

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química física



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIO CINÉTICO DEL POTENCIAL ALQUILANTE
DEL ÁCIDO SÓRBICO Y DE LOS PRODUCTOS DE SU
REACCIÓN CON NITRITO**

María Teresa Pérez Prior

Salamanca 2009

Memoria presentada por la Graduada María
Teresa Pérez Prior para optar al Grado de Doctor

Salamanca, uno de Junio de dos mil nueve



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Departamento de Química física

**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 «**Estudio cinético del potencial alquilante del ácido sórbico y de los productos de su reacción con nitrito**» se ha realizado bajo su dirección en este Departamento por la Graduada en Química doña María Teresa Pérez Prior.

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

Salamanca, a 1 de Junio de dos mil nueve

J. Casado Linarejos

E. Calle Martín

El trabajo descrito en esta memoria se ha desarrollado dentro de los proyectos CTQ2004-05048 y CTQ2007-63263/BQU del Plan Nacional de I+D+I y SA011/A05 y SA040/A08 de la Junta de Castilla y León. Este último organismo concedió a María Teresa Pérez Prior una Beca de Formación de Personal Investigador durante el periodo 2004-08.
Se agradece sinceramente la ayuda de esos organismos.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a los Drs. D. Julio Casado y D. Emilio Calle por su confianza y orientación durante la realización del trabajo expuesto en esta memoria.

También quisiera hacer extensivo mi agradecimiento a todos los miembros del departamento. A Pilar y a Cruz por prestarme su ayuda.

No quiero olvidarme de mis compañeros Manso, Jesús, Estrella, Juanjo, Berna, Rafa, Marina, Fabián, Mario y Jorge por los momentos inolvidables vividos tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mi familia por acompañarme durante este tiempo y en especial a mi abuela que siempre me ha animado en todo lo que he hecho.

A mis 'amigas' que siempre han estado ahí cuando las he necesitado.

Quisiera agradecer a Antonio su aportación con el diseño de la portada.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a 'mis compañeros de viaje' por su ayuda durante estos últimos años.

Muchas gracias a todos.

A mis padres
y hermano

Índice

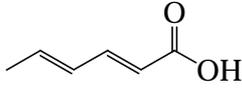
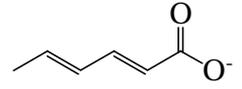
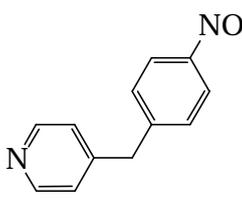
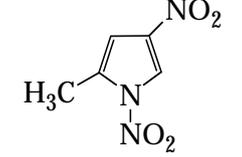
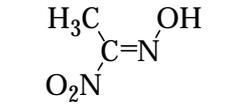
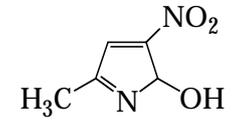
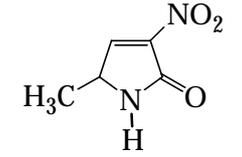
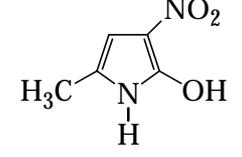
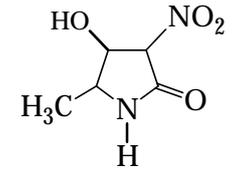
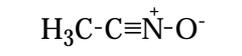
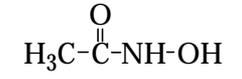
	Pág
Siglas y acrónimos	
1. Introducción	3
2. Antecedentes bibliográficos	11
2.1. Características generales del ácido sórbico y sus sales	13
2.2. Estabilidad del ácido sórbico en disolución acuosa	16
2.2.1. Degradación en medio acuoso	16
2.2.2. Degradación en los alimentos	16
2.2.3. Factores que afectan a la estabilidad del ácido sórbico	17
2.2.3.1. Influencia del pH	17
2.2.3.2. Efecto de los iones metálicos	18
2.2.3.3. Efecto de las sales	19
2.2.3.4. Influencia de los aminoácidos y de las proteínas	19
2.2.3.5. Otros factores que influyen en la estabilidad del ácido sórbico	20
2.3. Potencial genotóxico del ácido sórbico y sus sales	21
2.4. Reactividad química del ácido sórbico	23
2.5. Reacción entre el ácido sórbico y las aminas	27
2.5.1. Mecanismo de reacción	27
2.5.2. Genotoxicidad y mutagenia de los productos de reacción	28
2.6. Reacción entre el ácido sórbico y los tioles	31
2.6.1. Generalidades	31
2.6.2. Mecanismo de reacción del ácido sórbico y sus ésteres con los tioles	32
2.6.3. Hidrólisis de los productos de reacción	33
2.7. Reacción entre el ácido sórbico y el ión sulfito	35
2.8. Reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico	38
2.8.1. Importancia biológica y mecanismo de reacción	38
2.8.2. Factores que afectan a la actividad mutágena y antimicrobiana de la mezcla de reacción nitrito sódico-ácido sórbico	41
2.8.2.1. Influencia del pH de reacción	41
2.8.2.2. Condiciones de reacción	41
2.8.2.3. Efecto de la relación molar de los reactivos	42
2.8.2.4. Estabilidad de los productos de reacción	43

2.8.2.5. Influencia del ácido ascórbico y de la cisterna	43
2.8.3. Mutagenia de los productos de reacción	44
2.8.4. Estudio de la reactividad de los productos mayoritarios de la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico	45
2.8.4.1. Reactividad de pirroles: estudio de 1,4-dinitro-2metilpirrol (NMP)	45
2.8.4.2. Reacción de los ácidos nítricos para formar óxidos de nitrilo. Reactividad del ácido etilnítrico (ENA)	48
3. Parte experimental	55
3.1. Reacción de alquilación de NBP por el ácido sórbico y sus sales	57
3.1.1. Capacidad alquilante de los sorbatos. Test de NBP	57
3.1.2. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico	59
3.1.2.1. Tratamiento de datos cinéticos	59
3.1.2.2. Método experimental	61
3.1.2.2.1. Reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico	61
3.1.2.2.2. Determinación del pK _a del ácido sórbico	62
3.1.2.2.3. Determinación de la constante de asociación de los pares iónicos Na ⁺ sorbato ⁻ y K ⁺ sorbato ⁻	64
3.1.2.2.4. Cálculo de las barreras de energía para la reacción entre el ácido sórbico y la NBP	64
3.1.3. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por sorbato potásico	65
3.1.3.1. Tratamiento de datos cinéticos	65
3.1.3.2. Método experimental	65
3.1.4. Reactivos y equipo de trabajo	66
3.1.4.1. Reactivos utilizados	66
3.1.4.2. Equipo de trabajo	66
3.2. Reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico	69
3.2.1. Formación de 1,4-dinitro-2-metil pirrol y ácido etilnítrico	69
3.2.2. Reactividad de 1,4-dinitro-2-metil pirrol	70
3.2.2.1. Reacción de descomposición del NMP	70
3.2.2.1.1. Tratamiento de datos cinéticos	70
3.2.2.1.2. Método experimental	71
3.2.2.2. Reacción de alquilación de NBP por NMP	72

3.2.2.2.1.	Tratamiento de datos cinéticos	72
3.2.2.2.2.	Método experimental	76
3.2.3.	Reactividad del ácido etilnitrólico	78
3.2.3.1.	Reacción de descomposición del ENA	78
3.2.3.1.1.	Tratamiento de datos cinéticos	78
3.2.3.1.1.1.	Reacción de descomposición del ENA	78
3.2.3.1.1.2.	Reacción de hidrólisis del óxido de acetonitrilo	79
3.2.3.1.2.	Método experimental	81
3.2.3.2.	Reacción de alquilación de NBP por ENA	82
3.2.3.2.1.	Tratamiento de datos cinéticos	82
3.2.3.2.2.	Método experimental	86
3.2.4.	Reactivos y equipo de trabajo	87
3.2.4.1.	Reactivos utilizados	87
3.2.4.2.	Síntesis de NMP	88
3.2.4.3.	Síntesis de ENA	90
3.2.4.4.	Equipo de trabajo	92
4.	Resultados y discusión	93
4.1.	Reacción de alquilación de NBP por el ácido sórbico y sus sales	95
4.1.1.	Reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico	95
4.1.1.1.	Formación del aducto NBP-ácido sórbico	95
4.1.1.2.	Ecuación de velocidad	97
4.1.1.3.	Determinación del pK_a del ácido sórbico	99
4.1.1.3.1.	Método espectrofotométrico	99
4.1.1.3.2.	Método volumétrico	100
4.1.1.4.	Influencia del pH	103
4.1.1.5.	Parámetros de activación	105
4.1.2.	Reacción de alquilación de NBP por sorbato potásico	108
4.1.2.1.	Ecuación de velocidad	108
4.1.2.2.	Influencia del pH	109
4.1.2.3.	Coefficiente de absorción molar del aducto NBP-Sorbato	110
4.1.2.4.	Parámetros de activación	111
4.2.	Reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico	114
4.2.1.	Estudio de la reactividad de 1,4-dinitro-2-metil pirrol	114
4.2.1.1.	Reacción de descomposición del NMP	114

4.2.1.1.1.	Ecuación de velocidad	114
4.2.1.1.2.	Determinación del pK_a del NMP	115
4.2.1.1.3.	Influencia del pH	117
4.2.1.1.4.	Influencia del medio de reacción y de la temperatura	118
4.2.1.1.5.	Efecto cinético isotópico	121
4.2.1.2.	Reacción de alquilación de la NBP por el NMP	123
4.2.1.2.1.	Identificación de las especies participantes en el mecanismo de reacción	123
4.2.1.2.2.	Ecuación de velocidad	129
4.2.1.2.3.	Estudio de la capacidad alquilante del NMP	130
4.2.2.	Estudio de la reactividad del ácido etilnitrólico	134
4.2.2.1.	Reacción de descomposición del ENA	134
4.2.2.1.1.	Ecuación de velocidad	134
4.2.2.1.2.	Determinación del pK_a del ENA	136
4.2.2.1.2.1.	Método espectrofotométrico	136
4.2.2.1.2.2.	Método volumétrico	137
4.2.2.1.3.	Influencia del pH	139
4.2.2.1.4.	Influencia del medio y de la temperatura	141
4.2.2.1.5.	Efecto cinético isotópico	143
4.2.2.2.	Reacción de alquilación de NBP por ENA	144
4.2.2.2.1.	Identificación de las especies presentes en el mecanismo de reacción	144
4.2.2.2.2.	Ecuación de velocidad	145
4.2.2.2.3.	Influencia del pH	149
4.2.2.2.4.	Influencia de la temperatura	152
4.2.2.2.5.	Estudio comparativo de la actividad alquilante de diversas especies	153
5.	Conclusiones	155
6.	Bibliografía citada en esta memoria	161
7.	Apéndices	169
	Apéndice A	A1
	Apéndice B	B1
	Apéndice C	C1
	Apéndice D	D1
	Apéndice E	E1

Siglas y acrónimos

HS	Ácido sórbico	
S ⁻	Anión sorbato	
NBP	4-(p-Nitroencil) piridina	
NMP	1,4-Dinitro-2-metil pirrol	
ENA	Ácido etilnitrólico	
MN2PO	5-Metil-3-nitro-2H-pirrol-2-ol	
MN1P5N	5-Metil-3-nitro-1H-pirrol-2(5H)-ona	
MN1PO	5-Metil-3-nitro-1H-pirrol-2-ol	
4HMNP	4-Hidroxi-5-metil-3-nitro-pirrolidin-2-ona	
ACNO	Óxido de acetonitrilo	
ACH	Ácido acetohidroxámico	

CAPÍTULO 1

Introducción

«Alkylating agents are considered to be archetypal carcinogens. The primary carcinogen is the alkylating agent, not one of its metabolic products; alkylating agents react with significant receptors in vivo in the same way as in vitro»

P. D. Lawley

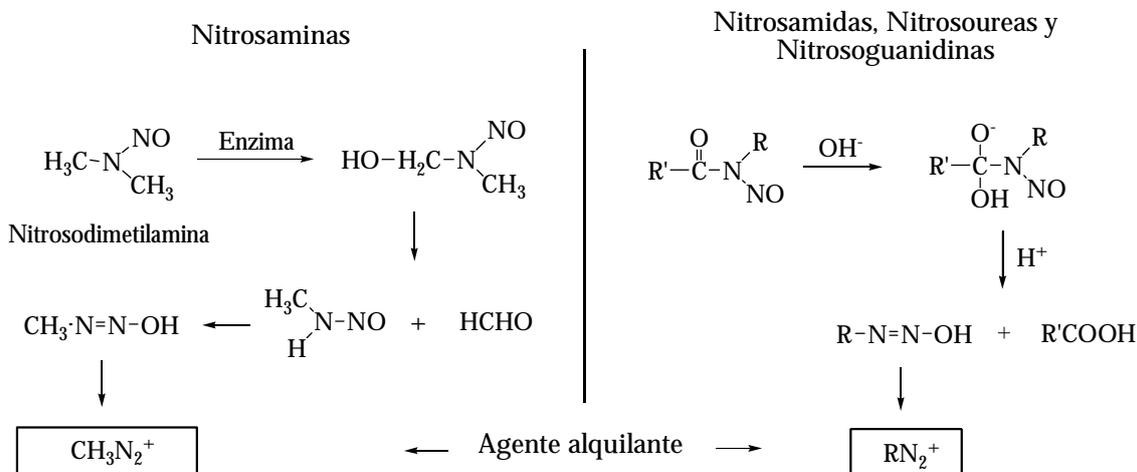
1. Introducción

La aparición de tumores en ratas tratadas con nitrosodimetilamina en la investigación pionera de Magee y Barnes (Magee y Barnes, 1956), abrió un amplio horizonte al estudio de los mecanismos de formación de nitrosocompuestos y de sus efectos biológicos.

Los nitrosocompuestos se pueden formar en alimentos con nitrito como conservante, en el medio ambiente y en el tracto digestivo, especialmente en el estómago. Algunos *N*-nitrosocompuestos son sintetizados por las plantas aunque muchos se forman eventualmente como consecuencia de la nitrosación de aminas (Mirvish, 1975 y 1995; Lijinsky, 1992; Loepky y Michejda, 1994).

En 1967 Druckrey y colaboradores (Druckrey *et al.*, 1967) observaron que las nitrosaminas sufren *in vivo* una reacción de α -hidroxilación cuyo producto, el hidroxicompuesto correspondiente, se fragmenta espontáneamente para dar lugar a un agente alquilante, el ión alquildiazonio, que actúa en sitios específicos del ADN celular, iniciándose así el proceso de carcinogénesis. El proceso de hidroxilación no tiene lugar *in vitro*, siendo necesaria la activación enzimática. Existe un gran número de enzimas presentes

en el hígado, como las monooxigenasas citocromo P-450 que se pueden extraer y utilizar para generar productos de la reacción de α -hidroxilación (Esquema 1.1.).



Esquema 1.1. Formación de agentes alquilantes a partir de nitrosaminas y otras especies como nitrosamidas, nitrosoureas y nitrosoguanidinas.

Las nitrosamidas, nitrosoureas y nitrosoguanidinas inducen también mutaciones *in vitro*, pero sin necesidad de activación metabólica (Esquema 1.1.) con aparición de tumores en el sitio de aplicación.

Es interesante destacar la aplicación de algunos nitrosocompuestos como agentes antitumorales en quimioterapia. Entre ellos se encuentran las nitrosoureas $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{NO})\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ y $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NHCON}(\text{NO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, empleadas de forma habitual en este tipo de tratamientos (McCormick y McElhinney, 1990).

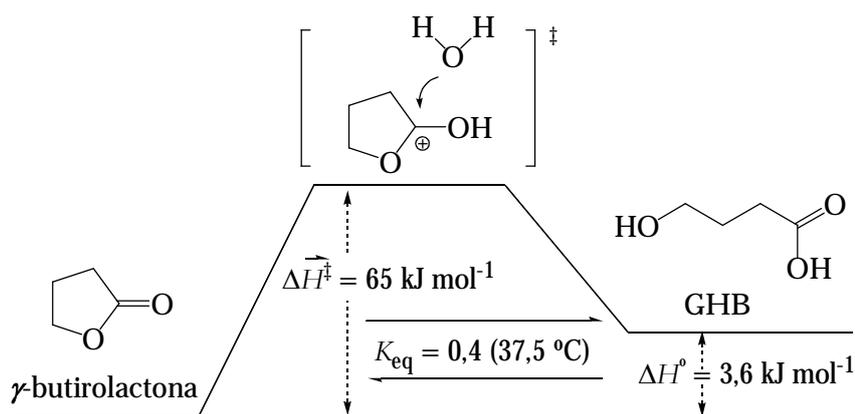
En este sentido en los últimos años se han estudiado en nuestro grupo de trabajo, mecanismos de nitrosación de substratos lineales y cíclicos (Calle *et al.*, 1992; Casado, 1994, 1997; Casado *et al.*, 1996; Iglesias *et al.*, 1997; Iglesias y Casado, 2002), así como la búsqueda de correlaciones estructura/actividad de nitrosaminas (Vera *et al.*, 1992). En particular, se abordó la nitrosación de aminoácidos con grupo amino secundario (Gil *et al.*, 1994, 1997).

Respecto a la inhibición de mecanismos de nitrosación, González Mancebo (González Mancebo *et al.*, 1997, 1999 y 2002) encontró que la reacción de nitrosación del fenol y derivados fenólicos se inhibe en presencia de sustituyentes alquílicos que bloquean la posición activa para el ataque electrófilo de los agentes nitrosantes $\text{NO}^+/\text{NO}_2\text{H}_2^+$ (orientación en *para* con respecto al grupo hidroxilo del fenol). La reacción de nitrosación se puede inhibir también con el agente nitrosante y/o el substrato nitrosable incluidos en ciclodextrinas (Hernández Benito, 2003).

El estudio de la nitrosación de α , β y γ -aminoácidos con grupo amino primario ha revelado que los agentes alquilantes que resultan de estas reacciones son las α , β y γ -lactonas. Su potencial alquilante sigue la secuencia: α -lactonas > β -lactonas > γ -lactonas (García Santos *et al.*, 2001, 2002) es decir, los aminoácidos naturales más comunes son precursores de las lactonas con mayor poder alquilante.

Debido al interés químico y bioquímico de las reacciones de alquilación, se ha llevado a cabo el estudio cinético de diversos agentes alquilantes como las lactonas β -propiolactona y β -butirolactona (Manso *et al.*, 2005), dicetena (Gómez Bombarelli *et al.*, 2008) o α -angelicalactona (Fernández Rodríguez *et al.*, 2007) que se caracteriza por sus propiedades antitumorales. Otras lactonas estudiadas, como la γ -butirolactona y δ -valero lactona (Pérez Prior *et al.*, 2005), con anillo pentagonal y hexagonal, respectivamente, son inactivas como carcinógenos; desde el punto de visto biológico, su importancia reside en sus reacciones de hidrólisis.

Aparte del interés químico de la reacción de hidrólisis de la γ -butirolactona, su relevancia biológica es notoria, ya que la sal sódica del ácido hidroxibutírico o GHB, producto resultante de su hidrólisis, es una ‘droga de diseño’ de consumo creciente como euforizante y estimulante sexual y muscular. Su consumo puede provocar graves efectos, sobre todo si se usa combinado con alcohol u otras drogas; de ahí el interés por conocer lo mejor posible el mecanismo de conversión γ -butirolactona \longleftrightarrow GHB (Esquema 1.2.).



Esquema 1.2. Formación de GHB en la hidrólisis catalizada en medio ácido de γ -butirolactona (Pérez Prior *et al.*, 2005)

Otros compuestos estudiados en nuestro grupo de investigación han sido las *N*-alquil-*N*-nitrosoureas (Manso *et al.*, 2008) o epóxidos como el óxido de estireno (González Pérez, 2008) de carcinogenia probada.

Con objeto de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de alquilación, en la primera parte del trabajo descrito en esta memoria se ha estudiado la capacidad alquilante del ácido sórbico y sus sales sódica y potásica.

Los sorbatos han sido clasificados por la FDA (FDA, 2005) como aditivos GRAS (Generally Recognized as Safe). Aunque la mayoría de los estudios no han revelado propiedades mutágenas de estas especies, algunos resultados indican la existencia de un posible potencial genotóxico de las mismas (Münzner *et al.*, 1990; Würzler *et al.*, 1992; Mpountoukas *et al.*, 2008).

Como el ácido sórbico inhibe el crecimiento del *Clostridium botulinum*, así como la formación de nitrosaminas, se utiliza junto con los nitritos en el proceso de curado de carnes. Esta práctica da lugar a otros problemas toxicológicos, porque el ácido sórbico reacciona con el nitrito para formar productos mutágenos. Los productos mayoritarios son el 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) y el ácido etilnitroso (ENA) (Namiki *et al.*, 1981; Osawa y Namiki, 1982).

Debido a la notable importancia biológica de las especies NMP y ENA, en la segunda parte de esta memoria se describen los resultados obtenidos al estudiar su reactividad.

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

Casado, J. *Nitrosation reactions; Invited Lecture*. In *Fast Reactions in Solution*; Royal Society of Chemistry, Annual Meeting, 1994.

Casado, J. *Chemistry of Nitrosation Reactions in Solution; Invited Lecture*. In *Kolloquien der Ortsverbände, Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie*, 1997.

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

Druckrey, H.; Preussmann, R.; Ivankovic, S.; Schmahl, D. *Krebsforsch* 1967, 69, 103.

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

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. *FDA List of Food Additives that are Generally Recognized as Safe (GRAS)*; U.S. GPO: Washington, DC, 2005.

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

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

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

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

- Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964.
- González Mancebo, S.; Calle, E.; García Santos, M. P.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 334.
- González Mancebo, S.; García Santos, M. P.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2235.
- González Mancebo, S.; Lacadena, J.; García Alonso, Y.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 157.
- González Pérez, M., 'Estudio cinético de la capacidad alquilante del óxido de estireno', Grado de Salamanca, **2008**.
- Hernández Benito, J., 'Influencia de las ciclodextrinas en los mecanismos de hidrólisis y aminólisis de nitritos de alquilo', Tesis Doctoral, **2003**.
- Iglesias, E.; García Río, L.; Leis, J. R.; Casado, J. *Recent. Res. Devel. Phys. Chem.* **1997**, *1*, 403.
- Iglesias, E.; Casado, J. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *21*, 37.
- Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds* Cambridge Univ. Press: Cambridge, **1992**.
- Loepky, R. N.; Michejda, C. J. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds: Chemistry and Biochemistry* ACS Symposium Series N° 553, Am. Chem. Soc., Washington, **1994**.
- Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Br. J. Cancer* **1956**, *10*, 114.
- Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
- Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.
- McCormick, J. E.; McElhinney, R. S. *Eur. J. Cancer* **1990**, *26*, 202.
- Mirvish, S. S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1975**, *31*, 325.
- Mirvish, S. S. *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 17.
- Mpountoukas, P.; Vantarakis, A.; Sivridis, E.; Lialiaris, T. *Fd. Chem. Toxic.* **2008**, *46*, 2390.
- Münzner, R. C.; Tilch, H. W.; Renner, H. W. *Fd. Chem. Toxic.* **1990**, *28*, 397.
- Namiki, M.; Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, K.; Tsuji, K. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 407.
- Osawa, T.; Namiki, M. *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 2299.
- Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 420.
- Vera, A.; Montes, M.; Usero, J. L.; Casado, J. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*, 791.
- Williams, D. L. H. *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide* Elsevier Applied Science, Amsterdam, **2004**.
- Würgler, F. E.; Schlatter, J.; Maier, P. *Mutat. Res.* **1992**, *283*, 107.

CAPÍTULO 2

Antecedentes bibliográficos

«Sorbic acid and its salts have antibacterial activities and also inhibit the growth of yeasts and other fungi. Since the 1940s they have been found to be effective antimicrobial agents and hence are used as preservatives in a wide range of foods and drinks, and to a lesser in certain cosmetics, pharmaceuticals and tobacco products»

B. R. Thakur, K. Singh, S. S. Arya, 1994

2. Antecedentes bibliográficos

2.1. Características generales del ácido sórbico y sus sales

El ácido *trans*, *trans*-2,4-hexadienoico, ácido sórbico (1), y sus sales de potasio y calcio se utilizan como conservantes en una gran variedad de alimentos, fármacos y cosméticos (Thakur et al., 1994; Dacosta, 1994; Andersen, 2008).

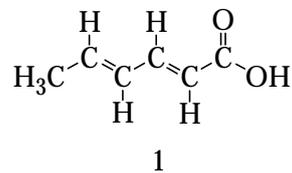


Figura 2.1. Estructura del ácido sórbico

Los sorbatos se encuentran entre los aditivos denominados GRAS: 'Generally Recognized as Safe' (Thakur et al., 1994; FDA, 2005). En la Unión Europea está autorizado el uso del ácido sórbico (E200) y de sus sales potásica (E202) y cálcica (E203) en alimentos

como margarina, fruta, postres, vinos y otras bebidas, quesos, etc (Ferrand et al., 2000a), para prolongar el tiempo de almacenamiento (shelf life).

El ácido sórbico fue aislado por primera vez de las bayas agraces de la planta 'Sorbus aucuparia' por A. W. Hoffmann en 1859. Su estructura química se conoció entre 1870 y 1890. En 1900, Doebner lo sintetizó mediante condensación de crotonaldehído (2) y ácido malónico (3) (Lück, 1976; Figura 2.2.).

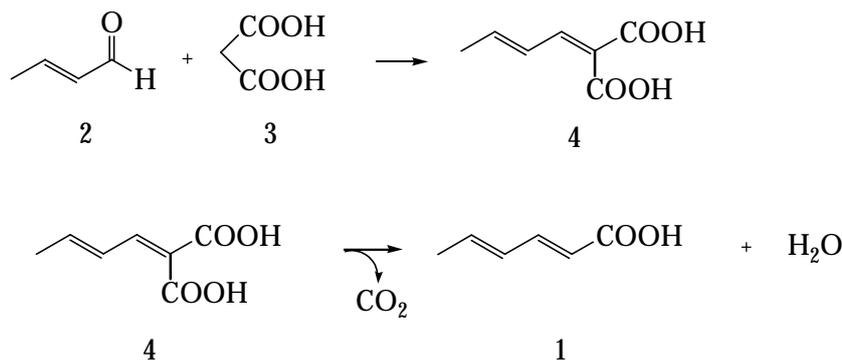


Figura 2.2. Síntesis del ácido sórbico por condensación de crotonaldehído (2) y ácido malónico (3)

Las propiedades antimicrobianas del ácido sórbico fueron descubiertas por Müller y Gooding en 1939 y 1940, respectivamente (Sofos et al., 1981). Este hecho permitió el empleo del ácido sórbico y de los sorbatos como inhibidores de levaduras, mohos y bacterias en una gran variedad de productos. Pero su utilización como conservantes alimenticios no comenzó hasta 1950.

En 1974 Tompkin y colaboradores (Tompkin et al., 1974) emplearon sorbato potásico en algunos alimentos como salchichas; observaron que la adición de un 0,1% del mismo retrasa el crecimiento de *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, así como el crecimiento y generación de toxinas por *Clostridium botulinum*.

A partir de esa fecha se empezó a utilizar el ácido sórbico y los sorbatos como agentes antibotulínicos y conservantes en diferentes tipos de carnes y productos cárnicos. Se hicieron ensayos con estos compuestos en combinación con nitrito sódico para conservar carnes curadas e inhibir la formación de especies potencialmente cancerígenas (como las nitrosaminas) (National Academy of Sciences, 1981; Robach y Sofos, 1982).

El ácido sórbico desempeña actualmente un papel importante en la conservación de alimentos frescos con alto grado de humedad. Actúa como agente antimicrobiano muy efectivo en este tipo de productos (Erickson, 1982).

El ácido sórbico en forma cristalina es estable, no habiéndose observado cambios en su coeficiente de absorción molar (en disolución) después de tres años de almacenamiento a temperatura ambiente y en presencia de aire (Melnick et al., 1953); pero en disolución acuosa y en los alimentos, es relativamente inestable (Doesburg et al., 1969; Heintze, 1971; McCarthy y Eagles, 1976; Saxby et al., 1982; Vidyasagar y Arya, 1984) observándose, en algunos casos, la aparición de un color pardo. En esos medios el ácido sórbico puede sufrir descomposición a través de mecanismos como oxidación, interacción con otros conservantes o aditivos, o por acción microbiana.

2.2. Estabilidad del ácido sórbico en disolución acuosa

2.2.1. Degradación en medio acuoso

El ácido sórbico es relativamente inestable en disolución acuosa y se degrada siguiendo una cinética de orden uno (Arya, 1980; Seow y Cheah, 1985). Debido a la presencia en su molécula de dos insaturaciones, se oxida para dar lugar a compuestos carbonílicos como malonaldehído o crotonaldehído (Arya, 1980; Arya y Thakur, 1988). Los agentes oxidantes reaccionan con la molécula para formar peróxidos que se degradan y, finalmente, polimerizan.

La degradación del ácido sórbico en disoluciones de ácido sulfúrico diluido y dióxido de azufre da lugar a productos volátiles como α -angélicalactona ó 2-metil-5-acetilfurano (Saxby et al., 1982). La reacción entre el oxígeno molecular y el ácido sórbico solamente tiene lugar, de manera significativa, cuando éste está en disolución acuosa (Arya, 1980); la luz favorece su descomposición (Saxby et al., 1982; Arya, 1980). Algunos autores (Heintze, 1973) han observado que la autooxidación del ácido sórbico es despreciable tras 48 horas de aireación intensiva, en presencia de ácido acético.

En sistemas que contienen azúcares y/o glicerol, la reacción de descomposición del ácido sórbico es análoga a la observada en disolución acuosa, siguiendo también una cinética de orden uno (Seow y Cheah, 1985; Thakur y Arya, 1991; Gerschenson et al., 1986).

2.2.2. Degradación en los alimentos

En los alimentos el ácido sórbico se degrada de la misma forma que en disolución acuosa (Pekkarinen, 1969; Gerschenson et al., 1986; Vidyasagar y Arya, 1983; Bolin et al., 1980; Thakur et al., 1992) aunque, de forma general, esta degradación transcurre en menor proporción que en esta última (Sofos, 1989). En zumos de fruta pasteurizada el ácido sórbico se degrada menos de un 3% al cabo de 320 días de almacenamiento a 20 °C, mientras que en disolución acuosa se descompone un 25 y un 75% en las mismas condiciones después de 3 y 5 meses de almacenamiento, respectivamente (Heintze, 1971). El ácido sórbico empleado en carnes curadas almacenadas en un lugar fresco se descompone solamente un 10% al cabo de 50 días de almacenaje (Maekawa et al., 1984). En el caso del beicon y de productos de pavo procesados, el ácido sórbico se degrada en pequeña cuantía durante el almacenamiento de aquellos en lugar fresco (Robach et al., 1980a; Robach et al., 1980b). Sin embargo, en las lonchas de jamón curado, el sorbato se degrada un 50% al cabo de 30 o 60 días de almacenamiento a 22 °C, con una humedad

relativa del 70% (Baldock et al., 1979), mientras que en el caso del pescado ahumado en las mismas condiciones de temperatura y humedad el ácido sórbico se degrada en menor proporción (Boyd y Tarr, 1955). Las diferencias observadas en su degradación muestran la importancia de la composición de los alimentos en su estabilidad.

Bolin y colaboradores (Bolin et al., 1980) observaron una pérdida rápida de ácido sórbico en ciruelas pasas durante los dos primeros días de almacenamiento, degradándose posteriormente de forma gradual. Como la cinética de descomposición del ácido sórbico no seguía una cinética de orden uno, atribuyeron este comportamiento a causas químicas y no microbiológicas. Sin embargo, la cinética de descomposición del ácido sórbico en melocotones almacenados seguía una cinética de orden uno con una constante de velocidad y una energía de activación similares a las obtenidas para la reacción de descomposición en disoluciones de glucosa en las mismas condiciones de pH (Gerschenson et al., 1986).

La degradación del ácido sórbico, tanto en disolución acuosa como en los alimentos se ve influida por numerosos factores como pH, composición del alimento, presencia o ausencia de otros aditivos, actividad del agua, características del embalaje, temperatura de almacenamiento, etc. A continuación se reseñan los efectos de estos factores en esa degradación.

2.2.3. Factores que afectan a la estabilidad del ácido sórbico

2.2.3.1. Influencia del *pH*

La estabilidad del ácido sórbico en disolución acuosa o en los alimentos se ve fuertemente influida por el pH del medio. Se ha encontrado que su degradación auto-oxidativa en disolución acuosa disminuye al aumentar el pH, siendo la molécula en su forma no disociada más susceptible de oxidación que la especie disociada (Arya, 1980). La Tabla 2.1. muestra el efecto del pH sobre la degradación del ácido sórbico en disolución acuosa a 37 °C.

Tabla 2.1. Efecto del pH en la velocidad de degradación del ácido sórbico en disolución acuosa; T = 37,0 °C.^a

pH	10 ² ·k (día ⁻¹)
2,5	6,48 ± 0,19
3,3	5,30 ± 0,17
3,5	1,58 ± 0,07
4,0	0,38 ± 0,04
4,5	0,24 ± 0,04
5,0	0,19 ± 0,02
7,0	0,07 ± 0,02

^aRef. Arya, 1980

Algunos ácidos, como clorhídrico, acético, tricloroacético, trifluoroacético y sulfúrico catalizan la degradación del ácido sórbico (Vidyasagar y Arya, 1983; Pekkarinen y Rissanen, 1966; Dulog y Tsobanidis, 1981). La catálisis puede deberse a la reacción entre el grupo hidropoxi terminal del ácido sórbico con el ácido para formar peroxiésteres que se descomponen para generar radicales (Pekkarinen y Rissanen, 1966). Vidyasagar et al. (Vidyasagar y Arya, 1983) estudiaron el efecto de ácidos presentes habitualmente en los alimentos. Encontraron que, excepto los ácidos cítrico y maleico, los demás presentan efecto catalítico. Se observó que, a elevadas temperaturas, la estabilidad del ácido sórbico aumentaba con el pH. Sin embargo, el efecto de un ácido específico parece ser más importante en la descomposición del ácido sórbico que el efecto genérico del pH.

2.2.3.2. Efecto de los iones metálicos

Generalmente, los iones metálicos aceleran la velocidad de las reacciones autooxidativas. En el caso del ácido sórbico, el efecto de los iones metálicos depende de su concentración. Concentraciones bajas de iones metálicos aumentan la velocidad de descomposición, mientras que concentraciones altas la retardan (Pekkarinen y Porkka, 1967; Pekkarinen, 1968; Maekawa et al., 1984).

La autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados conjugados transcurre con formación de birradicales (Allen y Kummerow, 1951). Los iones metálicos tienden a formar complejos con peroxirradicales. Este hecho puede explicar la disminución en la velocidad de autooxidación del ácido sórbico en presencia de concentraciones altas de

iones metálicos. Sin embargo, la descomposición del ácido sórbico ocurre por ruptura del doble enlace cuando se trabaja con concentraciones bajas de iones metálicos o a través de la descomposición de peróxidos, generando en ambos casos radicales libres.

2.2.3.3. Efecto de las sales

Sales como cloruro sódico y potásico, fosfatos de sodio, etc. se utilizan solas o en combinación con otros conservantes alimentarios (como el ácido sórbico) para prolongar la vida media de los alimentos (Thakur et al., 1994). Se ha observado que los cloruros sódico y potásico aumentan la estabilidad del ácido sórbico en disolución acuosa, mientras que los cloruros de litio y amonio favorecen su descomposición. El efecto protector del cloruro de sodio o de potasio aumenta al hacerlo la concentración de los mismos de un 0,1% a un 2% (Arya, 1980). Los sulfatos de sodio, potasio y amonio muestran un fuerte efecto oxidante en la degradación del ácido sórbico en disolución acuosa (Arya, 1980). El efecto de los iones fosfato es más complejo. La adición de hidrogenofosfato sódico aumenta el pH del sistema, ejerciendo un efecto estabilizador sobre el ácido sórbico. Pero cuando se ajusta de nuevo el pH a 3,3 (pH del ácido sórbico en disolución acuosa) los iones fosfato muestran un fuerte efecto oxidante (Arya, 1980).

Los bisulfitos y el dióxido de azufre aceleran la degradación del ácido sórbico; también pueden reaccionar para formar productos de adición 1:1 (Heintze, 1976). En el vino, el ácido sórbico puede reaccionar con dióxido de azufre para formar compuestos mutágenos durante su almacenaje (Lafont y Lafont, 1979).

2.2.3.4. Influencia de los aminoácidos y de las proteínas

Tanto los aminoácidos como las proteínas -especialmente los primeros- que contienen grupos sulfhidrilos libres, interactúan con el ácido sórbico modificando su estabilidad. Excepto la arginina e histidina, que presentan un efecto estabilizador, el resto de aminoácidos favorecen la degradación del ácido sórbico. El efecto estabilizador de estos dos aminoácidos se puede atribuir al aumento de pH (de pH 3,3 a 4,9) que tiene lugar en la mezcla de reacción cuando se añaden estos aminoácidos (Arya, 1980; Arya y Thakur, 1991).

Se ha observado que la incorporación de proteínas como BSA (albúmina de suero bovino), caseinato sódico o gluten reducen la velocidad de descomposición del ácido sórbico (Arya y Thakur, 1991).

2.2.3.5. Otros factores que influyen en la estabilidad del ácido sórbico

El ácido ascórbico inhibe la reacción de descomposición del ácido sórbico en conservas de frutas (Czukur, 1976). Como la degradación del ácido ascórbico transcurre rápidamente en presencia de sorbatos (Kagami, 1967; Li et al., 1989) éste podría competir con el sórbico por el oxígeno, retardando la autooxidación del último.

La estabilidad del ácido sórbico se ve influida por la temperatura. Un aumento de temperatura disminuye la estabilidad en disolución acuosa (Arya, 1980). El mismo efecto se observa en sistemas que contienen azúcares y sales (Gerschenson, 1986; Guerrero et al., 1990).

2.3. Potencial genotóxico del ácido sórbico y sus sales

Por sus efectos inhibidores sobre levaduras, mohos y bacterias (Lück, 1976) el ácido sórbico y los sorbatos se utilizan de forma generalizada como conservantes alimentarios. Algunos estudios toxicológicos de estas especies -mediante tests de toxicidad crónica y aguda y estudios de carcinogenia (Gaunt et al., 1975; Hendy et al., 1976), teratogenia (FDA, 2005) y mutagenia- han mostrado que los sorbatos son inocuos como conservantes de alimentos (Lück, 1980). Sin embargo, hay resultados contradictorios respecto al potencial genotóxico del ácido sórbico y los sorbatos.

No se ha encontrado evidencia de efectos mutágenos del ácido sórbico o su sal potásica sobre la *Salmonella typhimurium* en presencia o ausencia de activación metabólica (d'Aquino y Santini, 1977; Ishidate et al., 1984; Kawachi et al., 1980; LBI, 1974; Morita et al., 1981; Münzner, 1990). El sorbato sódico muestra una débil mutagenia en el test de Ames en ausencia de activación metabólica (Hasegawa, 1984). En diversos estudios realizados con el ensayo rec utilizando *Bacillus subtilis* no se ha observado actividad (Kada, 1974; Hayatsu, 1975; Khoudokormoff, 1978; Namiki et al., 1980; Morita et al., 1981).

Los resultados del test de mutagenia para evaluar la resistencia de tioguanina en células de ovario de Hámster Chino o fibroblastos de hámster V79 con disoluciones de ácido sórbico, sorbato potásico y sorbato sódico (Hasegawa, 1984; Münzner et al., 1990) revelan que disoluciones de ácido sórbico, sorbato potásico y disoluciones recién preparadas de sorbato sódico no son mutágenas. Sin embargo, el sorbato sódico de pureza desconocida presentaba mutagenia en concentraciones de 200-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Hasegawa, 1984).

Respecto a los estudios realizados para evaluar posibles daños cromosómicos, no se ha detectado daño cromosómico en células de la médula espinal de ratones tratados con ácido sórbico durante treinta días (15 mg de ácido sórbico por kilogramo de peso corporal; Banerjee y Giri, 1986). En un estudio similar en ratas se observó que el sorbato potásico no causa daño en el ADN (Kawachi et al., 1980). Según el test de intercambio cromátida hermana, el ácido sórbico y el sorbato potásico no son genotóxicos (Hasegawa et al., 1984). Sin embargo, Mukherjee y colaboradores (Mukherjee et al., 1988) detectaron inducción in vivo de intercambio de cromátida hermana y formación de micronúcleos después de un tratamiento agudo intraperitoneal (ip) de ratones con ácido sórbico (dosis más elevada: 150 mg por kilogramo de peso corporal). El sorbato sódico, en concentraciones de 600 y 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, causa inducción significativa de aberraciones cromosómicas e intercambio cromátida hermana (SCEs) en células V79 (Hasegawa et al., 1984). Sin embargo no se ha

observado incremento significativo en la velocidad de intercambio cromátida hermana al emplear disoluciones puras de sorbato sódico y potásico de concentración 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Münzner et al., 1990).

Con los estudios realizados *in vivo* con test de micronúcleos y análisis cromosómico (Münzner et al., 1990) no se observó mutagenia en ratones o hámsteres tras una administración oral o intraperitoneal de disoluciones recién preparadas de sorbato sódico y sorbato potásico (200 mg por kilogramo de peso corporal). Estudios con disoluciones de sorbato sódico almacenadas durante algún tiempo (100 mg por kilogramo de peso corporal) revelaron una débil actividad clastógena, evidenciada por el incremento del número de aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Münzner et al., 1990).

Jung y colaboradores (Jung et al., 1992) estudiaron el potencial genotóxico provocado por dosis elevadas de ácido sórbico y su sal potásica mediante el test de intercambio de cromátida hermana y micronúcleos. De los resultados obtenidos se concluye que tanto el ácido sórbico como el sorbato potásico no son genotóxicos. Dosis orales extremadamente elevadas de ácido sórbico (superiores a 5000 mg por kilogramo de peso corporal) no causan daño genético. La administración de dosis no fisiológicas de sorbato potásico por vía intraperitoneal no provoca efectos genotóxicos.

En otros trabajos se han descrito efectos positivos para sorbato sódico de pureza desconocida. Debido a la estabilidad tan limitada del sorbato sódico (por ej., la oxidación del sorbato sódico da lugar a la formación del mutágeno 4,5-oxohexenoato), estos resultados no parecen ser concluyentes para evaluar el potencial genotóxico de un aditivo alimenticio.

Como resultado de estudios *in vivo* e *in vitro* con las disoluciones de ácido sórbico y sus sales sódica y potásica (Jung et al., 1992) se puede concluir que las aberraciones cromosómicas se atribuyen a muestras de pureza desconocida. Disoluciones recién preparadas de sorbato sódico y potásico no son mutágenas según el test de micronúcleos *in vitro* y no producen transformaciones celulares en células embrionarias de hámsteres Syrian con dosis superiores a 1,2 mg/ml.

2.4. Reactividad química del ácido sórbico

El ácido sórbico, forma *trans, trans* del ácido 2,4-hexadienoico, (Figura 2.3.) tiene un sistema de dobles enlaces conjugados susceptible de ataque de nucleófilos como tioles (Khandelwal y Wedzicha, 1990a; Wedzicha y Brook, 1989), aminas (Kheddis et al., 1981; Leraux y Vauthier, 1970; Verbiscar y Campbell, 1964) y nitritos (Khandelwal y Wedzicha, 1990b; Kito et al., 1978).

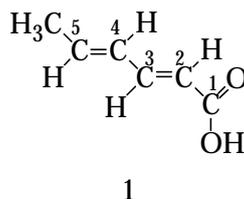


Figura 2.3. Estructura del ácido *trans, trans*-2,4-hexadienoico o ácido sórbico

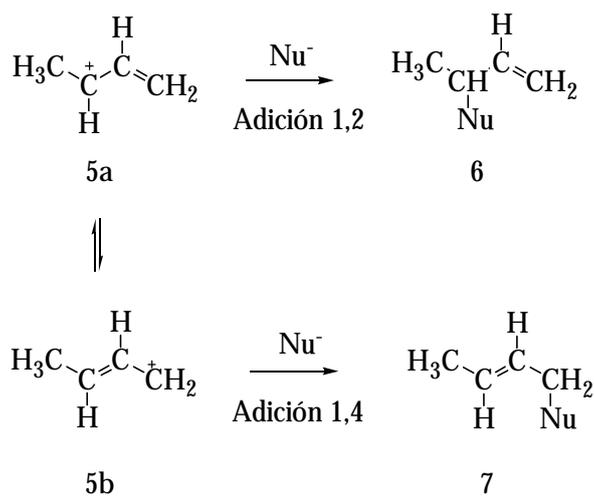
La Tabla 2.2. recoge las señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los átomos de carbono del dieno de la molécula (Leraux y Vauthier, 1970; Reger y Habib, 1980). Debido a la baja densidad electrónica que presenta el carbono 3, el ataque nucleófilo debería estar favorecido en esta posición.

Tabla 2.2. Señales de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de los átomos de carbono del dieno de la molécula de ácido sórbico.

Átomo de carbono	2	3	4	5
^1H -RMN δ , ppm	5,81	7,41	6,25	6,25
^{13}C -RMN δ , ppm	118,1	147,2	129,6	140,6

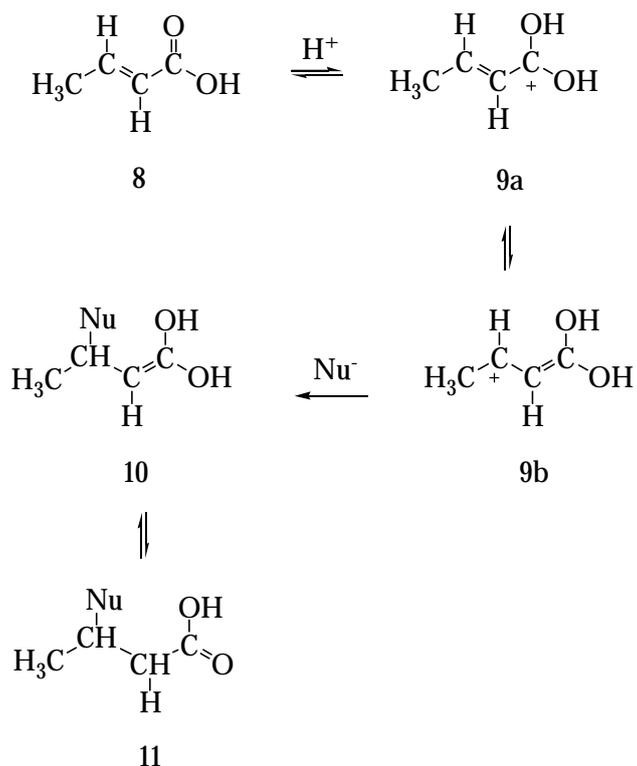
El ejemplo más simple de adición nucleófila en dienos es la reacción del butadieno con especies del tipo H^+Nu^- donde Nu^- representa a un nucleófilo. Esta reacción transcurre con protonación inicial de dieno en el carbono 1 seguida del ataque nucleófilo dando lugar al producto de adición 1,2 (6) o 1,4 (7) según se refleja en el Esquema 2.1. (Khandelwal y Wedzicha, 1990a).

La protonación en el carbono C_1 es preferible, puesto que la protonación en C_2 da lugar a carbocationes secundarios estabilizados por la deslocalización de la carga positiva (Sykes, 1965). El producto final depende de las velocidades relativas de reacción del nucleófilo con los posibles carbocationes 5a y 5b (Khandelwal y Wedzicha, 1990a).



Esquema 2.1. Reacción de adición nucleófila sobre la molécula de butadieno

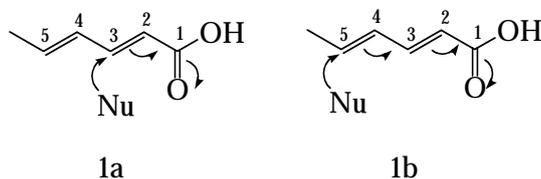
En el caso del ácido crotonico, que es α,β -insaturado, puede reaccionar con nucleófilos débiles del tipo H^+Nu^- mediante la adición 1,4 (Esquema 2.2.)



Esquema 2.2. Reacción de adición de nucleófilos débiles sobre la molécula de ácido crotonico

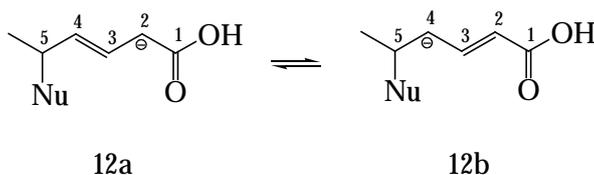
Los nucleófilos fuertes, como aminas o tioles, conducen a productos de adición 1,4, sin que sea necesaria la protonación inicial; la adición de H^+ tiene lugar en la última etapa

del mecanismo. Al aplicar este argumento a la molécula de ácido sórbico, podría decirse que un nucleófilo fuerte atacaría a la molécula en las posiciones 3 ó 5, como muestra el Esquema 2.3. (Khandelwal y Wedzicha, 1990a).



Esquema 2.3. Reacción de adición de nucleófilos fuertes sobre la molécula de ácido sórbico

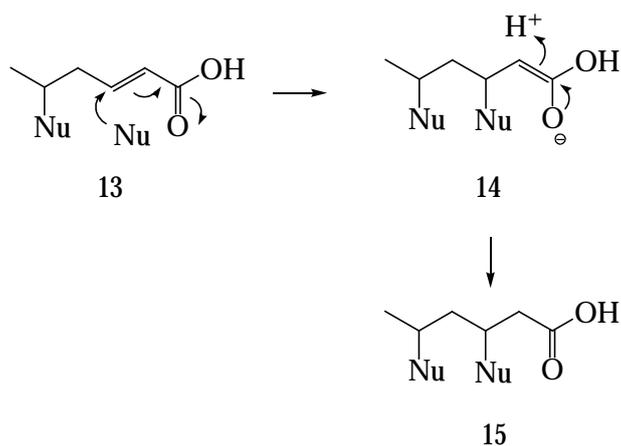
La mayor deslocalización de la carga en la especie resultante del ataque nucleófilo en la posición 5 de la molécula (1b) sugiere que esta posición debería ser más favorable para el ataque nucleófilo, a pesar de la baja densidad electrónica que presenta el carbono 3. La reacción finalizaría con la protonación en las posiciones 2 y 4 (Esquema 2.4.).



Esquema 2.4. Estructuras resultantes de la adición de nucleófilos sobre la molécula de ácido sórbico

Es probable que el producto resultante de la adición de nucleófilos sobre el ácido sórbico dependa de la estabilidad relativa de las especies 12a y 12b y de su velocidad de reacción relativa respecto a H^+ (Khandelwal y Wedzicha, 1990a).

Como se ha podido observar, los productos resultantes de la adición de nucleófilos sobre dienos tienen lugar por adición 1,2 ó 1,4. En el caso del butadieno, la tendencia de los nucleófilos para dar lugar a adición sobre el dieno puede depender también de la polaridad del disolvente. Por ejemplo, la adición 1,2 sobre el butadieno ocurre preferentemente a temperaturas bajas en disolventes no polares (Sykes, 1965). La adición 1,2 sobre el dieno del ácido sórbico permite que dicha molécula pueda adicionar una segunda molécula de nucleófilo para formar un diaducto (15) como muestra el Esquema 2.5.



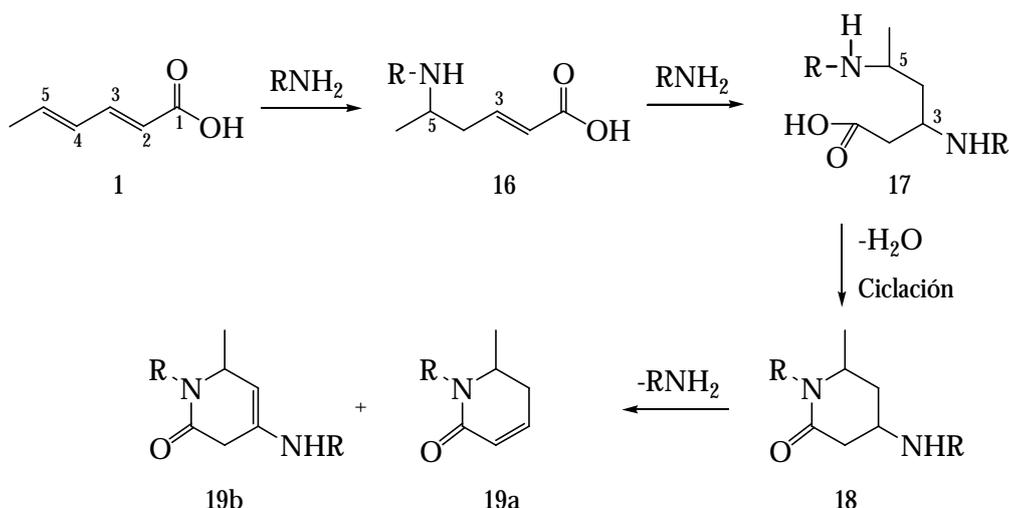
Esquema 2.5. Formación de un diaducto sobre la molécula de ácido sórbico

Los alimentos contienen numerosos nucleófilos, como aminas o tioles, así como el ión sulfito que se encuentra como dióxido de azufre y cuya reactividad como nucleófilo es conocida (Wedzicha, 1984). Dado el pródigo empleo del ácido sórbico como conservante alimentario, es interesante conocer la naturaleza de los productos resultantes de su interacción con los nucleófilos presentes en los alimentos. A continuación se muestran algunas de las reacciones más importantes que tienen lugar entre el ácido sórbico y especies como los iones sulfito, las aminas y los tioles.

2.5. Reacción entre el ácido sórbico y las aminas

2.5.1. Mecanismo de reacción

La reactividad del ácido sórbico con aminas en alimentos ha sido poco estudiada. Algunos autores (Ferrand et al., 1998) han estudiado la interacción entre el ácido sórbico y los grupos funcionales R-NH₂ presentes de forma natural en los alimentos. En condiciones de reacción drásticas (autoclave a 200 °C durante 6 horas) se han identificado dihidropiridonas (Esquema 2.6.) como productos de reacción entre ácido sórbico y aminas primarias (Kheddis et al., 1981; Verbiscar y Campbell, 1964; Khandelwal y Wedzicha, 1990b).



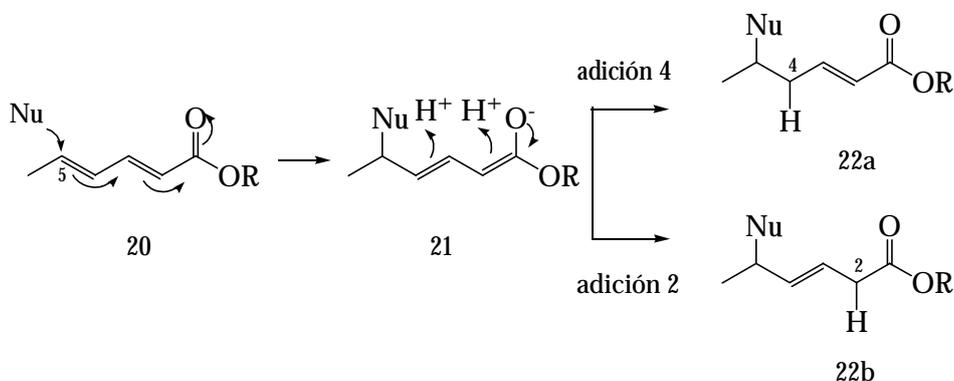
Esquema 2.6. Adición nucleófila de aminas sobre la molécula de ácido sórbico para dar lugar a productos cíclicos

Ferrand y colaboradores (Ferrand et al., 2000b) estudiaron la reacción entre ácido sórbico y aminas en condiciones de reacción más suaves, semejantes a las que se dan en los alimentos. El sistema de reacción estudiado estaba constituido por ácido sórbico y una amina primaria como la metilamina, disuelta en agua a 50 °C.

Los resultados (Ferrand et al., 2000b) (Esquema 2.6.) muestran que la formación de los productos con estructura cíclica 19a y 19b tiene lugar como resultado de la doble adición de la amina sobre la molécula de ácido sórbico para dar lugar a la especie 17. La estructura 18 es el producto de la ciclación de 17 con eliminación de una molécula de agua. Los productos finales 19a y 19b se obtienen a partir de 18 que pierde una molécula de amina. A pesar de su interés, la formación de los diaductos intermedios 17 y 18 para dar lugar a las especies 19a y 19b no se ha podido demostrar en este trabajo.

Khandelwal y colaboradores (Khandelwal y Wedzicha, 1990b) estudiaron la formación de productos del tipo 22a y 22b (Esquema 2.7.). Los productos mayoritarios de

la reacción entre el éster del ácido sórbico y un nucleófilo, Nu⁻, como la metilamina, se generan como consecuencia del ataque del nucleófilo en la posición 5 del éster, seguido de la adición de un protón en la posición 2 mientras que los minoritarios se forman con la protonación en la posición 4 (Esquema 2.7.).



Esquema 2.7. Adición nucleófila de aminas sobre ésteres del ácido sórbico

Los productos cíclicos que muestra el Esquema 2.6. resultan de la adición de una segunda molécula de amina al compuesto lineal conjugado 16. La posición del doble enlace en los compuestos 22b, mayoritario, y 22a, minoritario, es diferente. Al calentar los compuestos 22a y 22b a 50 °C en presencia de amina, sólo el compuesto 22a -que sería equivalente al compuesto 16 del Esquema 2.6.- conduce a la formación de las piridonas 19a y 19b; por tanto, es la especie 22a la que presenta el doble enlace conjugado. Khandelwal y Wedzicha (Khandelwal y Wedzicha, 1990b) observaron que los aductos que se formaban entre el ácido sórbico y los tioles eran inestables, mientras que las formas observadas con los ésteres correspondientes no se podían considerar despreciables. La obtención de estructuras cíclicas a temperaturas elevadas se debe, estrictamente, a la formación del aducto 16 y a los diaductos 17 y 18. Puesto que las estructuras cíclicas aparecen a 50 °C, los aductos lineales intermedios de reacción, deben formarse también, bien a partir del ácido sórbico o del etil éster correspondiente. La inestabilidad de estos aductos lineales podría provocar la desaparición de los mismos para dar lugar a los reactivos de partida a temperaturas más bajas (20 °C) o su evolución hacia las estructuras cíclicas 19a y 19b a temperaturas superiores.

2.5.2. Genotoxicidad y mutagenia de los productos de reacción

A 50 y 80 °C, tanto el ácido sórbico como el sorbato potásico reaccionan con aminas como metilamina, etilamina, propilamina, butilamina o benzilamina, para dar lugar a

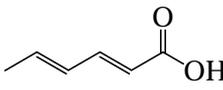
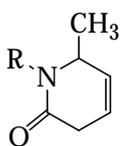
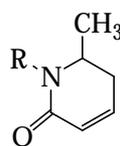
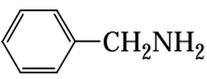
dos isómeros cíclicos, enantiómeros, para cada tipo de amina empleada (Ferrand et al., 2000a; 2000c). La Tabla 2.3. muestra las estructuras químicas y la pureza de los productos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y el sorbato potásico con diferentes aminas (Ferrand et al., 1998). Estos compuestos resultan de la doble adición de aminas sobre la estructura de dobles enlaces de los sorbatos, seguida de deshidratación y pérdida de una molécula de amina (Esquema 2.6.).

Ferrand y colaboradores (Ferrand et al., 2000a; 2000b; 2000c) estudiaron la genotoxicidad de los productos de reacción con células HeLa y plásmidos de ADN y la mutagenia de los mismos con el test de Ames. Se manejaron cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537.

Los productos resultantes de la reacción entre ácido sórbico y butilamina presentan un resultado ligeramente positivo con cepas TA98 en ausencia del sistema de activación S9 y en dosis pequeñas. Para dosis más elevadas, los valores de los revertientes son siempre inferiores al doble de los valores de los revertientes espontáneos. Estas observaciones no se han encontrado con el test de Ames con preincubación. Se admite que estos productos no son mutágenos. Estudios similares se han llevado a cabo con los productos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y bencilamina con cepas TA98 y sistema de activación S9. Respecto a los productos de reacción obtenidos al interaccionar el ácido sórbico con otras aminas, el valor de los revertientes de His⁺ inducido por las muestras de dichos productos es similar al de los revertientes espontáneos. Los resultados obtenidos sin y con incubación son idénticos. Se desprende así que los productos de reacción estudiados no son mutágenos, con o sin la presencia del sistema de activación S9, con las cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537. Además, como el valor de los revertientes de His⁺ para dichos compuestos, no ha alcanzado el doble del valor de los revertientes espontáneos, ninguno de los compuestos analizados puede considerarse mutágeno (Chu et al., 1981) a diferencia de los resultados obtenidos para los compuestos resultantes de la interacción entre el ácido sórbico y los nitratos o los sulfatos.

Los estudios realizados sobre los productos de interacción entre el ácido sórbico y diversas aminas han permitido concluir que no presentan efectos citotóxicos, genotóxicos o mutágenos y no inducen ninguna reacción al sistema de reparación SOS (Ferrand et al., 2000c).

Tabla 2.3. Estructuras de los productos cíclicos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y diversas aminas a 50 y 80 °C.

Reactivos	Productos de reacción		Pureza	
	Mayoritario	Minoritario		
 Ácido sórbico				
		R = CH ₃		
CH ₃ NH ₂ Metilamina	50 °C	N-metil-6-metil-3,6-dihidro-2-piridona 72,0 %	N-metil-6-metil-5,6-dihidro-2-piridona 25,1 %	97,1 %
		R = CH ₂ CH ₃		
CH ₃ CH ₂ NH ₂ Etilamina	50 °C	N-etil-6-metil-3,6-dihidro-2-piridona 75,2 %	N-etil-6-metil-5,6-dihidro-2-piridona 22,2 %	97,4 %
		R = CH ₂ CH ₂ CH ₃		
CH ₃ CH ₂ CH ₂ NH ₂ Propilamina	50 °C	N-propil-6-metil-3,6-dihidro-2-piridona 77,9 %	N-propil-6-metil-5,6-dihidro-2-piridona 18,9 %	96,8 %
		R = CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		
CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ Butilamina	50 °C	N-butil-6-metil-3,6-dihidro-2-piridona 67,1 %	N-butil-6-metil-5,6-dihidro-2-piridona 30,8 %	97,9 %
		R = H ₂ C- 		
 Bencilamina	80 °C	N-bencil-6-metil-3,6-dihidro-2-piridona 98,2 %		98,2 %

2.6. Reacción entre el ácido sórbico y los tioles

2.6.1. Generalidades

La idea de que las aminas son especies menos reactivas que los tioles frente a la molécula de ácido sórbico es consistente con el hecho de que la nucleofilia es mayor en éstos (Davis, 1968). El ión tiolato es el nucleófilo más efectivo presente de forma natural en los alimentos (Wedzicha y Brook, 1989).

El ácido sórbico reacciona lentamente con tioles en disolución acuosa a 80 °C y pH comprendido entre 3,7 y 5,7 (Wedzicha y Brook, 1989). El estudio cinético de la reacción entre el ácido sórbico y mercaptoetanol, ácido mercaptoacético y cisteína muestra que la reacción es de orden dos (Wedzicha y Zeb, 1990). El producto resultante de dicha reacción podría deberse a la adición sobre el C5 de la molécula de ácido sórbico, con el doble enlace en la posición 3 de la molécula. Sin embargo no se ha llevado a cabo un estudio sistemático de la estructura de los productos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y el tiol (Wedzicha y Brook, 1989). La razón principal de la escasa información que se tiene acerca de la estructura de los productos resultantes se debe a la dificultad en el aislamiento de los mismos, puesto que el ácido sórbico se descompone en medio débilmente ácido o en condiciones alcalinas. Algunos autores (Khandelwal y Wedzicha, 1990) sintetizaron los ésteres de metilo y etilo de los aductos formados mediante la adición nucleofílica de iones tiolato al éster del ácido sórbico. La adición se llevaba a cabo en el alcohol correspondiente en presencia de alcóxido sódico o trietilamina como catalizador. Los productos se purificaban fácilmente por destilación. El objetivo final era la preparación de muestras puras para el análisis estructural.

El sorbato de etilo y el hidrocloreuro del éster de etilo de cisteína se colocan en un medio de etanol seco y se añade etóxido sódico. Después de 48 horas de agitación continua a temperatura ambiente, se genera la especie 23 (Figura 2.4.) que se aísla con buen rendimiento. Del mismo modo, el sorbato de metilo reacciona con hidrocloreuro del éster de etilo de cisteína en diclorometano en presencia de trietilamina. Si, por otra parte, el ácido sórbico reacciona con cisteína en medio acuoso y se esterifica el producto, éste es idéntico al formado a partir de ésteres del ácido sórbico y cisteína (Khandelwal y Wedzicha, 1990).

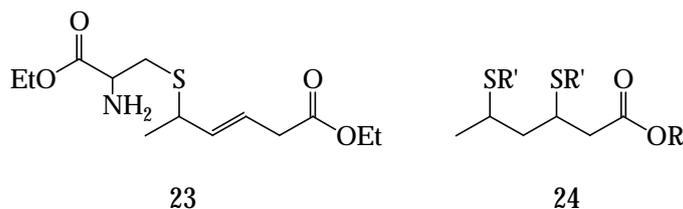


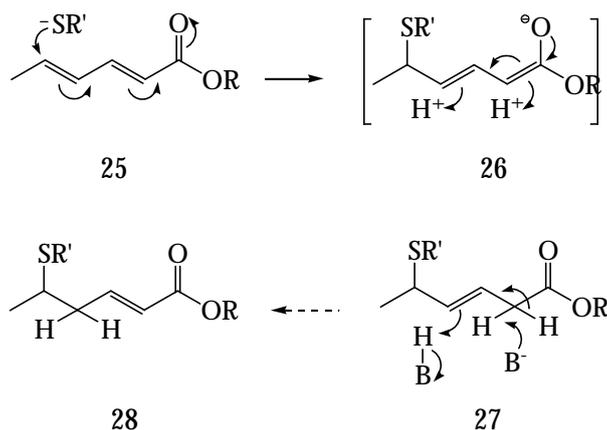
Figura 2.4. Aductos resultantes de la reacción entre ésteres del ácido sórbico y compuestos que contienen azufre

El ácido sórbico reacciona en las mismas condiciones con las especies 2-mercaptoacetato de etilo, mercaptoetanol y mercaptoacetato de metilo, generando monoadductos de estructura similar a la de 23 con el correspondiente tiol en posición 5. Sin embargo, cuando se emplean tioles de alquilo como etanotiol, 2-metil-2-propanotiol o butanotiol que reaccionan con ésteres del ácido sórbico, se obtienen solamente diaductos con estructuras del tipo 24 (Figura 2.4.).

Se puede concluir que el ataque nucleófilo de tioles de alquilo conduce a la formación de diaductos, mientras que la reacción con mercaptoetanol, ésteres del ácido 2-mercaptoacético e hidrocloreuro del éster de etilo de cisteína da lugar a monoadductos.

2.6.2. Mecanismo de reacción del ácido sórbico y sus ésteres con los tioles

El Esquema 2.8. muestra el mecanismo de reacción propuesto para el ataque del ión tiolato sobre el éster de ácido sórbico (Khandelwal y Wedzicha, 1990).



Esquema 2.8. Mecanismo de adición del anión tiolato al éster del ácido sórbico y posible reordenamiento del producto 3-eno (27) al 2-eno (28). En el estado de transición (26) se muestran las dos posibilidades de protonación, en la posición 2 o en la 4

El intermedio aniónico se combina con protones para formar la especie 27 ó 28. Para que se forme un diaducto es necesaria la formación de la especie 28. Se plantea, por lo

tanto, si la presencia de una base fuerte como el alcóxido sódico podría convertir la especie 27 en 28. Para explicar esta isomerización se ha propuesto un mecanismo de catálisis ácido-base (Esquema 2.8.). La naturaleza conjugada del éster α,β -insaturado podría favorecer la conversión. Los resultados obtenidos por estos autores muestran que la especie 3-hexenoato de metilo es completamente inerte frente a tioles en las mismas condiciones que las empleadas en la síntesis y, a menos que el sustituyente en posición 5 participe en la reacción, la isomerización del 3-eno a 2-eno parece improbable. Cuando la especie 2-hexenoato de metilo se trata con metóxido sódico en presencia del tiol se forma el producto 29 representado en la Figura 2.5. mientras que, en ausencia de nucleófilos, la especie 30 es la que se produce.

