot 10^{-6}$ M y 1,6%, respectivamente.

4.7.6. Límites de detección y cuantificación

Conociendo la desviación estándar del método ($\sigma = 0,0143$) es posible determinar su límite de detección, que es la mínima cantidad o concentración que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Para un nivel de confianza de detección de un 98,3% la expresión utilizada es:²⁶³

$$LD = \frac{3\sigma}{m} \quad (4.157)$$

donde m es la pendiente de la curva de calibrado.

Así, para el método el límite de detección es de $3,88 \cdot 10^{-6}$ M.

El límite de cuantificación es la cantidad más pequeña a la que se pueden hacer medidas cuantitativas. Su cálculo se hace mediante la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{10\sigma}{m} \quad (4.158)$$

El límite de cuantificación del método es de $1,29 \cdot 10^{-5}$ M. Este límite lo hace adecuado para el análisis de muestras fisiológicas, alimentarias y medioambientales.²⁶⁴

4.7.7. Aplicación del método

Se ha utilizado el método propuesto para determinar nitrito en una muestra de agua procedente de un pozo de Cardeñosa, provincia de Ávila. La muestra fue recogida, filtrada y guardada en una botella de poliestileno. Se mezclaron 10 ml de la muestra con 12 ml de la mezcla base. Se determinó una concentración de nitrito de $2,51 \pm 0,02$ ppm ($(3,63 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$ M)). En comparación con el resultado obtenido por el método oficial de medida, $2,48 \pm 0,06$ ppm, el método mostró un excelente comportamiento.

Discusión de los resultados

5.1. C-Nitrosación de compuestos aromáticos

Como se ha indicado en páginas anteriores de esta Memoria, los mecanismos de C-nitrosación aromáticos han sido menos investigados que los de nitración aromática. La causa es que, para que aquellos puedan transcurrir a velocidad adecuada, es necesaria la presencia en el sustrato nitrosable de grupos dadores de carga electrónica. Los agentes nitrosantes ion nitrosonio, nitrosacido y sales de nitrosonio son electrófilos mucho más débiles que el ion nitronio. Se estima que ion nitrosonio es 10^{14} veces menos reactivo que el ion nitronio.¹²⁹

En su Tesis Doctoral, González Mancebo investigó los mecanismo de C-nitrosación de una amplia serie de compuestos fenólicos (figura 5.1).²⁵⁰ Como estos sustratos son estructuralmente similares a los del presente trabajo, es de esperar que las reacciones de nitrosación de todos ellos estén relacionados isocinéticamente. Esto quiere decir que si comparten el mismo mecanismo, las entalpías y entropías de activación de los procesos de nitrosación de los sustratos deben satisfacer la relación:

$$\Delta H^\ddagger + \beta \Delta S^\ddagger = \text{cte} \quad (5.1)$$

donde β es un parámetro independiente de la temperatura.²⁶⁵

En la figura 5.2 se han representado las entropías de activación de las reacciones

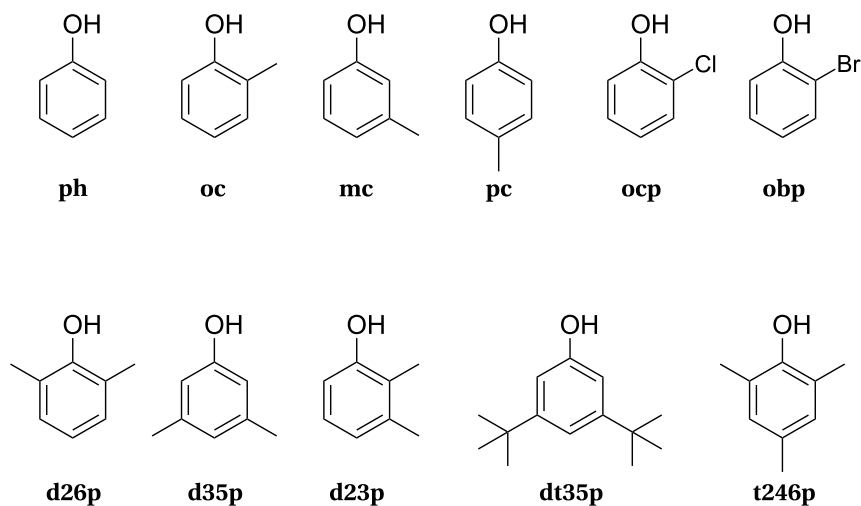


Figura 5.1: Compuestos estudiados por González Mancebo *et al.*²⁵⁰ Sus abreviaturas son **ph**, fenol; **oc**, *o*-cresol; **mc**, *m*-cresol; **pc**, *p*-cresol; **ocp**, *o*-clorofenol; **obp**, *o*-bromofenol; **d26p**, 2,6-dimetilfenol; **d35p**, 3,5-dimetilfenol; **d23p**, 2,3-dimetilfenol; **dt35p**, 3,5-di-*tert*-butilfenol y **t246p**, 2,4,6-trimetilfenol.

de nitrosación de los diferentes sustratos frente a las entalpías de activación. Se puede observar que existe una correlación lineal entre todos los puntos, lo que aporta un nuevo argumento para admitir que todos los sustratos se nitrosan siguiendo el mismo mecanismo.

Otra prueba de que los compuestos comparten el mismo mecanismo la constituye el criterio de los soviéticos Viktor Palm y Regina Vizgert quienes, a través de una formulación matemática del efecto isocinético, demostraron que existe una relación lineal entre dos series de valores logarítmicos de la constante de velocidad observada a dos temperaturas diferentes:²⁶⁷

$$\ln k_{T2} = a + b \ln k_{T1} \quad (5.2)$$

La figura 5.3 muestra el buen ajuste de los resultados experimentales a la correlación de Palm-Vizgert, representando el logaritmo natural de las constantes de velocidad a 25,0 °C frente al logaritmo de las constantes medidas a 30,0 °C.

Sustrato	ΔS^\ddagger / $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	ΔH^\ddagger / kJ mol^{-1}	Sustrato	ΔS^\ddagger / $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	ΔH^\ddagger / kJ mol^{-1}
DOP	-20	76	d23p	-109	46
TYR	-54	70	mc	-130	46
obp	-92	59	oc	-115	45
ocp	-101	56	d26p	-107	44
SER ($k_{\text{obs},2}$)	-92	53	d35p	-132	42
ph	-112	51	MIN	-163	20

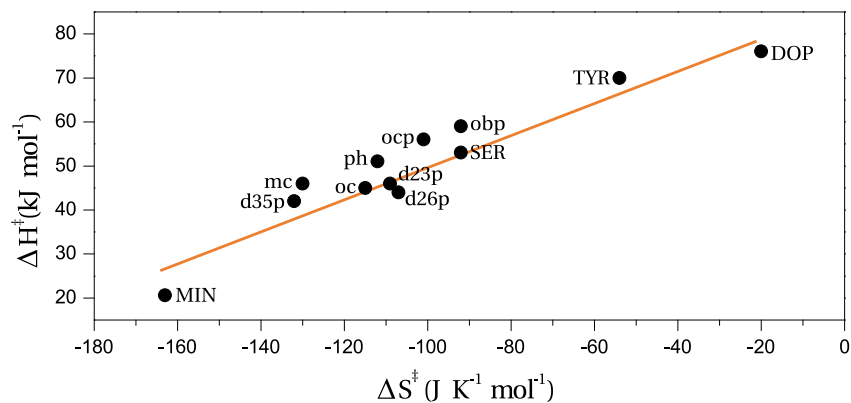


Tabla 5.1 y Figura 5.2: Relación isocinética entre los compuestos estudiados.

Sustrato	k_{25} / $M^{-1} s^{-1}$	k_{30} / $M^{-1} s^{-1}$	Sustrato	k_{25} / $M^{-1} s^{-1}$	k_{30} / $M^{-1} s^{-1}$
TYR	0,0048	0,0072	obp	0,088	0,116
DOP	0,0252	0,0405	oc	0,116	0,162
SER ($k_{obs,2}$)	0,057	0,078	d23f	0,167	0,228
pc	0,070	0,101	d35f	0,166	0,234
ocp	0,078	0,109	MIN	0,224	0,264

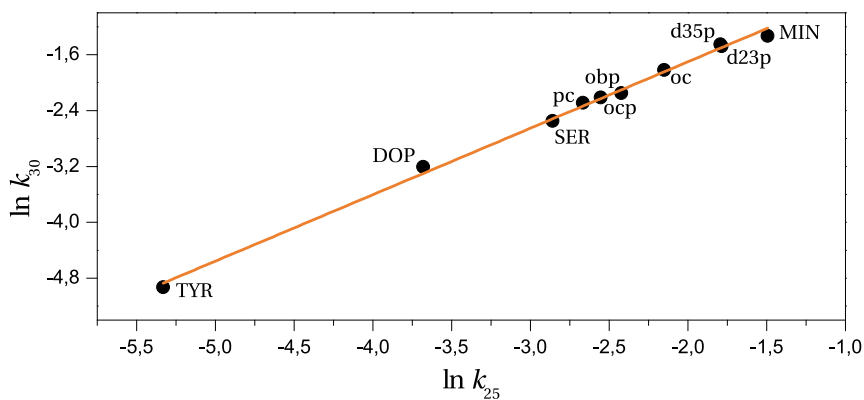


Tabla 5.2 y Figura 5.3: Representación de Palm-Vizgert. $T_2/T_1 = 0,983$.

Se puede admitir pues, que todos los sustratos reaccionan a través de un mecanismo común. La tabla 5.3 muestra los valores experimentales de las constantes de velocidad y equilibrio del mecanismo de C-nitrosación de todos los sustratos. La constante k_a , recogida en la segunda columna, es la constante de velocidad de la adición del grupo nitroso al anillo aromático. Para todos los compuestos su valor es superior a $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo que significa que esta primera etapa se encuentra controlada por difusión. También reúne los valores del efecto isotópico cinético observado en cada sustrato. Se puede ver que todos los compuestos, al compartir el mismo mecanismo, muestran un incremento similar en la velocidad de nitrosación al sustituir el hidrógeno de su estructura por deuterio. Este efecto se muestra más pronunciado en la molécula de minoxidilo.

A partir de los datos de la tabla 5.3 se han calculado en cada caso los valores de k_{obs} que se toman como índice de reactividad:

$$k_{\text{obs}} = k_a K_3 K_2 K_1 \quad (5.3)$$

La tabla 5.4 recoge los índices de reactividad de los sustratos investigados en esta tesis y por González Mancebo en una secuencia que va desde el compuesto más reactivo, minoxidilo, hasta los compuestos que no reaccionan con el ácido nitroso.

El orden de esta secuencia es razonable en términos de la activación de la posición nitrosable (sección 2.3.1), salvo en casos puntuales en los que el impedimento estérico interfiere reduciendo la reactividad de algún sustrato.

En los compuestos aquí estudiados el índice de reactividad varía varios órdenes de magnitud. El minoxidilo es el compuesto más reactivo, con su posición nitrosable libre situada en *orto* y *para* con respecto a tres aminas activantes. Además los nitrógenos heteroaromáticos se encuentran en posición *meta*, que es donde menos desactivan. La influencia del óxido de amina es pequeña en comparación con las aminas activantes.