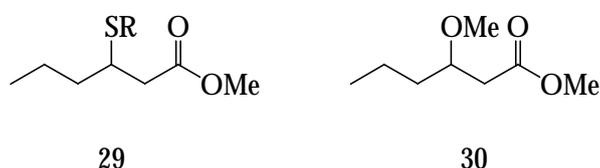


Figura 2.5. Productos resultantes de la reacción de la especie 2-hexenoato de metilo con metóxido sódico en presencia y en ausencia de tiol

Una explicación del mecanismo propuesto sería que la formación del derivado 3-hexenoato estuviese favorecida termodinámicamente, mientras que la del derivado 2-hexenoato lo estuviera cinéticamente. Por tanto, en el caso de nucleófilos muy reactivos como el alquiltiol, sería posible la formación de un diaducto, mientras que en presencia de nucleófilos menos reactivos predominaría la isomerización irreversible para generar finalmente el producto más estable.

La principal diferencia entre nucleófilos que dan lugar a monoadductos y los que forman diaductos es la presencia de oxígeno en su estructura. Es difícil distinguir si la causa que provoca repulsiones entre las cargas negativas y el estado de transición aniónico (Esquema 2.8.) es la electronegatividad del oxígeno o la presencia del par de electrones no enlazantes del mismo.

2.6.3. Hidrólisis de los productos de reacción

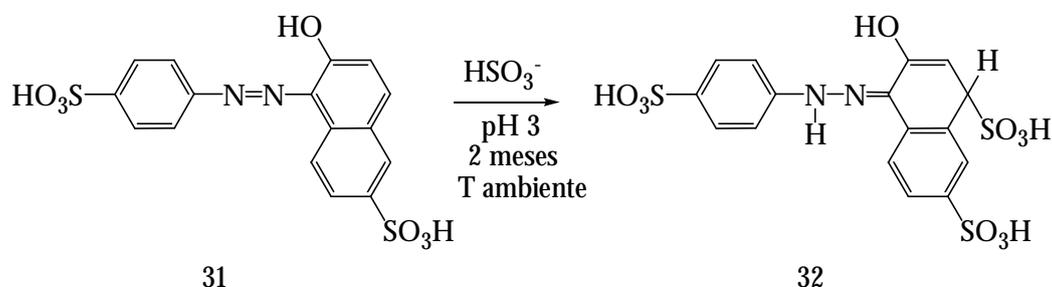
Una aplicación importante de los productos obtenidos por Khandelwal y Wedzicha (Khandelwal y Wedzicha, 1990) es la preparación de muestras para la evaluación toxicológica. Para llevar a cabo este proceso es necesario hidrolizar los ésteres. La hidrólisis ácida o básica de los monoadductos no se puede llevar a cabo correctamente, puesto que se obtiene ácido sórbico como producto de reacción con alto rendimiento. Estos autores

estudiaron la posibilidad de emplear enzimas como la esterasa en condiciones neutras para evitar la ruptura de los aductos 1:1. Por otra parte, los productos de reacción entre el alquiltiol y el ácido sórbico se obtenían cuando los diaductos se hidrolizaban en condiciones normales para la hidrólisis de ésteres.

2.7. Reacción entre el ácido sórbico y el ión sulfito

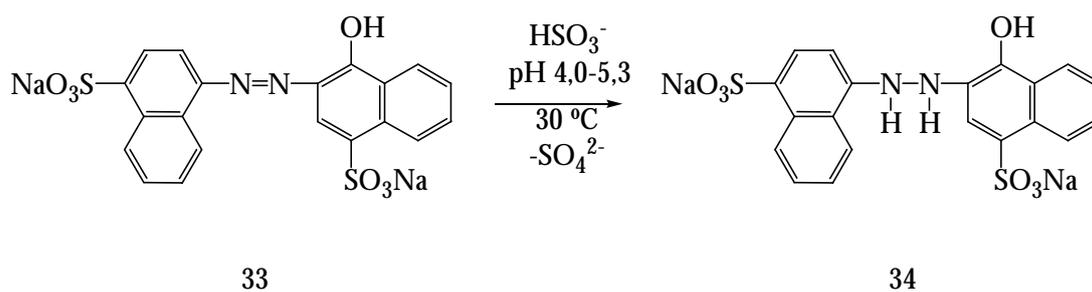
El dióxido de azufre en sus diferentes formas se añade a los alimentos para inhibir y controlar el crecimiento de microorganismos, para inhibir reacciones catalizadas enzimáticamente o el pardeo (browning) no enzimático y como agente antioxidante y reductor. Se utiliza mucho para conservar alimentos de todo tipo como frutas y verduras, zumos de frutas, mermeladas, conservas, salsas, productos cárnicos, aves, productos de panadería y alimentos deshidratados. A pesar de su alta reactividad química, especialmente la que presenta el ión bisulfito como nucleófilo, no se han observado apenas interacciones con otras especies presentes en los alimentos. Las reacciones más relevantes del dióxido de azufre en los alimentos tienen lugar con colorantes azoicos, con el ácido ascórbico y sus productos de descomposición, con el ión nitrito o con el ácido sórbico (Adams, 1997).

La reacción del dióxido de azufre con colorantes azoicos es importante debido a su uso frecuente en zumos de fruta y, en menor extensión, en mermeladas, conservas y otros productos. La estabilidad de los colorantes azoicos en presencia del dióxido de azufre es variable (Wedzicha, 1984; Kroyer, 1986). Los colorantes se pueden dividir en dos clases: los que producen colorantes secundarios al reaccionar con el ión bisulfito (la especie predominante del dióxido de azufre en medio ácido) como los colorantes Amaranth, Ponceau 4R y Sunset Yellow (31) y los que experimentan una pérdida de color sin cambio en la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción, como la Carmoisine (33) y la Tartrazine (Adams y Langley, 1995). El colorante posee grupos hidroxilo en posición orto respecto al enlace azo y la posición para sin sustituir en la molécula de naftaleno. Por tanto, los colorantes aparecen predominantemente como tautómeros de hidrazona en vez de compuestos azo propiamente dichos. Este hecho facilita la adición del ión bisulfito a la posición para, como se puede observar en la conversión de Sunset Yellow para dar lugar a un derivado 4-sulfonato de color amarillo limón (32) como muestra el Esquema 2.9. (Damant et al., 1989).



Esquema 2.9. Reacción del ión bisulfito con el colorante Sunset Yellow (31)

La reacción del bisulfito con los colorantes Carmoisine y Tartrazine no da lugar a colorantes secundarios. En el caso del Carmoisine, el tautómero de hidrazona es viable; sin embargo, la adición del ión bisulfito en la posición para parece no tener lugar. Este hecho puede deberse a la deslocalización de la carga en el anillo aromático del naftaleno. Algunos autores apoyan la idea de la posible reacción entre una molécula de colorante y una de bisulfito para generar un complejo inestable que se hidroliza hasta a un compuesto hidrazo incoloro (34) (Esquema 2.10.; Wedzicha y Rumbelow, 1981).



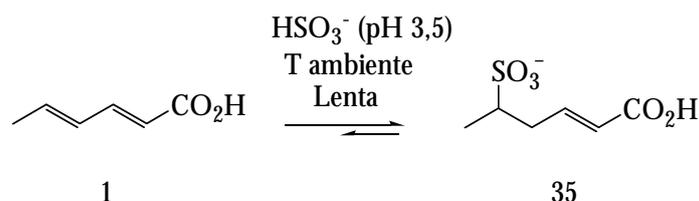
Esquema 2.10. Reacción del ión bisulfito con el colorante Carmoisine (33)

El dióxido de azufre inhibe la oxidación del ácido ascórbico y se utiliza en zumos de fruta y salchichas. En condiciones anaeróbicas se observa que la hidrólisis del anillo lactónico de la molécula de ácido ascórbico podría estar catalizada por el ión bisulfito debido a su elevada nucleofilia (Davies y Wedzicha, 1992). La especie 3,4-dideoxipentosulos-3-eno se forma lentamente como resultado de las reacciones de decarboxilación y deshidratación. El ión bisulfito se adiciona rápidamente al doble enlace de 3,4-dideoxipentosulos-3-eno para dar lugar al producto 3,4-dideoxi-4-sulfo pentosulosa (Wedzicha, 1984). En condiciones aeróbicas, el ión bisulfito reacciona con la molécula de ácido ascórbico para dar lugar a un hidroxisulfonato del ácido dehidroascórbico. Solamente se conoce el monoadducto debido a la estructura rígida del anillo del ácido dehidroascórbico que impide la aproximación de una segunda molécula de ión bisulfito al grupo carbonílico libre por impedimento estérico.

El dióxido de azufre raramente se usa en combinación con el ión nitrito, debido a la posterior reacción con el ión bisulfito para dar lugar a sulfonatos de especies como hidroxilamina o amonio (Wedzicha, 1984). Este tipo de reacciones podría destruir la capacidad conservante de cada uno de los aditivos.

El ácido sórbico se usa ampliamente como sustituto del dióxido de azufre y en algunas ocasiones se emplean conjuntamente.

El ión bisulfito también reacciona con el ácido sórbico para dar lugar a un aducto (35) (Esquema 2.11.; Khandelwal y Wedzicha, 1990a). El oxígeno interfiere en la reacción entre ambos conservantes. La oxidación de sulfito generaría radicales libres como $\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{O}_2^-$ que oxidarían al ácido sórbico (Goddard y Wedzicha, 1992). En alimentos conservados en condiciones aeróbicas prevalecen las autooxidaciones. En medio neutro el efecto de la luz parece no afectar a la pérdida de sulfito.



Esquema 2.11. Reacción del ión bisulfito con el ácido sórbico

En medio ácido el ión bisulfito causa la degradación del ácido sórbico para formar varios productos de descomposición entre los que se encuentran la α -angélicalactona y el 2-metil-5-acetilfurano como productos minoritarios (Saxby et al., 1982). Los productos mayoritarios no se pudieron identificar mediante espectrometría de masas-cromatografía de gases. Sin embargo, la reacción es catalizada por la luz y puede, fácilmente, generar radicales libres como el radical hidroxilo o el anión superóxido, capaces de oxidar a compuestos orgánicos insaturados (Yang, 1984).

2.8. Reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico

2.8.1. Importancia biológica y mecanismo de reacción

El hecho de que el ácido sórbico coexista en diversos alimentos con el nitrito, presente de forma natural o añadido como conservante, hace que esta reacción tenga gran relevancia desde el punto de vista toxicológico puesto que se han identificado como productos de reacción compuestos mutágenos del tipo C-nitro y C-nitroso y sus posibles precursores (Kada, 1974; Namiki y Kada, 1975; Kito et al. 1978; Namiki et al., 1980, 1981; Osawa et al., 1979).

En la industria cárnica los sorbatos se manejan como inhibidores del crecimiento de mohos en alimentos (Binstok et al., 1998). Los nitritos se utilizan en el proceso de curado de carnes por su actividad antibotulínica y también por su efecto cromógeno.

La concentración de sorbato potásico que se puede utilizar en los productos cárnicos en presencia de 20-80 ppm de nitrito sódico, es de 2000-2600 ppm. De esta forma se reduce la concentración de nitrito sódico y como consecuencia de ello la formación de N-nitrosaminas cancerígenas. En estas condiciones se mantiene el color de la carne y se controla el crecimiento de *Clostridium botulinum* y la producción de toxinas (Sofos, 1989). Sin embargo, el uso de estas especies acarrea problemas toxicológicos, puesto que el ácido sórbico reacciona con nitrito para formar especies mutágenas.

Dada la estructura molecular del ácido sórbico, es de interés averiguar si es capaz de formar enlaces tipo C-nitro o C-nitroso, presentes en productos mutágenos identificados en la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito. Osawa y colaboradores (Osawa y Namiki, 1982) estudiaron la reacción entre el nitrito y compuestos análogos al ácido sórbico (Figura 2.6.) e identificaron las especies mutágenas resultantes de la reacción entre el éster metílico del ácido sórbico y el nitrito sódico.

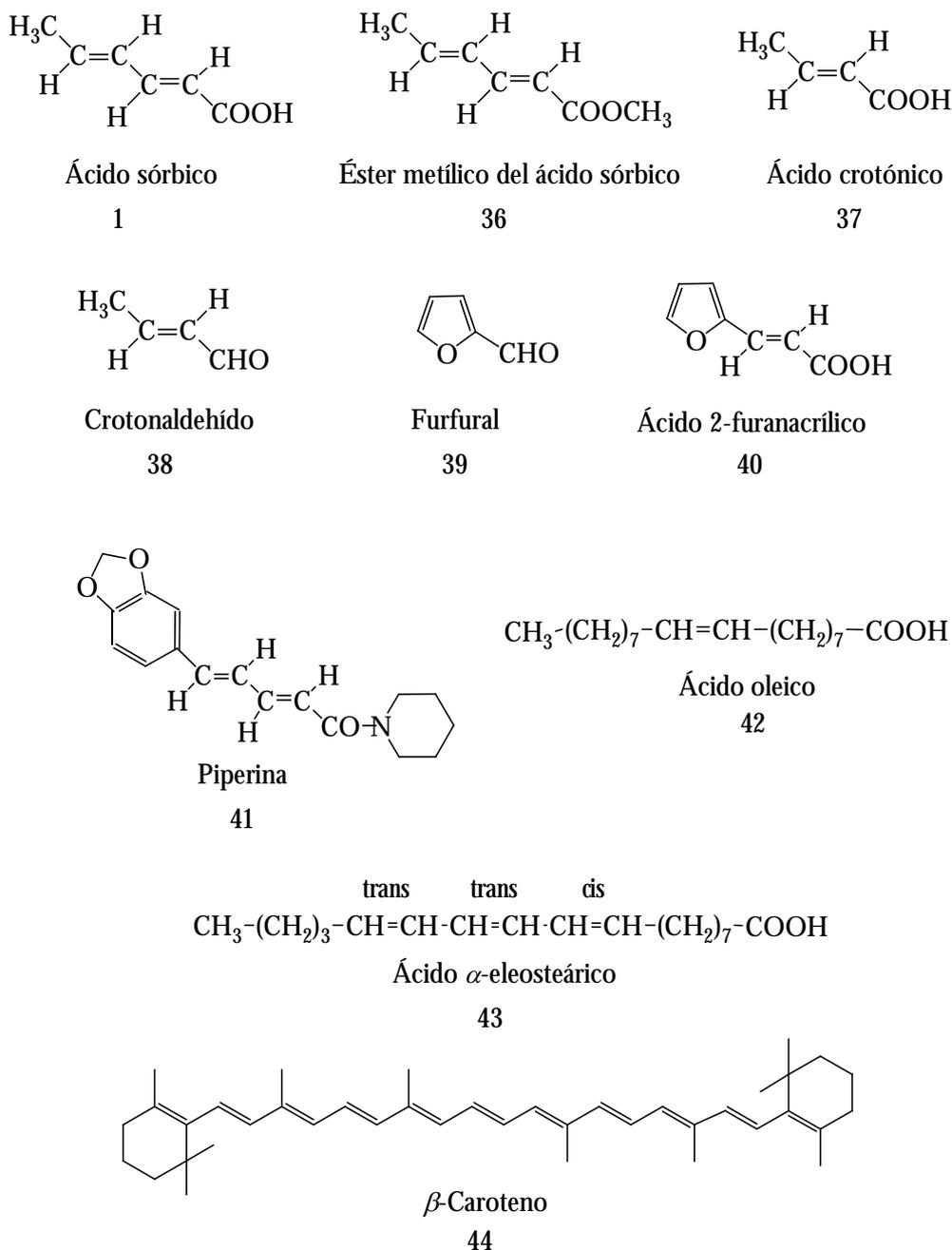
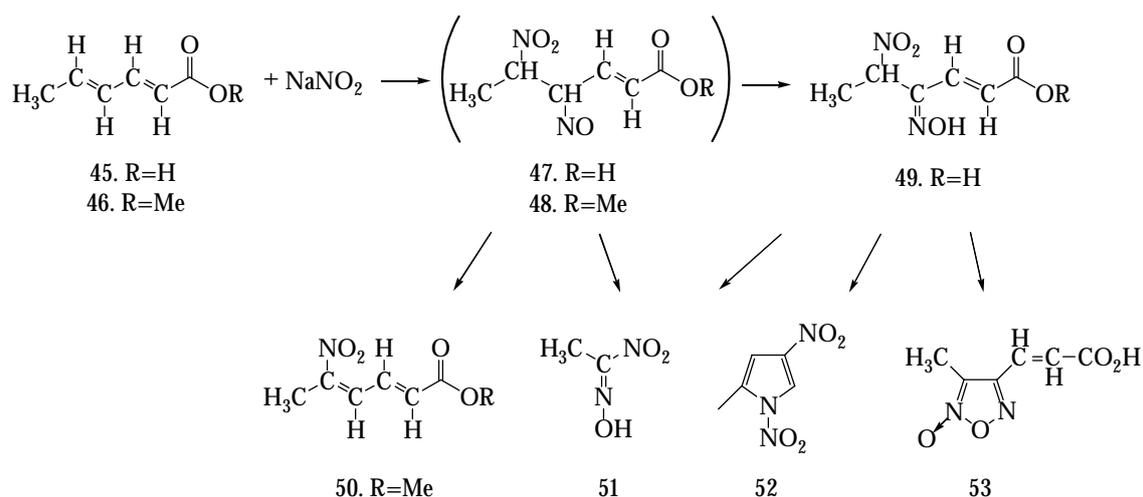


Figura 2.6. Estructuras de los compuestos análogos al ácido sórbico

Muchas de las especies estudiadas presentan un grupo carbonilo α,β -insaturado, excepto el ácido oleico que posee solamente un enlace doble en su estructura. El ácido eleosteárico, principal componente del aceite de tung o aceite de madera de China, y el β -caroteno poseen un sistema poliinsaturado. La formación de los productos resultantes de la reacción de estas especies con el nitrito sódico se ha estudiado mediante cromatografía de capa fina y su posible mutagenia mediante el ensayo Rec, utilizando *B. subtilis* (Osawa y Namiki, 1982).

El nitrito tratado con ácido crotonico, crotonaldehído, furfural y ácido oleico no da lugar a productos de reacción detectables por cromatografía en capa fina, ni muestran mutagenia. Sin embargo, la reacción entre el nitrito y el éster metílico del ácido sórbico o la piperina conduce a diversos productos de reacción, detectados por cromatografía en capa fina, que son fuertemente mutágenos. El ácido 2-furanacrílico, el β -caroteno y el aceite de tung reaccionan con el nitrito y forman cantidades significativas de productos débilmente mutágenos. Estos resultados muestran que el grupo carbonilo conjugado con el dieno presente en estos compuestos es esencial para la formación de productos mutágenos en la reacción con el nitrito (Osawa y Namiki, 1982).

Entre los productos de mayor actividad mutágena resultantes de la mezcla de nitrito sódico-ácido sórbico (Esquema 2.12.) (Namiki et al., 1980, 1981) se han identificado el ácido etilnitroso (51) (Namiki y Kada, 1975) y la especie 1,4-dinitro-2-metilpirrol (52) (Kito y Namiki, 1978).



Esquema 2.12. Mecanismo de reacción propuesto para el sistema nitrito sódico y ácido sórbico/éster metílico

Como muestra el Esquema 2.12., el ataque de los grupos NO y NO₂ sobre las posiciones γ y δ del grupo carbonilo conjugado con el dieno daría lugar a la formación de las especies intermedias 47 y 48. El mecanismo de reacción entre los productos intermedios y los finales es difícil de elucidar. La especie 49 se ha identificado como precursora de la 53 (Osawa et al., 1979) pero no se sabe aún si los compuestos 51 y 52 se generan via 49 o no. El producto 51 se produce también como resultado de la reacción entre el nitrito y el éster metílico del ácido sórbico, aunque la velocidad de reacción y el rendimiento son muy bajos comparados con los observados con el ácido libre (Osawa y Namiki, 1982).

2.8.2. Factores que afectan a la actividad mutágena y antimicrobiana de la mezcla de reacción nitrito sódico-ácido sórbico

Namiki y colaboradores (Namiki et al., 1981) estudiaron, mediante cromatografía en capa fina, el efecto de las condiciones de trabajo sobre el rendimiento de los productos de reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico. Los resultados obtenidos se reseñan a continuación.

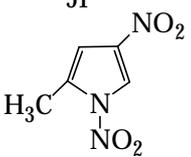
2.8.2.1. Influencia del pH de reacción

El efecto del pH (Namiki et al., 1980) se ha investigado cuantitativamente en el intervalo de pH 1,5-7,0. Los resultados muestran que, entre pH 3,0 y 5,0 se forma el producto 1,4-dinitro-2-metilpirrol (52) con un rendimiento máximo a pH 3,5, mientras que la formación del ácido etilnitroso (51) tiene lugar entre pH 3,5 y 5,0 observándose un rendimiento máximo en pH 4,2. En pH 1,5 estos productos se ven sustituidos por otros; uno de ellos, de estructura aún no elucidada, posee un grupo nitro y otro nitroso (54; Tabla 2.4.). Otro producto identificado es un derivado del furoxano (53). El resto de especies formadas son minoritarias y aún están sin identificar. En pH > 6 la reacción no tiene lugar (Namiki et al., 1981).

2.8.2.2. Condiciones de reacción

Namiki y colaboradores (Namiki et al., 1981) investigaron los productos de la mezcla de reacción en pH 3,5 a 4 °C . Entre los productos detectados se encuentran la especie 49 y dos compuestos más no identificados que presentan R_f 0,2 y 0,3 en la cromatografía de capa fina de la mezcla de reacción tomada dos minutos después de su comienzo. Las especies 51, 52 y 54 comienzan a aparecer al cabo de diez horas de reacción. Varios productos no identificados que se forman y desaparecen durante este tiempo pueden ser precursores de los productos finales. El producto 52 parece ser más estable. Estos resultados son acordes con resultados biológicos previos (Namiki et al., 1980). El rendimiento de los productos 51, 52 y 54, respecto al ácido sórbico es significativamente alto. En términos molares, al cabo de dos días (4 °C), la suma de los tres productos alcanza el 40-50 % del ácido sórbico empleado.

Tabla 2.4. Actividades biológicas de los productos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico.

Producto	Ensayo Rec con <i>B. subtilis</i>		Inhibición del crecimiento (límite inferior, ppm)	
	μg por disco	Zona de Inhibición (mm)		
		Rec ⁺	Rec ⁻	
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{NO}_2 \\ \parallel \\ \text{NOH} \end{array}$ 51	100	0	12,8	5
 52	40	0	12,4	5
$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_4\text{N}_2$ (-NO ₂ , -NO, -CHO) ^a	40	0,2	0,5	1
54	250	0,5	0,5	1
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{COOH} \\ \parallel \quad \parallel \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \text{N} \quad \text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ 53	40	0	0	Negativo
$\begin{array}{c} \text{NO}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{COOH} \\ \parallel \quad \text{H} \\ \text{NOH} \end{array}$ 49	40	0	0	Negativo
Ácido sórbico (100 mM)	40 μl	0	0	400
Nitrito sódico (800 mM, pH 6,5, 60 °C, 30 min)	20 μl	0	0	100
Nitrito sódico (160 mM, pH 3,5, 60 °C, 30 min)	20 μl	0	0	
Nitrito sódico (160 mM, pH 3,5, 4 °C, 30 min)	20 μl	0	0	
Nitrito sódico (160 mM, pH 1,5, 60 °C, 30 min)	20 μl	0	0	

^a Se identificaron estos grupos funcionales, sin embargo se desconoce la estructura

2.8.2.3. Efecto de la relación molar de los reactivos

Cuando la relación molar nitrito-ácido sórbico (20 mM) aumenta de 0,5 a 16, se observa un rendimiento máximo del producto 52 después de 30 minutos a 60 °C y pH 3,5 cuando la concentración de nitrito sódico es ocho veces superior a la del ácido sórbico. Para un exceso de nitrito superior a ocho se produce un descenso en el rendimiento del producto 52, mientras que, en el caso de la especie 51, aumenta al hacerlo la concentración

de nitrito. Estos resultados son acordes con estudios biológicos previos que revelan que la mutagenia e inhibición del crecimiento aumentan al hacerlo la concentración de nitrito, hasta alcanzar un exceso frente al ácido sórbico de ocho unidades (Namiki et al., 1980). Estas concentraciones no se alcanzan, de forma habitual, en los alimentos. Los productos mutágenos se forman por encima de los niveles de detección con una relación molar 1,0:0,5. Este hecho es interesante, puesto que la formación de estos productos mutágenos requiere una relación molar de los reactivos 1:4 (nitrito sódico: ácido sórbico).

2.8.2.4. Estabilidad de los productos de reacción

Namiki y colaboradores (Namiki et al., 1981) estudiaron la estabilidad de los productos activos 51 y 52 en disoluciones reguladoras a pH 3,0 (citrate) o pH 6,0 (fosfato) a 30, 60 y 100 °C. La investigación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados mostraron que los dos productos son lábiles a alta temperatura y valores bajos de pH.

En condiciones similares, algunos alimentos como el beicon cocinado a 170 °C en presencia de aceite han mostrado una disminución del 37 % en las concentraciones de las especies 51 y 52, al cabo de tres minutos.

2.8.2.5. Influencia del ácido ascórbico y de la cisteína

El ácido ascórbico inhibe la formación de N-nitrosaminas (Mirvish, 1975) debido a la mayor velocidad de la reacción entre el nitrito y ácido ascórbico que entre nitrito y el grupo amino secundario.

Namiki y colaboradores (Namiki et al., 1981) investigaron si el ácido ascórbico o la cisteína muestran capacidad inhibidora similar en la formación de C-nitro compuestos mutágenos. Los resultados obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución para los productos 51 y 52 de la reacción entre el ácido sórbico (20 mM) y nitrito sódico (160 mM) con y sin adición de ácido ascórbico a 60 °C y pH 3,5, revelan que, al cabo de 30 minutos, la adición de ácido ascórbico (80 mM) bloquea la formación de estos productos. En condiciones de reacción más realistas (ácido sórbico 20 mM y nitrito sódico 20 mM) el ácido ascórbico, con la mínima concentración, inhibe la formación de los productos, obteniéndose 51 (10 mM) y 52 (5 mM). En el caso de la cisteína, se requieren concentraciones equivalentes (cisteína 160 mM), para conseguir inhibición completa de la formación de los productos 51 y 52.

De esos resultados se desprende que la inhibición de la formación de mutágenos puede deberse a la alta velocidad de reacción entre nitrito y ácido ascórbico/cisteína o a la reacción de estas especies con el ácido sórbico, puesto que la actividad mutágena de la especie 52 se reduce en presencia de ácido ascórbico o cisteína a temperatura ambiente y pH = 6,8, siendo débil con pH = 3,5 (Osawa et al., 1980).

2.8.3. Mutagenia de los productos de reacción

La Tabla 2.4. (véase Apartado 2.8.2.2.) muestra la actividad biológica de los productos de reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico (Namiki et al., 1980) así como las observadas para los reactivos de partida.

La especie 52 es el producto con mayor actividad mutágena e inhibidora del crecimiento, presenta una alta actividad en el ensayo Rec y los resultados obtenidos con el test de Ames con cepas TA98 y TA100, sin activación metabólica, revelan, también, actividades mutágenas elevadas. El producto 51, que es mutágeno pero en menor extensión que el 52, es altamente activo en el ensayo Rec; sin embargo, se ha observado una débil actividad con TA100 no detectada con TA98 en el test de Ames. Las especies 51 y 52 inhiben de forma efectiva el crecimiento de bacterias. El producto 54 no es mutágeno, pero posee alta capacidad como inhibidor, mientras que los productos 49 y 53 no son activos ni como mutágenos ni como inhibidores. El ácido sórbico y el nitrito sódico en las concentraciones indicadas no son mutágenos según el ensayo Rec. Sin embargo, es conocida la mutagenia del nitrito sódico en otros sistemas mutágenos (Hollaender, 1971; McCann et al., 1975). Puede concluirse que la actividad mutágena de la mezcla de reacción es máxima en el intervalo de pH comprendido entre 3,5 y 4,2, debido a la formación del producto 52 y, en menor extensión, del 51. A valores de pH inferiores se intensifica la inhibición, debida fundamentalmente a la especie 54 (Namiki et al., 1980, 1981).

A la vista de los resultados obtenidos, es interesante destacar que la formación de productos mutágenos del tipo C-nitro y C-nitroso, resultantes de la interacción entre nitrito sódico y ácido sórbico o análogos, puede tener lugar en diversos alimentos así como in vivo en el cuerpo humano (Osawa y Namiki, 1982).

2.8.4. Estudio de la reactividad de los productos mayoritarios de la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico

2.8.4.1. Reactividad de pirroles: estudio de 1,4-dinitro-2-metilpirrol (NMP)

Kito y Namiki (Kito y Namiki, 1978) aislaron uno de los productos resultantes de la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico, la especie 1,4-dinitro-2-metilpirrol o NMP (52) y elucidaron su estructura (Figura 2.7.) basándose en diferentes estudios espectroscópicos.

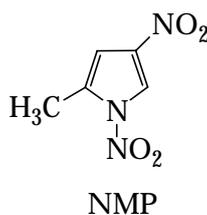
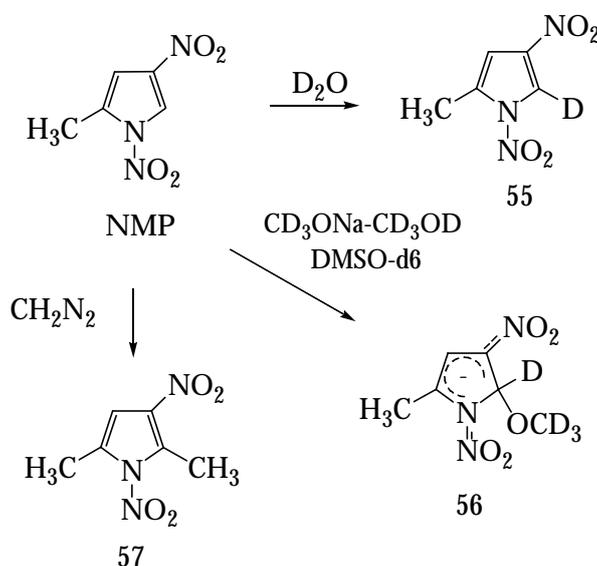


Figura 2.7. Estructura de 1,4-dinitro-2-metilpirrol

El compuesto 1,4-dinitro-2-metilpirrol reacciona con diferentes especies como refleja el Esquema 2.13 (Kito y Namiki, 1978).



Esquema 2.13. Reacción de 1,4-dinitro-2-metilpirrol con agua deuterada, metóxido sódico y diazometano deuterados

El tratamiento con diazometano da lugar al compuesto metilado (57). La señal de RMN de ^1H correspondiente al protón en posición α no experimenta ningún cambio en CDCl_3 o DMSO-d_6 al añadir agua deuterada. Sin embargo, desaparece

completamente al disolver el compuesto en piridina-d₆ durante dos días en hielo después de la adición de agua deuterada. Además, cuando se disuelve en agua deuterada por calentamiento, la señal que aparece a 9,36 (H_α) como doblete, desaparece al cabo de dos horas, mientras que la señal en 8,36 (H_β) es una mezcla de singulete y doblete que aparece como singulete. No se ha observado ningún cambio en el espectro en agua deuterada acidulada con cloruro de hidrógeno deuterado. Los nitropirroles sufren, fácilmente, un intercambio del hidrógeno en posición α mediante catálisis básica (De Santis y Stegel, 1974). En el caso de 1,4-dinitro-2-metilpirrol, dada la reactividad del protón en posición α , no es necesaria la presencia de una base que actúe como catalizador para que tenga lugar el intercambio del protón. Este hecho explica la facilidad con la que se produce la metilación en posición α al tratar dicha especie con diazometano (Kito y Namiki, 1978).

La adición de una cantidad equivalente de metóxido sódico en metanol sobre una disolución de 1,4-dinitro-2-metilpirrol en DMSO-d₆ da lugar a una coloración marrón de la mezcla con el consecuente cambio en el espectro de ¹H-RMN. Inmediatamente después de la adición, todas las señales del espectro correspondientes a los protones desaparecen. Se observan dos singuletes a 2,00 y 6,93 ppm (3H, 1H) que se podrían asignar a un aducto de tipo Meisenheimer (56) (De Santis y Stegel, 1974) junto a otras señales no identificadas que posiblemente se pueden atribuir a productos de descomposición. El aducto es inestable, se descompone al cabo del tiempo y el espectro se ve modificado al desaparecer los dos singuletes. No se observa reacción de intercambio del hidrógeno puesto que, posiblemente, queda enmascarada por la formación del aducto tipo Meisenheimer (Kito y Namiki, 1978).

La formación de aductos tipo Meisenheimer a partir de derivados del tiofeno (Doddi et al., 1972; Paulmier et al., 1973; Spinelli et al., 1970), selenófeno (Paulmier et al., 1973) o furano (Doddi et al., 1974) que poseen sustituyentes aceptores de electrones en la reacción con el ión metóxido está favorecida y se ha estudiado con diferentes sustratos. Para poder comparar el comportamiento de los diferentes derivados pirrólicos frente al ión metóxido en función de la naturaleza de los sustituyentes se ha llevado a cabo el estudio con las especies 2,4-dinitro-1-(p-nitrofenil)-pirrol (58) y 2,4-dinitro-1-metilpirrol (59) cuyas estructuras se muestran en la Figura 2.8. (De Santis y Stegel, 1974).

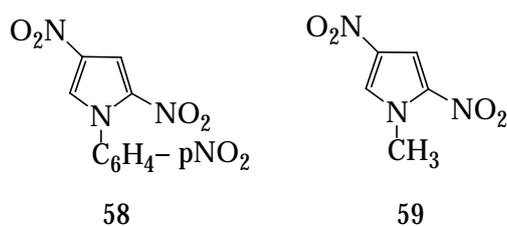


Figura 2.8. Estructuras de 2,4-dinitro-1-(p-nitrofenil)-pirrol (58) y 2,4-dinitro-1-metilpirrol (59)

El estudio mediante resonancia magnética nuclear, de la reacción entre las especies 58 y 59 con el ión metóxido revela importantes diferencias en el comportamiento de ambos sustratos y más concretamente, indica la formación de un aducto tipo Meisenheimer para el primero de los compuestos.

El espectro de RMN de la especie 58 en DMSO- d_6 muestra los dobletes asignados a los protones del anillo pirrónico a 1,34 (H_α) y 1,93 ppm (H_β) y los dos dobletes correspondientes al anillo fenólico a 1,58 y 2,07 ppm. La adición de una cantidad equivalente de metóxido sódico en metanol 4,5 M, a una solución 0,5 M de la especie 58 en DMSO- d_6 produce cambios en el espectro de RMN. Aparecen dos singuletes de la misma intensidad a 2,27 y 4,05 ppm mientras que la intensidad de las señales correspondientes al anillo pirrónico disminuye. De la misma manera, los dos dobletes del anillo fenólico se han desplazado a 1,87 y 3,13 ppm, respectivamente, manteniendo el acoplamiento inicial. La aparición de una señal a 4,05 ppm y la reducción del acoplamiento entre los protones del anillo pirrónico indica un cambio en la hibridación del átomo de carbono enlazado al hidrógeno de sp^2 a sp^3 . Estos cambios se pueden explicar en términos de formación de un aducto tipo Meisenheimer. Los resultados obtenidos por RMN sugieren que la estructura 60 podía corresponder al aducto de Meisenheimer formado entre la especie 58 y el ión metóxido (Figura 2.9.).

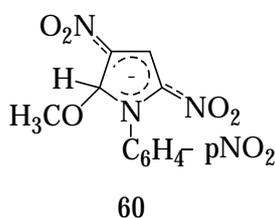


Figura 2.9. Aducto de Meisenheimer formado en la reacción entre 2,4-dinitro-1-(p-nitrofenil)-pirrol y el ión metóxido

El comportamiento de la especie 58 frente al ión metóxido difiere del observado para el compuesto 59 que, en DMSO, sufre una reacción irreversible que

implica la desaparición completa de las señales del espectro de RMN en la región aromática. En condiciones de reacción más moderadas utilizando como disolvente el metanol, la especie 59 sufre un intercambio del hidrógeno en posición α , catalizado en medio básico. El espectro de RMN del compuesto 59 en metanol no se ve modificado por la presencia del ión metóxido. Sin embargo, cuando la reacción ocurre en metanol deuterado, el doblete a 1,86 ppm (H_α) desaparece inmediatamente y el doblete a 2,23 ppm (H_β) pasa a ser un singulete. La señal correspondiente al grupo N-CH₃ a 5,87 ppm no se ve modificada. La facilidad con la que se forma el 2,4-dinitro-1-metil-5-deuteropirrol posiblemente requiera la formación de un ión intermedio (Buncel y Symons, 1966). Las reacciones de intercambio de hidrógeno favorecidas en medio básico en sustratos heteroaromáticos de cinco miembros no activados no ocurren fácilmente. No obstante, la constante de velocidad (Zatsepina et al., 1969) para el intercambio selectivo del hidrógeno en posición α en la especie 1-metilpirrol, a 140 °C en C₂H₅OD, en presencia de C₂H₅O⁻ 0,57 M, es $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. En presencia de grupos aceptores de electrones, la velocidad de intercambio aumenta, pero la reacción puede quedar enmascarada por la formación de aductos tipo Meisenheimer (Doddi et al., 1974; Simonin et al., 1973; Doddi et al., 1973). Por lo tanto, la reacción de la especie 59 es un ejemplo inusual de reacción de intercambio rápida y clara en un compuesto heteroaromático polinitrado (De Santis y Stegel, 1974).

El comportamiento de las especies 58 y 59 frente al ión metóxido está relacionado con el efecto electrónico de los sustituyentes en posición 1. La diferente electronegatividad de los mismos en dicha posición puede afectar a la densidad electrónica π y, como consecuencia de ello, a la reactividad del anillo pirrólico (Jones et al., 1967). De hecho, el grupo p-nitrofenilo de la especie 58 podría tener un papel importante junto con los grupos nitro del anillo pirrólico, en la disminución de la alta densidad electrónica π del anillo favoreciendo el ataque de agentes nucleófilos.

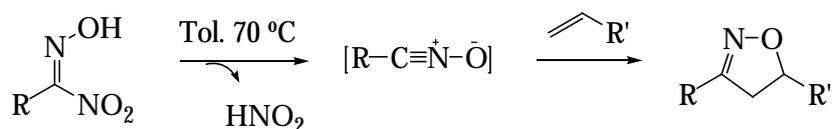
2.8.4.2. Reacción de los ácidos nítricos para formar óxidos de nitrilo.

Reactividad del ácido etilnítrico (ENA)

Los óxidos de nitrilo fueron identificados por Werner en el año 1894 (Werner and Buss, 1894) y debido a su versatilidad, actualmente se utilizan como materiales de partida, en síntesis orgánica. Los ácidos nítricos se preparan, con buenos rendimientos, a partir de nitroalcanos primarios o bromuros de alquilo primarios (Meyer, 1873). Son compuestos altamente inestables, difíciles de manejar y propensos a la descomposición, por calentamiento, para formar los correspondientes óxidos de nitrilo (Wieland y Semper,

1906). Por estas razones y quizá debido a la carencia de un método de síntesis, no se ha considerado la fragmentación termolítica de los ácidos nítricos como vía para la generación de óxidos de nitrilo.

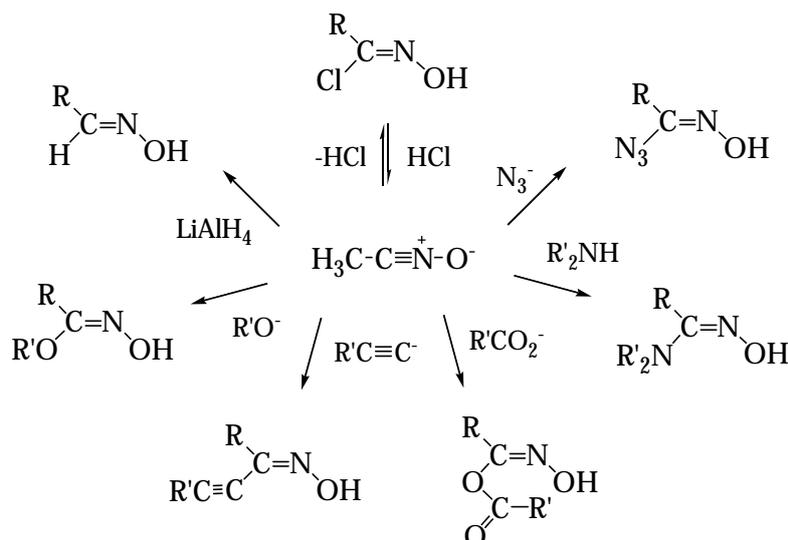
Estas especies sufren rápidamente cicloadiciones 1,3-dipolares con diferentes tipos de sustratos insaturados para formar productos heterocíclicos pentagonales (Nguyen et al., 1991). Matt y colaboradores (Matt et al., 2000) estudiaron el uso de los ácidos nítricos como precursores de óxidos de nitrilo para las cicloadiciones 1,3-dipolares (Esquema 2.14.)



Esquema 2.14. Ácidos nítricos como precursores de óxidos de nitrilo que dan lugar a cicloadiciones 1,3-dipolares

La conversión de los ácidos nítricos a los óxidos de nitrilo correspondientes se lleva a cabo por calentamiento. La cicloadición para generar el correspondiente isoxazol, tiene lugar al calentar la disolución del ácido nítrico en THF en presencia de un dipolarófilo. Por tanto, la formación termolítica de óxidos de nitrilo a partir de ácidos nítricos parece ser una reacción eficiente, especialmente en el caso de los ácidos nítricos con un sustituyente alquilo donde no se requiera la presencia de agentes oxidantes o deshidratantes fuertes -como en los métodos clásicos para la obtención de óxidos de nitrilo- y se pueda llevar a cabo en condiciones neutras. Sin embargo, la inestabilidad de los ácidos alcóxicarbonil y arilnítricos durante la etapa de purificación implica utilizar directamente la mezcla del ácido nítrico con su precursor, el bromo o nitro compuesto, para que se produzca la cicloadición.

Los óxidos de nitrilo reaccionan con diferentes nucleófilos en el carbono adyacente al nitrógeno como se muestra en el Esquema 2.15.

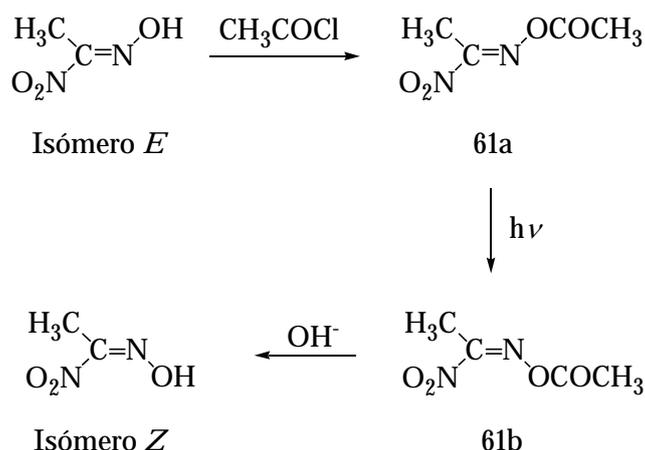


Esquema 2.15. Reactividad de los óxidos de nitrilo con diferentes nucleófilos

Digman y colaboradores (Digman et al., 1978) estudiaron la estereoquímica de estas reacciones y observaron que todas ellas eran estereoespecíficas. Se forma únicamente la oxima Z siempre que este aducto sea termodinámicamente menos estable que el correspondiente isómero E. Como queda reflejado en el Esquema 2.15., el nucleófilo y el par de electrones no enlazante del nitrógeno se disponen en conformación trans en relación con el doble enlace C=N, forzando que el grupo hidroxilo quede en conformación cis con el resto del nucleófilo.

En el caso concreto del ácido acetonitrílico o ácido etilnitrílico (ENA), Egan y colaboradores (Egan et al., 1991) sintetizaron los dos isómeros y estudiaron su conversión al correspondiente óxido de nitrilo. Aunque no se habían obtenido previamente, los isómeros geométricos de los ácidos acetonitrílicos, se identificaron dos tipos de sales, unas de color rojo y otras incoloras. Las sales rojas se transformaban en sales incoloras por calentamiento o exposición a la luz. Aunque solamente las sales rojas regeneran el ácido etilnitrílico inicial por acidificación, ambas dan lugar a los mismos productos de hidrólisis.

El isómero E del ácido acetonitrílico se sintetiza a partir de la reacción entre nitroetano y nitrito sódico en hidróxido sódico al 20%. Al reemplazar el grupo hidroxilo por un grupo acetilo que es un grupo protector que impide la isomerización a la oxima inicial se favorece la fotoisomerización y posterior separación de la mezcla isomérica (Esquema 2.16.).



Esquema 2.16. Isómeros E y Z del ácido acetónitrílico

El derivado acetilado (61a) del isómero E del ácido etilnitrílico se fotoisomeriza mediante fotólisis UV para generar, con un 100% de conversión, el isómero 61b. Este porcentaje de conversión es inusualmente elevado, normalmente se observan para otros derivados de oximas, mezclas E/Z en una proporción que varía de 1:1 a 3:1. Finalmente, la eliminación del grupo protector en medio básico dará lugar al isómero Z. De esta manera finaliza la ruta entre los isómeros E y Z del ácido etilnitrílico.

Los ésteres 61a y 61b sufren hidrólisis con velocidades de reacción similares. Solamente a partir del isómero 61a se observa el ácido etilnitrílico (Isómero E) puesto que, en el caso del isómero 61b, la hidrólisis del ácido etilnitrílico (Isómero Z) es muy rápida a valores altos de pH.

Adams, J. B.; Langley, F. M. Interacción between additives in food systems Campden y Chorleywood Food Research Association, R y D Report 20, 1995.

Adams, J. B. Food Chem. 1997, 59, 401.

Allen, R. R.; Kummerow, F. A. J. Am. Oil Chem. Soc. 1951, 28, 101.

Andersen, F. A. Int. J. Toxicol. 2008, 27, 77.

d'Aquino M.; Santini, P. Archivos latino-americanos de nutrición 1977, 27, 411.

Arya, S. S. J. Agric. Food Chem. 1980, 28, 1246.

Arya, S. S.; Thakur, B. R. Food Chem. 1988, 29, 41.

Arya, S. S.; Thakur, B. R. Proteins in Life and Environment Srinivasan, A. y Abraham, E. C., Universidad de Madrás, India, 1991.

Baldock, J. D.; Frank, P. R.; Graham, P. P.; Ivey, F. J. J. Food Prot. 1979, 42, 780.

Banerjee, T. S.; Giri, A. K. Toxicology Letters 1986, 31, 101.

Binstok, G.; Campos, C.; Varela, O.; Gerschenson, L. N. Food Res. Int. 1998, 31, 581.

Bolin, H. R.; King Jr., A.D.; Stafford, A. E. J. Food Sci. 1980, 45, 1434.

Boyd, J. W.; Tarr, H. L. A. Food Technol. 1955, 9, 411.

Buncel, E.; Symons, E. A. Can. J. Chem. 1966, 44, 771.

- Chu, K. C.; Patel, K. M.; Lin, A. H.; Tarone, R. E.; Linhart, M. S.; Dunkel, V. C. *Mut. Res.* 1981, 85, 119.
- Czukur, B. *Konzerv-paparikaip.* 1976, 4, 154; *Chem. Abstr.* 1977, 87, 166233.
- Dacosta, Y. *L'acide sorbique et les sorbates* CDIUPA, Massy, France, 1994.
- Damant, A.; Reynolds, S.; Macrae, R. *Food Addit. Contam.* 1989, 6, 273.
- Davies, C. G. A.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1992, 9, 471.
- Davis, R. E. *Mechanisms of sulphur reactions.* In *Inorganic Sulphur Chemistry* ed. G. Nickless, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1968.
- De Santis, F.; Stegel, F. *Tetrahedron Letters* 1974, 1079.
- Dignam, K. J.; Hegarty, A. F.; Quain, P. L. *J. Org. Chem.* 1978, 43, 388; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1977, 1457.
- Doddi, G.; Illuminati, G.; Stegel, F. *Chem. Comm.* 1972, 1143.
- Doddi, G.; Illuminati, G.; Stegel, F. *Tetrahedron Letters* 1973, 3221.
- Doddi, G.; Poretti, A.; Stegel, F. *J. Heterocycl. Chem.* 1974, 11, 97.
- Doesburg, J. J.; Lamprecht, E. C.; Elliot, M. C.; Reid, D. A. *J. Food Technol.* 1969, 4, 339.
- Dulog, L.; Tsobanidis, K. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 1981, 2, 407; *Chem. Abstr.* 1981, 95, 133396.
- Egan, E.; Clery, M.; Hegarty, A. F.; Welch, A. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1991, 249.
- Erickson, L. E. *J. Food Prot.* 1982, 45, 484.
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. *FDA List of Food Additives that are Generally Recognized as Safe (GRAS)*; U.S. GPO: Washington, DC, 2005.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 487.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *J. Agric. Food Chem.* 2000a, 48, 3605.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Amino Acids* 2000b, 18, 251.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Toxicology in vitro* 2000c, 14, 423.
- Gaunt, I. F.; Butterworth, K. R.; Hardy, J.; Gangolli, S.D.; *Food and Cosmetics Toxicology* 1975, 13, 31.
- Gerschenson, L. N.; Alzamora, S.; Chirife, J. *J. Food Sci.* 1986, 51, 1028.
- Goddard, S. J.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1992, 9, 485.
- Guerrero, S.; Alzamora, S. M.; Gerschenson, L. N. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1990, 23, 271.
- Hasegawa, M. M.; Nishi, Y.; Ohakawa, Y.; Inui, N. *Fd. Chem. Toxic.* 1984, 22, 501.
- Hayatsu, H. *Mut. Res.* 1975, 30, 417.
- Heintze, K. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1971, 4, 64.
- Heintze, K. *Ind. Obst-Gemueseverwert.* 1973, 58, 187; *Chem. Abstr.* 1973, 79, 41049x.
- Heintze, K. *Ind. Obst-Gem.* 1976, 61, 555; *Food Sci. Technol. Abstr.* 1977, 9, 6H1042.
- Hendy, R. J.; Hardy, J.; Gaunt, I. F.; Kiss, I. S.; Butterworth, K.R. *Food and Cosmetics Toxicology* 1976, 14, 381.
- Hollaender, A. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection* Plenum, Vol 1, Nueva York, 1971.
- Ishidate, M.; Jr, Sofuni, T.; Yoshikawa, K.; Hayashi, M.; Nohmi, T.; Sawada, M.; Matsuoka, A. *Fd. Chem. Toxic.* 1984, 22, 623.
- Jones, R. A.; Spotswood, T. M.; Cheuychit, P. *Tetrahedron* 1967, 23, 4469.
- Jung, R.; Cojocel, C.; Müller, W.; Böttger, D.; Lück, E. *Fd. Chem. Toxic.* 1992, 30, 1.
- Kada, T. *Annu. Rep. Natl. Inst. Genet.* 1974, 24, 43.
- Kagami, M. *Fukushima Daigaku Kvoikugakubu Rika Hokoku* 1967, 17, 68; *Chem. Abstr.* 1969, 70, 31647.
- Kawachi, T.; Komatsu, T.; Kada, T.; Ishidate, M.; Sasaki, M.; Sugiyama, T.; Tazima, Y. *Applied Methods in Oncology* 1980, 3, 253.
- Khandelwal, G. D.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1990a, 7, 685.
- Khandelwal, G. D.; Wedzicha, B. L. *Food Chem.* 1990b, 37, 159.
- Kheddis, B.; Bahibah, D.; Hamdi, M.; Périe, J. *J. Bulletin de la Société Chimique de France* 1981, 34(II), 135.
- Khoudokormoff, B. *Mut. Res.* 1978, 53, 208.
- Kito, Y.; Namiki, M. *Tetrahedron* 1978, 34, 505.

- Kroyer, G. *Ernährung/Nutrition* 1986, 10, 557.
- Lafont, P.; Lafont, J. *Med. Nutr.* 1979, 15, 195.
- LBI Litton Biónetics Incorporated Mutagenic evaluation of compared FDA 74-4, potassium sorbate, prepared for Food and Drug Administration US Dept of Commerce, National Technical Information Service, Nov. 1974, PB 245434.
- Leraux, E.; Vautier, E. Etude par spectroscopie et moments dipolaires de diènes conjugués du type $\text{CH}_3\text{-HC=CH-CH=CH-Y}$ C. R. Académies des sciences de Paris, 1333-1336, 1970.
- Li, Z.; Alli, I.; Kermasha, S. *J. Food Sci.* 1989, 54, 674.
- Lück, E. *Int. Flavours Food Additiv.* 1976, 7, 122.
- Lück, E. *Antimicrobial Food Additives* (Springer-Verlag, Nueva York, 1980).
- Maekawa, T.; Tsujisawa, H.; Yokoyama, T. *Ann. Rept. Wakayama Prefect. Res. Cent. Environ. Pub. Health* 1984, 30, 75; *Food Sci. Technol. Abstr.* 1984, 18, 10S105.
- Matt, C.; Gissot, A.; Wagner, A.; Miokowski, C. *Tetrahedron Letters* 2000, 41, 1191.
- McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975, 72, 5135.
- McCarthy, J. J.; Eagles, P. F. K. *Toiletries* 1976, 91, 33.
- Melnick, D.; Luckman, F. H.; Gooding, C. M. *Food Res.* 1953, 19, 33.
- Meyer, V. *Ber.* 1873, 6, 1492.
- Mirvish, S. S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975, 31, 325.
- Morita, K.; Ishigaki, M.; Abe, T. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Japan* 1981, 15, 243.
- Mukherjee, A.; Giri, A. K.; Talukder G.; Sharma, A. *Toxicology Letters* 1988, 42, 47.
- Münzner, R. C.; Tilch, H. W.; Renner, H. W. *Fd. Chem. Toxic.* 1990, 28, 397.
- National Academy of Sciences, National Academy Press, Washington, DC, 1981.
- Namiki, M.; Kada, T. *Ag. Biol. Chem.* 1975, 39, 1335.
- Namiki, M.; Udaka, S.; Osawa, T.; Tsuji, K.; Kada, T. *Mut. Res.* 1980, 73, 21.
- Namiki, M.; Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, K.; Tsuji, K. *J. Agric. Food Chem.* 1981, 29, 407.
- Nguyen, M. T.; Malone, S.; Hegarty, F.; Williams, I. I. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 3683.
- Osawa, T.; Kito, Y.; Namiki, M.; Tsuji, K. *Tetrahedron Lett.* 1979, 4399.
- Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, M.; Kada, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 95, 835.
- Osawa, T.; Namiki, M. *Ag. Biol. Chem.* 1982, 46, 2299.
- Paulmier, C.; Simonnin, M. P.; Chatrousse, A. P.; Terrier, F. *Tetrahedron Letters* 1973, 1123.
- Pekkarinen, L.; Rissanen, P. *Suomen Kemistilehti B* 1966, 39, 50; *Chem. Abstr.* 1966, 65, 7016.
- Pekkarinen, L.; Porkka, E. *Suomen Kemistilehti B* 1967, 40, 54; *Chem. Abstr.* 1967, 67, 26385.
- Pekkarinen, L. *Lebensm. Z. Unters. Forsch.* 1968, 23, 139.
- Pekkarinen, L. *Suom. Kemistilehti B* 1969, 42, 147; *Chem. Abstr.* 1969, 71, 12288.
- Reger, D. L.; Habib, M. M. *J. Phys. Chem.* 1980, 84, 177.
- Robach, M. C.; Meydav, S.; To, E. C.; Cook, C. F. *J. Food Sci.* 1980a, 45, 638.
- Robach, M. C.; Owens, J. L.; Paquette, M. W.; Sofos, J. N.; Busta, F. F. *J. Food Sci.* 1980b, 45, 1280.
- Robach, M. C.; Sofos, J. N. *J. Food Prot.* 1982, 45, 374.
- Saxby, M. J.; Stephens, M. A.; Reid, R. G. *Food Chem.* 1982, 9, 283.
- Seow, C. C.; Cheah, P. B. *Food Chem.* 1985, 18, 71.
- Simonin, M.P.; Terrier, F.; Paulmier, C. *Tetrahedron Letters* 1973, 2803.
- Sofos, J. N.; Busta, F. F. *J. Food Prot.* 1981, 44, 614.
- Sofos, J. N. *Sorbate Food Preservatives* CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- Spinelli, D.; Armanino, V.; Corrao, A. *J. Heterocyclic Chem.* 1970, 7, 1441.
- Sykes, P. *A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry* (2^a ed. Longmans, Londres, 149-155, 1965).
- Thakur, B. R.; Arya, S. S. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1991, 26, 157.
- Thakur, B. R.; Semwal, A. D.; Arya, S. S. *Indian Food Packer* 1992, 46, 53.
- Thakur, B. R.; Singh, K.; Arya, S. S. *Food Rev. Int.* 1994, 10, 71.
- Tompkin, R. B.; Christiansen, L. N.; Shaparis, A.B.; Bolin, H. *Appl. Microbiol.* 1974, 28, 262.
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA List of Food Additives that are Generally Recognized as Safe (GRAS); U.S. GPO: Washington, DC, 2005.
- Verbiscar, A. J. Campbell, K. N. *J. Org. Chem.* 1964, 29, 2472.
- Vidyasagar, K.; Arya, S. S. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 1262.
- Vidyasagar, K.; Arya, S. S. *J. Food Technol.* 1984, 19, 447.
- Wedzicha, B. L.; Rumbelow, S. J. *J. Sci. Food Sci. Agric.* 1981, 32, 699.
- Wedzicha, B. L. *Chemistry of Sulphur Dioxide in Food* Elsevier Applied Science, Londres, 1984.

Wedzicha, B. L.; Brook, M.A. Food Chem. 1989, 31, 29.

Wedzicha, B. L.; Zeb, A. Int. J. Food Sci. Technol. 1990, 25, 230.

Werner, A.; Buss, H. Chem. Ber. 1894, 27, 2193.

Wieland, H.; Semper, L. Ber. 1906, 39, 2522.

Yang, S.F. Food Chem. 1984, 15, 113.

Zatsepina, N. N.; Kaminsky, Yu. L.; Tupitsyn, I. F. Reakts. Sposobnost Org. Soedin., Tartu Gos. Univ. 1969, 3, 753.

CAPÍTULO 3

Parte experimental

«The most versatile reagent for the determination of alkylating agents has been 4-(4-nitrobenzyl) pyridine. With this reagent a procedure has been described for the determination of ethyleneimines, α -halogenated esters, diethyl sulphate, alkyl iodides, bromides, and chlorides; of various phosphorus, silicon, and nitrogen chlorides; and of nitrogen and sulfur mustard gases»

J. Epstein, R. W. Rosenthal, R. Ess, 1955

3. Parte experimental

3.1. Reacción de alquilación de NBP por el ácido sórbico y sus sales

3.1.1. Capacidad alquilante de los sorbatos. Test de NBP

Para poder determinar la capacidad alquilante del ácido sórbico (HS) y sus sales se ha empleado una ‘molécula trampa’ de agentes alquilantes, la 4-(*p*-nitrobencil) piridina (NBP) (Figura 3.1.) cuya nucleofilia es análoga a la de las bases del ADN (Kim y Thomas, 1992; Shephard y Lutz, 1989).

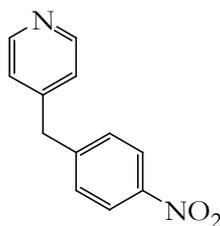


Figura 3.1. Estructura de la NBP

El empleo de la NBP como molécula modelo para la identificación de agentes alquilantes se remonta a principios del siglo veinte. Koenigs y colaboradores (Koenigs *et al.*, 1925) observaron que, tanto la γ -(4-nitrobencil)piridina (NBP) como las especies 2- y 4-bencilpiridina, reaccionan con ioduro de metilo formando una sal que, en presencia de hidróxido potásico, da lugar a una coloración azul. La aplicación de esta reacción fue clave para la detección del gas mostaza por Brown en 1941. Del mismo modo Gehauf (Gehauf, 1943) y Braun (Braun, *et al.*, 1945) detectaron gran número de compuestos orgánicos alquilantes. Los vapores de los haluros de alquilo se adsorbían en sílica gel impregnada con NBP y la adición de una base daba lugar a la aparición de color que variaba desde el azul al violeta e incluso marrón. De los compuestos identificados destacan, sulfato de dietilo, tiocianato de butilo, cloruro de sulfonilbenceno, difenilcloroarsina y dietilfosforofluoridato.

Todos los estudios de detección de especies alquilantes realizados hasta entonces eran cualitativos. Swift y colaboradores (Swift *et al.*, 1943) ampliaron el estudio de Gehauf y Braun. Agruparon las moléculas orgánicas en función de la reactividad. Observaron que los compuestos que contienen los grupos $-\text{COX}$, $-\text{CH}_2\text{X}$ y $-\text{OCH}_2\text{X}$, tienen una reactividad similar. Al comparar la intensidad de color que presentan las especies con estos grupos funcionales se puede establecer la siguiente secuencia de actividad alquilante: $\text{RCH}_2\text{CH}_2\text{X} > \text{RCH}_2\text{CHX}_2 > \text{RCH}_2\text{CX}_3$, $\text{ArCH}_2\text{X} > \text{ArX}$, $\text{ROCH}_2\text{X} > \text{ROCH}_2\text{CH}_2\text{X}$ y $\text{COCH}_2\text{X} > \text{COX}$.

El estudio cuantitativo de la reacción de la NBP con diversas especies alquilantes fue llevado a cabo por Epstein y colaboradores (Epstein *et al.*, 1955). Del mismo modo, con la molécula de NBP se podían determinar, de forma cuantitativa, concentraciones de agentes acilantes (Agree y Meeker, 1966).

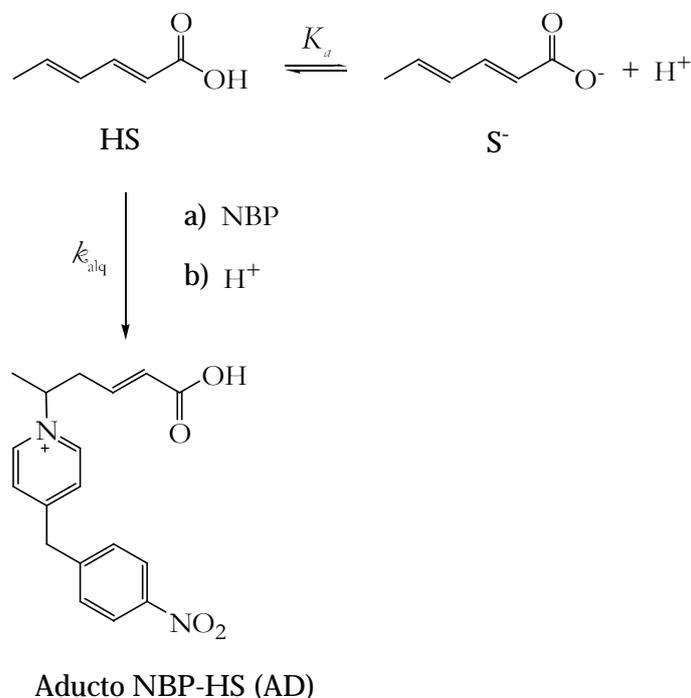
Trabajos posteriores muestran la gran versatilidad de la NBP como *molécula modelo* en la identificación de una gran cantidad de especies alquilantes de diversa naturaleza como aminoácidos (Meier *et al.*, 1990; García Santos *et al.* 2001, 2002), compuestos halogenados (Sawicki *et al.*, 1963), epóxidos (Kim y Thomas, 1992) y lactonas (Hemminki, 1981; Manso *et al.* 2005, Gómez Bombarelli *et al.* 2008) entre otros.

En este trabajo se ha estudiado la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico así como la capacidad alquilante de su sal potásica de uso habitual como conservante en gran cantidad de alimentos.

3.1.2. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico

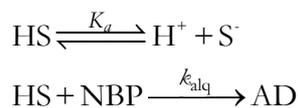
3.1.2.1. Tratamiento de datos cinéticos

La forma no disociada del ácido sórbico (HS) reacciona con la NBP para dar lugar al aducto NBP-HS (Esquema 3.1).



Esquema 3.1. Reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico

Como: (i) La reactividad de la mezcla sórbico/sorbato aumenta al disminuir el pH y (ii) la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y sus sales ha sido atribuida principalmente a la capacidad inhibidora de la molécula no disociada (Eklund, 1983; Hartman, 1983; Dacosta, 1994; Food Safety and Hygiene, 2003) parece razonable admitir que la formación del aducto transcurre como muestra el Esquema 3.2.



Esquema 3.2. Mecanismo de la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico

Del Esquema 3.2. se desprende que la velocidad de formación del aducto (AD) viene dada por la Ec 1.

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_{alq} [HS][NBP] \quad (1)$$

Como:

1. La concentración total de sorbato [S] es suma de la concentración de ácido sórbico en su forma no disociada [HS] y la concentración de la especie disociada [S⁻]:

$$[S] = [HS] + [S^-] \quad (2)$$

2. La constante de disociación del ácido sórbico es:

$$K_a = \frac{[S^-][H^+]}{[HS]} \quad (3)$$

la ecuación de velocidad de formación del aducto se puede escribir de la forma:

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_{alq} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} [S][NBP] \quad (4)$$

Como se ha trabajado con fuerte exceso de sorbato y a pH constante la Ec 4 puede escribirse en función de la pseudoconstante de velocidad k_1 :

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_1 [NBP] \quad (5)$$

definida como:

$$k_1 = k_{alq} \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} [S] \quad (6)$$

Si designamos como $[AD]_t$ la concentración de aducto a un tiempo t , la Ec 5 se puede escribir así:

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_1 ([NBP]_0 - [AD]_t) \quad (7)$$

Al integrar la Ec 7 y expresar el resultado en términos de absorbancia, resulta:

$$\ln \left(\frac{A_\infty - A_0}{A_\infty - A_t} \right) = k_1 t \quad (8)$$

donde:

$$A_0 = \varepsilon_{NBP} [NBP]_0 \quad (9)$$

$$A_t = \varepsilon_{NBP} ([NBP]_0 - [AD]_t) + [AD]_t \varepsilon_{AD} \quad (10)$$

$$A_{\infty} = \varepsilon_{AD}[\text{NBP}]_0 \quad (11)$$

siendo A_0 , A_t y A_{∞} , la absorbancia inicial, a tiempo t y a tiempo infinito, respectivamente y ε_{NBP} y ε_{AD} los coeficientes de absorción molar de la NBP y del aducto, respectivamente.

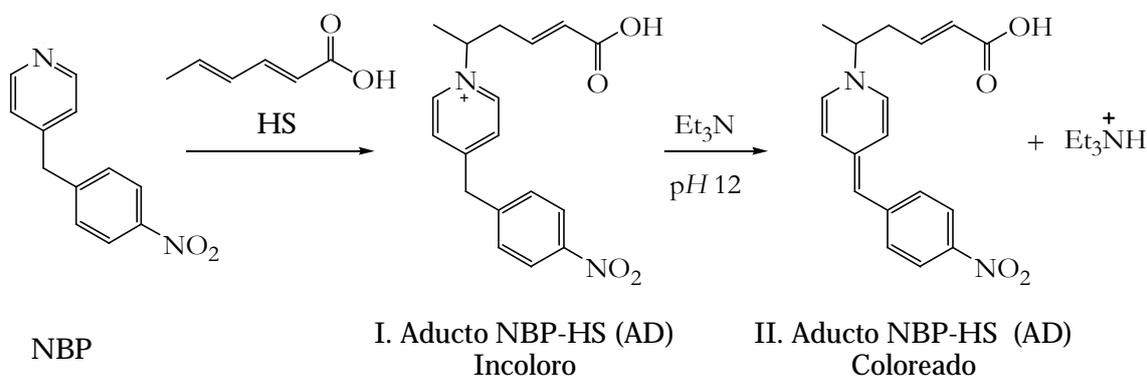
La absorbancia del aducto varía con el tiempo según la Ec 12.

$$A_t = A_{\infty} (1 - e^{-k_1 t}) + A_0 e^{-k_1 t} \quad (12)$$

3.1.2.2. Método experimental

3.1.2.2.1. Reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico

El seguimiento cinético de la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico se ha llevado a cabo espectrofotométricamente (Esquema 3.3.) El aducto formado entre la molécula de NBP y el ácido sórbico (AD) es incoloro y, en presencia de una base como la trietilamina, se produce una desprotonación del carbono sp^3 que se encuentra entre los dos anillos aromáticos para formar un aducto coloreado que permite seguir la reacción de alquilación en la zona visible del espectro. En la Figura 3.2. se muestran los espectrogramas obtenidos utilizando como sistema regulador la mezcla ácido sórbico/sorbato potásico.