La dopamina es el siguiente compuesto más reactivo con dos alcoholes activantes, uno de ellos en posición *para*.

La tiramina tiene una reactividad similar a la del *p*-cresol, puesto que ambos

Sustrato	$k_a K_2$ / $10^2 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$	k_a / $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_{-a}/K_b k_c$ / 10^4 M^{-1}	$k_c^{\text{H}_2\text{O}}/k_c^{\text{D}_2\text{O}}$
ph	$6,6 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,5$	3,5
mc	$8,1 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$	4,4
oc	$7,1 \pm 1,0$	$2,4 \pm 0,3$	$0,97 \pm 0,15$	3,2
pc	$0,83 \pm 0,12$	$0,28 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,3$	3,0
d23p	$10,7 \pm 1,5$	$3,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	3,0
d35p	$21,3 \pm 1,6$	$7,1 \pm 0,5$	$19,0 \pm 1,5$	4,3
d26p	$6,9 \pm 0,5$	$2,3 \pm 0,2$	$0,13 \pm 0,02$	3,0
t246p	sin reacción con el nitrito			
dt35p	sin reacción con el nitrito			
ocp	$1,0 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,03$	$2,0 \pm 0,2$	2,2
obp	$0,80 \pm 0,19$	$0,27 \pm 0,06$	$1,6 \pm 0,4$	1,9
ETH	sin reacción con el nitrito			
TYR	$0,47 \pm 0,09$	$0,16 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,07$	2,9
DOP	11 ± 1	$3,66 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,04$	3,4
SER ($k_{\text{obs},2}$)	13 ± 2	$4,3 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$	2,4
MIN	45 ± 3	15 ± 1	$0,17 \pm 0,01$	8,4

Tabla 5.3: Constantes asociadas a las C-nitrosaciones aromáticas de diferentes sustratos.

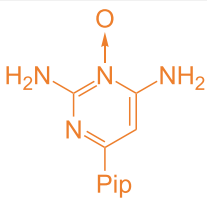
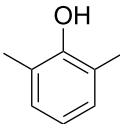
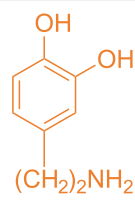
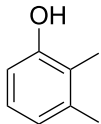
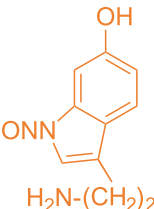
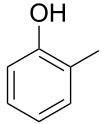
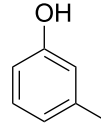
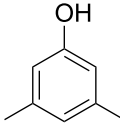
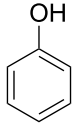

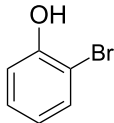
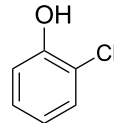
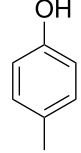
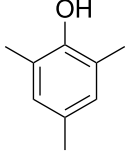
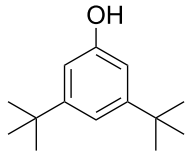
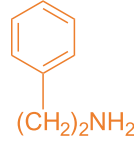

Sustrato	MIN	d26p	DOP	d23p
Fórmula				
k_{obs} ($M^{-1} s^{-1}$)	$2,64 \pm 0,08$	$0,53 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,07$	$0,10 \pm 0,02$
SER	oc	mc	d35p	ph
				
$0,072 \pm 0,009$	$0,07 \pm 0,01$	$0,062 \pm 0,008$	$0,011 \pm 0,001$	$0,010 \pm 0,001$
TYR	obf	ocp	pc	t246p
				
$0,006 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,0050 \pm 0,0007$	$0,0044 \pm 0,0009$	0
	dt35p	PHE	ETH	
				
	0	0	0	

Tabla 5.4: Índices de reactividad de los sustratos aromáticos C-nitrosados en el presente trabajo y en el de González Mancebo²⁵⁰.

son fenoles cuya posición *para* se encuentra alquilada.

Los compuestos sin el grupo –OH en su estructura carecen de la activación necesaria para que reaccionen con el ion nitrosonio. Por eso ni la fenetilamina ni el etilbenceno experimentan C-nitrosación en las condiciones descritas.

El impedimento estérico no es un factor tan determinante en las moléculas estudiadas como en los sustratos investigados por González Mancebo, donde se reducía significativamente la velocidad en algunos compuestos. Dada su estructura el *m*-cresol tiene una reactividad 6 veces superior al 3,5-dimetilfenol. Tan sólo el minoxidilo tiene una posición significativamente impedida, con una amina y una piperidina en las posiciones adyacentes al centro de nitrosación. Sin embargo, como muestra la nitrosación del floroglucinol, dado que la etapa determinante es la ruptura del complejo de Wheland, la estabilización de este complejo por los grupos dadores de electrones influye mucho más en la velocidad de reacción que el impedimento estérico que puedan sufrir los compuestos.²⁶⁴

5.2. Reacciones de N-nitrosación

En este trabajo se han estudiado dos tipos diferentes de N-nitrosación. Por un lado, la nitrosación de una amina primaria alifática, que se encuentra en todas las estructuras con las que se ha trabajado, salvo en el etilbenceno y el minoxidilo y, por otro lado, la nitrosación en el nitrógeno heteroatómico del anillo aromático de la serotonina.

Para investigar la nitrosación de la amina primaria se ha medido la velocidad de nitrosación de la fenetilamina. Esta molécula es representativa puesto que, tras el experimento con el etilbenceno, se ha demostrado que su anillo aromático no está lo suficientemente activado para sufrir C-nitrosación y, por lo tanto todo el nitrito reacciona exclusivamente con la amina de sus estructura. Se ha comprobado que la nitrosación de la fenetilamina tiene las mismas características que las nitrosaciones de aminas primarias, donde el agente nitrosante es el N_2O_3 y la reacción se encuentra controlada por difusión. No obstante, la reacción requiere que la amina no esté protonada para poder transcurrir, lo que

hace que, en el medio ácido en el que el trióxido de dinitrógeno se forma, la proporción de amina desprotonada sea muy baja y pese a estar controlada por difusión, la reacción sea significativamente lenta.

La serotonina no presenta este inconveniente porque el nitrógeno que se nitrosa es muy difícil de protonar al estar integrado en una estructura aromática. Sin embargo, pese a la rapidez de la reacción, la constante de velocidad del encuentro entre la serotonina y el trióxido de dinitrógeno no es lo suficientemente alta como para que la reacción se considere controlada por difusión. No obstante, tanto el efecto isotópico de 1,42, cercano al 1,25 provocado por la diferencia de viscosidad del agua pesada en las reacciones controladas por difusión, como la entalpía (tan sólo 6 kJ/mol superior al límite de las reacciones controladas por difusión) sugieren que el mecanismo de reacción se encuentra cercano a control por difusión.

Challis y Lawson demostraron que los indoles con pK_a superior a -3,5 siguen un mecanismo controlado por difusión.²⁵⁴ El pK_a de la serotonina, -3,6, explica la cercanía al mecanismo al de una reacción controlada por difusión.

5.3. Competencia entre N-nitrosación y C-nitrosación

Desde el punto de vista biológico, las nitrosaciones de aminas primarias son menos peligrosas que las de compuestos aromáticos ya que, generalmente, la molécula nitrosada se descompone rápidamente antes de actuar sobre la célula, dada la inestabilidad de la sal de diazonio, mientras que, por el contrario, la C-nitrosación forma compuestos estables que directa o indirectamente pueden alquilar el material genético (sección 2.3.2). Por eso es importante dilucidar qué reacción predomina en las moléculas aquí estudiadas.

Para conocer el tipo de nitrosación dominante se han comparado las velocidades de C-nitrosación de cada sustrato (tiramina, dopamina y serotonina) con la velocidad de N-nitrosación representada por la fenetilamina. La diferencia de velocidad entre ambas nitrosaciones depende exclusivamente del pH y de la concentración de nitrito. La dependencia del nitrito se debe a que las N-nitrosaciones son de orden dos respecto a ese reactivo y las C-nitrosaciones son

de orden uno. En consecuencia, cuanto menor sea la concentración de nitrito mayor será el predominio de la C-nitrosación. Este resultado se ve confirmado por los espectros de masas de los productos de nitrosación de las moléculas complejas.

$$z = \log_{10} \frac{v_C}{v_N} = \log_{10} \frac{\frac{k_a^C K_2^C [\text{NIT}] [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1^C)(1 + k_a^C / K_b^C k_c^C [\text{H}^+])}}{\frac{k_a^N K_3^N K_2^N K_1^N K_1^N [\text{NIT}]^2 [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1^N)([\text{H}^+] + K_1^N)^2}} \quad (5.4)$$

La ecuación 5.4 muestra la forma en que se han comparado ambas velocidades. Como la velocidad de nitrosación del anillo aromático es varios órdenes de magnitud superior a la de la amina, por simplicidad se ha escogido el término z que corresponde al logaritmo decimal del cociente entre ambas velocidades. Esta ecuación se ha representado en un mapa de contornos para los tres sustratos en las figuras 5.5 y 5.4, de tal forma que se pueda ver la zona a partir de la cual la velocidad de C-nitrosación comienza a ser significativa respecto a la de N-nitrosación (diez veces superior). Para la tiramina (figura 5.5), que sufre la nitrosación aromática más lenta, ha sido necesario utilizar para la concentración del nitrito una escala más pequeña.

En estas gráficas se puede ver que las zonas donde la N-nitrosación es importante corresponde a pHs superiores a 4,0 y a concentraciones altas de nitrito ($2 \cdot 10^{-3}$ M para la tiramina y $6 \cdot 10^{-2}$ M para la dopamina y la serotonina). Estas condiciones se encuentra muy alejadas de las que se pueden encontrar en el lumen del estómago, donde la baja concentración de nitrito y la alta acidez favorecen la C-nitrosación frente a la N-nitrosación, lo que es importante ante la amplia presencia de la tiramina en la alimentación.