Esquema 3.3. Seguimiento de la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico

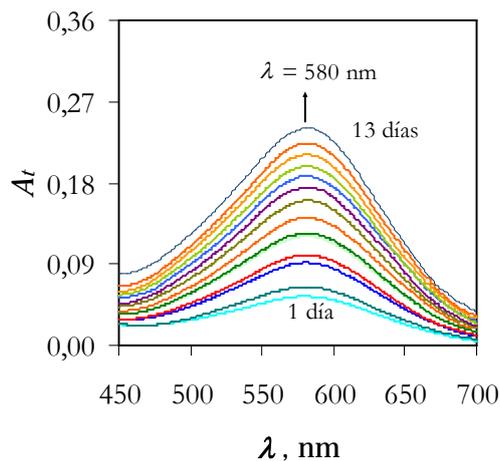


Figura 3.2. Espectrogramas que muestran la variación de la absorbancia del aducto NBP-sorbato potásico con el tiempo de reacción. Medio 7:3, agua:dioxano. pH 5,78; $T = 35,0$ °C; $[NBP]_0 = 2,90 \times 10^{-3}$ M; $[S]_0 = 0,15$ M; $[KOH]_0 = 0,1$ M.

Se ha trabajado en exceso de ácido sórbico frente a la NBP, a pH constante. El ácido sórbico, en presencia de una base como el hidróxido sódico o potásico se disocia y el par ácido sórbico/sorbato formado actúa como tampón permitiendo trabajar en medios con acidez constante sin necesidad de utilizar mezclas reguladoras. Las reacciones de alquilación se han estudiado en medio ácido (pH 5-6) frecuente en gran cantidad de alimentos (Dacosta, 1994) como pan, 5,0-6,0, pollo, 5,5,-6,4, queso, 5,0-6,1 o carne de ternera, 5,3-6,2.

Como la molécula de NBP no es soluble en agua se ha trabajado en mezclas acuorgánicas, agua:dioxano en proporción 7:3 (v/v).

Para el seguimiento cinético a lo largo del tiempo, se toman alícuotas de $2,4$ cm³ de la mezcla de reacción (HS+NaOH ó KOH+NBP) que se añaden a una cubeta con $0,6$ cm³ de trietilamina (Esquema 3.3.). La medida de la absorbancia del aducto coloreado se ha hecho a una longitud de onda $\lambda = 580$ nm, correspondiente a su máximo de absorción (Figura 3.2.).

3.1.2.2.2. Determinación del pK_a del ácido sórbico

Método espectrofotométrico

La variación de la absorbancia del ácido sórbico con el pH del medio de reacción (Figura 3.3.) permite la determinación del pK_a con la expresión de Henderson-Hasselbalch (Po y Senozan, 2001):

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{S}^-]}{[\text{HS}]} = \text{p}K_a - \log \frac{A_{\text{S}^-} - A_\lambda}{A_\lambda - A_{\text{HS}}} \quad (13)$$

A_{HS} y A_{S^-} son las absorbancias de las formas no disociada ($\lambda = 265$ nm, $\text{pH} \sim 3,8$ en medio 7:3, agua:dioxano) y disociada ($\lambda = 265$ nm, $\text{pH} \sim 9,2$ en medio 7:3, agua:dioxano) del ácido sórbico, respectivamente. A_λ representa los valores de absorbancia a diferentes pH s comprendidos entre los dos valores límite $\text{pH} 3,8$ y $9,2$.

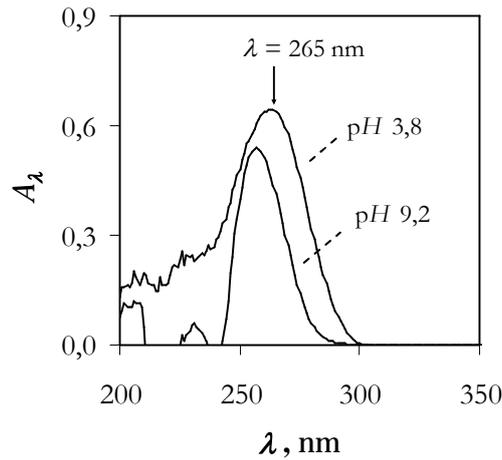


Figura 3.3. Espectrogramas del ácido sórbico a $\text{pH} 3,8$ y $9,2$ en medio 7:3, agua:dioxano a $T = 25,0$. $[\text{HS}] = 2,85 \times 10^{-5}$ M; NaOH para ajustar el pH .

Para ajustar el pH inicial, $\text{pH} \sim 3,8$, se utiliza ácido clorhídrico (0,1 M) y para modificar la acidez del medio se utilizaron dos bases diferentes, hidróxido sódico (0,01 - 0,1 M) e hidróxido potásico (0,01 - 0,1 M) para estudiar la influencia del ión metálico, Na^+ y K^+ , en el valor de la constante de disociación. El volumen de base añadido a la disolución de ácido sórbico no llegaba al 1% del volumen total de dicha disolución, para evitar el efecto de la dilución.

Método volumétrico

Como método alternativo al espectrofotométrico, se ha medido el $\text{p}K_a$ del ácido sórbico mediante volumetría ácido-base. Conocido el volumen de hidróxido sódico consumido en la valoración a diferentes valores de pH , se puede determinar el valor de $\text{p}K_a$ con la ecuación de Henderson-Hasselbalch en la forma:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{V}{V_{\text{max}} - V} \quad (14)$$

V_{\max} y V representan el volumen de hidróxido sódico consumido en el punto final de la valoración y a cada valor de pH durante la misma, respectivamente.

Para ajustar el pH inicial, se utiliza ácido clorhídrico (0,1 M). El volumen total de hidróxido sódico ($9,38 \times 10^{-2}$ M) consumido en la valoración es inferior a 7 cm^3 , aproximadamente, en un volumen final de 100 cm^3 .

3.1.2.2.3. Determinación de la constante de asociación de los pares iónicos Na^+ sorbato $^-$ y K^+ sorbato $^-$

Para determinar las constantes de asociación de los pares iónicos Na^+ S^- y K^+ S^- , se han medido las conductividades eléctricas de diferentes disoluciones de sorbato sódico y potásico.

La preparación de las sales sódica y potásica del ácido sórbico se ha llevado a cabo a partir del ácido en presencia de los hidróxidos sódico y potásico, respectivamente, en cantidades equimoleculares. La recristalización de las sales se hizo en etanol-agua.

3.1.2.2.4. Cálculo de las barreras de energía para la reacción entre el ácido sórbico y la NBP

La adición de la molécula de NBP sobre la estructura de dobles enlaces del ácido sórbico puede tener lugar en dos posiciones, en el carbono 3 o 5 de dicha estructura (Esquema 3.1.; véase Apartado 3.1.2.1.). Para conocer cual de las dos reacciones es más favorable, desde el punto de vista energético, se han calculado computacionalmente las barreras de energía para ambos procesos.

Las estructuras de los reactivos, NBP y ácido sórbico, y de los estados de transición en ambos casos, se han optimizado al nivel de teoría DFT-B3LYP 6-31++G (d.p.). Las geometrías de los reactivos corresponden a mínimos, ninguna frecuencia de vibración imaginaria y las de los estados de transición muestran una frecuencia imaginaria.

Se ha tenido en cuenta la solvatación mediante un método de campo de reacción autoconsistente (SCRf) y el medio continuo polarizable (PCM).

Todos los cálculos se han hecho con el programa Gaussian 03W.

3.1.3. Seguimiento de la reacción de alquilación de NBP por sorbato potásico

3.1.3.1. Tratamiento de datos cinéticos

Para estudiar la capacidad alquilante del sorbato potásico (KS) se ha empleado la 4-(*p*-nitrobencil)piridina (NBP) que es una molécula ‘trampa de agentes alquilantes’ (véase Apartado 3.1.1.). El tratamiento cinético de datos es análogo al llevado a cabo en el caso del ácido sórbico puesto que, en ambos casos existe un equilibrio entre las formas ácida y básica del ácido sórbico de la forma $HS \rightleftharpoons S^- + H^+$ y solamente la forma no disociada reacciona con la NBP para dar lugar al aducto correspondiente (véase Apartado 3.1.2.).

3.1.3.2. Método experimental

La reacción de alquilación de la NBP por el sorbato potásico se ha estudiado espectrofotométricamente, con el seguimiento de la formación del aducto coloreado NBP-ácido sórbico a la longitud de onda de su máximo de absorción, $\lambda = 580$ nm (Esquema 3.3.). En la Figura 3.4. se muestran los espectrogramas obtenidos en una cinética realizada en las condiciones de trabajo indicadas.

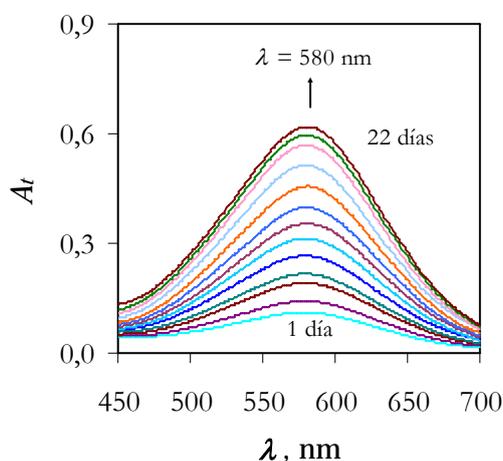


Figura 3.4. Espectrogramas que muestran la variación de la absorbancia del aducto NBP-Sorbato con el tiempo de reacción. Medio 7:3, agua:dioxano. pH 5,53; $T = 35,0$ °C; $[NBP]_0 = 2,83 \times 10^{-3}$ M; $[S]_0 = 0,2$ M; $[HCl] = 0,1$ M.

Se ha trabajado en exceso de sorbato frente a NBP en medios de acidez constante. El sorbato potásico en medio clorhídrico se protona y el sistema KS+HCl actúa como disolución reguladora.

Como la molécula de NBP no es soluble en agua se ha trabajado en mezclas acuoorgánicas, agua:dioxano en proporción 7:3 (v/v).

El seguimiento cinético de la reacción de alquilación de la NBP por el sorbato potásico es análogo al empleado con el ácido sórbico (Apartado 3.1.2.2.1.).

3.1.4. Reactivos y equipo de trabajo

3.1.4.1. Reactivos utilizados

El ácido sórbico utilizado es un reactivo Panreac PRS y el sorbato potásico (99%) es Sigma. Sus disoluciones se hicieron por pesada directa.

La 4-(*p*-nitrobencil)piridina (98%), el dioxano PRS y la trietilamina (99%) son productos Sigma.

Para preparar las disoluciones reguladoras sórbico/sorbato se ha utilizado hidróxido sódico Fluka ($\geq 98\%$) e hidróxido potásico Panreac en aquellos sistemas donde el ácido sórbico era el producto de partida. Se ha empleado ácido clorhídrico (37%) Panreac para preparar los sistemas reguladores con la sal potásica del ácido sórbico.

Se ha utilizado agua desionizada en un equipo *MilliQ-Gradient* (Millipore)

3.1.4.2. Equipo de trabajo

El seguimiento cinético de la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico se ha hecho espectrofotométricamente en un espectrofotómetro *Shimadzu* UV-2401-PC de doble haz (Figura 3.5.) con portacubetas CSP-240-A (Figura 3.6.) con seis celdas termostatadas por sistema Peltier. Se han manejado cubetas de cuarzo *Hellma*, 110QS, de 1 cm de paso óptico.



Figura 3.5. Espectrofotómetro Shimadzu UV-2401-PC de doble haz.



Figura 3.6. Portacubetas CSP-240-A

Las medidas de pH se han realizado en un pH -metro *Crison Micro pH 2000*.

Las valoraciones ácido base se han llevado a cabo en una autobureta *Metrohm 718 STAT Titrino* (Figura 3.7.).

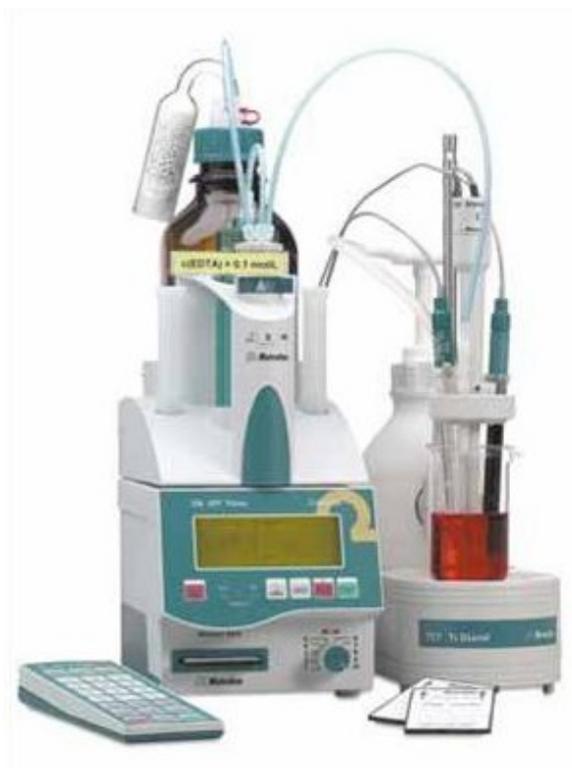


Figura 3.7. Autobureta Metrohm 718 STAT Titrino.

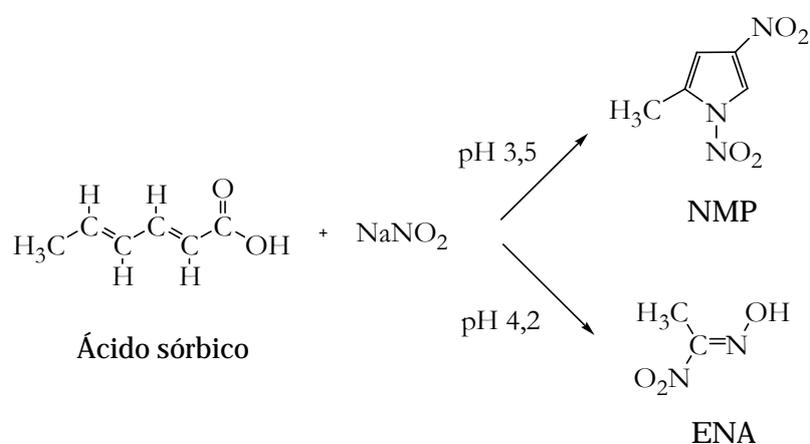
Para mantener la temperatura constante ($\pm 0,04$ °C) se ha utilizado un termostato *Lauda Ecoline Re 120*.

Las medidas de conductancia se hicieron en un conductímetro microCM 2200 equipado con célula de vidrio y platino y compensador automático de temperatura (C.A.T.). Constante de celda: $0,98 \text{ cm}^{-1}$.

3.2. Reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico

3.2.1. Formación de 1,4-dinitro-2-metil pirrol y ácido etilnitrólico

El ácido sórbico reacciona con nitrito sódico para dar lugar a productos mutágenos (véase apartado 2.8.). Los productos mayoritarios son 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) y ácido etilnitrólico (ENA) (Esquema 3.4.). La formación de los productos se ve influida notablemente por el pH del medio de reacción (Namiki *et al.*, 1980). A pH 3,5 la especie NMP se forma mayoritariamente, mientras que a pH 4,2, se ve favorecida la formación de ENA. A valores de pH muy ácidos (pH 1,5) se obtienen especies de estructura desconocida y, a pH elevados (pH \geq 6) la reacción no tiene lugar.



Esquema 3.4. Reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico.

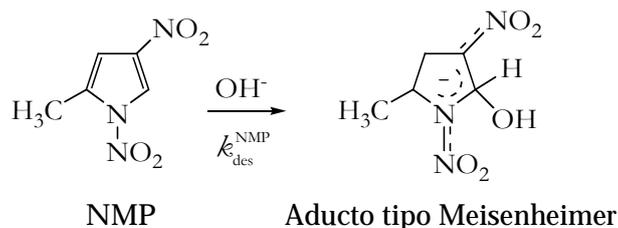
En este trabajo se ha estudiado la capacidad alquilante de las especies NMP y ENA frente a la molécula de NBP así como su reacción de descomposición que es la etapa previa a la alquilación.

3.2.2. Reactividad de 1,4-dinitro-2-metil pirrol

3.2.2.1. Reacción de descomposición del NMP

3.2.2.1.1. Tratamiento de datos cinéticos

El producto NMP es inestable en disolución acuosa y en medio débilmente alcalino reacciona con los iones OH^- para formar el aducto tipo Meisenheimer que se muestra en el Esquema 3.5.



Esquema 3.5. Reacción de descomposición del NMP.

La ecuación de velocidad de descomposición de la especie NMP viene dada por la expresión:

$$v = -\frac{d[\text{NMP}]}{dt} = k_{\text{des}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}] [\text{OH}^-] \quad (15)$$

Como se trabaja a pH constante, se puede definir una pseudoconstante $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$ de la forma:

$$k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} = k_{\text{des}}^{\text{NMP}} [\text{OH}^-] \quad (16)$$

de manera que:

$$v = -\frac{d[\text{NMP}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}] \quad (17)$$

Al integrar esta expresión entre tiempo cero y tiempo t resulta:

$$\ln \frac{[\text{NMP}]_0}{[\text{NMP}]_t} = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t \quad (18)$$

Si se designa como ϵ_{NMP} y ϵ_{p} a los coeficientes de absorción del NMP y del producto de descomposición, respectivamente, las absorbancias a tiempo cero, t e infinito serán:

$$A_0 = \epsilon_{\text{NMP}} [\text{NMP}]_0 \quad (19)$$

$$A_t = \varepsilon_{\text{NMP}}([\text{NMP}]_0 - [\text{P}]_t) + \varepsilon_{\text{P}}[\text{P}]_t \quad (20)$$

$$A_\infty = \varepsilon_{\text{P}}[\text{NMP}]_0 \quad (21)$$

Al sustituir estas expresiones en Ec 18 y reordenar se llega fácilmente a la Ec 22:

$$\ln \frac{A_0 - A_\infty}{A_t - A_\infty} = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t \quad (22)$$

es decir:

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} \quad (23)$$

expresión que, mediante optimización no lineal permite conocer los valores de A_∞ y $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$.

3.2.2.1.2. Método experimental

Para el seguimiento cinético de la reacción de descomposición del NMP, se ha empleado un método espectrofotométrico. La disminución del valor de la absorbancia del reactivo en la longitud de onda correspondiente a su máximo de absorción - $\lambda = 269$ nm, en disolución acuosa- (Figura 3.8.) permite determinar el valor de la pseudoconstante de velocidad $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$. Cuando empleamos un codisolvente orgánico como dioxano en las mezclas acuoorgánicas, el espectro visible-ultravioleta se modifica. Se observa un desplazamiento batócromo de los picos del reactivo a medida que aumenta la proporción de dioxano, de manera que la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción varía, de $\lambda = 269$ nm en medio 10:0 (agua:dioxano) a $\lambda = 271, 272, 273$ y 275 nm en medios 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5, respectivamente.

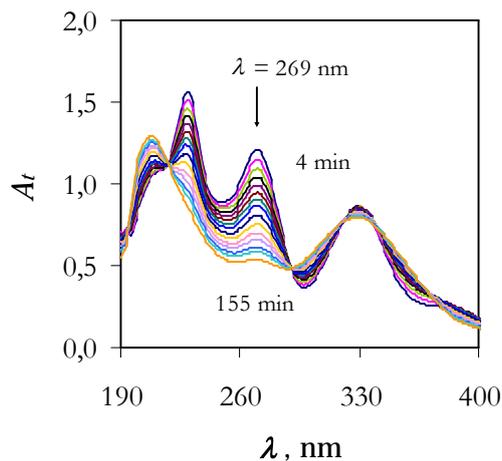


Figura 3.8. Espectrogramas que muestran la variación de la absorbancia con el tiempo en la reacción de descomposición del NMP. Disolución acuosa pH 9,47, tampón borato; $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{NMP}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$.

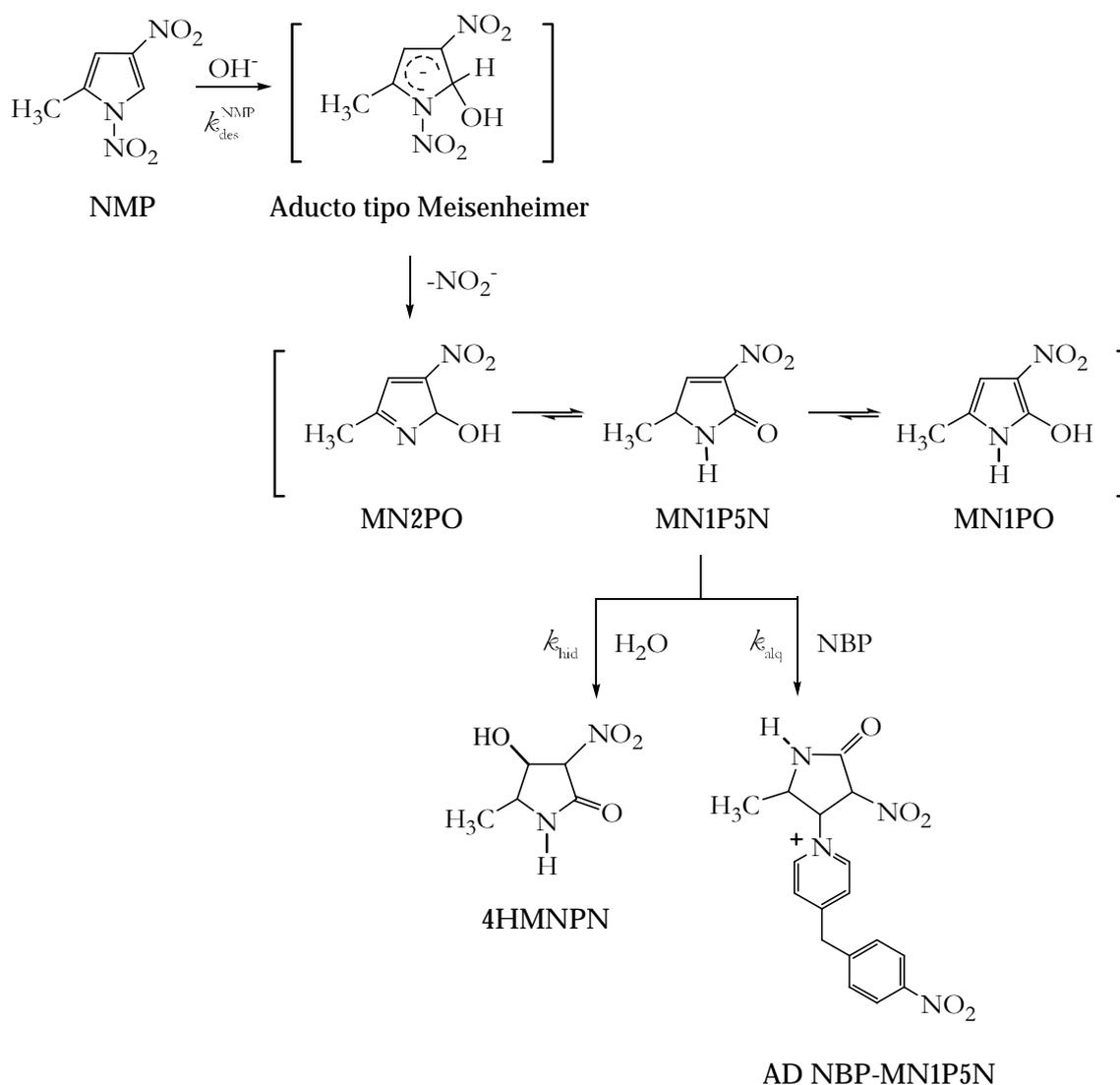
Para mantener el pH constante a lo largo de la reacción se han empleado disoluciones reguladoras. En el intervalo de pH 7,0-8,0 se ha utilizado tampón fosfato (NaH_2PO_4 0,1 M; NaOH 0,1 M) y para valores de pH superiores, en el intervalo 8,0-9,5, tampón borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,025 M; HCl 0,1 M; NaOH 0,1 M).

3.2.2.2. Reacción de alquilación de NBP por NMP

3.2.2.2.1. Tratamiento de datos cinéticos

Para estudiar la capacidad alquilante del 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) se ha empleado la NBP como molécula alquilable, de nucleofilia análoga a la de las bases del ADN (véase Apartado 3.1.1.).

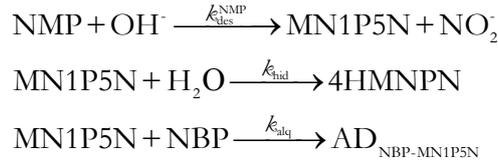
El Esquema 3.6. muestra las posibles especies presentes en el mecanismo de reacción.



Esquema 3.6. Reacción de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N.

La reacción entre el NMP y el ión hidróxido da lugar a un aducto tipo Meisenheimer que evoluciona rápidamente para formar la especie 5-metil-3-nitro-2H-pirrol-2-ol (MN2PO). Debido a su inestabilidad, se isomeriza como muestra el Esquema 3.6. La especie 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2-ol (MN1PO), aromática, es la más estable energéticamente. Sin embargo, la especie 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2(5H)-ona (MN1P5N), que posee una amida α,β -insaturada en su estructura parece ser la especie que reacciona con nucleófilos, en este caso el agua o la NBP.

El Esquema 3.7. muestra el mecanismo de alquilación propuesto.



Esquema 3.7. Mecanismo de la reacción de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N.

La ecuación de velocidad de formación del aducto NBP-MN1P5N viene dada por la expresión:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}} [\text{MN1P5N}][\text{NBP}] \quad (24)$$

Como se trabaja con exceso de NBP frente al NMP, se puede definir una pseudoconstante de velocidad de alquilación de la forma:

$$k_{\text{alq obs}} = k_{\text{alq}} [\text{NBP}] \quad (25)$$

de manera que la Ec 24 puede escribirse así:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq obs}} [\text{MN1P5N}] \quad (26)$$

La concentración de la especie intermedia MN1P5N se conoce fácilmente con el tratamiento de reacciones consecutivas de primer orden (cf. por ej. Espenson, 1995):

$$\frac{d[\text{MN1P5N}]}{dt} = k_{\text{des}}^{\text{NMP}} [\text{OH}^-][\text{NMP}] - k_{\text{hid}} [\text{H}_2\text{O}][\text{MN1P5N}] - k_{\text{alq}} [\text{NBP}][\text{MN1P5N}] \quad (27)$$

Como se trabajó a pH constante y en exceso de H₂O y NBP frente al reactivo NMP, la Ec 27 puede escribirse así:

$$\frac{d[\text{MN1P5N}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}] - (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) [\text{MN1P5N}] \quad (28)$$

donde $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$ y $k_{\text{hid obs}}$ son las pseudoconstantes de velocidad de descomposición del NMP e hidrólisis de la especie intermedia MN1P5N, respectivamente ($k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} = k_{\text{des}}^{\text{NMP}} [\text{OH}^-]$; $k_{\text{hid obs}} = k_{\text{hid}} [\text{H}_2\text{O}]$).

Como la variación de la concentración de NMP con el tiempo obedece a la Ec 29 (véase Apartado 3.2.2.1.):

$$[\text{NMP}] = [\text{NMP}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} \quad (29)$$

la Ec 28 puede escribirse así:

$$\frac{d[\text{MN1P5N}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}]_o e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} - (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) [\text{MN1P5N}] \quad (30)$$

La solución de esta ecuación diferencial lineal permite conocer la concentración de la especie intermedia MN1P5N a un tiempo t :

$$[\text{MN1P5N}] = \frac{k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}]_o}{(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}})} \left(e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t} \right) \quad (31)$$

Al sustituir la Ec 31 en la ecuación de velocidad de formación del aducto se obtiene:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq obs}} \frac{k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}]_o}{(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}})} \left(e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t} \right) \quad (32)$$

Al integrar esta expresión entre $t = 0$ y t resulta:

$$[\text{AD}] = \frac{k_{\text{alq obs}} [\text{NMP}]_o}{(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}) (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})} \left[(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) (1 - e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t}) - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} (1 - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t}) \right] \quad (33)$$

Como la absorbancia del aducto a un tiempo t , A_{AD} , es directamente proporcional a la concentración del mismo, según la ecuación de Lambert Beer, la Ec 33 puede escribirse en términos de absorbancia de la forma:

$$A_{\text{AD}} = \frac{k_{\text{alq obs}} [\text{NMP}]_o \varepsilon_{\text{AD}} l}{(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}) (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})} \left[(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) (1 - e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t}) - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} (1 - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t}) \right] \quad (34)$$

donde ε_{AD} es el coeficiente de absorción del aducto NBP-MN1P5N y l el paso óptico de la cubeta.

La Ec 34 se puede escribir de forma simplificada según:

$$y = a \left[b(1 - e^{-cx}) - c(1 - e^{-bx}) \right] \quad (35)$$

definidos a , b y c de la forma: $a = k_{\text{alq obs}} [\text{NMP}]_o \varepsilon_{\text{AD}} l / (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}) (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})$, $b = (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})$ y $c = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$.

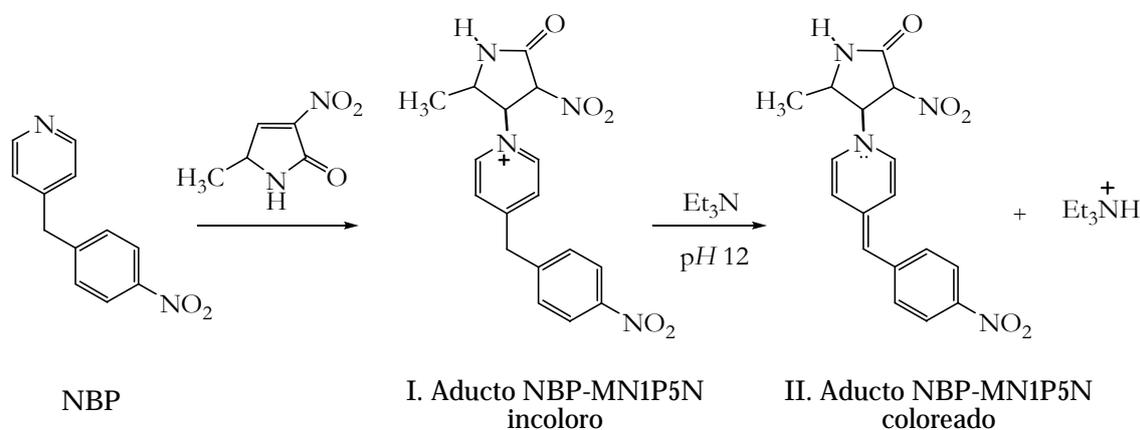
El ajuste de los resultados experimentales a la Ec 35 permite determinar los parámetros cinéticos de la reacción de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N.

Con el inverso del producto $a(b-c)$ se puede conocer el valor del cociente $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$ y el coeficiente de absorción molar del aducto, ϵ_{AD} , con los valores de la pendiente y ordenada en el origen de la recta obtenida al representar el primer miembro de la Ec 36 frente al inverso de la concentración de NBP, mantenidas constantes el resto de variables como la temperatura, el pH y la concentración del reactivo NMP (véase Apartado 4.2.2.2.).

$$\frac{1}{a(b-c)} = \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NMP}]_0 \epsilon_{\text{AD}} l} \left(\frac{k_{\text{hid}}}{k_{\text{alq}}} \right) \frac{1}{[\text{NBP}]_0} + \frac{1}{[\text{NMP}]_0 \epsilon_{\text{AD}} l} \quad (36)$$

3.2.2.2. Método experimental

El estudio cinético de la reacción de alquilación de la NBP por la especie 1,4-dinitro-2-metilpirrol se ha llevado a cabo espectrofotométricamente mediante el seguimiento de la forma coloreada del aducto NBP-MN1P5N en la zona visible del espectro (Esquema 3.8.).



Esquema 3.8. Seguimiento de la reacción de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N.

La Figura 3.9. muestra los espectrogramas obtenidos al seguir cinéticamente la reacción de alquilación de la NBP por la especie NMP.

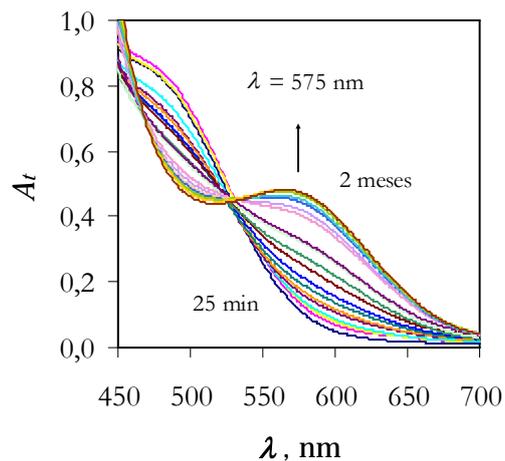


Figura 3.9. Variación de la absorbancia con el tiempo en la reacción de alquilación de NBP por MN1P5N. $T = 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; Mezcla 7:3 (tampón acético/acetato:dioxano) de $\text{pH } 4,77$; $[\text{NMP}]_0 = 8,0 \times 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NBP}]_0 = 1,5 \times 10^{-2}\text{ M}$.

El aducto NBP- MN1P5N presenta un máximo de absorción en la zona visible del espectro a una longitud de onda $\lambda = 575\text{ nm}$ (Figura 3.9).

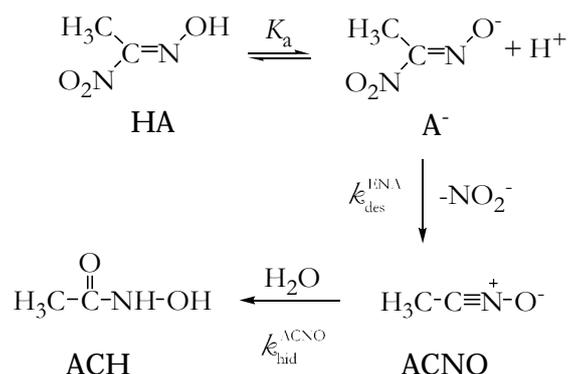
Se ha trabajado con exceso del reactivo NBP frente al NMP. Para mantener el pH constante se han utilizado disoluciones reguladoras acético/acetato.

3.2.3. Reactividad del ácido etilnitroso

3.2.3.1. Reacción de descomposición del ENA

3.2.3.1.1. Tratamiento de datos cinéticos

El ácido etilnitroso es inestable en disolución acuosa. Esta inestabilidad se ve acentuada notablemente en valores elevados de pH . El Esquema 3.9. muestra el mecanismo propuesto para esta descomposición del ENA.



Esquema 3.9. Reacción de descomposición del ENA.

Como puede observarse, HA y A⁻ son las formas ácida y básica del ácido etilnitroso, respectivamente, siendo K_a la constante de equilibrio de disociación del mismo. La forma desprotonada se descompone para dar lugar al óxido de acetonitrilo (ACNO) por pérdida del ión nitrito (Egan *et al.*, 1991). El ACNO se hidroliza para formar ácido acetohidroxámico (ACH).

Como (i) se ha trabajado en el margen de pH 6,0-9,5 y (ii) el ácido acetohidroxámico tiene un $pK_a = 9,31$ (agua a $T = 25,0$ °C) (Senent *et al.*, 2003; Mora Díez *et al.*, 2005) la forma sin disociar del ACH predomina en este intervalo de pH .

3.2.3.1.1.1. Reacción de descomposición del ENA

Admitido orden uno respecto a la concentración del reactivo A⁻ (Esquema 3.9.) la ecuación de velocidad de descomposición sería:

$$v = -\frac{d[\text{A}^-]}{dt} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} [\text{A}^-] \quad (37)$$

Como:

1. La concentración total de ácido etilnitroso (ENA) es suma de las concentraciones de las formas ácida y básica:

$$[\text{ENA}] = [\text{HA}] + [\text{A}^-] \quad (38)$$

2. La constante de equilibrio de disociación del ENA es:

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} \quad (39)$$

la concentración de la forma disociada del ácido etilnitrótico (A⁻) es:

$$[\text{A}^-] = [\text{ENA}] \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (40)$$

Como se ha trabajado en medios de acidez constante, se define una pseudoconstante de velocidad de descomposición del ácido etilnitrótico ($k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$) según:

$$k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (41)$$

de modo que:

$$v = -\frac{d[\text{ENA}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}] \quad (42)$$

Al integrar la Ec 42 y expresar el resultado en términos de absorbancia resulta:

$$A_t = A_{\infty} + (A_0 - A_{\infty}) e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} \quad (43)$$

donde A_0 , A_t y A_{∞} representan la absorbancia inicial, a un tiempo t y a tiempo infinito, respectivamente.

El ajuste no lineal de los valores A_t/t permite conocer el valor de

$$k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$$

3.2.3.1.1.2. Reacción de hidrólisis del óxido de acetonitrilo

La ecuación de velocidad manejada para la formación del ACH es:

$$v = \frac{d[\text{ACH}]}{dt} = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}][\text{H}_2\text{O}] \quad (44)$$

Como se trabaja en disolución acuosa, el agua está en fuerte exceso, de modo que se puede definir una nueva pseudoconstante de velocidad de orden uno de la forma: $k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{H}_2\text{O}]$, con lo que la ecuación de velocidad de formación de ACH resulta:

$$v = \frac{d[\text{ACH}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}] \quad (45)$$

Para expresar la concentración de ACNO en función de la concentración de reactivo se ha aplicado el tratamiento de reacciones consecutivas de primer orden (cf. por ej. Espenson, 1995).

La variación de la concentración de ACNO con el tiempo es:

$$\frac{d[\text{ACNO}]}{dt} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} [\text{A}^-] - k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}] \quad (46)$$

Dado que la concentración de la forma disociada del ácido etilnitroso se puede relacionar con la concentración total de ácido según la expresión:

$$[\text{A}^-] = [\text{ENA}] \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (40)$$

Como la variación de la concentración de ENA con el tiempo sigue una cinética de pseudoprimer orden de la forma:

$$[\text{ENA}] = [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} \quad (47)$$

la variación de la concentración de ACNO con el tiempo se puede escribir así:

$$\frac{d[\text{ACNO}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} - k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}] \quad (48)$$

La resolución de esta ecuación diferencial lineal permite conocer la concentración de ACNO en un tiempo t .

$$[\text{ACNO}] = \frac{k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0}{(k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}})} \left(e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} - e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} t} \right) \quad (49)$$

La concentración de ACH en un tiempo t puede determinarse al tener en cuenta que:

$$[\text{ENA}]_0 = [\text{ENA}] + [\text{ACNO}] + [\text{ACH}] \quad (50)$$

Al sustituir las Ec 47 y Ec 49 en la Ec 50 puede escribirse:

$$[\text{ACH}] = [\text{ENA}]_0 \left(1 + \frac{k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} t} - k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t}}{k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \right) \quad (51)$$

Como $A_{\text{ACH}} = \varepsilon_{\text{ACH}} l [\text{ACH}]$ (siendo ε_{ACH} el coeficiente de absorción molar del ácido acetohidroxámico y l el paso óptico de la cubeta) la Ec 51 puede escribirse así:

$$A_{\text{ACH}} = \varepsilon_{\text{ACH}} l [\text{ENA}]_0 \left(1 + \frac{k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} t} - k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t}}{k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \right) \quad (52)$$

La variación de la absorbancia de la especie ACH con el tiempo permite conocer el valor de la pseudoconstante de velocidad de hidrólisis mediante el ajuste de los resultados obtenidos a una expresión del tipo:

$$y = a \left(1 + \frac{be^{-cx} - ce^{-bx}}{c - b} \right) \quad (53)$$

donde: $a = \varepsilon_{\text{ACH}} l [\text{ENA}]_0$, $b = k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ y $c = k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}}$.

3.2.3.1.2. Método experimental

El seguimiento cinético de las reacciones de descomposición del ENA y de hidrólisis de ACNO se ha llevado a cabo espectrofotométricamente. La Figura 3.10. muestra los espectrogramas obtenidos en una cinética en disolución acuosa en las condiciones que se indican.

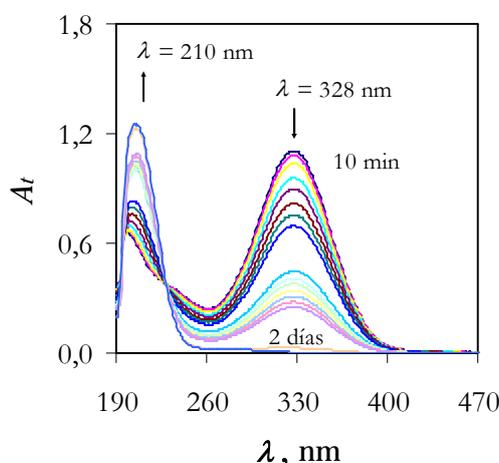


Figura 3.10. Espectrogramas que muestran la variación de la absorbancia con el tiempo en la reacción de hidrólisis del ENA. Disolución acuosa pH 9,52, tampón borato; $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ENA}]_0 = 1,13 \times 10^{-4} \text{ M}$.

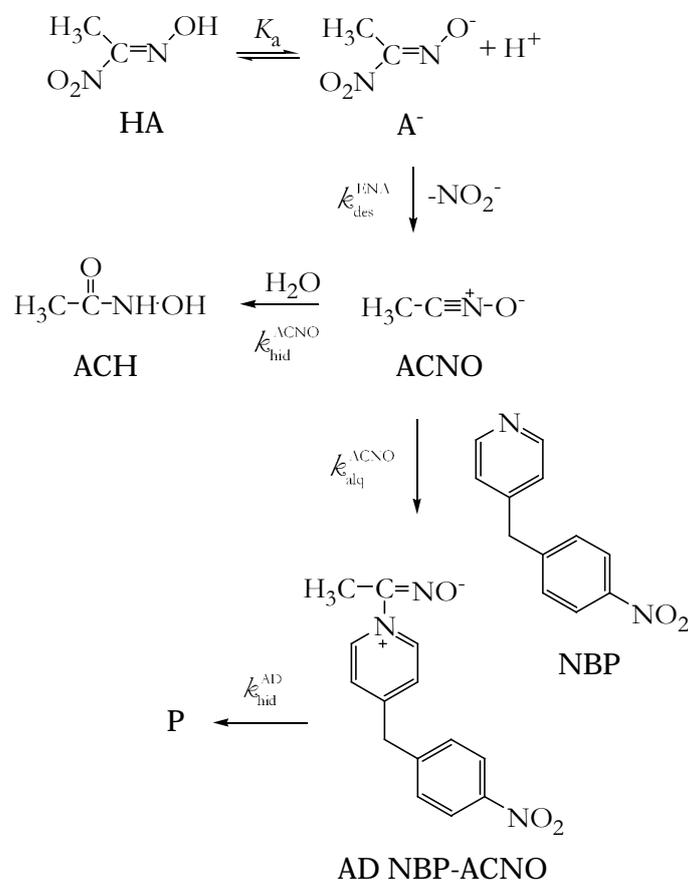
La longitud de onda escogida para llevar a cabo el seguimiento de la reacción de descomposición es $\lambda = 328 \text{ nm}$, correspondiente al máximo de absorción de su forma disociada. En mezclas acuoorgánicas agua:dioxano (v/v) este valor se desplaza a longitudes de onda mayores. La formación del ácido acetohidroxámico se ha seguido en $\lambda = 210 \text{ nm}$ (Figura 3.10).

Para mantener el pH constante se han utilizado disoluciones reguladoras fosfato y borato.

3.2.3.2. Reacción de alquilación de NBP por ENA

3.2.3.2.1. Tratamiento de datos cinéticos

La reacción de alquilación de la NBP por ácido etilnitrótico tiene lugar entre la molécula de NBP y el óxido de acetonitrilo (ACNO) especie intermedia en la reacción de hidrólisis de la forma desprotonada del isómero *E* del ácido etilnitrótico (A) (Esquema 3.10).



Esquema 3.10. Reacción de alquilación de la NBP por el óxido de acetonitrilo.

La especie ACNO se hidroliza dando lugar al ácido acetohidroxámico (ACH) y, por otra parte, reacciona con la NBP para formar el aducto NBP-ACNO (AD NBP-ACNO).

La ecuación de velocidad de formación del aducto NBP-ACNO, según el mecanismo mostrado en el Esquema 3.10., viene dada por la siguiente expresión, supuesto orden uno con respecto a cada uno de los reactivos:

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_{alq}^{ACNO} [ACNO][NBP] - k_{hid}^{AD} [AD] \quad (54)$$

Teniendo en cuenta que:

1. La reacción de descomposición del ENA para dar lugar a la especie ACNO es la etapa determinante del mecanismo de reacción y, por tanto, la formación de la especie intermedia ACNO es lenta,

2. La hidrólisis de la especie ACNO así como la alquilación de la NBP por dicha especie son reacciones rápidas, la concentración de la especie ACNO es muy pequeña, prácticamente cero, y no varía significativamente durante el transcurso de la reacción, de modo que se puede aplicar a la misma la aproximación del estado estacionario:

$$\frac{d[ACNO]}{dt} = k_{des}^{ENA} [A^-] - k_{hid}^{ACNO} [ACNO][H_2O] - k_{alq}^{ACNO} [ACNO][NBP] = 0 \quad (55)$$

es decir,

$$[ACNO] = \frac{k_{des}^{ENA} [A^-]}{k_{hid}^{ACNO} [H_2O] + k_{alq}^{ACNO} [NBP]} \quad (56)$$

que llevada a la Ec 54 resulta:

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = \frac{k_{alq}^{ACNO} [NBP] k_{des}^{ENA} [A^-]}{k_{hid}^{ACNO} [H_2O] + k_{alq}^{ACNO} [NBP]} - k_{hid}^{AD} [AD] \quad (57)$$

Como NBP y H₂O se encuentran en exceso, se pueden definir las pseudoconstantes de alquilación de NBP por ACNO ($k_{alq\ obs}^{ACNO}$) y de hidrólisis de ACNO ($k_{hid\ obs}^{ACNO}$) de la forma:

$$k_{alq\ obs}^{ACNO} = k_{alq}^{ACNO} [NBP] \quad (58)$$

$$k_{hid\ obs}^{ACNO} = k_{hid}^{ACNO} [H_2O] \quad (59)$$

Como:

1. La concentración total de ácido etilnitroso es suma de las concentraciones de las especies ácida (HA) y básica (A⁻):

$$[\text{ENA}] = [\text{HA}] + [\text{A}^-] \quad (38)$$

2. La constante de equilibrio de disociación del ENA es:

$$K_a = \frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} \quad (39)$$

la concentración de la forma disociada del ácido etilnitrólico (A⁻) se puede expresar en función de la concentración total de ENA (Ec 40).

$$[\text{A}^-] = [\text{ENA}] \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K_a} \quad (40)$$

Como se ha trabajado en medios de acidez constante, puede definirse una pseudoconstante de velocidad de descomposición del ácido etilnitrólico ($k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$) según la Ec 41.

$$k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (41)$$

Al sustituir las Ec 58, 59 y 41 en la Ec 57 resulta:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = \frac{k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]}{k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}} - k_{\text{hid}}^{\text{AD}} [\text{AD}] \quad (60)$$

Como la velocidad de desaparición del reactivo ENA es:

$$v = -\frac{d[\text{ENA}]}{dt} = k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}] \quad (42)$$

la concentración de ENA varía exponencialmente con el tiempo:

$$[\text{ENA}] = [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} \quad (47)$$

Al llevar la Ec 47 a la Ec 60 resulta:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = \frac{k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}}{k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}} [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} - k_{\text{hid}}^{\text{AD}} [\text{AD}] \quad (61)$$

que, reordenada, puede escribirse así:

$$\frac{d[\text{AD}]}{dt} + k_{\text{hid}}^{\text{AD}} [\text{AD}] = \frac{k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}}{k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}} [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} \quad (62)$$

Al integrar la Ec 62 resulta:

$$[AD]e^{k_{hid}^{AD} t} = \frac{k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA}}{k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO}} [ENA]_0 \int e^{(k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})t} dt + cte \quad (63)$$

A tiempo cero $[AD] = [AD]_0 = 0$ la constante de integración es:

$$cte = - \frac{k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA} [ENA]_0}{(k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO})(k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})} \quad (64)$$

de modo que:

$$[AD] = \frac{k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA} [ENA]_0}{(k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO})(k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})} (e^{-k_{obs}^{ENA} t} - e^{-k_{hid}^{AD} t}) \quad (65)$$

Como $A_{AD} = \varepsilon_{AD} l [AD]$, siendo ε_{AD} el coeficiente de absorción molar del aducto y l el paso óptico de la cubeta, la Ec 65 puede escribirse en términos de absorbancia:

$$A_{AD} = \frac{\varepsilon_{AD} l k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA} [ENA]_0}{(k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO})(k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})} (e^{-k_{obs}^{ENA} t} - e^{-k_{hid}^{AD} t}) \quad (66)$$

A_{AD} y t son las variables dependiente e independiente de manera que la Ec 66 puede escribirse abreviadamente así:

$$y = \frac{a}{b-c} (e^{-cx} - e^{-bx}) \quad (67)$$

donde $a = (\varepsilon_{AD} l k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA} [ENA]_0) / (k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO})$, $b = k_{hid}^{AD}$ y $c = k_{obs}^{ENA}$.

El ajuste no lineal de la Ec 70 permite conocer las constantes de velocidad de alquilación de la NBP por el ACNO para formar el aducto NBP-ACNO (k_{alq}^{ACNO}), de hidrólisis del mismo (k_{hid}^{AD}) y el coeficiente de absorción molar del aducto (ε_{AD}).

Como el parámetro c es la constante de velocidad de descomposición del ENA, conocida previamente (véase Apartado 3.2.3.1.) con el valor obtenido del ajuste no lineal a la Ec 67 podemos verificar dicho valor y comprobar la validez del ajuste.

Con el inverso del factor preexponencial $a/(b-c)$ y, como $k_{alq\ obs}^{ACNO} = k_{alq}^{ACNO} [NBP]$ y $k_{hid\ obs}^{ACNO} = k_{hid}^{ACNO} [H_2O]$, (Ec 58 y 59) puede escribirse:

$$\frac{(b-c)}{a} [ENA]_0 = \frac{[H_2O](k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})}{\varepsilon_{AD} l k_{obs}^{ENA}} \left(\frac{k_{hid}^{ACNO}}{k_{alq}^{ACNO}} \right) \frac{1}{[NBP]} + \frac{(k_{hid}^{AD} - k_{obs}^{ENA})}{\varepsilon_{AD} l k_{obs}^{ENA}} \quad (68)$$

Al representar el primer término de la Ec 68 frente al inverso de [NBP], se puede calcular $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ y el coeficiente de absorción molar del aducto.

En medio ácido ($\text{pH} < 6,5$) las constantes de velocidad de hidrólisis del aducto NBP-ACNO ($k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$) y la de velocidad observada de descomposición del ENA ($k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$) son: $k_{\text{hid}}^{\text{AD}} = 1,89 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ y $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} = 3,77 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ a $\text{pH} 6,25$ y $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Como $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ tiene un valor muy pequeño y $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} \ll k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ la Ec 66 puede simplificarse:

$$A_{\text{AD}} = \frac{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0}{(k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}) k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} (1 - e^{-k_{\text{hid}}^{\text{AD}} t}) \quad (69)$$

La Ec 69 puede ajustarse a una de la forma:

$$y = a(1 - e^{-bx}) + c \quad (70)$$

donde a , b y c son: $a = (\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0) / [(k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}) k_{\text{hid}}^{\text{AD}}]$, $b = k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ y c un factor de corrección.

Con el inverso del factor preexponencial (a) y las Ec 58 y 59 se puede escribir:

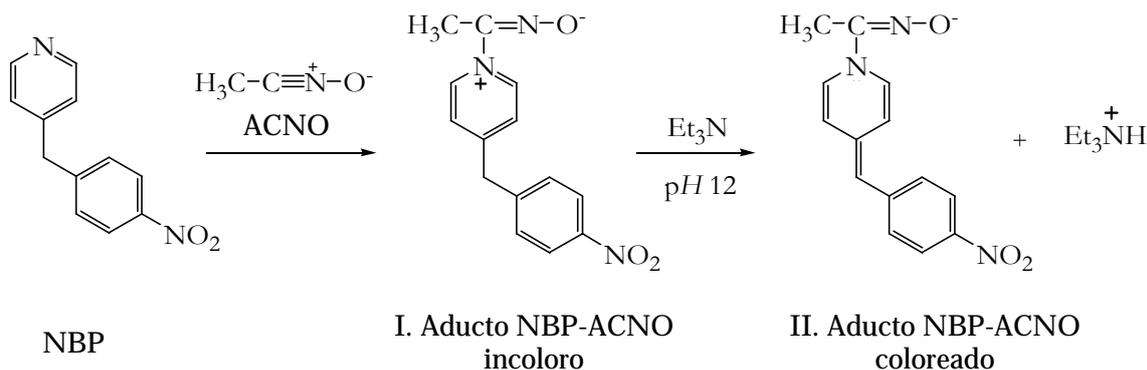
$$\frac{1}{a} [\text{ENA}]_0 = \frac{[\text{H}_2\text{O}] k_{\text{hid}}^{\text{AD}}}{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \left(\frac{k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}}}{k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}} \right) \frac{1}{[\text{NBP}]} + \frac{k_{\text{hid}}^{\text{AD}}}{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \quad (71)$$

La representación del primer término de la Ec 71 frente al inverso de la concentración de NBP, permite determinar el cociente $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ y el coeficiente de absorción molar del aducto.

3.2.3.2.2. Método experimental

El Esquema 3.11. muestra el seguimiento cinético de la reacción de alquilación de la NBP por el óxido de acetonitrilo.

El aducto NBP-ACNO en presencia de una base como la trietilamina adquiere color, lo que permite seguir su formación en la región visible del espectro (Figura 3.11.). La longitud de onda seleccionada para estudiar la reacción de alquilación corresponde a su máximo de absorción, $\lambda = 519 \text{ nm}$.



Esquema 3.11. Seguimiento de la reacción de alquilación de la NBP por el óxido de acetonitrilo

Se ha trabajado con exceso de NBP frente al ácido etilnitrólico y a pH constante mediante el empleo de disoluciones reguladoras. Como la molécula de NBP es poco soluble en agua, se han utilizado mezclas agua:dioxano en proporción 7:3 (v/v).

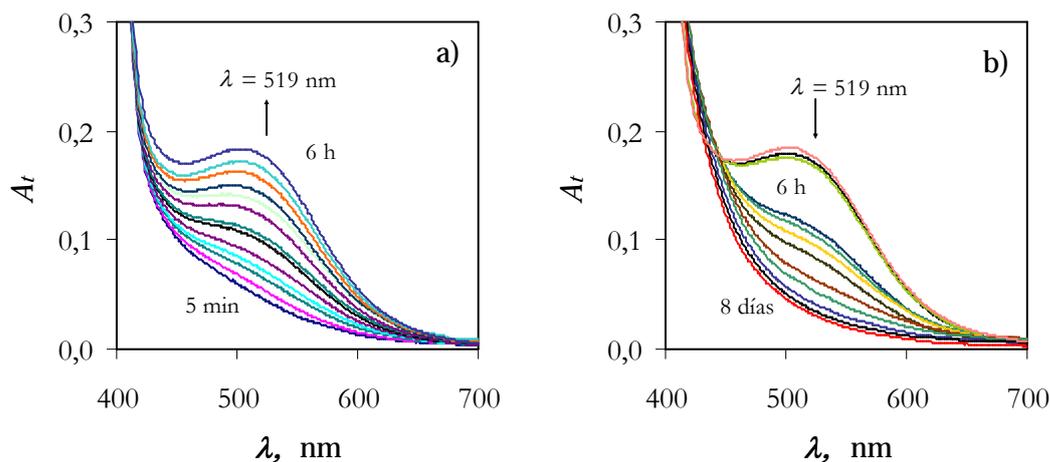


Figura 3.11. (a) Espectrogramas que muestran la variación de la absorbancia del aducto en su formación y (b) descomposición. Medio 7:3 (Tampón borato:dioxano) pH 9,17; $T = 30,0$ °C; $[\text{ENA}]_0 = 8,37 \times 10^{-4}$ M; $[\text{NBP}]_0 = 2,6 \times 10^{-2}$ M.

3.2.4. Reactivos y equipo de trabajo

3.2.4.1. Reactivos utilizados

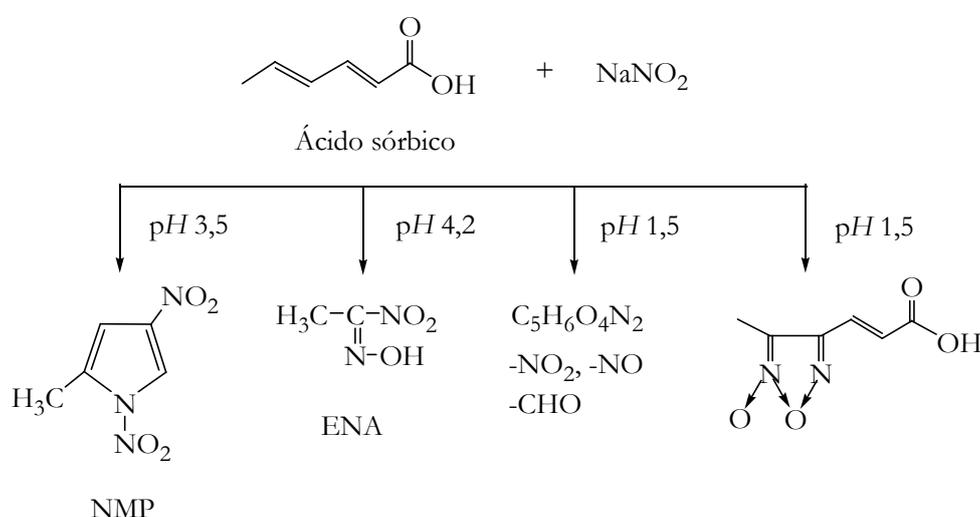
Los reactivos ácido acético glacial y dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, utilizados para preparar las disoluciones reguladoras, son Panreac PRS. El tetraborato de sodio decahidratado es Merck.

El agua deuterada utilizada para estudiar el efecto cinético isotópico en las reacciones de descomposición del ENA y del NMP es un reactivo Aldrich (98%).

Las especies NMP y ENA se han sintetizado a partir del ácido sórbico y del nitroetano, respectivamente, como se indica a continuación.

3.2.4.2. Síntesis de NMP

La especie 1,4-dinitro-2-metilpirrol se ha obtenido por reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico. En el Esquema 3.12. se muestran los principales productos de la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico en función del pH (Namiki *et al.*, 1981). La formación mayoritaria de un producto u otro depende del pH del medio de reacción (véase Apartado 2.8.).



Esquema 3.12. Influencia del pH en la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico

El NMP se forma en el intervalo de pH comprendido entre 3,0 y 5,0 con un máximo en pH 3,5 mientras que la formación del ácido etilnitroso (ENA) tiene lugar entre pH 3,5 y 5,0 obteniéndose mayor rendimiento en pH 4,2. A pH 1,5 estos productos son reemplazados por otras especies como las mostradas en el Esquema 3.12., especies que contienen grupos funcionales del tipo -NO₂, -NO o -CHO y un derivado del furoxano además de otros productos minoritarios no identificados. Por encima de pH 6 la reacción no tiene lugar (Namiki *et al.*, 1981).

Para optimizar el rendimiento de la reacción de formación del NMP se ha trabajado con exceso de nitrito sódico frente al ácido sórbico (8:1) a pH 3,5, como muestra la Figura 3.12. (Namiki *et al.*, 1981).

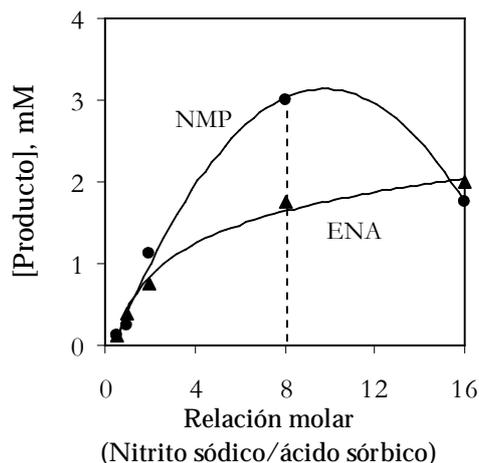


Figura 3.12. Efecto de la relación molar entre el nitrito sódico y el ácido sórbico en la reacción de formación de NMP y ENA. El ácido sórbico (20 mM) reacciona con el nitrito sódico a pH 3,5 y $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.

La especie NMP se ha obtenido por reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico en disolución acuosa a pH 3,5.

La disolución de nitrito sódico (11,0 g) se añade a una disolución de ácido sórbico (2,2 g) en un volumen total de 200 cm^3 , de manera que las concentraciones de ambas especies en la mezcla de reacción resultan 0,1 y 0,8 M, respectivamente. La reacción tiene lugar a pH constante (pH 3,5) mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado durante dos horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La extracción del producto se ha llevado a cabo con cuatro porciones de 50 cm^3 de diclorometano. Los extractos se lavan con agua, se secan con sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente en el rotavapor.

El residuo obtenido tiene impurezas, observadas en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ en cloroformo. Las estructuras de las posibles especies presentes se muestran en la Figura 3.13.

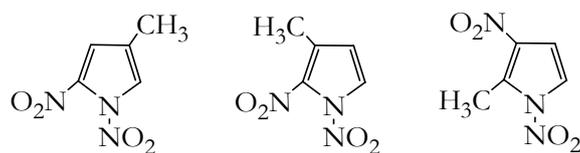


Figura 3.13. Posibles impurezas presentes en el residuo obtenido en la reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico.

La recristalización del NMP se ha llevado a cabo en cloroformo-éter. Las señales obtenidas en el espectro de ^1H -RMN del sólido puro en cloroformo deuterado son las siguientes (véase Apéndice A):

Experimental: ^1H -RMN (CDCl_3): δ 2,64 (s, 3H, CH_3), 7,9 (d, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-N-NO}_2$), 8,8 (d, 1H, CH-N-NO_2).

Resultados bibliográficos (Kito y Namiki, 1978): ^1H -RMN (CDCl_3): δ 2,65 (s, 3H, CH_3), 7,91 (d, 1H, $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-N-NO}_2$), 8,88 (d, 1H, CH-N-NO_2).

Las señales obtenidas en el espectro vis-UV de la especie NMP en disolución acuosa son: UV λ_{max} en nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 209 (11.621 ± 123), 229 (17.428 ± 135), 270 (13.551 ± 107), 329 (8.764 ± 66), 385 (1.806 ± 19).

La masa calculada para $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ (M^+Na) es 194,017227, el valor encontrado es 194,0187.

Los reactivos utilizados en la síntesis del NMP han sido:

El ácido sórbico, el nitrito sódico y el ácido sulfúrico empleados son Panreac PRS.

El diclorometano PA utilizado en la extracción del producto y los disolventes empleados en el proceso de recristalización, el cloroformo y el éter, han sido productos Panreac.

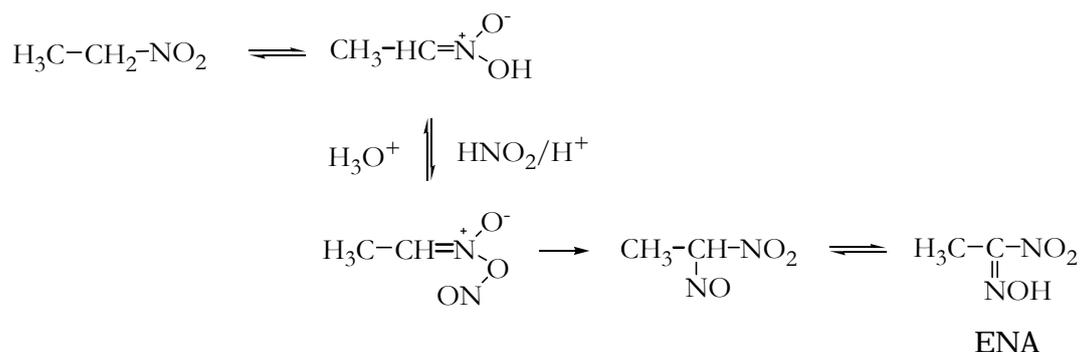
Los espectros de ^1H -RMN se han obtenido con un espectrómetro *Mod. Mercury VS2000* (200 MHz).

Para determinar la masa del producto se ha utilizado un espectrómetro de masas *QSTAR XL TOF-MS* (Applied Biosystems).

3.2.4.3. Síntesis de ENA

El ácido etilnitroso se ha sintetizado por reacción de nitrosación del nitroetano en medio ácido (Pérez Prior *et al.*, 2008).

El nitroetano reacciona rápidamente con ácido nitroso como ácido nítrico. El mecanismo de reacción se resume en el Esquema 3.13. La reacción podría transcurrir de forma irreversible en el átomo de oxígeno del ácido nítrico seguido de un reordenamiento del grupo nitroso (Iglesias y Williams, 1988).



Esquema 3.13. Mecanismo de nitrosación de nitroetano para generar ácido etilnitrólico (ENA).

La síntesis del ENA se ha hecho mediante un procedimiento análogo al empleado para la obtención de nitrosaminas (Roberts e Ingold, 1973).

El nitrito sódico (8,9 g) se añade a una disolución de nitroetano (8 cm³) en disolución acuosa de hidróxido sódico (4,3 g en 100 cm³) a 0 °C. A temperaturas superiores a 20 °C se forman óxidos de nitrógeno. Se trabaja con pequeño exceso de nitrito sódico. Simultáneamente a la adición del nitrito sódico, se añade lentamente una disolución de ácido sulfúrico (5 M) para mantener el pH ácido en la mezcla durante el tiempo de reacción.

La extracción del producto ENA se lleva a cabo con tres porciones de 50 cm³ de éter. Los extractos se secan con sulfato sódico anhidro y se evapora el disolvente en el rotavapor.

El residuo se recristaliza con diclorometano-hexano. Debido a la inestabilidad del ENA a temperatura ambiente, se almacena a 0 °C y en atmósfera de Ar.

Las señales obtenidas en el espectro de ¹H-RMN del sólido recristalizado se muestran a continuación (véase Apéndice A).

Experimental: ¹H-RMN (CDCl₃): δ 2,46 (s, 3H, CH₃), 9,3 (ancho y variable, 1H, OH) Resultados bibliográficos (Namiki y Kada, 1975): ¹H-RMN (CDCl₃): δ 2,5 (s, 3H, CH₃), 9,9 (ancho y variable, 1H, OH).

El espectro vis-UV de la especie ENA presenta los siguientes picos: UV λ_{max} in nm (ε, M⁻¹cm⁻¹): 240 (pH ácido, 4341 ± 29), 328 (pH básico, 8237 ± 17).

El punto de fusión del sólido obtenido es 85 °C.

Los reactivos utilizados han sido:

El nitroetano (96 %) es Aldrich y el hidróxido sódico es Fluka (≥ 98 %). El hexano utilizado como disolvente de extracción es Panreac.

El resto de reactivos empleados en la síntesis del ENA están descritos en el Apartado 3.2.4.2.

3.2.4.4. Equipo de trabajo

El equipo de trabajo utilizado para llevar a cabo el seguimiento cinético de las reacciones de descomposición y alquilación se describe en el Apartado 3.1.4.2.

-
- Agree, A. M.; Meeker, R. L. *Talanta*, **1966**, *13*, 1151.
Braun, C. E.; Seydel, P. V.; Sauer, C. W.; Dubin, I. M.; Chao, Y. T.; Lemiey, J. D.; Mass. Inst. of Technol., Cambridge, Mass. MIT-MR N° 177, September 21. 1945 (resultados sin publicar).
Brown, W. G. Office of Scientific Research and Development, OSRD 140, September 22. 1941 (resultados sin publicar).
Dacosta, Y. *L'Acide Sorbique et les Sorbates*; CDIUPA: Massy, France, 1994.
Egan, E.; Clery, M.; Hegarty, A. F.; Welch, A. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1991**, 249.
Eklund, T. *J. Appl. Bacteriol.* **1983**, *54*, 383.
Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1435.
Espenson, J. H. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms* 2ª Ed McGraw-Hill International Edition 1995.
Food Safety and Hygiene; Bulletin for the Australian Food Industry, June 2003; p2.
Gehauf, B. Chemical Warfare Service. CWS Field Lab., Memo 1-2-8, **1943**.
Hartman, P. E. *Environ. Mutagen.* **1983**, *5*, 217.
Hemminki, K. *Chem. Biol. Interact.* **1981**, *34*, 323.
Iglesias, E.; Williams, D. L. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1988**, 1035.
Kim, J. H.; Thomas, J. J. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1992**, *49*, 879.
Kito, Y.; Namiki, M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 505.
Koenigs, E.; Kohler, K.; Blindow, K. *Ber.* **1925**, *58*, 933.
Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 193.
Mora Díez, N.; Senent, M. L.; García, B. *Chem. Phys.* **2005**, *324*, 350.
Namiki, M.; Kada, T. *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1335.
Namiki, M.; Uda, S.; Osawa, T.; Tsuji, K.; Kada, T. *Mut. Res.* **1980**, *73*, 21.
Namiki, M.; Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, K.; Tsuji, K. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 407.
Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Caballero, M. C.; Casado, J. J. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11824.
Po, H. N.; Senozan, N. M. *J. Chem. Ed.* **2001**, *78*, 1499.
Roberts, J. R.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 3228.
Sawicki, E.; Bender, D. F.; Hauser, T. R.; Wilson, R. M.; Meeker, J. E. Jr.; Meeker, J. E. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1479.
Senent, M. L.; Niño, A.; Muñoz Caro, C.; Ibeas, S.; García, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6535.
Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Cancer Surv.* **1989**, *8*, 401.
Swift, E. H.; Gould, C. W.; Holzman, G.; Sease, J. W.; Niemann, C. Chemical Warfare Service. CWS Field Lab., Memo 1-2-16, July **1943** (resultados sin publicar).