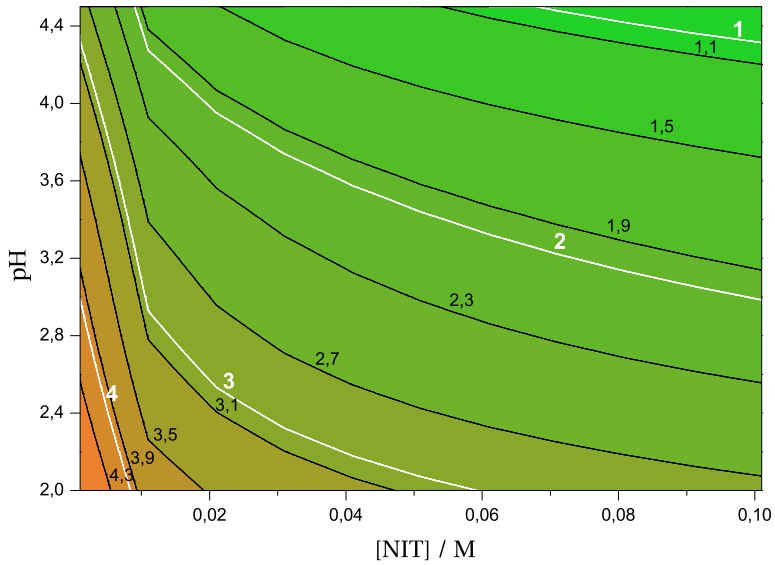
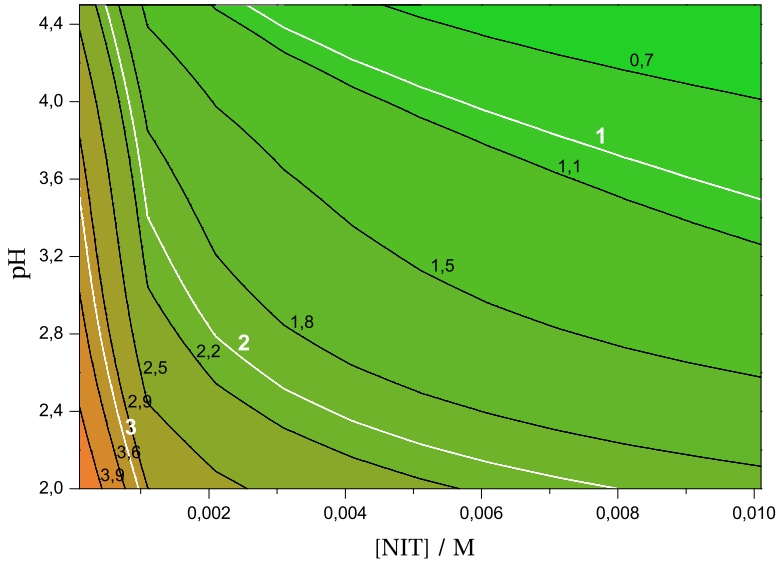


Figura 5.4: Influencia del pH y la concentración de nitrito en la relación z en la nitrosación de la tiramina (gráfica superior) y la dopamina.

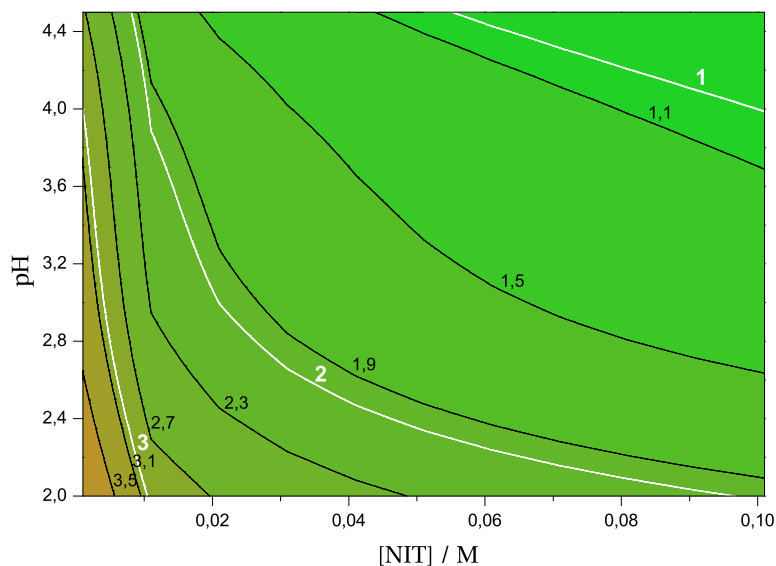


Figura 5.5: Influencia del pH y la concentración de nitrito en la relación z en la nitrosación de la serotonina.

5.4. Actividad biológica de los compuestos estudiados

La aplicación del test de Ames y el test de aberraciones cromosómicas a los productos de nitrosación del presente trabajo ha demostrado que son compuestos poco (en el caso de la tiramina) o nada mutágenos y genotóxicos. Esto entra en contradicción con los estudios previos encontrados en la bibliografía (sección 2.5). No obstante, a diferencia de nuestro trabajo, que se realizó con los nitrosocompuestos sintetizados, los estudios de la bibliografía se llevaron a cabo poniendo en el medio de cultivo una disolución formada por el compuesto a estudiar, un ácido y un gran exceso de nitrito sódico, lo que induce la aparición de sales de diazonio aromáticas estables por la diazotación de los C-nitrosocompuestos formados (sección 2.3.2, página 77).^{191,196,211,214} Por ello, los trabajos de la bibliografía reflejan más la actividad biológica de estas sales

de diazonio que la de los compuestos nitrosados, pese a que las condiciones de exceso de nitrito son difíciles de darse en medios *in vivo*.

Mediante el test del MTT se ha comprobado que los nitrosocompuestos obtenidos son citotóxicos en una intensidad según la secuencia:

NSER > NDOP > NTYR >> NMIN

Esta serie concuerda con la reactividad de los sustratos, salvo por el caso del nitrosominoxidilo. El nitrosominoxidilo no ha provocado una muerte significativa de las células V-79 en ninguna de las concentraciones a las que se han expuesto en este trabajo. Es posible que la ausencia de citotoxicidad de esta molécula se deba a su tamaño y a la alta polaridad del enlace dativo de su estructura, que dificultan que la molécula traspase la membrana celular.

Conclusiones

El estudio cinético de las reacciones de nitrosación de etilbenceno, fenetilamina, tiramina, dopamina, serotonina y minoxidilo por espectrometría UV-visible ha conducido a las siguientes conclusiones:

1. El etilbenceno no se nitrosa en una escala significativa de tiempo, incluso en las condiciones más favorables para las reacciones de nitrosación.
2. En los márgenes de tiempo en que se ha trabajado, la fenetilamina sólo sufre N-nitrosación en su grupo $-\text{NH}_2$. La ecuación de velocidad experimental de la reacción de nitrosación es:

$$v = \frac{\alpha[\text{PHE}][\text{NIT}]^2[\text{H}^+]}{([\text{H}^+] + \beta)^2} \quad (6.1)$$

3. El mecanismo de reacción propuesto para la nitrosación de fenetilamina incluye como etapa limitante de velocidad el ataque de trióxido de dinitrógeno sobre la amina desprotonada. Ese mecanismo conduce a la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_a K_3 K_2 K_1 K_1 \frac{[\text{PHE}][\text{NIT}]^2[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (6.2)$$

que se ajusta muy bien a los resultados experimentales.

4. El cálculo por vía cinética del valor del pK_a del ácido nitroso, efectuado sobre la base del mecanismo propuesto, concuerda bien con el bibliográfico, lo que apoya ese mecanismo.
5. El valor de la constante de velocidad de la etapa cinética determinante de la alquilación de fenetilamina por trióxido de dinitrógeno, $k_a = (1,72 \pm 0,08) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, y la entalpía de activación de esa reacción, $\Delta H \approx 7 \text{ kJ mol}^{-1}$, indican que se trata de un mecanismo controlado por difusión.
6. La molécula de serotonina experimenta dos nitrosaciones consecutivas en su anillo indólico: la primera tiene lugar en el nitrógeno heteroatómico, siendo la segunda una reacción de C-nitrosación. Aquélla obedece a la ecuación de velocidad:

$$v = \frac{\alpha[\text{SER}][\text{NIT}]^2[\text{H}^+]}{([\text{H}^+] + \beta)^2} \quad (6.3)$$

El mecanismo propuesto conduce a una ecuación de velocidad análoga a la encontrada en el caso de la fenetilamina salvo que, debido a la estructura aromática en que se encuentra integrado el átomo de nitrógeno, éste no se puede protonar en las condiciones débilmente ácidas del medio de reacción:

$$v = k_a K_3 K_2 K_1 K_I \frac{[\text{SER}][\text{NIT}]^2[\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_I)([\text{H}^+] + K_1)^2} \quad (6.4)$$

El de los resultados experimentales ajuste a esta ecuación ha conducido a un $pK_a = 3,3 \pm 0,2$ para el sistema nitrito/ácido nitroso muy similar al bibliográfico lo que, también aquí, constituye un apoyo al mecanismo propuesto.

7. La segunda reacción de nitrosación de la serotonina, al igual que la nitrosación de tiramina, dopamina y minoxidilo, es una sustitución electrofílica aromática de un hidrógeno por el grupo nitroso. La ecuación de velocidad experimental es:

$$v = \frac{\alpha[\text{sustrato}][\text{NIT}][\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1)(1 + \beta[\text{H}^+])} \quad (6.5)$$

8. El mecanismo de nitrosación para los cuatro sustratos indicados en 7. implica, como etapa determinante de velocidad, la ruptura del complejo de Wheland formado en el ataque de los iones nitrosonio/nitrosacidio al anillo aromático. El mecanismo propuesto conduce a la ecuación de velocidad:

$$v = \frac{k_a K_2 [\text{sustrato}] [\text{NIT}] [\text{H}^+]^2}{([\text{H}^+] + K_1) \left(1 + \frac{k_{-a}}{K_b k_c} [\text{H}^+]\right)} \quad (6.6)$$

9. En las reacciones de nitrosación en las que la etapa determinante es la ruptura del complejo sigma se ha observado un claro efecto cinético isotópico $k_c^{\text{H}_2\text{O}} / k_c^{\text{D}_2\text{O}}$ reflejo de transferencia protónica en esa etapa.
10. El excelente ajuste de los resultados a las relaciones isocinéticas $\Delta H^\ddagger / \Delta S^\ddagger$ y $\ln k_{T1} / \ln k_{T2}$ tanto por parte de las reacciones ahora investigadas como por otras reacciones de C-nitrosación previamente estudiadas es indicativo (aunque no demostrativo) de un mecanismo común. La reactividad de estos compuestos está controlada por la activación del carbono nitrosable por su entorno electrónico.
11. En la tiramina, dopamina y serotonina las reacciones de C-nitrosación predominan sobre las de N-nitrosación.
12. El amplio uso comercial del minoxidilo y el elevado valor del coeficiente de absorción molar del nitrosominoxidilo acreditan a aquél como buen reactivo para el análisis de nitritos, con un excelente límite de detección ($3,88 \cdot 10^{-6}$ M). Por la misma razón, como resultado colateral de esta investigación de Doctorado, se ha implementado una práctica de laboratorio para alumnos de química general y medioambiental.
13. En contraste con algunos resultados bibliográficos, los encontrados en este trabajo sugieren una baja mutagenia y genotoxicidad (test de Ames) de los nitrosocompuestos investigados. En cambio, su citotoxicidad (test del MTT) es consistente con la reactividad de los sustratos de los que proceden. El minoxidilo, probablemente debido a su tamaño y polaridad, no es citotóxico.