CAPÍTULO 4

Resultados y discusión

«The characteristics of sorbic acid which make it a better preservative for foods include its very low acute toxicity; higher solubility of its salts; absence of taste, odor, and color when used in proper concentration; antimicrobial action even at higher pH (6.0-6.5); and its metabolization by normal physiological pathways»

B. R. Thakur, K. Singh, S. S. Arya, 1994

4. Resultados y discusión

4.1. Reacción de alquilación de NBP por el ácido sórbico y sus sales

4.1.1. Reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico

4.1.1.1. Formación del aducto NBP-ácido sórbico

La alquilación de la 4-(*p*-nitrobenzil)piridina (NBP) por el ácido sórbico transcurre con la forma no disociada del ácido (HS) como agente alquilante, para formar el aducto NBP-HS (véase Apartado 3.1.2.1.).

Como la NBP es un nucleófilo fuerte, puede reaccionar en las posiciones 3 ó 5 de la molécula de ácido sórbico (Khandelwal y Wedzicha, 1990) (Figura 4.1.; véase Apartado 2.4.).

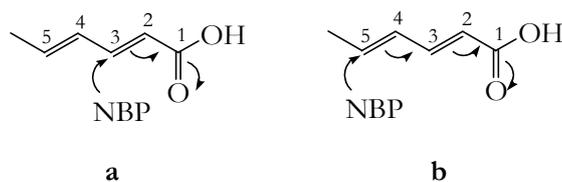


Figura 4.1. Reacción de adición de la NBP en el carbono 3 (a) y 5 (b) de la molécula de ácido sórbico.

La adición en C5 parece más favorable, debido a la mayor deslocalización de la carga en la especie resultante del ataque nucleofílico en dicha posición (Khandelwal y Wedzicha, 1990). Para verificar esta adición en C5 se han calculado las barreras energéticas (Apartado 3.1.2.2.4.) correspondientes a las diferencias de energía, entalpía y energía libre de Gibbs entre los reactivos y los respectivos estados de transición en las posiciones C5 y C3 (Tabla 4.1.)

Tabla 4.1. Valores de energía, entalpía y energía libre de Gibbs de activación para las reacciones de adición de la NBP sobre la molécula de ácido sórbico en C3 y C5.

Reacción entre el ácido sórbico y la NBP	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger_{25^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
C3	98	101	152
C5	84	87	137

Como puede verse, la energía para la adición en C3 es superior que en C5. Ello, junto a la existencia de una mayor deslocalización electrónica en el aducto resultante de la adición en C5, sugiere que la formación del aducto NBP-ácido sórbico transcurre en este sitio.

La etapa posterior a la formación del aducto es la protonación del mismo, que puede tener lugar en los carbonos 2 ó 4 de la molécula del ácido para formar los compuestos α,β ó β,γ -insaturado, respectivamente.

De forma general, la estabilidad de los dobles enlaces α,β -insaturados es mayor que la que presentan los β,γ -insaturados (*cf.*, por ej., Gómez Bombarelli, *et al.*, 2009). Así en la molécula de butenoato de metilo cuya estructura es semejante a la del sorbato, la estabilidad de su isómero α,β -insaturado es mayor que la del β,γ -insaturado (Figura 4.2.)

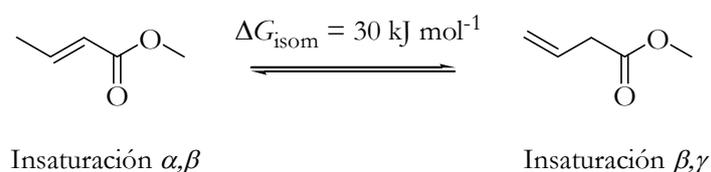
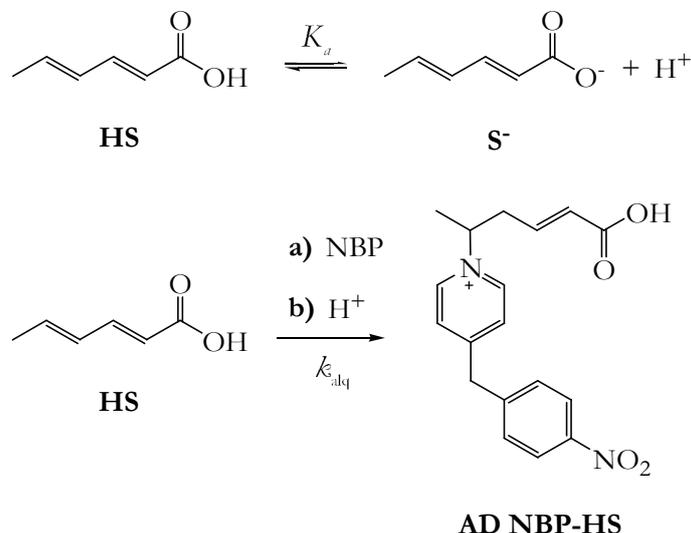


Figura 4.2. Energía de isomerización entre los isómeros del butenoato de metilo.

Así pues, la alquilación de la NBP por el ácido sórbico tendrá lugar en el carbono 5 de la molécula del ácido y su posterior protonación conducirá al aducto NBP-HS con un doble enlace α,β -insaturado (Esquema 4.1).



Esquema 4.1. Mecanismo de la reacción de alquilación de la NBP por ácido sórbico.

El seguimiento cinético de la reacción de alquilación se ha llevado a cabo en medios de acidez constante. Para ello se ha empleado la propia mezcla sórbico/sorbato como sistema regulador, utilizando como bases hidróxido sódico y potásico (véase Apartado 3.1.2.).

4.1.1.2. Ecuación de velocidad

La ecuación de velocidad manejada para la reacción de formación del aducto NBP-HS (véase Apartado 3.1.2.) es:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{alk} \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{S}][\text{NBP}] \quad (4)$$

donde [S] es la concentración de sorbato total -suma de la forma disociada y sin disociar del ácido sórbico- y [NBP] la concentración de NBP sin protonar (Esquema 4.2.).

Como se trabaja en un margen de pH próximo al valor del pK_{a1} de la NBP ($pK_{a1} = 4,3$ en un medio 7:3 agua:dioxano) una fracción importante de la misma se encuentra protonada (NBPH⁺):



Esquema 4.2. Equilibrio ácido base de la NBP

Por tanto, la constante de equilibrio de desprotonación de la especie NBPH^+ se puede escribir de la forma:

$$K_{a1} = \frac{[\text{NBP}][\text{H}^+]}{[\text{NBPH}^+]} = 10^{-4,3} \quad (72)$$

Como la concentración total de NBP es la suma de las concentraciones de sus formas ácida (NBPH^+) y básica (NBP):

$$[\text{NBP}]_{\text{total}} = [\text{NBPH}^+] + [\text{NBP}] \quad (73)$$

la concentración de NBP se puede conocer con la Ec 74, para un determinado valor de pH :

$$[\text{NBP}] = [\text{NBP}]_{\text{total}} \frac{1}{10^{4,3}[\text{H}^+] + 1} \quad (74)$$

Se ha manejado la ecuación de velocidad integrada en términos de absorbancia:

$$\ln\left(\frac{A_{\infty} - A_0}{A_{\infty} - A_t}\right) = k_1 t \quad (8)$$

definidos A_0 , A_t y A_{∞} , como la absorbancia del aducto inicial, a tiempo t y a tiempo infinito, respectivamente.

La pendiente de la recta obtenida al representar el primer miembro de la Ec 8 frente al tiempo (Figura 4.3.b) permite conocer la pseudoconstante de velocidad de orden uno. La Figura 4.3.a muestra, como ejemplo, la variación de la absorbancia del aducto con el tiempo (Ec 12) para el sistema ácido sórbico/sorbato potásico.

$$A_t = A_{\infty} (1 - e^{-k_1 t}) + A_0 e^{-k_1 t} \quad (12)$$

El buen ajuste de los resultados experimentales a la ecuación integrada de velocidad (Figura 4.3.a y 4.3.b) verifica el orden uno con respecto a la concentración de NBP, que es el reactivo limitante. En el caso del sistema ácido sórbico/sorbato sódico se verifica también orden uno respecto a la concentración de NBP.

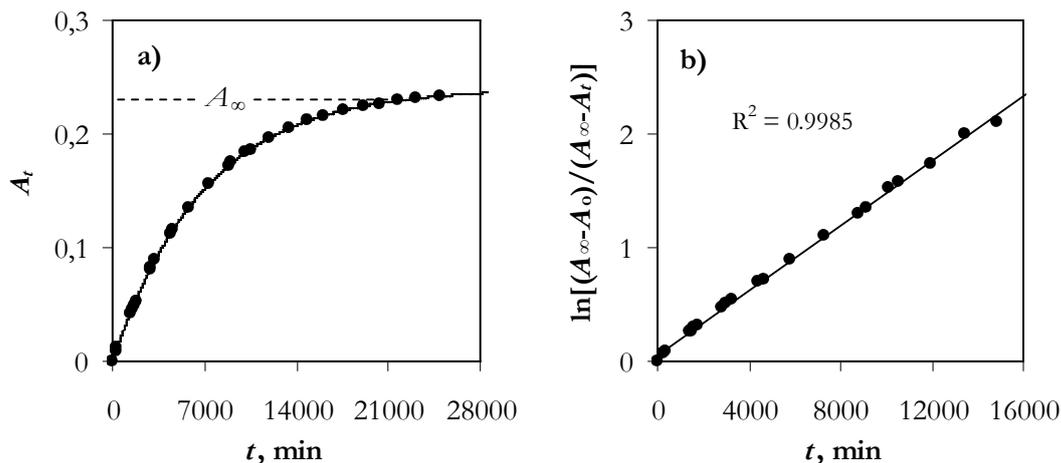


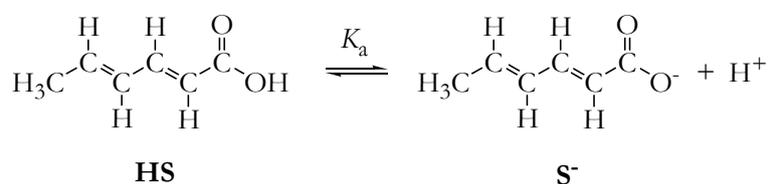
Figura 4.3. (a) Variación de la absorbancia del aducto NBP-Sorbato con el tiempo a una longitud de onda $\lambda = 580$ nm. (b) Ajuste lineal de los resultados a la Ec 8. Medio 7:3, agua:dioxano; pH 5,78; $T = 35,0$ °C; $[\text{NBP}]_0 = 2,90 \times 10^{-3}$ M; $[\text{S}]_0 = 0,15$ M; $[\text{KOH}]_0 = 0,1$ M.

Como la constante de velocidad de descomposición del ácido sórbico en disolución acuosa es muy pequeña, $k_{\text{des}} = 1,5 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ a pH 5,0 y $T = 37,0$ °C (Arya, 1980) su influencia en la reacción de alquilación no se ha tomado en consideración.

4.1.1.3. Determinación del pK_a del ácido sórbico

La especie efectiva en la reacción de alquilación de la NBP por ácido sórbico es la forma no disociada por tanto es necesario conocer su concentración en la mezcla de reacción, $[\text{HA}] = [\text{H}^+][\text{S}]/(K_a + [\text{H}^+])$, donde K_a es la constante de disociación del ácido.

La determinación de K_a (Esquema 4.3.) en agua y en mezclas agua:dioxano se ha llevado a cabo espectrofotométricamente y mediante volumetría ácido-base (véase Apartado 3.1.2.2.2. y Apéndice C).



Esquema 4.3. Estructuras de las especies ácida (HS) y básica (S⁻) del ácido sórbico.

4.1.1.3.1. Método espectrofotométrico

La Figura 4.4.a muestra los espectrogramas del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano, al modificar el pH del medio, pH 3,8-9,2, con hidróxido sódico. La

variación de la absorbancia a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del ácido sórbico ($\lambda = 265$ nm) permite conocer el valor de la constante de disociación mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (Figura 4.4.b):

$$pH = pK_a + \log \frac{[S^-]}{[HS]} = pK_a - \log \frac{A_{S^-} - A_{\lambda}}{A_{\lambda} - A_{HS}} \quad (13)$$

donde A_{HS} y A_{S^-} son las absorbancias de las formas no disociada ($\lambda = 265$ nm, $pH \sim 3,8$ en medio 7:3, agua:dioxano) y disociada ($\lambda = 265$ nm, $pH \sim 9,2$ en medio 7:3) respectivamente y A_{λ} es la absorbancia del ácido sórbico a diferentes valores de pH (*cf.* Apartado 3.1.2.2.2.).

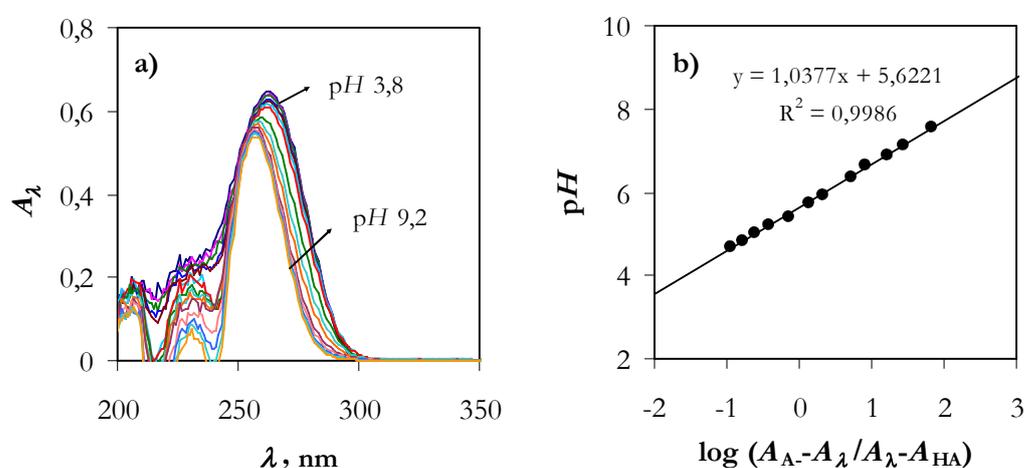


Figura 4.4. (a) Espectrogramas del ácido sórbico a diferentes valores de pH y (b) determinación del pK_a del ácido sórbico, $\lambda = 265$ nm en medio 7:3, agua:dioxano, a $T = 25,0$ °C. $[HS] = 2,85 \times 10^{-5}$ M.

El valor de pK_a obtenido es $pK_a = 5,6 \pm 0,1$ a $T = 25,0$ °C y medio 7:3. agua:dioxano.

Como la variación de K_a con la T en el intervalo de temperatura en que se ha trabajado es muy pequeña, no se ha tenido en cuenta.

4.1.1.3.2. Método volumétrico

La constante de disociación del ácido sórbico se ha medido también mediante volumetría ácido-base (*cf.* Apartado 3.1.2.2.2.).

A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 4.5.a la curva de valoración del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano. Conocido el volumen de hidróxido sódico consumido en la valoración, se puede conocer el valor del pK_a (Figura 4.5.b):

$$pH = pK_a + \log \frac{V}{V_{\max} - V} \quad (14)$$

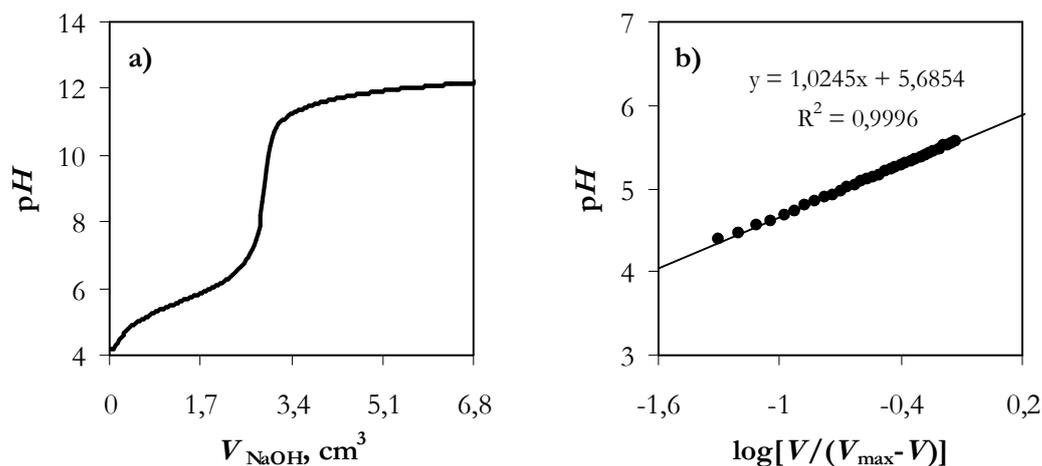


Figura 4.5. (a) Curva de valoración del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano y (b) determinación del pK_a del ácido sórbico a $T = 25,0$ °C. $[\text{HS}] = 2 \times 10^{-3}$ M; $[\text{NaOH}] = 9,38 \times 10^{-3}$ M.

El valor del pK_a obtenido es: $pK_a = 5,6 \pm 0,1$ a $T = 25,0$ °C y medio 7:3, agua:dioxano. Este valor coincide con el determinado mediante espectrofotometría.

Para conocer la influencia del medio de reacción sobre la constante de disociación del ácido sórbico, se ha determinado su valor en diferentes medios agua:dioxano. Como el valor obtenido para la constante de disociación es el mismo con ambos métodos, se ha medido en medios con diferente proporción de dioxano mediante volumetría ácido-base. La Tabla 4.2 recoge los resultados.

Tabla 4.2. Constante de disociación del ácido sórbico en diferentes medios agua:dioxano; $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Agua:dioxano (v/v)	$10^5 K_a^a$ (M)	ϵ^b
10/0	$1,5 \pm 0,3$	78,49
9/1	$1,0 \pm 0,3$	69,71
8/2	$0,5 \pm 0,1$	60,84
7/3	$0,25 \pm 0,05$	51,92
6/4	$0,08 \pm 0,02$	42,99
5/5	$0,030 \pm 0,007$	34,27

^a Valor promedio

^b Resultados bibliográficos (Timmermans, 1960; Akerlof y Sort, 1936) o calculados mediante interpolación lineal a partir de estos (véase Apéndice C).

Al relacionar la constante dieléctrica del disolvente con el mecanismo de reacción en procesos que implican cambios en el momento dipolar, como la formación de iones amonio cuaternarios (Vaneven y Haulait-Pirson, 1977), la solvolisis (Smith *et al.*, 1961) o la transferencia protónica (Brzezinski y Zundel, 1983; Fritsch y Zundel, 1981) se ha observado una dependencia entre la constante de velocidad y la constante dieléctrica. Esta relación se establece entre la constante de velocidad, su inverso o el logaritmo de la misma y el coeficiente de Onsager (Kalsi *et al.*, 1987). Se ha comprobado (Fritsch y Zundel, 1981) que el equilibrio que implica una transferencia protónica del tipo $\text{OH}\cdots\text{N} \rightleftharpoons \text{O}^- \cdots \text{H}^+\text{N}$ está desplazado a favor de la estructura polar en proporción con el parámetro de Onsager $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$ (Onsager, 1936). Este hecho puede ser la causa de la interacción entre el momento dipolar del enlace de hidrógeno y el campo resultante de la polarización del entorno por el dipolo (Fritsch y Zundel, 1981).

En la Figura 4.6. se muestra la variación de la constante de disociación del ácido sórbico en medios agua:dioxano con el parámetro de Onsager $(\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1)$ (Onsager, 1936) observándose una relación lineal entre el $\ln K_a$ y dicho parámetro. Según el comportamiento mostrado en la Figura 4.6., podría decirse que el equilibrio $\text{HS} \rightleftharpoons \text{S}^- + \text{H}^+$ ocurre a través del mecanismo mostrado en el Esquema 4.4.

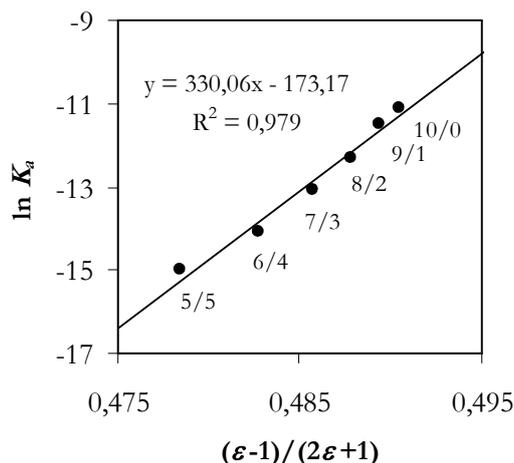
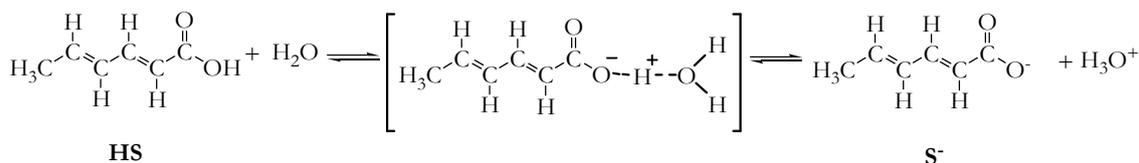


Figura 4.6. Variación de la constante de disociación del ácido sórbico en medios agua:dioxano con el coeficiente de Onsager a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$.



Esquema 4.4. Formación de enlaces $\text{O}\cdots\text{H}$ en el equilibrio de disociación del ácido sórbico.

4.1.1.4. Influencia del pH

Para determinar la influencia que el pH ejerce sobre la constante de velocidad de alquilación de la NBP por ácido sórbico, se ha trabajado en un intervalo de pH comprendido entre 5-6. Por debajo de pH 5 la forma predominante del ácido sórbico es la ácida (pK_a 5,6 en medio 7:3 agua:dioxano a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$) y, como la solubilidad del ácido sórbico en agua es muy baja ($1,6\text{ g l}^{-1}$ a $25,0\text{ }^\circ\text{C}$; Thakur, 1994) hay problemas de solubilidad. Para valores de $\text{pH} > 6$, como la forma disociada del ácido sórbico es la que predomina, la reacción de alquilación de la NBP es muy lenta, del orden de meses.

Para mantener la acidez constante a lo largo de la reacción se han utilizado las mezclas ácido sórbico/sorbato potásico y ácido sórbico/sorbato sódico como sistemas reguladores (*cf.* Apartado 3.1.2.).

La Tabla 4.3. recoge los valores de las pseudoconstantes de velocidad de orden uno k_1 en función del pH para los dos sistemas estudiados, HS+NaOH y HS+KOH, donde HS es la forma no disociada del ácido sórbico.

Tabla 4.3. Efecto del pH en la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en los sistemas HS+KOH y HS+NaOH en 7:3, agua:dioxano; $T = 35,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

HS+NBP+KOH ^a			HS+NBP+NaOH ^b		
pH	[S] (M)	$10^4 k_1^c$ (min^{-1})	pH	[S] (M)	$10^4 k_1^c$ (min^{-1})
-	-	-	5,46	0,20	$2,88 \pm 0,04$
5,59	0,19	$2,96 \pm 0,04$	5,59	0,19	$2,18 \pm 0,03$
5,65	0,18	$2,31 \pm 0,02$	5,65	0,18	$1,90 \pm 0,03$
5,78	0,15	$1,43 \pm 0,01$	5,80	0,15	$1,34 \pm 0,01$
5,89	0,14	$1,06 \pm 0,02$	-	-	-
-	-	-	6,05	0,13	$0,61 \pm 0,02$
-	-	-	6,32	0,11	$0,44 \pm 0,01$

^a[KOH] = 0,1 M; ^b[NaOH] = 0,1 M

^cDesviación estándar

[NBP]₀ = $2,80\text{-}2,97 \times 10^{-3}$ M (pH 5,46-6,32)

La dependencia de k_1 con la acidez del medio viene dada por la siguiente expresión:

$$k_1 = k_{\text{alq}} \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{S}] \quad (6)$$

donde K_a la constante de equilibrio de disociación del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano, previamente calculada, $K_a = 2,5 \times 10^{-6}$ M.

La representación de la pseudoconstante de velocidad de orden uno k_1 frente al cociente $[\text{H}^+][\text{S}]/(K_a + [\text{H}^+])$ es una línea recta (Figura 4.7.). Así se verifica la Ec 6. Con el valor de la pendiente de la recta obtenida se conoce la constante de alquilación de la NBP por el ácido sórbico k_{alq} .

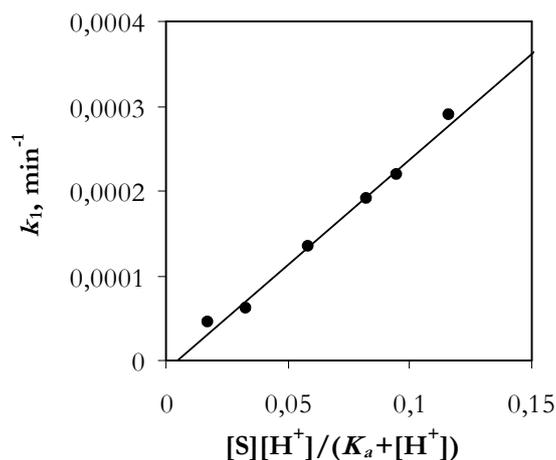


Figura 4.7. Variación de la pseudo-constante de velocidad de alquilación de la NBP por el ácido sórbico con $[H^+][S]/(K_a + [H^+])$ en 7:3, agua:dioxano, en la mezcla HS+NBP+NaOH. $T = 35,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[NBP]_0 = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$.

4.1.1.5. Parámetros de activación

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la constante de alquilación de la NBP por el ácido sórbico se ha trabajado en un intervalo de temperatura comprendido entre 30,0 y 37,5 $^\circ\text{C}$. La Tabla 4.4. recoge los valores de las constantes de orden dos, k_{alq} , a diferentes temperaturas.

Tabla 4.4. Influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en los sistemas HS+KOH y HS+NaOH en 7:3, agua:dioxano.

T ($^\circ\text{C}$)	$10^5 k_{\text{alq}}^a$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	
	HS+NBP+KOH ^b	HS+NBP+NaOH ^c
30,0	$4,1 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$
32,5	$5,0 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$
35,0	$6,5 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,2$
37,5	$7,3 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,1$

^aDesviación estándar

^b $[\text{KOH}] = 0,1 \text{ M}$; $[\text{NBP}]_0 = 2,86 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{S}] = 0,19 \text{ M}$

^c $[\text{NaOH}] = 0,1 \text{ M}$; $[\text{NBP}]_0 = 2,82 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{S}] = 0,20 \text{ M}$

Los parámetros de activación se han determinado con las ecuaciones de Arrhenius y Eyring-Wynne-Jones:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (75)$$

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \ln \frac{h}{k_B} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad (76)$$

La Figura 4.8. muestra el cumplimiento de las Ec 75 y 76 con los sistemas ácido sórbico/sorbato potásico y ácido sórbico/sorbato sódico.

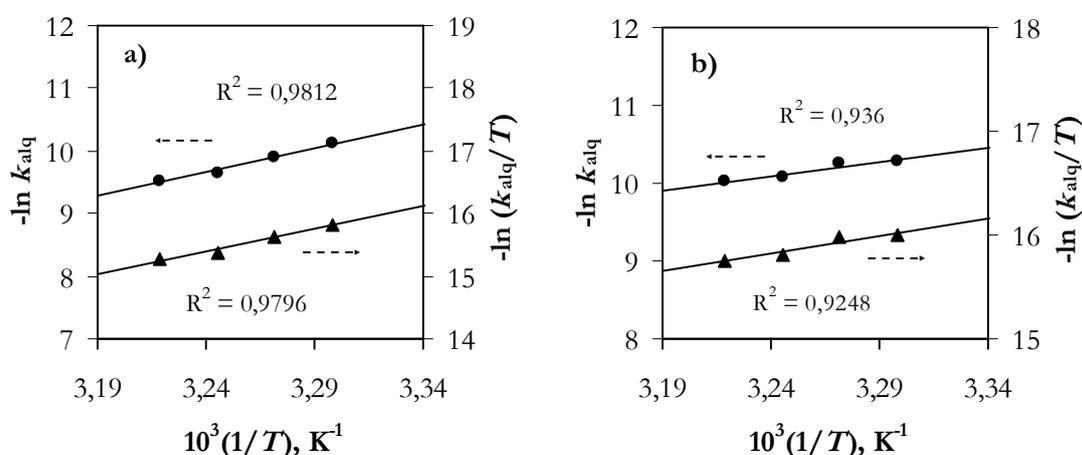


Figura 4.8. Representación de Arrhenius (●) y Eyring (▲) para la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en los sistemas (a) HS+NBP+KOH y (b) HS+NBP+NaOH.

Los valores de la energía y la entalpía de activación obtenidos para los sistemas ácido sórbico/sorbato potásico y ácido sórbico/sorbato sódico se recogen en la Tabla 4.5. Debido al elevado error asociado a la entropía de activación, no se ha tenido en consideración.

La entalpía de activación obtenida para la reacción entre NBP y ácido sórbico, $\Delta H^\ddagger = 87 \text{ kJ mol}^{-1}$, es acorde con la entalpía de activación para el sistema ácido sórbico/sorbato potásico. En presencia del ión Na^+ este valor se reduce aproximadamente a la mitad.

Tabla 4.5. Influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en los sistemas HS+KOH y HS+NaOH en 7:3, agua:dioxano.

Mezcla de reacción	E_a^a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)
HS+NBP+KOH ^b	63 ± 6	60 ± 6
HS+NBP+NaOH ^c	31 ± 6	28 ± 6

^aDesviación estándar

^b[KOH] = 0,1 M; [NBP]_o = 2,86 × 10⁻³ M; [S] = 0,19 M

^c[NaOH] = 0,1 M; [NBP]_o = 2,82 × 10⁻³ M; [S] = 0,20 M

Debido a las diferencias observadas en ΔH^\ddagger para los dos sistemas estudiados donde la única diferencia es el ión metálico presente en el medio, Na⁺ o K⁺, se ha estudiado la posible influencia de estos cationes en la constante de disociación del ácido sórbico.

El valor de pK_a obtenido para el ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano, a $T = 25,0$ °C, para el sistema ácido sórbico/sorbato sódico es $pK_a = 5,6 \pm 0,1$, (véase Apartado 4.1.1.3.) coincidente con el encontrado para el sistema ácido sórbico/sorbato potásico.

Al no observarse variación alguna en el valor de la constante de disociación del ácido sórbico en presencia los iones metálicos Na⁺ y K⁺, se estudió la influencia de estos en el comportamiento del anión sorbato (S⁻) en disolución acuosa mediante medidas de conductividad. Se midió la conductividad molar límite del anión sorbato en las sales sódica y potásica de dicho ácido, así como la constante de asociación iónica en ambos casos (K_{NaS} y K_{KS}) (Tabla 4.6.; *cf.* Apéndice E).

Tabla 4.6. Conductividad molar límite de las sales sódica y potásica del ácido sórbico y del anión sorbato y constante de asociación iónica

Compuesto	Λ° (S cm ² mol ⁻¹) ^a	K	λ_S° (S cm ² mol ⁻¹)
Sorbato sódico	84,0 ± 0,2	5,7 ± 0,4	33,9
Sorbato potásico	106,5 ± 0,2	6,2 ± 0,3	33,0

$T = 25,0$ °C

^aDesviación estándar

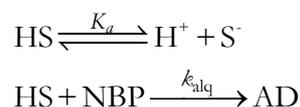
Se observa que las constantes de disociación del ácido sórbico (K_a) y de equilibrio entre los iones, S⁻, Na⁺ o K⁺, y el par iónico asociado, Na⁺S⁻ o K⁺S⁻ (K_{NaS} y K_{KS}), no se ven influenciadas por el catión metálico presente en el medio.

4.1.2. Reacción de alquilación de NBP por sorbato potásico

4.1.2.1. Ecuación de velocidad

Conocida la capacidad alquilante del ácido sórbico frente a la NBP se ha abordado el estudio de la actividad alquilante del sorbato potásico, sal empleada habitualmente como conservante alimentario debido a su elevada solubilidad en disolución acuosa (>50 % a 25 °C) comparada con la del ácido sórbico (0,16 % a 25 °C; Thakur *et al.*, 1994).

La forma no disociada HS, en equilibrio ácido base con la forma disociada S⁻, reacciona con la molécula de NBP para dar lugar al aducto NBP-HS (AD), comportamiento análogo al observado para el ácido sórbico puesto que la especie alquilante (HS) es la misma en ambos casos (*cf.* véase Apartado 3.1.2. y Esquema 4.5).



Esquema 4.5. Mecanismo de la reacción de alquilación de la NBP por el sorbato potásico.

La ecuación de velocidad integrada expresada en términos de absorbancia tiene la siguiente forma:

$$A_t = A_\infty (1 - e^{-k_1 t}) + A_0 e^{-k_1 t} \quad (12)$$

La Figura 4.9.a muestra el ajuste de los resultados experimentales a la Ec 12. Para determinar el valor de la pseudoconstante de velocidad k_1 se ha manejado la ecuación linealizada en términos de absorbancia (Ec 8) (Figura 4.9.b).

$$\ln \left(\frac{A_\infty - A_0}{A_\infty - A_t} \right) = k_1 t \quad (8)$$

El ajuste de los resultados experimentales a las Ec 8 y 12, verifica el orden uno respecto a la concentración de NBP.