Bibliografía

- [1] *Obra completa*
San Juan de la Cruz
Alianza Editorial
Edición de E. Pacho, **2010**, Madrid (España)
- [2] *¡Oh, Dios, ceguera en la que estoy perdido...!*
Felipe Doyagüez Chico
Kadmos
1ª edición, **2002**, Salamanca (España)
- [3] *Enciclopedia de la Ciencia*
A. Craig, C. Rosney
Suseta
1990, Madrid (España)
- [4] *Mémoire sur l'alcool amylique*
A. J. Balard
Comptes rendus de l'Académie des sciences
19, **1844**, 634-641
- [5] *Asparagin und Asparaginsäure*
R. Piria
Justus Liebigs Annalen der Chemie
68, **1848**, 343-350
- [6] *Recherches sur la constitution chimique de l'asparagine et de l'acide aspartique*
R. Piria
Annales de Chimie et de Physique
22, **1848**, 160-167
- [7] *Beiträge zur Kenntniss der flüchtigen organischen Basen*
A. W. Hofmann
Justus Liebigs Annalen der Chemie
75, **1850**, 356-368

- [8] *Dyes and dyeing*
H. A. Webb
Journal of Chemical Education
19, **1942**, 460-470
- [9] *The history of chemistry*
J. Hudson
Chapman & Hall
1ª edición, **1992**, Nueva York (EE.UU.)
- [10] *Vorläufige notiz über die Einwirkung von salpetriger Säure auf Amidinitro- und Aminitrophenylsäure*
P. Griess
Justus Liebigs Annalen der Chemie
106, **1858**, 123-125
- [11] *Vorläufige Notiz über Diazobenzoësäure*
P. Griess
Justus Liebigs Annalen der Chemie
120, **1861**, 125-128
- [12] *Peter Griess - Discoverer of diazocompounds*
Sister V. Heines
Journal of Chemical Education
35, **1958**, 187-191
- [13] *Über die Einwirkung von salpetrigsaurem Kali auf salzsaures Diäthylamin*
A. Geuther
Justus Liebigs Annalen der Chemie
128, **1863**, 151-156
- [14] *Untersuchungen über die Constitution der Nitrolsäuren*
V. Meyer, J. Locher
Chemische Berichte
7, **1874**, 670-675
- [15] *Über die Pseudonitrole, die Isomeren der Nitrolsäuren*
V. Meyer, J. Locher
Justus Liebigs Annalen der Chemie
180, **1876**, 133-155
- [16] *Über die Einwirkung der salpetrigen Säure auf Dimethylanilin und über Nitrosophenol*
A. Bäyer, H. Caro
Chemische Berichte
7, **1874**, 963-968
- [17] *The first 85 Years of C-nitroso compounds: A survey of the salient features*
B. G. Gowenlock, G. B. Richter-Addo
Journal of Chemical Education
85, **2008**, 1243-1245

- [18] *Nitrosation, diazotisation, and deamination*
J. H. Ridd
Quarterly Reviews, Chemical Society
15, **1961**, 418-441
- [19] *Zur Kenntniss der Nitrosamine*
O. Fischer, E. Hepp
Chemische Berichte
19, **1886**, 2991-2995
- [20] *Products of the action of nitrous acid on tetramethylenylmethylamine*
N. J. Demjanov, M. Lushnikov
Zhurnal Russkago Fiziko-Khimicheskago Obshchestva
35, **1903**, 26-42
- [21] *Structure and mechanism in organic chemistry*
C. K. Ingold
Cornell University Press
1ª edición, **1953**, Ithaca, Nueva York (EE.UU.)
- [22] *Some toxic properties of dimethylnitrosamine*
P. N. Magee, J. M. Barnes
British Journal of Industrial Medicine
11, **1954**, 167-174
- [23] *The action of retrorsine on rat's liver*
J. Davidson
The Journal of Pathology and Bacteriology
40, **1935**, 285-295
- [24] *Senecio alkaloids: Primary liver tumours in rats as a result of treatment with (1) a mixture of alkaloids from *S. Jacobaea* Lin.; (2) Retrorsine; (3) Isatidine.*
R. Schoental, M. A. Head, P. R. Peacock
British Journal of Cancer
8, **1954**, 458-465
- [25] *The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine*
P. N. Magee, J. M. Barnes
British Journal of Cancer
10, **1956**, 114-122
- [26] *An outbreak of toxic liver injury in ruminants*
N. Koppang
Nordisk Veterinaer Medicin
16, **1964**, 305-322

- [27] *Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring*
E. Ender, G. Favre, A. Helgebostad, N. Koppang, R. Madsen, L. Ceh
Naturwissenschaften
51, **1964**, 637-638
- [28] *Dimethylnitrosamine; its hepatotoxic effect in sheep and its occurrence in toxic batches of herring meal*
J. Sakshaug, E. Sögnen, M. A. Hansen, N. Koppang
Nature
206, **1965**, 1261-1262
- [29] <http://www.webofknowledge.com>
ISI Web of Knowledge
- [30] *N-nitroso compounds in the diet*
W. Lijinsky
Mutation Research
443, **1999**, 129-138
- [31] *Description of the thermal energy analyzer (TEA) for trace determination of volatile and nonvolatile N-nitroso compounds*
D. H. Fine, F. Ruffe, D. Lieb, D. P. Rounbehler
Analytical Chemistry
47, **1975**, 1188-1191
- [32] *Tumour-promoting agents in unburned cigarette tobacco*
E. G. Bock, R. J. Shamberger, H. K. Myers
Nature
208, **1965**, 584-585
- [33] *Directiva 93/11/CEE de la Comisión de 15 de marzo de 1993 relativa a la cesión de N-nitrosaminas y de sustancias N-nitrosables por las tetinas y chupetes de elastómeros o caucho*
Diario Oficial de las Comunidades Europeas
37, **1993**, 1-2
- [34] *N-Nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos*
T. Y. Fan, E. U. Golf, L. Song, D. H. Fine, G. P. Arsenault, K. Bieman
Food and Cosmetics Toxicology
15, **1977**, 423-430
- [35] *Analysis of nitrosamines in cosmetics*
K. Ikeda, K. G. Migliorese
Journal of the Society of Cosmetic Chemists
41, **1990**, 283-333

- [36] *Contamination of beer with trace quantities of N-nitrosodimethylamine*
B. Spiegelhalder, G. Eisenbrand, R. Preussmann
Food and Cosmetics Toxicology
17, **1979**, 29-31
- [37] *Nitrate reduction and N-nitrosation in brewing*
N. A. Smith
Journal of the Institute of Brewing
100, **1994**, 347-355
- [38] *Formation of N-nitrosopyrrolidine in a dog's stomach*
T. S. Mysliwy, E. L. Wick, M. C. Archer, R. C. Shank, P. M. Newberne
British Journal of Cancer
30, **1974**, 279-283
- [39] *Formation of nitrosamines in food and in the digestive system*
J. S. Wishnok
Journal of Chemical Education
54, **1977**, 440-442
- [40] *Ascorbate-nitrite reaction: Possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds*
S. S. Mirvish, L. Wallcave, M. Eagen, P. Shubik
Science
177, **1972**, 65-68
- [41] *Ascorbic acid blocking of aminopyrine nitrosation in NZO/BI mice*
M. Greenblatt
Journal of the National Cancer Institute
50, **1972**, 1055-1056
- [42] *Use of ascorbic acid to inhibit nitrosation: kinetic and mass transfer considerations for an in vitro system*
W. R. Licht, S. R. Tannenbaum, W. M. Deen
Carcinogenesis
9, **1988**, 365-372
- [43] *Chemical structure and carcinogenicity of aliphatic hydrazo, azo, and azoxy compounds and of triazenes, potential in vivo alkylating agents*
R. Preussmann, H. Druckrey, S. Ivankovic, A. v. Hodenberg
Annals of the New York Academy of Sciences
163, **1969**, 697-716
- [44] *Epidemiology of gastric cancer*
D. Palli
Annali dell'Istituto Superiore di Sanita
32, **1996**, 85-99

- [45] *Catalysis and inhibition of N-nitrosation reactions*
M. C. Archer
En *IARC Scientific Publication*
World Health Organization Press
57, **1984**, 263-274
- [46] *Simultaneous C- and N-nitrosation of Synephrine. A kinetic Study*
M. P. Fernández Liencres, F. Carazo, M. C. Cabeza, B. Quintero, J. Thomas, J. M. Álvarez
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1993, 2265-2273
- [47] *Cerebrospinal fluid nitrite/nitrate levels in neurologic diseases*
S. Milstien, N. Sakai, B. J. Brew, C. Krieger, J. H. Vickers, K. Saito, M. P. Heyes
Journal of Neurochemistry
63, **1994**, 1178-1180
- [48] *Breve historia de la química*
I. Asimov
Alianza Editorial
1ª edición, **1999**, Madrid (España)
- [49] *Vitriol in the history of chemistry*
V. Karpenko, J. A. Norris
Chemicke Listy
96, **2002**, 997-1005
- [50] *Chemistry of the elements*
N. Greenwood, A. Earnshaw
Butterworth Heinemann
2ª edición, **1997**, Oxford (Reino Unido)
- [51] *Kinetics of nitrous acid. III. Kinetics of nitrous acid decomposition*
E. Abel, H. Schmid
Zeitschrift für Physikalische Chemie
136, **1928**, 419-430
- [52] *The equilibrium between nitric acid, nitrous acid and nitric oxide*
G. N. Lewis, A. Edgar
Journal of the American Chemical Society
33, **1911**, 292-299
- [53] *The kinetics of oxidation by nitrous and nitric acid. Part III. Oxidation of oxalic acid by nitrous acid*
P. A. Vamplew, K. Singer
Journal of the Chemical Society
1956, 1143-1146

- [54] *Nitric acid, nitrous acid and nitrogen oxides*
M. Thiemann, E. Scheibler, K. W. Wiegand
En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*
Ed: B. Elvers; Wiley-VCH
6ª edición, **2002**, Weinheim (Alemania)
- [55] *Protolysis of nitrous acid in aqueous sodium nitrate and sodium nitrite solutions at different temperatures*
J. Tummavuori, P. Lumme
Acta Chemica Scandinavica
22, **1968**, 2003-2011
- [56] *Nitrates and nitrites*
W. Laue, M. Thiemann, E. Scheibler, K. W. Wiegand
En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*
Ed: B. Elvers; Wiley-VCH
6ª edición, **2002**, Weinheim (Alemania)
- [57] *Methemoglobinemia resulting from absorption of nitrates*
J. C. Harris, B. H. Rumack, R. G. Peterson, B. M. McGuire
Journal of the American Medical Association
242, **1979**, 2869-2871
- [58] *Brock biology of microorganisms*
M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl, D. P. Clark
Benjamin Cummings
13ª edición, **2012**, San Francisco, California (EE.UU.)
- [59] *Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity*
J. J. Doel, N. Benjamin, M. P. Hector, M. Rogers, R. P. Allaker
European Journal of Oral Sciences
113, **2005**, 14-19
- [60] *Microbes involved in dissimilatory nitrate reduction in the human large intestine*
N. J. Parham, G. R. Gibson
FEMS Microbiology Ecology
31, **2000**, 21-28
- [61] *Química agrícola. Volumen 3, alimentos*
E. Primo Yúfera
Alhambra
1ª edición, **1979**, Madrid (España)
- [62] *Lawrie's Meat Science*
R. A. Lawrie
Woodhead Publishing
6ª edición, **1998**, Cambridge (Reino Unido)

- [63] *Nitrite, nitrite alternatives, and the control of Clostridium Botulinum in cured meats*
M. D. Pierson, L. A. Smoot, M. C. Robach
C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition
17, **1983**, 141-187
- [64] *Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano*
Diario Oficial de las Comunidades Europeas
330, **1998**, 32-54
- [65] *Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano*
Boletín Oficial del Estado
45, **2003**, 7228-7245
- [66] *Directiva 95/2/CE del parlamento europeo y del consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes*
Diario Oficial de la Unión Europea
61, **1995**, 1-53
- [67] *Normas de identidad y pureza para aditivos alimentarios y evaluación de su toxicidad. Octavo informe*
Organización Mundial de la Salud
309, **1966**, 1-30
- [68] *The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics*
J. O. Lundberg, E. Weitzberg, M. T. Gladwin
Nature Reviews
7, **2008**, 156-167
- [69] *Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca*
J. Tamargo, R. Caballero, R. Gómez, L. Núñez, M. Vaquero, E. Delpón
Revista Española de Cardiología
6, **2006**, 3A-20A
- [70] *Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview*
L. J. Ignarro
Journal of Physiologic Pharmacology
53, **2002**, 503-514
- [71] *Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo*
N. S. Bryan, T. Rassaf, R. E. Maloney, C. M. Rodriguez, F. Saijo, J. R. Rodriguez, M. Feelisch
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
101, **2004**, 4308-4313
- [72] *The determination of nitrite: A critical review*
J. B. Fox, F. B. Suhre
C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry
15, **1985**, 283-313

- [73] *Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“*
P. Griess
Chemische Berichte
12, **1879**, 426-428
- [74] *L'acide azoteux dans la salive et dans l'aire exhalé*
M. L. Ilosvay
Bulletin de l'Association belge des chimistes
3, **1889**, 388-391
- [75] *The 125th anniversary of the Griess reagent*
V. M. Ivanov
Journal of Analytical Chemistry
59, **2004**, 1002-1005
- [76] *Detection and quantitative determination of nitrites and nitrates*
D. Acel
Biochemische Zeitschrift
107, **1916**, 1-12
- [77] *Análisis inorgánico cualitativo sistemático*
F. Bucarons, E. Capitán García, L. F. Capitán Vallvey
Reverté
1ª edición, **1986**, Barcelona (España)
- [78] *Chemical redox agents for organometallic chemistry*
N.G. Connelly, W. E. Geiger
Chemical Reviews
96, **1996**, 877-910
- [79] *Redox equilibria of the nitrosonium cation and of its nonbonded complexes*
K. Y. Lee, D. J. Kuchynka, J. K. Kochi
Inorganic Chemistry
29, **1990**, 4196-4204
- [80] *Synthesis and reactivity of the tetrakis(acetonitrile)nitrosyrrhodium dication*
N. G. Connelly, P. T. Draggett, M. Green, T. A. Kuc
Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions
1977, 70-73
- [81] *Nitrous acid equilibria in perchloric acid*
T. A. Turney, G. A. Wright
Journal of the Chemical Society
1958, 2415-2418
- [82] *Nitrosation Reactions and Chemistry of the Nitric Oxide*
D. H. L. Williams
Elsevier
2ª edición, **2004**, Ámsterdam (Países Bajos)

- [83] *The spectra and equilibria of nitrosonium ion, nitroacidium ion, and nitrous acid in solutions of sulphuric, hydrochloric, and phosphoric acids*
N. S. Bayliss, D. W. Watts
Australian Journal of Chemistry
9, **1956**, 319-332
- [84] *Mechanism of the azide-nitrite reaction. Part III. Reaction in [¹⁸O] water*
C. A. Bunton, G. Stedman
Journal of the Chemical Society
1959, 3466-3479
- [85] *¹⁵N NMR spectroscopic investigation of nitrous and nitric acids in sulfuric acid solutions of varying acidities*
G. K. S. Prakash, L. Heiliger, G. A. Olah
Inorganic Chemistry
29, **1990**, 4965-4968
- [86] *Protonation of nitrous acid and formation of the nitrosating agent NO⁺: an ab initio Study*
M. Nguyen, A. F. Hegart
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1984, 2037-2041
- [87] *Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part IX. The influence of neutral salts on the kinetics of diazotisation*
B. C. Challis, A. R. Butler
Journal of the Chemical Society
1962, 5197-5203
- [88] *Cytological methods for detecting chemical mutagens*
B. C. Challis, A. R. Butler
En *The Chemistry of the Amino Group*
Ed: A. Hollaender; Wiley-Interscience
4, **1968**, 1-29
- [89] *Studies in N-nitrosation reactions*
S. S. Mirvish
En *IARC Scientific Publication*
World Health Organization Press
104, **1972**, 279-295
- [90] *Micellar catalysis of the nitrous acid deamination reaction*
R. A. Moss, C. S. Talkowski
Tetrahedron Letters
12, **1971**, 703-706

- [91] *Kinetik und Mechanismus der Diazotierung, 16. Mitt.: Kinetik der Reaktionen des Nitrosoacidiumions und des Distickstofftrioxyds mit diazotierbaren Aminen*
H. Schmid, C. Essler
Monatshefte für Chemie
91, **1960**, 484-499
- [92] *Kinetic studies on the formation of N-nitroso compounds. IV. Formation of mononitrosopiperazine and general discussion of N-nitrosation mechanisms in aqueous perchloric solution*
J. Casado, A. Castro, M. López-Quintela
Monatshefte für Chemie
112, **1981**, 1221-1238
- [93] *Hydrolysis equilibrium of dinitrogen trioxide in dilute acid solution*
G. Y. Markovits, S. E. Schwartz, L. Newman
Inorganic Chemistry
20, **1981**, 445-450
- [94] *The nitrous acid-dinitrogen trioxide equilibrium in aqueous perchloric acid*
T. A. Turney
Journal of the Chemical Society
1960, 4263-4265
- [95] *Reaction mechanisms of inorganic nitrogen compounds*
G. Stedman
Advances in Inorganic Chemistry and Radiochemistry
22, **1979**, 113-170
- [96] *Kinetic studies on the formation of N-nitroso compounds VI. The reactivity of N₂O₃ as a nitrosating agent*
J. Casado, A. Castro, J. R. Leis, M. A. López Quintela, M. Mosquera
Monatshefte für Chemie
114, **1983**, 639-646
- [97] *Visible spectrum of dinitrogen trioxide in aqueous solution*
A. M. M. Doherty, N. Haine, E. Jones, G. Stedman
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1996, 2055-2058
- [98] *The microwave spectrum of dinitrogen trioxide*
R. L. Kuczkowski
Journal of the American Chemical Society
87, **1965**, 5259-5260
- [99] *Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part I. Principles, background, and method for the kinetic study of diazotisation*
E. D. Hughes, K. Ingold, J. H. Ridd
Journal of the Chemical Society
1958, 58-65

- [100] *Die Chemie des Nitrosyl-Ions. XI. Über die blaue oder rote Schwefelsäure und verwandte Verbindungen*
E. Seel, H. Sauer
Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie
292, **1957**, 1-19
- [101] *The Preparation of N-Nitrosoamides Under Basic Conditions*
J. M. Simpson, D. C. Kapp, T. M. Chapman
Synthesis
1979, 100-102
- [102] *The chemical properties of nitrosyl perchlorate: The neutralization equivalent*
M. M. Markowitz, J. E. Ricci, R. J. Goldman, P. F. Winternitz
Journal of the American Chemical Society
79, **1957**, 3659-3661
- [103] *Nitrosation of amines in nonaqueous solvents. 1. Evidence of a stepwise mechanism*
L. García Río, J. R. Leis, E. Iglesias
Journal of Organic Chemistry
62, **1997**, 4701-4711
- [104] *Nitrosation of amines in nonaqueous solvents. 2. Solvent-induced mechanistic changes*
L. García Río, J. R. Leis, E. Iglesias
Journal of Organic Chemistry
62, **1997**, 4712-4720
- [105] *Formation of nitrosamines in alkaline conditions: A kinetic study of the nitrosation of linear and cyclic secondary amines by alkyl nitrites*
E. Calle, J. Casado, J. L. Cinos, F. J. Mateos, M. Tostado
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1992, 987-991
- [106] *Structure-reactivity correlations in nitrosation reactions of secondary amines by alkyl nitrites in basic media*
J. Casado, A. Castro, M. A. López-Quintela, F. M. Lorenzo-Barral
Bulletin de la Societe Chimique de France
1987, 401-404
- [107] *Kinetics of the aminolysis and hydrolysis of alkyl nitrites: Evidence for an orbital-controlled mechanism*
M. P. García-Santos, E. Calle, S. González-Mancebo, J. Casado
Monatshefte für Chemie
127, **1996**, 997-1003
- [108] *Studies in the hydrolysis and alcoholysis of some organic nitrites*
A. D. Allen
Journal of the Chemical Society
1954, 1968-1974

- [109] *Mechanisms of hydrolysis and nitrosation reactions of alkyl nitrites in various media*
E. Iglesias, J. Casado
International Reviews in Physical Chemistry
21, **2002**, 37-74
- [110] *T. Lauder Brunton and amyl nitrite: a Victorian vasodilator*
W. B. Fye
Circulation
74, **1986**, 222-229
- [111] *The mysterious adventures of Sherlock Holmes*
A. C. Doyle
Puffin Classics
1ª edición, **1995**, Londres (Reino Unido)
- [112] *Nitric oxide-Some old and new perspectives*
E. W. Ainscough, A. M. Brodie
Journal of Chemical Education
72, **1995**, 686-692
- [113] *Fisicoquímica*
G. W. Castellan
Pearson Educación
2ª edición, **1987**, Madrid (España)
- [114] *Über Nitroverbindungen, VI. zur photochemischen Nitrosierung aliphatischer und cycloaliphatischer Kohlenwasserstoffe mit Stickstoffmonoxyd und Chlor*
H. Metzger, E. Müller
Chemische Berichte
90, **1957**, 1179-1185
- [115] *Rapid formation of N-nitrosamines from nitric oxide in the presence of silver (I) salts*
B. C. Challis, J. R. Outram
Journal of the Chemical Society, Chemical Communications
1978, 707-708
- [116] *Nitric oxide: Chemical puzzles posed by a biological messenger*
S. Pfeiffer, B. Mayer, B. Hemmens
Angewandte Chemie International Edition
38, **1999**, 1714-1731
- [117] *Coordination chemistry of nitric oxide*
R. Eisenberg, C. D. Meyer
Accounts of Chemical Research
8, **1975**, 26-34

- [118] *The nitroprusside ion as a nitrosating reagent. Kinetic studies on the nitrosation of morpholine*
J. Casado, M. A. López Quintela, M. Mosquera, M. F. Rodríguez Prieto, J. Vázquez Tato
Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie
87, **1983**, 1208-1211
- [119] *Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part VI. Comparative discussion of mechanisms of N- and O-nitrosation with special reference to diazotisation*
E. D. Hughes, C. K. Ingold, J. H. Ridd
Journal of the Chemical Society
1958, 88-98
- [120] *Mechanism of the azide-nitrite reaction. Part IV*
G. Stedman
Journal of the Chemical Society
1960, 1702-1709
- [121] *Kinetic studies on the formation of N-nitroso compounds IX. Nitrosyl acetate as a nitrosating agent*
J. Casado, A. Castro, M. Mosquera, M. F. Rodríguez Prieto, J. Vázquez Tato
Monatshefte für Chemie
115, **1984**, 669-682
- [122] *N-Nitrosation by nitrite ion in neutral and basic medium*
L. K. Keeper, P. P. Roller
Science
181, **1973**, 1245-1247
- [123] *Kinetic studies on the formation of N-nitroso compounds*
J. Casado, A. Castro, M. A. López Quintela, M. F. Rodríguez Prieto
Zeitschrift für Physikalische Chemie
118, **1979**, 43-57
- [124] *Spot Tests in Organic Analysis*
F. Fagl
Elsevier
5ª edición, **1956**, Londres (Reino Unido)
- [125] *Catalytic Effect of p-Nitrosophenol*
E. A. Walker, B. Pignatelli, M. Castegnaro
Journal of Agricultural and Food Chemistry
27, **1979**, 393-396
- [126] *A new nitrite ionic liquid (IL-ONO) as a nitrosonium source for the efficient diazotization of aniline derivatives and in-situ synthesis of azo dyes*
H. Valizadeh, A. Shomali
Dyes and Pigments
92, **2012**, 1138-1143

- [127] *Organic Chemistry*
L. G. Wade
Prentice Hall
7ª edición, **2010**, Upper Saddle River, Nueva Jersey (EE.UU.)
- [128] *Advanced Organic Chemistry*
F. A. Carey, R. J. Sundberg
Springer
5ª edición, **2007**, Nueva York (EE.UU.)
- [129] *Electrophilic ipso-substitutions. Part 3. Reactions of 3-substituted indoles, 4-substituted N,N-dimethylanilines, and 1- and 3-substituted indolizines with nitrous acid*
M. Colonna, L. Greci, M. Poloni
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1984, 165-169
- [130] *The direct introduction of the diazonium group into aromatic nuclei. VI: Reaction mechanisms*
M. Tedder, G. Theaker
Tetrahedron
5, **1959**, 288-292
- [131] *Principios de química orgánica*
T. A. Geissman
Reverté
1ª edición, **1973**, Barcelona (España)
- [132] *Amino acid nitrosation products as alkylating agents*
M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
Journal of the American Chemical Society
123, **2001**, 7506-7510
- [133] *Diazo chemistry I. Aromatic and heteroaromatic compounds*
H. Zollinger
VCH Verlagsgesellschaft
1ª edición, **1994**, Weinheim (Alemania)
- [134] *The reaction of tertiary amines with nitrous acid*
G. E. Hein
Journal of Chemical Education
40, **1963**, 181-184
- [135] *Nitrosative cleavage of tertiary amines*
P. A. S. Smith, R. N. Loepky
Journal of the American Chemical Society
89, **1967**, 1147-1157

- [136] *Formation of N-nitrosodimethylamine from naturally occurring quaternary ammonium compounds and tertiary amines*
W. Fiddler, J. W. Pensabene, R. C. Doerr, A. E. Wassermang
Nature
236, **1972**, 307
- [137] *Natural bond orbital population analysis of p-substituted O-nitrosyl carboxylate compounds*
L. Xiao-Hong, C. Qing-Dong, Z. Xian-Zhou
Structural Chemistry
20, **2009**, 1043-1048
- [138] *Effects of vitamins C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis, and cancer*
S. S. Mirvish
Cancer
58, **1986**, 1842-1850
- [139] *Chemistry of sorbates. A basic perspective*
B. R. Thakur, K. Singh, S. S. Arya
Food Reviews International
10, **1994**, 71-91
- [140] *Formation of ethylnitrolic acid by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite*
M. Namiki, T. Kada
Agricultural and Biological Chemistry
39, **1975**, 1335-1336
- [141] *A new N-nitropyrrole. 1,4-dinitro-2-methylpyrrole, formed by the reaction of sorbic acid with sodium nitrite*
Y. Kito, M. Namiki, K. Tsuji
Tetrahedron
34, **1978**, 505-508
- [142] *Formation of mutagens by sorbic acid-nitrite reaction: effects of reaction conditions on biological activities*
M. Namiki, S. Udaka, T. Osawa, K. Tsuji, T. Kada
Mutation Research
73, **1980**, 21-28
- [143] *Chemical aspects of mutagen formation by sorbic acid-sodium nitrite reaction*
M. Namiki, T. Osawa, H. Ishibashi, K. Namiki K. Tsuji
Journal of Agricultural and Food Chemistry
29, **1981**, 407-411
- [144] *Review: putative mutagens and carcinogens in foods*
P. E. Hartman
Environmental Mutagenesis
5, **1983**, 217-222

- [145] *Mutagen formation in the reaction of nitrite with the food components analogous to sorbic acid*
T. Osawa, M. Namiki
Agricultural and Biological Chemistry
46, **1982**, 2299-2304
- [146] *Identification of a nonenylnitrolic acid in corn treated with nitrous acid*
T. J. Hansen, S. R. Tannenbaum, M. C. Archer
Journal of Agricultural and Food Chemistry
29, **1981**, 1008-1011
- [147] *Reactivity of amino acids in nitrosation reactions and its relation to the alkylating potencial of their products*
M. P. García Santos, S. González Mancebo, J. Hernández Benito, E. Calle, J. Casado
Journal of the American Chemical Society
124, **2002**, 2177-2182
- [148] *Reactivity of lactones and GBH formation*
M. T. Pérez Prior, J. A. Manso, M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
Journal of Organic Chemistry
70, **2005**, 420-426
- [149] *A kinetic approach to the alkylating potencial of carcinogenic lactones*
J. A. Manso, M. T. Pérez Prior, M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
Chemical Research in Toxicology
18, **2005**, 1161-1166
- [150] *The unusual ability of α -angelicalactone to form adducts: a kinetic approach*
E. Fernández Rodríguez, J. A. Manso, M. T. Pérez Prior, M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
International Journal of Chemical Kinetics
39, **2007**, 591-595
- [151] *Alkylating potencial of potassium sorbate*
M. T. Pérez Prior, J. A. Manso, M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
Journal of Agricultural and Food Chemistry
53, **2005**, 10244-10247
- [152] *Sorbic acid as an alkylating agent*
M. T. Pérez Prior, J. A. Manso, M. P. García Santos, E. Calle, J. Casado
Journal of Solution Chemistry
37, **2008**, 459-466
- [153] *Potential of the NBP Method for the Study of Alkylation Mechanisms: NBP as a DNA-Model*
R. Gómez Bombarelli, M. González Pérez, E. Calle, J. Casado
Chemical Research in Toxicology
25, **2012**, 1176-1191

- [154] *Sorbate-Nitrite Interactions: Acetonitrile Oxide as an Alkylating Agent*
M. T. Pérez Prior, R. Gómez Bombarelli, M. González Pérez, J. A. Manso, E. Calle, J. Casado
Chemical Research in Toxicology
22, **2009**, 1320-1324
- [155] *Inhibitory effects of phenolics, teas and saliva on the formation of mutagenic nitrosation products of salted fish*
H. F. Stich, P. K. L. Chan, M. P. Rosin
International Journal of Cancer
30, **1982**, 719-724
- [156] *Formation of peroxyxynitrite from the oxidation of hydrogen peroxide by nitrosonium ion: A pulse radiolysis study*
S. Goldstein, G. Czapski
Inorganic Chemistry
35, **1996**, 7735-7740
- [157] *The chemistry of peroxonitrites. Part II. Copper(II)-catalysed reaction between hydroxylamine and peroxonitrite in alkali*
M. N. Hughes, H. G. Nicklin
Journal of the Chemical Society A
1970, 925-928
- [158] *The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach*
G. Czapski, S. Goldstein
Free Radical Biology and Medicine
19, **1995**, 785-794
- [159] *Technical guidance document on minimising and determining nitrosamines in cosmetics*
Colipa - The European Cosmetics Association
Colipa Guidelines
Enero, **2009**, Bruselas (Bélgica)
- [160] *Structural effects on the N-nitrosation of amino acids*
R. Gil, J. Casado, C. Izquierdo
International Journal of Chemical Kinetics
29, **1997**, 495-504
- [161] *Isomérisation de l'oxyde de méthylène cyclohexane en hexahydrobenzaldéhyde et désamination de l'aminoalcool correspondant en cycloheptanone*
M. Tiffeneau, P. Weill, B. Tchoubar
Comptes rendus de l'Académie des sciences
205, **1937**, 54-56

- [162] *The Demjanov and Tiffeneau-Demjanov one-carbon ring enlargements of 2-aminomethyl-7-oxabicyclo[2.2.1]heptane derivatives. The stereo- and regioselective additions of 8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-2-one to soft electrophiles*
D. Fattori, S. Henry, P. Vogel
Tetrahedron
49, **1993**, 1649-1664
- [163] *Nitrosation, thiols, and hemoglobin: Energetics and kinetics*
W. H. Koppenol
Inorganic Chemistry
51, **2012**, 5637-5641
- [164] *Kinetics and mechanism of thionitrite formation. Mercapto-carboxylic acid: a new range of efficient nitrous acid scavengers*
L. R. Dix, D. L. H. Williams
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2
1984, 109-112
- [165] *S-N dissociation energies of S-nitrosothiols: On the origins of nitrosothiol decomposition rates*
M. D. Bartberger, J. D. Mannion, S. C. Powell, J. S. Stamler, K. N. Houk, E. J. Toone
Journal of the American Chemical Society
123, **2001**, 8868-8869
- [166] *Physical Chemistry*
R. G. Mortimer
Elsevier
3ª Edición, **2008**, Londres (Reino Unido)
- [167] *Elementary steps in enzyme reactions (as studied by relaxation spectrometry)*
M. Eigen, G. G. Hammes
En *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*
Ed: F. F. Nord; Willey
25, **2006**, 1-38
- [168] *Principles of chemical kinetics*
J. E. House
Elsevier
2ª Edición, **2007**, Londres (Reino Unido)
- [169] *Chemical reactivity and the concept of charge- and frontier-controlled reactions*
G. Klopman
Journal of the American Chemical Society
90, **1968**, 223-234
- [170] *The kinetics and mechanism of the aminolysis of phenethyl nitrite*
S. Oae, N. Asai, K. Fujimori
Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II
1978, 1124-1130

- [171] *DNA adducts of nitrosamines*
D. E. Shuker, H. Bartsch
En *IARC Scientific Publication*
World Health Organization Press
125, **1994**, 73-89
- [172] *Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential*
A. R. Tricker, R. Preussmann
Mutation Research
259, **1991**, 277-289
- [173] *Review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*
International Agency for Research on Cancer
World Health Organization Press
100, **2012**, Ginebra (Suiza)
- [174] *Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines*
S. S. Hecht
Chemical Research in Toxicology
11, **1998**, 559-603
- [175] *Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence*
P. Jakszyn, C. A. González
World Journal of Gastroenterology
12, **2006**, 4296-4303
- [176] *Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence*
M. Eichholzer, F. Gutzwiller
Nutrition Reviews
56, **1998**, 95-105
- [177] *A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors*
M. Dietrich, G. Block, J. M. Pogoda, P. Buffer, S. Hecht, S. Preston-Martin
Cancer Causes and Control
16, **2005**, 619-635
- [178] *An overview of chemical processes that damage cellular DNA: Spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals*
K. S. Gates
Chemical Research in Toxicology
22, **2009**, 1747-1760

- [179] *Instability and decay of the primary structure of DNA*
T. Lindahl
Nature
362, **1993**, 709-715
- [180] *Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance*
F. Drabløs, E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbø, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Peña-Díaz, M. Otterlei, G. Slupphaug, H. E. Krokan
DNA Repair
3, **2004**, 1389-1407
- [181] *Alkylation and subsequent repair of DNA after exposure to diethylnitrosamine and related compounds*
A. E. Pegg
En *Reviews in Biochemical Toxicology*
Ed: E. Hogdson, J. R. Bend, R. M. Philpot; Elsevier
5, **1983**, 83-133
- [182] *Ethylene: The organic chemical industry's most important building block*
W. C. Ferneliuss, H. Wittcoff, R. E. Varnerin
Journal of Chemical Education
56, **1979**, 385-387
- [183] *Ethylbenzene*
V. A. Welch, K. J. Fallon
En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*
Ed: B. Elvers; Wiley-VCH
6ª edición, **2002**, Weinheim (Alemania)
- [184] *A review of the genotoxicity of ethylbenzene*
L. Henderson, D. Brusick, F. Ratpan, G. Veenstra
Mutation Research
635, **2007**, 81-89
- [185] *Phenethylamine in neuropsychiatric disorders*
M. E. Wolf, A. D. Mosnaim
General Pharmacology
14, **1983**, 385-390
- [186] *Isolation of ethylbenzene from Oklahoma petroleum*
J. D. White, F. W. Rose, Jr.
Bureau of Standards Journal of Research
10, **1933**, 639-645
- [187] *Oxidation of β -phenylethylamine by both types of monoamine oxidase: Examination of enzymes in brain and liver mitochondria of eight species*
O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya
Journal of Neurochemistry
36, **1981**, 1298-1301

- [188] *Beta-phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain*
H. Y. Yang, N. H. Neff
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
187, **1973**, 365-371
- [189] *β -Phenylethylamine and noradrenergic function in depression*
M. Nakagawara
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry
16, **1992**, 45-53
- [190] *Anomalous pKa values of some substituted phenylethylamines*
M. M. Tuckerman, J. R. Mayer, F. C. Nachod
Journal of the American Chemical Society
81, **1959**, 92-94
- [191] *Genotoxicity of nitrosated red wine and of the nitratable phenolic compounds present in wine: Tyramine, quercetin and malvidine-3-glucoside*
A. Laires, J. Gaspar, H. Borba, M. Proença, M. Monteiro, J. Rueff
Food and Chemical Toxicology
31, **1993**, 989-994.
- [192] *Análisis de tiramina en la dieta popular costarricense*
R. Masis Moya
Universidad de Costa Rica
1981, San José (Costa Rica)
- [193] *Kinetic study on p-tyramine metabolism in humans using stable isotope-labeled tracers*
M. Shimamura, H. Kodaka, T. Hayashi, H. Naruse
Neurochemical Research
18, **1993**, 727-730
- [194] *Relation of nitrite concentration to mutagen formation in soy sauce*
A. Nagahara, K. Ohshita, S. Nasuno
Food and Chemical Toxicology
24, **1986**, 13-15
- [195] *Formation of an activated N-nitrosocompound in nitrite-treated fava beans (Vicia fava)*
B. G. Piacek-Llanes, S. R. Tannenbaum
Carcinogenesis
3, **1982**, 1379-1384
- [196] *Tyramine is a major mutagen precursor in soy sauce, being convertible to a mutagen by nitrite*
M. Ochiai, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura
Japanese Journal of Cancer Research (Gann)
75, **1984**, 1-3

- [197] *Induction of oral cavity cancer by 3-diazotyramine, a nitrosated product of tyramine present in foods*
Y. Fujita, K. Wakabayashi, S. Takayama, M. Nagao, T. Sugimura
Carcinogenesis
8, **1987**, 527-529
- [198] *Analysis and significance of tyramine in foods*
N. P. Sen
Journal of Food Science
34, **1969**, 22-26
- [199] *42 salt forms of tyramine: structural comparison and the occurrence of hydrate formation*
N. E. Briggs, A. R. Kennedy, C. A. Morrison
Acta Crystallographica Section B
64, **2012**, 453-464
- [200] *Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals*
K. A. Montagu
Nature
180, **1957**, 244-245
- [201] *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists*
A. Carlsson, M. Lindqvist, T. Magnusson
Nature
180, **1957**, 1200
- [202] *The biochemical basis of neuropharmacology*
J. R. Cooper, F. E. Bloom, R. H. Roth
Oxford University Press
8ª edición, **2003**, Oxford (Reino Unido)
- [203] *Classical neurotransmitters and their significance within the nervous system*
A. Veca, J. H. Dreisbach
Journal of Chemical Education
65, **1988**, 108-111
- [204] *CRC handbook of chemistry and physics*
D. R. Lide (ed.)
CRC Press
90, **2010**, Boca Ratón, Florida (EE.UU.)
- [205] *Quantum-dot/dopamine bioconjugates function as redox coupled assemblies for in vitro and intracellular pH sensing*
I. L. Medintz, M. H. Stewart, S. A. Trammell, K. Susumu, J. B. Delehanty, B. C. Mei, J. S. Melinger, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson, H. Mattoussi
Nature Materials
9, **2010**, 676-684

- [206] *Autoxidation of dopamine: A comparison of luminescent and spectrophotometric detection in basic solutions*
A. Klegeris, L. G. Korkina, S. A. Greenfield
Free Radical Biology & Medicine
18, **1995**, 215-222
- [207] *The role of superoxide anion in the autoxidation of eminephrine and a simple assay for superoxide dismutase*
H. P. Misra, I. Fridovich
The Journal of Biological Chemistry
247, **1972**, 3170-3175
- [208] *Kinetic and structural analysis of the early oxidation products of dopamine*
M. Bisaglia, S. Mammi, L. Bubacco
The Journal of Biological Chemistry
282, **2007**, 15597-15605
- [209] *The chemistry of adrenochrome and related compounds*
R. A. Heacock
Chemical Reviews
59, **1959**, 181-237
- [210] *Effect of pH on the oxidation pathway of dopamine catalyzed by tyrosinase*
M. García-Moreno, J. N. Rodríguez-López, F. Martínez-Ortiz, J. Tudela, R. Varón, F. García-Cánovas
Archives of Biochemistry and Biophysics
288, **1991**, 427-434
- [211] *Mutagenic activity of dopamine after nitrosation*
S. Changhao, C. Bingqing, W. Suyan, L. Zicheng
Mutation Research
347, **1995**, 17-19
- [212] *The discovery of serotonin and its role in neuroscience*
P. M. Whitaker-Azmitia
Neuropsychopharmacology
21, **1999**, 2S-8S
- [213] *Conformational dependence of serotonin theoretical pKa prediction*
J. Pratuangdejkul, W. Nosoongnoen, G. A. Guérin, S. Loric, M. Conti, J. M. Launay, P. Manivet
Chemical Physics Letters
420, **2006**, 538-544
- [214] *Mutagenic activities of tyrtptophan metabolites before and after nitrite treatment*
T. Hashizume, H. Santo, H. Tsujisawa, K. Kosaka, T. Ozawa, M. Yamashita, N. Kinai
Food and Chemical Toxicology
29, **1991**, 839-844

- [215] *Treatment of essential hypertension with a new vasodilator in combination with beta-adrenergic blockade*
E. Gilmore, J. Weil, C. Chidsey
The New England Journal of Medicine
282, **1970**, 521-527
- [216] *The history of the development of minoxidil*
G. R. Zins
Clinics in dermatology
6, **1988**, 132-147
- [217] *Crystal structure of minoxidil at low temperature and polymorph prediction*
A. P. Martín-Islán, D. Martín-Ramos, C. I. Saínez-Díaz
Journal of Pharmacological Sciences
97, **2008**, 815-830
- [218] *Minoxidil: mechanisms of action on hair growth*
A. G. Messenger, J. Rundegren
British Journal of Dermatology
150, **2004**, 186-194
- [219] *From surgery to pharmacology to gene therapy. The past, present, and future of hair restoration*
S. Jandali
Annals of Plastic Surgery
4, **2010**, 437-442
- [220] *Spectrophotometric and electroanalytical study of minoxidil*
J. Arcos, B. García, J. López Palacios, J. M. Kauffmann, G. J. Patriarche
Analytical Letters
24, **1991**, 357-376
- [221] *Acid-base equilibria of minoxidil*
B. García, J. Arcos, P. L. Domingo, and J. M. Leal
Analytical Letters
24, **1991**, 391-411
- [222] *Solubility of minoxidil in methanol, ethanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, and water from (278.15 to 333.15) K*
H. Yan, R. Li, Q. Li, J. Wang, J. Gong
Journal of Chemical & engineering data
56, **2011**, 2720-2722
- [223] *The initial rate method in chemical kinetics. Evaluation and experimental illustration.*
J. Casado, M. A. López-Quintela, F. M. Lorenzo-Barral
Journal of Chemical Education
63, **1986**, 450-452

- [224] *Exploring chemistry with electronic structure methods*
J. B. Foresman, Æ. Frisch
Gaussian, Inc.
2ª Edición, **1996**, Pittsburgh (EE.UU.)
- [225] *Química cuántica*
I. N. Levine
Pearson educación
5ª Edición, **2001**, Madrid (España)
- [226] *Extending the reliability and applicability of B3LYP*
I. Y. Zhang, J. Wu, X. Xu
Chemical Communications
46, **2010**, 3057-3070
- [227] *Computational Chemistry*
D. Young
Wiley-Interscience
1ª Edición, **2001**, Nueva York (EE.UU.)
- [228] *Theoretical study on mechanism and selectivity of electrophilic aromatic nitration*
K. J. Szabó, A. Hörnfeldt, S. Gronowitz
Journal of the American Chemical Society
114, **1992**, 6827-6834
- [229] *New aspects of electrophilic aromatic substitution mechanism: Computational model of nitration reaction*
A. V. Sokolov
International Journal of Quantum Chemistry
100, **2004**, 1-12
- [230] *Scaling factors and uncertainties for ab initio anharmonic vibrational frequencies*
R. D. Johnson III, K. K. Irikuta, R. N. Kacker, R. Kessel
Journal of Chemical Theory and Computation
6, **2010**, 2822-2828
- [231] *Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance*
E. Zeiger
Regulatory Toxicology and Pharmacology
28, **1998**, 85-95
- [232] *Frameshift mutagenesis in Salmonella*
B. N. Ames, H. J. Whitfield, Jr.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology
31, **1966**, 221-225

- [233] *Special microbiological systems: 2. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms*
W. Szybalski
Annals of the New York Academy of Sciences
76, **1958**, 475-489
- [234] *Chromosomal alterations affecting regulation of histidine biosynthetic enzymes in Salmonella*
B. N. Ames, F. Jacob, P. E. Hartman
Journal of Molecular Biology
7, **1963**, 23-28
- [235] *Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection*
B. N. Ames, W. E. Durston, E. Yamasaki, F. D. Lee
Proceedings of the National Academy of Sciences
70, **1973**, 2281-2285
- [236] *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*
D. M. Maron, B. N. Ames
Mutation Research
113, **1983**, 173-215
- [237] *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*
K. Mortelmans, E. Zeiger
Mutation Research
455, **2000**, 29-60
- [238] *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals*
B. N. Ames, J. McCann
Proceedings of the National Academy of Sciences
73, **1976**, 950-954
- [239] *Salmonella mutagenicity test: III. Results from the testing of 255 chemicals*
E. Zeiger, B. Anderson, S. Haworth, T. Lawlor, K. Mortelmans, W. Speck
Environmental Mutagenesis
9, Suppl. 9, **1987**, 1-110
- [240] *Cytological methods for detecting chemical mutagens*
H. J. Evans
En *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*
Ed: A. Hollaender; Plenum Press
4, **1976**, 1-29

- [241] *Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro*
A. Matsuoka, M. Hayashi, M. Ishidate Jr.
Mutation Research
66, **1979**, 277-290
- [242] *Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons*
C. A. Hilliard, M. J. Armstrong, C. I. Bradt, R. B. Hill, S. K. Greenwood, S. M. Galloway
Environmental and Molecular Mutagenesis
31, **1998**, 316-326
- [243] *Genetic toxicology of some known or suspected human carcinogens*
M. D. Waters, N. E. Garrett, C. M. Covone-de-Serres, B. E. Howard, H. F. Stack
En *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*
Ed: F. J. Serres; Plenum Press
8, **1983**, 261-341
- [244] *Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture*
D. K. Ford, G. Yerganian
Journal of the National Cancer Institute
21, **1958**, 393-425
- [245] *X-Ray damage and recovery in mammalian cells in culture*
M. M. Elkind, H. Sutton
Nature
184, **1959**, 1293-1295
- [246] *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*
T. Mosmann
Journal of Immunological Methods
65, **1983**, 55-63
- [247] *Mitochondrial and non mitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes*
T. Bernas, J. Dobrucki
Cytometry
47, **2002**, 236-242
- [248] *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*
F. Denizot, R. Lang
Journal of Immunological Methods
89, **1986**, 271-277
- [249] *Determinación estructural de compuestos orgánicos*
E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, A. Herrera, R. Martínez
Masson
1ª Edición, **2005**, Barcelona (España)

- [250] *Nitrosation of phenolic compounds: Inhibition and enhancement*
S. González Mancebo, M. P. García Santos, J. Hernández Benito, E. Calle, J. Casado
Journal of Agricultural and Food Chemistry
47, **1999**, 2235-2240
- [251] *Taurine-nitrite interaction as a precursor of alkylation mechanisms*
J. Arenas-Valgañón, R. Gómez-Bombarelli, M. González-Pérez, M. González-Jiménez, E. Calle, J. Casado
Food Chemistry
134, **2012**, 986-991
- [252] *Dissociation constants and thermodynamic properties of amino acids used in CO₂ Absorption from (293 to 353) K*
E. S. Hamborg, J. P. M. Niederer, G. F. Versteeg
Journal of Chemical and Engineering Data
52, **2007**, 2491-2502
- [253] *The mechanism of nitrosodecarboxylation of 3,5-dibromo-4-hydroxybenzoic acid and nitrosodeprotonation of 2,6-dibromophenol*
K. M. Ibne-Rasa
Journal of the American Chemical Society
84, **1962**, 4962-4969
- [254] *The chemistry of nitroso-compounds. Part II. The nitrosation of phenol and anisole*
B. C. Challis, A. J. Lawson
Journal of the Chemical Society B
1971, 770-775
- [255] *Nitrosation of phenolic compounds: effects of alkyl substituents and solvent*
S. González Mancebo, J. Lacadena, Y. García Alonso, J. Hernández Benito, E. Calle, J. Casado
Monatshefte für Chemie
133, **2002**, 157-166
- [256] *Nitrosation kinetics of phenolic components of foods and beverages*
M. P. Fernández Liencres, E. Calle, S. González Mancebo, J. Casado, B. Quintero
International Journal of Chemical Kinetics
29, **1997**, 119-125
- [257] *Kinetics of acid and nucleophile catalysis of the diazotization of 1-naphthylamine*
J. Casado, A. Castro, E. Iglesias, M. E. Peña, J. Vázquez Tato
Canadian Journal of Chemistry
64, **1986**, 133-137
- [258] *Comprehensive chemical kinetics. Volume 40: Kinetics of multistep reactions*
F. G. Helfferich
Elsevier
2ª Edición, **2004**, Londres (Reino Unido)

- [259] *The protonation of indoles. Basicity studies. The dependence of acidity functions on indicator structure*
R. L. Hinman, J. Lang
Journal of the American Chemical Society
86, **1964**, 3796-3806
- [260] *Diffusion control and pre-association in nitrosation, nitration and halogenation*
J. H. Ridd
Advances in Physical Organic Chemistry
16, **1978**, 1-49
- [261] *A formula for correlating pK_a values determined in D₂O and H₂O*
A. Krežel, W. Bal
Journal of Inorganic Biochemistry
98, **2004**, 161-166
- [262] *Nouveau traité de chimie minérale*
R. Vaillard
Masson
1^a Edición, **1956**, París (Francia)
- [263] *Estadística sencilla para estudiantes de ciencias*
J. M. Fernández Solís, J. Pérez Iglesias, H. M. Seco Lago
Síntesis
1^a Edición, **2012**, Madrid (España)
- [264] *Evaluation of phenolic assays for the detection of nitrite*
J. Davis, K. J. McKeegan, M. F. Cardosi, D. H. Vaughan
Talanta
50, **1999**, 103-112
- [265] *Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994)*
P. Muller
Pure and Applied Chemistry
66, **1994**, 1077-1184
- [266] *Detection of nitrite in water using minoxidil as a reagent*
M. González-Jiménez, J. Arenas-Valgañón, I. F. Céspedes-Camacho, J. C. García-Prieto, E. Calle, J. Casado
Journal of Chemical Education
90, **2013**,
- [267] *Correlation of rate constants in alkaline hydrolysis of aromatic sulfoacid esters, as dependent on structure of these compounds*
V. A. Palm, R. V. Vizgert
Doklady Akademii Nauk SSSR
142, **1962**, 1091-1097

Índice alfabético

ácido ascórbico, 39, 52, 83
ácido nitroso, 41
actinomyces naeslundii, 46
Ames, Bruce, 131
analizador de energía térmica (TEA), 38
arilación de Meerwein, 79
autooxidación de la dopamina, 108, 201

Balard, Antoine-Jérôme, 65, 66
Barnes, John Morrison, 36, 37, 94
Brunton, Thomas Lauder, 66

carboxilatos de nitrosilo, 69
Carlsson, Arvid, 106
Challis, Brian, 59
Chidsey, Charles, 113
cinética química, 117
citocromo P450, 95, 134
clostridium botulinum, 38, 48
clostridium ramosum, 46
complejo de Wheland, 74, 112, 184
complejos del óxido nítrico, 69
constante de Markovits, 59
control orbitálico, 92
control por difusión, 90
correlación de Palm-Vizgert, 292

Demjanov, Nikolai Yakovlevich, 35, 37
dióxido de nitrógeno, 44, 68
dopamina, 100, 105, 107, 200

ecuación de Arrhenius, 119, 172

ecuación de Brønsted-Debye-Hückel, 120
ecuación de Eyring-Wynne-Jones, 120, 172
ecuación de velocidad, 118
efecto isocinético, 292
efecto isotópico cinético, 121, 188
Elkind, Mortimer, 139
Erspamer, Vittorio, 109
escherichia coli, 131
ésteres de nitrito, 33, 65, 81, 93
etilbenceno, 97, 99, 147

Faraday, Michael, 73
fenetilamina, 98, 100, 101, 153
Fischer, Otto, 35
Ford, Denys, 139
Furchgott, Robert, 48

Geber, falso, 41
González Mancebo, Samuel, 291
Griess, Johann Peter, 34, 37, 51

helicobacter pylori, 94
Hepp, Eduard, 35
hierba de Santiago, 36
Hofmann, August Wilhelm von, 34, 37
Holmes, Sherlock, 67

Ignarro, Louis, 48
Ilosvay, Lajos, 51, 70
ion nitrosacidio, 56, 291
ion nitrosonio, 55, 74, 83, 291

- Kekule, August von, 73
- L-DOPA, 106
- lactonas, formación de, 89
- Lewis, Gilbert, 41
- ley de Lambert-Beer, 154
- límite de cuantificación, 288
- límite de detección, 288
- líquido iónico, 72
- Magee, Peter Noel, 36, 37, 94
- metamioglobina, 47
- método de aislamiento de Ostwald, 118
- método de flujo detenido, 122
- método de Liebermann, 71
- Meyer, Viktor, 35, 37
- minoxidilo, 113, 115, 257, 284
- mioglobina, 46, 50
- Mirvish, Sidney, 39, 59
- monoamina oxidasa, 100, 105, 106
- Montagu, Kathleen, 105
- Mosmann, Tim, 141
- Murad, Ferid, 48
- nitritos, 44, 45, 48, 70, 284
- nitrosaminas, 33, 71, 78, 94
- NO sintasa, 48
- orden de reacción, 118
- óxido nítrico, 39, 41, 48, 67
- oximioglobina, 47
- púrpura de anilina, 34
- Palm, Viktor, 292
- Parkinson, enfermedad de, 106
- Perkin, William Henry, 34, 37
- peróxido de hidrógeno, 85
- Piria, Raffaele, 33, 37
- reacción de copulación, 80
- reacción de Gatterman, 79
- reacción de Gomberg-Bachmann, 79
- reacción de Piria, 33
- reacción de Sandmeyer, 79
- reacción de Schiemann, 79
- reacciones consecutivas, 226
- reactivo de Griess-Ilosvay, 51
- reordenamiento de Demjanov, 36, 89
- reordenamiento de Fischer-Hepp, 35, 82, 89
- reordenamiento de Tiffeneau-Demjanov, 89
- S9, extracto, 134
- sales de diazonio, 34, 77, 78, 80, 95
- sales de nitrosilo, 55, 62, 291
- sales de Roussin, 69
- Salmonella typhimurium*, 131
- serotonina, 109, 111, 223
- sustitución electrófila aromática, 74
- test de aberraciones cromosómicas, 137
- test de Ames, 131
- test del MTT, 141
- tiramina, 100, 102, 103, 176
- tríóxido de dinitrógeno, 59, 68, 78
- tripsinización, 140
- V-79, células, 139, 142
- veillonella atypica*, 46
- velocidad de reacción, 117
- Vizgert, Regina, 292
- Szybalski, Waclaw, 131
- Yerganian, George, 139