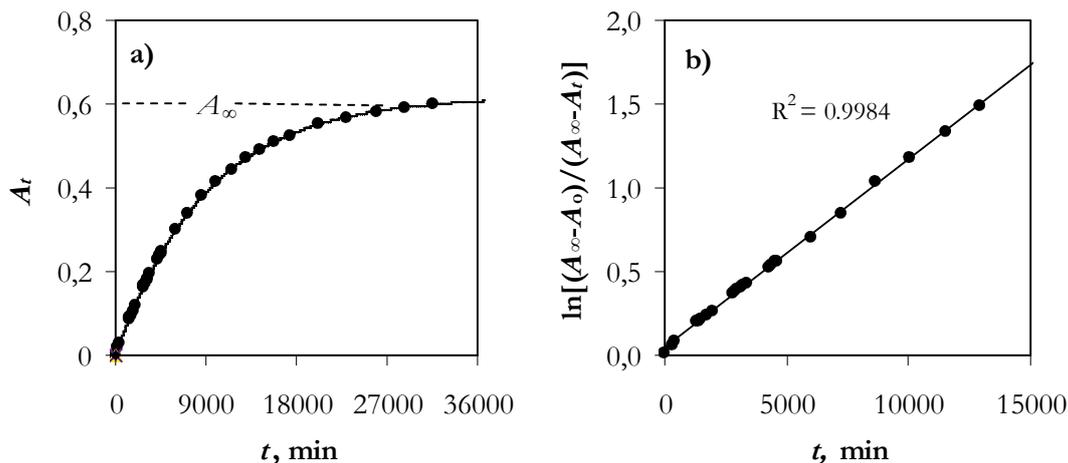


Figura 4.9. (a) Variación de la absorbancia del aducto NBP-Sorbato con el tiempo a una longitud de onda $\lambda = 580$ nm. (b) Ajuste lineal de los resultados experimentales a la Ec 8. Medio 7:3, agua:dioxano; pH 5,53; $T = 35,0$ °C; $[\text{NBP}]_0 = 2,83 \times 10^{-3}$ M; $[\text{S}]_0 = 0,2$ M; $[\text{HCl}]_0 = 0,1$ M.

4.1.2.2. Influencia del pH

Para conocer la influencia del pH sobre la constante de alquilación de NBP por sorbato se ha trabajado en medios de diferente acidez con la mezcla reguladora KS/HCl. En la Tabla 4.7. se muestran los valores de la pseudoconstante de velocidad de alquilación, k_1 , en el intervalo de pH 5,4-5,9.

Tabla 4.7. Efecto del pH en la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en el sistema KA+HCl en 7:3, agua:dioxano (v/v) a $T = 35,0$ °C.

KS+NBP+HCl ^a			
pH	[S] (M)	[HCl] (M)	$10^4 k_1^a$ (min ⁻¹)
5,42	0,175	0,1	$1,24 \pm 0,01$
5,56	0,175	0,088	$1,27 \pm 0,01$
5,62	0,187	0,087	$1,25 \pm 0,01$
5,66	0,175	0,075	$0,98 \pm 0,01$
5,76	0,162	0,062	$0,90 \pm 0,01$
5,90	0,15	0,05	$0,56 \pm 0,01$

^aDesviación estándar

$[\text{NBP}]_0 = 2,79\text{-}2,93 \times 10^{-3}$ M (pH 5,42-5,9)

La pseudoconstante de velocidad de orden uno, k_1 , viene definida de la forma:

$$k_1 = k_{\text{alq}} \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} [\text{S}] \quad (6)$$

donde K_a es la constante de equilibrio de disociación del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano ($K_a = 2,5 \times 10^{-6}$ M).

La representación del primer miembro de la Ec 6 frente al cociente $[\text{H}^+][\text{S}]/(K_a + [\text{H}^+])$ conduce a una línea recta (Figura 4.10.) cuya pendiente permite conocer la constante de alquilación, k_{alq} .

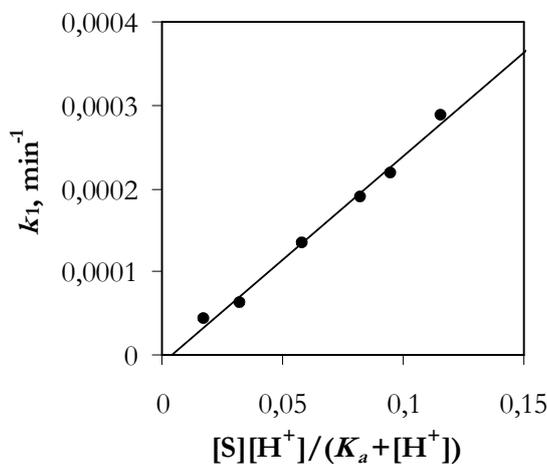


Figura 4.10. Variación de la pseudo-constante de velocidad de alquilación de la NBP por el sorbato con $[\text{H}^+][\text{S}]/(K_a + [\text{H}^+])$ en 7:3, agua:dioxano. $T = 35,0$ °C; $[\text{NBP}]_0 = 3 \times 10^{-3}$ M.

4.1.2.3. Coeficiente de absorción molar del aducto NBP-sorbato

Para conocer el coeficiente de absorción molar del aducto NBP-HS, se ha trabajado con diferentes concentraciones de reactivo limitante, NBP, mantenidas constantes el resto de variables, temperatura, concentración de sorbato total (S) y de ácido clorhídrico que forman la mezcla reguladora.

En la Figura 4.11.a se muestran los perfiles cinéticos obtenidos para las seis mezclas de reacción estudiadas. Se observa el aumento de la absorbancia con el tiempo hasta alcanzar una meseta de absorbancia constante (A_∞). Alcanzado este valor se considera que todo el reactivo en defecto NBP se ha consumido.

Para determinar el valor del coeficiente de absorción del aducto, ϵ_{AD} , se ha manejado la ecuación de Lambert-Beer, $A_{\infty} = \epsilon_{AD} l [\text{NBP}]_0$, siendo l el paso óptico de la cubeta y $[\text{NBP}]_0$ la concentración inicial de la NBP. Como la medida de absorbancia se hace después de diluir con trietilamina ($2,4 \text{ cm}^3$ de la mezcla de reacción KS+HCl+NBP en $0,6 \text{ cm}^3$ de trietilamina, véase Apartado 3.1.2.2.) hay que tener en cuenta esta dilución para expresar la concentración de NBP. La representación de A_{∞} ($\lambda = 580 \text{ nm}$) frente a la concentración inicial de NBP es una línea recta (Figura 4.11.b) cuya pendiente permite conocer el coeficiente de absorción molar del aducto, $\epsilon_{AD} = 215 \pm 18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

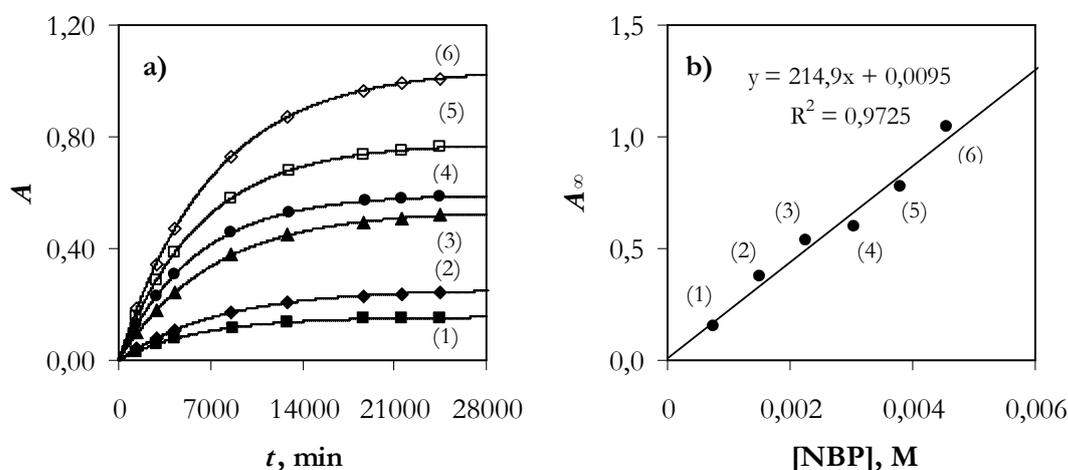


Figura 4.11. Coeficiente de absorción del aducto NBP-HS en 7:3, agua:dioxano a pH 5,56. (a) Variación de la absorbancia con el tiempo. (b) Determinación del coeficiente de absorción molar del aducto (Ec 119). $T = 35,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{S}]_0 = 0,2 \text{ M}$; $[\text{HCl}]_0 = 0,1 \text{ M}$; $[\text{NBP}]_0 \text{ cubeta} = 4,55 \times 10^{-3} \text{ M}$ (1), $3,79 \times 10^{-3} \text{ M}$ (2), $3,03 \times 10^{-3} \text{ M}$ (3), $2,27 \times 10^{-3} \text{ M}$ (4), $1,52 \times 10^{-3} \text{ M}$ (5), $0,76 \times 10^{-3} \text{ M}$ (6).

4.1.2.4. Parámetros de activación

La influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de la NBP por sorbato se ha estudiado en el intervalo $T = 27,5\text{-}37,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La Tabla 4.10. muestra la variación de los valores de la constante de alquilación, k_{alq} , con la temperatura.

Tabla 4.10. Influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en el sistema KS+HCl en 7:3, agua:dioxano.

T (°C)	$10^5 k_{\text{alq}}^a$ ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
27,5	$1,12 \pm 0,01$
32,5	$1,68 \pm 0,01$
35,0	$2,2 \pm 0,4$
37,5	$3,09 \pm 0,03$

^aDesviación estándar
 $[\text{HCl}] = 0,1 \text{ M}; [\text{S}] = 0,2 \text{ M}; \text{pH } 5,5$
 $[\text{NBP}]_0 = 2,8 \times 10^{-3} \text{ M}$

La Figura 4.12. muestra el ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones de Arrhenius y Eyring-Wynne-Jones.

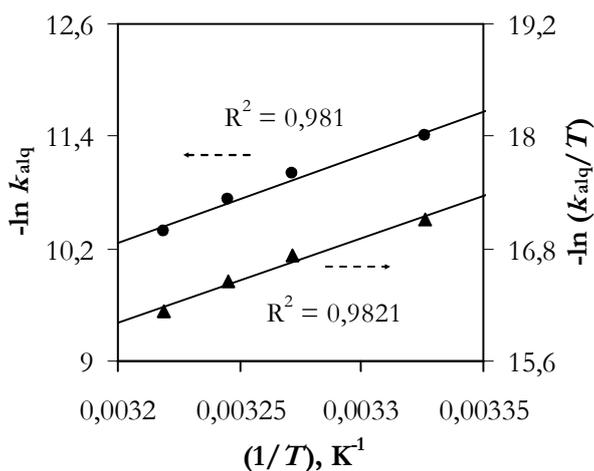


Figura 4.12. Representación de Arrhenius (●) y Eyring (▲) para la reacción de alquilación de la NBP por el ácido sórbico en el sistema KS+HCl.

La Tabla 4.11. recoge la energía y la entalpía de activación obtenidas en los tres sistemas estudiados.

Tabla 4.11. Influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de NBP por ácido sórbico en los sistemas HS+KOH, HS+NaOH y S+HCl en 7:3, agua:dioxano; $T = 35,0$ °C.

Mezcla de reacción	E_a^a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)
HS+NBP+KOH ^b	63 ± 6	60 ± 6
HS+NBP+NaOH ^b	31 ± 6	28 ± 6
KS+NBP+HCl	78 ± 7	75 ± 7
HS+NBP ^c	84	87

^aDesviación estándar

^bVéase Apartado 4.1.1.

^cCálculo computacional, véase Apartado 4.1.1.

Al comparar los valores de ΔH^\ddagger en los tres sistemas estudiados HS+NBP+NaOH, HS+NBP+KOH y KS+NBP+HCl, se observa: (i) Los valores de ΔH^\ddagger en los dos sistemas que contienen el catión K⁺ en el medio son prácticamente iguales y coinciden con el valor calculado. (ii) El valor obtenido para el sistema ácido sórbico/sorbato sódico es inferior, aproximadamente la mitad que el obtenido en las otras dos mezclas (véase Apartado 4.1.1.). (iii) Las diferencias observadas en los dos sistemas reguladores HS+NBP+KOH y KS+NBP+HCl, quizá se deban al efecto del ion Cl⁻ presente en este último (los cloruros sódico y potásico aumentan la estabilidad del ácido sórbico en disolución acuosa; Arya, 1980).

Akerlof, G.; Sort, O. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1241.

Arya, S. S. *J. Agric. Food. Chem.* **1980**, *28*, 1246.

Brzezinski, B.; Zundel, G. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 5461.

Fritsch, J.; Zundel, G. *J. Phys. Chem.* **1981**, *87*, 556.

Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* **2009** doi 10.1021/jo900645h

Kalsi, S.; Laframboise, R.; Scott, R. M. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 563.

Khandelwal, G., D.; Wedzicha, B., L. *Food Addit. Contaminants* **1990**, *7*, 685.

Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486.

Palm, V. A.; Vizgert, R. V. *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.* **1962**, *142*, 1091.

Smith, S. G.; Fainbery, A. H.; Winstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 618.

Thakur, B. R.; Singh, K.; Arya, S. S. *Food Rev. Int.* **1994**, *10*, 71.

Timmermans, J. *Physico-Chemical Constants of Binary Systems, Interscience*, Nueva York, 1960, pp16.

Vaneven, V.; Haulait-Pirson, M. C. *J. Solution Chem.* **1977**, *6*, 757.

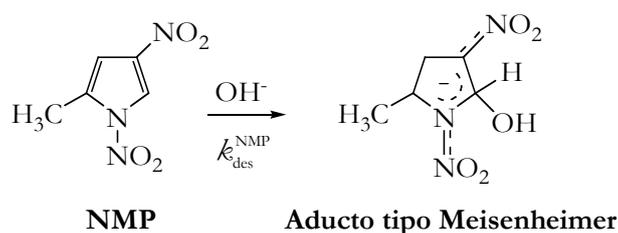
4.2. Reacción entre ácido sórbico y nitrito sódico

4.2.1. Estudio de la reactividad de 1,4-dinitro-2-metil pirrol

4.2.1.1. Reacción de descomposición del NMP

4.2.1.1.1. Ecuación de velocidad

La especie 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) es inestable en disolución acuosa y en medio débilmente alcalino, descomponiéndose en las proximidades de pH neutro. El ión hidróxido reacciona con la molécula NMP para formar un aducto tipo Meisenheimer (Esquema 4.6.; *cf.* Apartado 3.2.2.1.).



Esquema 4.6. Reacción de descomposición del NMP.

El ión hidróxido actúa como nucleófilo sobre la molécula de NMP para dar lugar a un aducto tipo Meisenheimer, cuya formación se ve favorecida por los grupos nitro que estabilizan la carga negativa en el anillo (Kito y Namiki, 1978).

La ecuación de velocidad de la reacción de descomposición del NMP en disolución acuosa es:

$$v = -\frac{d[\text{NMP}]}{dt} = k_{des}^{\text{NMP}} [\text{NMP}] [\text{OH}^-] \quad (15)$$

Como se ha trabajado en medios de acidez constante, la Ec 15 puede escribirse así:

$$v = -\frac{d[\text{NMP}]}{dt} = k_{obs}^{\text{NMP}} [\text{NMP}] \quad (17)$$

Al integrar la Ec 17 y expresar el resultado en términos de absorbancia resulta:

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) e^{-k_{obs}^{\text{NMP}} t} \quad (23)$$

de modo que el ajuste no lineal de los resultados a la Ec 23 permite conocer el valor de la pseudoconstante k_{obs}^{NMP} (Figura 4.13.).

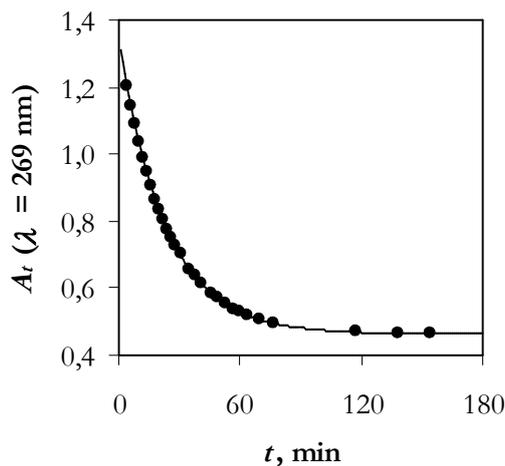
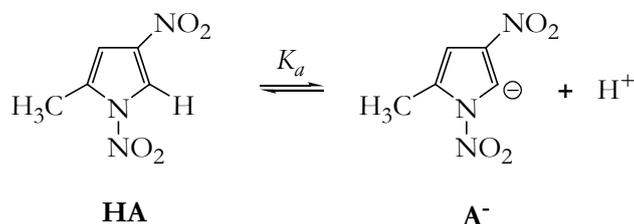


Figura 4.13. Determinación de $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$. Medio acuoso pH 9,47 (tampón borato); $T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; $[\text{NMP}]_0 = 10^{-4}\text{ M}$.

El buen ajuste a la Ec 23 confirma el orden uno con respecto a la concentración de NMP. El valor de la pseudoconstante de velocidad de descomposición es: $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} (T = 32,5\text{ }^{\circ}\text{C}) = (7,22 \pm 0,05) \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$.

4.2.1.1.2. Determinación del $\text{p}K_a$ del NMP

El hidrógeno del carbono en posición α respecto al nitrógeno del anillo pirrólico (Esquema 4.7.) es ácido y fácilmente intercambiable (De Santis y Stegel, 1974; Kito y Namiki, 1978) de modo que el NMP puede presentarse en disolución acuosa en su forma disociada o sin disociar. Como esta última es la que reacciona con el ión hidróxido (pH 7,0-9,5) para formar el aducto tipo Meisenheimer (Esquema 4.6.) es necesario conocer su constante de disociación.



Esquema 4.7. Estructuras de las especies ácida (HA) y básica (A⁻) del NMP.

La determinación del $\text{p}K_a$ se ha realizado espectrofotométricamente. La Figura 4.14. muestra los espectrogramas obtenidos en el intervalo de pH 1,3-13,3. Para

valores de pH muy ácidos, la morfología de los espectros no varía, siendo necesario alcanzar un valor de pH elevado (~ 10) para que se aprecie variación (Figura 4.15).

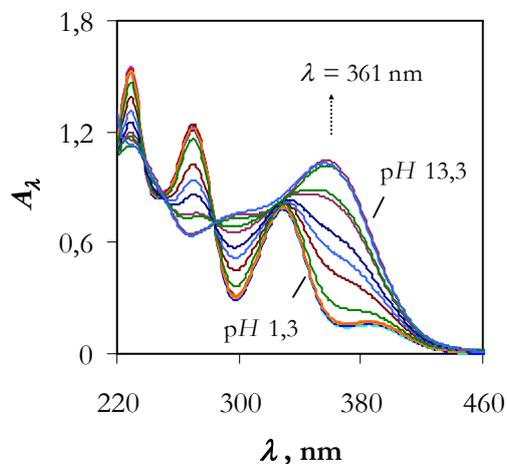


Figura 4.14. Espectrogramas del NMP en un intervalo de pH 1,3-13,3 en disolución acuosa. $[NMP]_0 = 9,7 \times 10^{-5} \text{ M}$; $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

En $\lambda = 361 \text{ nm}$, se observa un aumento considerable en la absorción de la forma ácida del NMP con el pH del medio (Figuras 4.14. y 4.15.).

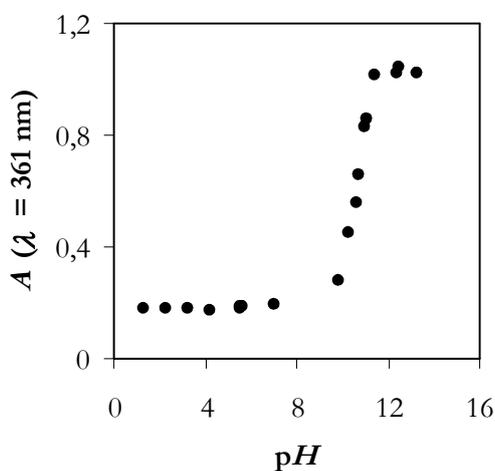


Figura 4.15. Perfil absorbancia- pH para el NMP en disolución acuosa. $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $[NMP]_0 = 9,7 \times 10^{-5} \text{ M}$; $\lambda = 361 \text{ nm}$.

La Figura 4.16. muestra el buen ajuste de los resultados a la ecuación de Henderson-Hasselbalch. El valor de la constante de disociación del NMP obtenido en disolución acuosa es: $K_a = (2,5 \pm 0,5) \times 10^{-11} \text{ M}$ a $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_a - \log \frac{A_{\lambda} - A_{HA}}{A_{\lambda} - A_{A^-}} \quad (13)$$

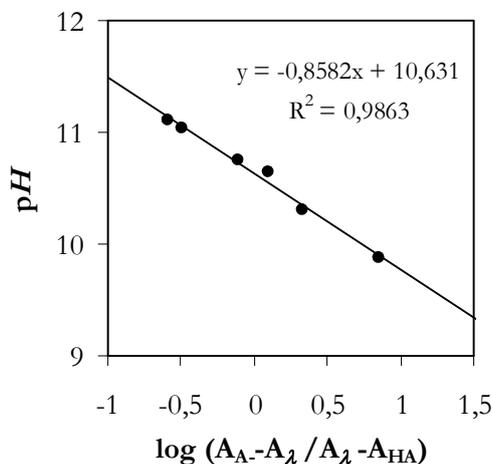


Figura 4.16. Determinación del pK_a del NMP, $\lambda = 361$ nm en medio acuoso; $T = 25,0$ °C. $[NMP]_0 = 9,7 \times 10^{-5}$ M;

La variación de K_a con la temperatura en el intervalo de trabajo es menor que el error experimental. Por ello no se ha tomado en consideración

4.2.1.1.3. Influencia del pH

Como el ión OH^- actúa como nucleófilo sobre la molécula de NMP, la pseudoconstante de descomposición de ésta depende del pH (*cf.* Apartado 3.2.2.1.):

$$k_{obs}^{NMP} = k_{des}^{NMP} [OH^-] \quad (16)$$

La Figura 4.17.a. muestra el buen ajuste de los resultados a la Ec 16. El valor de la pendiente de la recta obtenida es la constante de velocidad de descomposición. Como la representación de los valores de $\log k_{obs}^{NMP}$ frente al pH es una recta de pendiente unidad ($\log k_{obs}^{NMP} = \log k_{des}^{NMP} - K_w + pH$; K_w varía en función de la temperatura y porcentaje de dioxano en la mezcla, véase Apéndice C) se confirma, de nuevo, el orden uno respecto a la concentración de ión hidróxido (Figura 4.17.b).

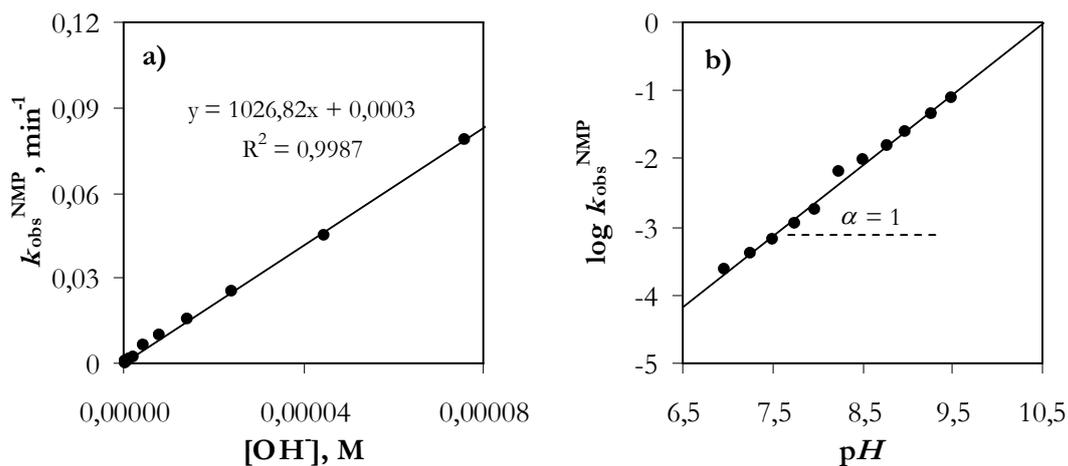


Figura 4.17. (a) Determinación de k_{des}^{NMP} y (b) verificación del orden uno respecto a $[\text{OH}^-]$ en disolución acuosa a $T = 37,5$ °C.

4.2.1.1.4. Influencia del medio de reacción y de la temperatura

La variación de la constante de descomposición del NMP con la temperatura en diferentes mezclas agua:dioxano se recoge en la Tabla 4.12. Como puede verse, la constante de velocidad de descomposición del NMP aumenta con la proporción de dioxano en el medio de reacción.

Tabla 4.12. Constantes de velocidad de descomposición del 1,4-dinitro-2-metil pirrol en función de la composición del medio y de la temperatura.

	Agua:dioxano (v/v)				
	10/0	8/2	7/3	6/4	5/5
T (°C)	k_{des}^{NMP} ^a ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)				
25,0	$9,4 \pm 0,5$	$25,8 \pm 0,2$	$36,5 \pm 0,6$	$44,0 \pm 0,4$	124 ± 2
27,5	$9,9 \pm 0,7$	$28,0 \pm 0,4$	39 ± 1	$49,6 \pm 0,4$	141 ± 1
30,0	$11,6 \pm 0,4$	$31,8 \pm 0,3$	43 ± 1	$54,4 \pm 0,7$	164 ± 2
32,5	$12,6 \pm 0,8$	36 ± 1	53 ± 2	$66,4 \pm 0,5$	168 ± 3
35,0	$15,2 \pm 0,7$	41 ± 1	65 ± 2	$74,4 \pm 0,6$	186 ± 3
37,5	$17,1 \pm 0,5$	43 ± 1	65 ± 1	$77,2 \pm 0,8$	213 ± 6

^aIntervalo de confianza del 95%

Los valores de $\text{p}K_w$ en las mezclas agua:dioxano se han tomado de la bibliografía (Llor *et al.*, 1987) o por interpolación lineal a partir de los mismos (véase Apéndice C).

Como es sabido, las reacciones de orden dos que transcurren entre dos especies polares, dos iones o un ión y una especie polar, muestran una relación lineal entre

el logaritmo de la constante de velocidad y la inversa de la constante dieléctrica (Ec 77; Espenson, 1995). La reacción entre un ión y una molécula polar mostrará una dependencia con la constante dieléctrica del disolvente acorde con la siguiente expresión:

$$\ln k = \ln k_{\text{ref}} - \frac{N z_c^2}{(4\pi\epsilon^0)^2 \epsilon RT} \times \left(\frac{1}{r_{\text{ión}}} - \frac{1}{r_{\#}} \right) \quad (77)$$

Al representar los valores del logaritmo de la constante de descomposición del NMP frente a la inversa de la constante dieléctrica se obtiene una línea recta de pendiente positiva (Figura 4.18.) consistente con el hecho de que el estado de transición es menos polar que los reactivos: el NMP y el ión OH⁻.

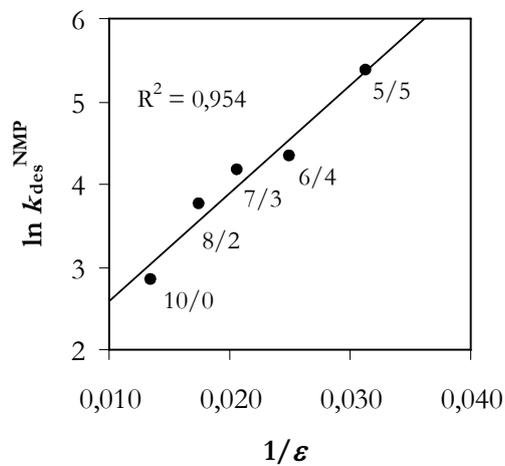


Figura 4.18. Variación de $k_{\text{des}}^{\text{NMP}}$ con la constante dieléctrica del medio en mezclas agua:dioxano. $T = 37,5$ °C.

La buena correlación de Palm-Vizgert (Palm y Vizgert, 1962) por parte de los resultados en diferentes medios agua:dioxano (Figura 4.19.) sugiere que la descomposición del NMP transcurre a través de un mecanismo común en todos ellos.

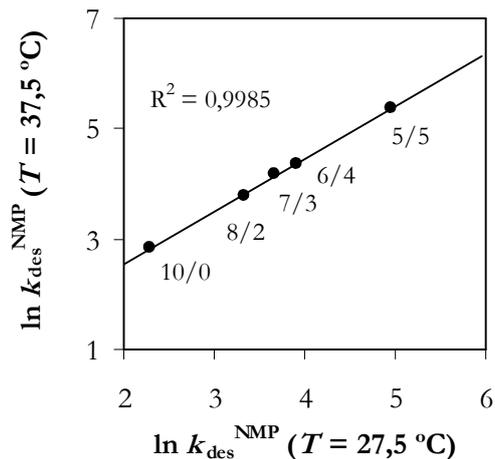


Figura 4.19. Correlación de Palm-Vizgert para la reacción de descomposición del NMP en diferentes mezclas agua:dioxano.

La influencia de la temperatura en la constante de descomposición del NMP se refleja en la Tabla 4.12. Para determinar los parámetros de activación se han manejado las ecuaciones de Arrhenius y de Eyring-Wynne-Jones (*cf.* Apartado 3.1.2.). La Figura 4.20. muestra el buen cumplimiento de estas ecuaciones.

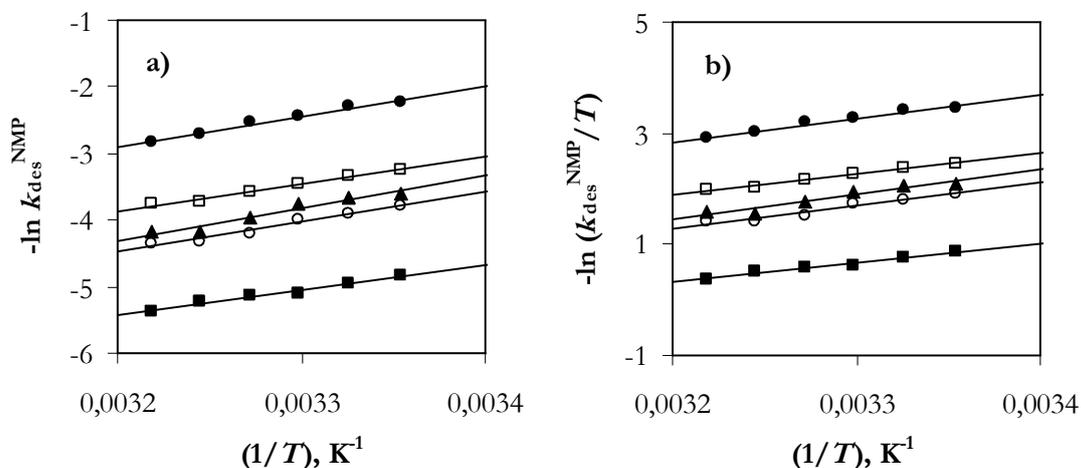


Figura 4.20. (a) Representación de Arrhenius y (b) Eyring para la reacción de descomposición del NMP en medios agua:dioxano: 10:0 (●), 8:2 (□), 7:3 (▲), 6:4 (○) y 5:5 (■).

En la Tabla 4.13. se recogen los valores de los parámetros de activación calculados.

Tabla 4.13. Parámetros de activación en función de la composición del medio para la reacción de descomposición del 1,4-dinitro-2-metil pirrol

Agua:dioxano (v/v)	NMP			
	E_a^a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\ddagger$ (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	ΔG^\ddagger (25,0 °C) (kJ mol ⁻¹)
10/0	38 ± 3	36 ± 3	107 ± 11	68 ± 3
8/2	34 ± 2	31 ± 2	113 ± 8	65 ± 2
7/3	40 ± 5	38 ± 5	88 ± 12	64 ± 5
6/4	37 ± 3	35 ± 3	97 ± 9	64 ± 3
5/5	31 ± 3	29 ± 3	108 ± 10	61 ± 3

^aDesviación estándar

Como puede observarse, no hay diferencias significativas en los parámetros de activación al modificar la proporción de dioxano en el medio. El signo negativo y elevado valor absoluto de ΔS^\ddagger en todos los medios estudiados sugiere un estado de transición ordenado.

4.2.1.1.5. Efecto cinético isotópico

Para tratar de conocer mejor el mecanismo de descomposición de 1,4-dinitro-2-metil pirrol se ha investigado la posible existencia de un efecto cinético isotópico. La Tabla 4.14. da cuenta de los resultados.

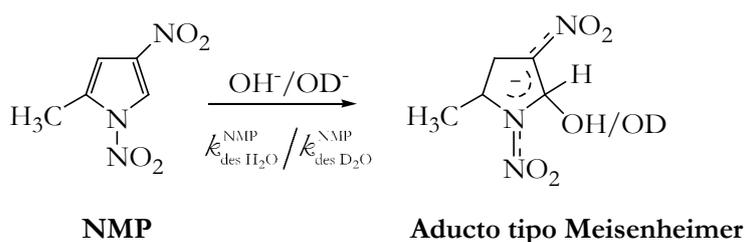
Tabla 4.14. Efecto cinético isotópico de la reacción de descomposición de 1,4-dinitro-2-metil pirrol en mezclas H₂O/D₂O:dioxano; $T = 37,5$ °C

H ₂ O/D ₂ O:dioxano (v/v)	$k_{\text{des H}_2\text{O}}^{\text{NMP}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	$k_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{NMP}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{\text{des H}_2\text{O}}^{\text{NMP}} / k_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{NMP}}$
10/0	17,1 ± 0,5	24,8 ± 0,3	0,69 ± 0,02
8/2	43 ± 1	50 ± 1	0,86 ± 0,03
7/3	65 ± 1	103 ± 1	0,63 ± 0,01
5/5	213 ± 6	305 ± 2	0,70 ± 0,02

^aIntervalo de confianza del 95%

La Tabla 4.14. permite observar un efecto isotópico inverso, prácticamente constante, al variar la proporción de dioxano en el medio. Las reacciones S_N2 de sustitución nucleófila catalizadas en medio básico presentan, en su mayoría, un

efecto isotópico inverso puesto que la especie OD^- es más efectiva como nucleófilo que el grupo OH^- (Oh *et al.*, 1998; Yew *et al.*, 1995). Este hecho se podría interpretar en nuestro caso como un ataque nucleófilo del grupo hidróxido sobre el carbono más electrófilo del anillo pirrólico (Esquema 4.8.) siendo ésta la etapa determinante del mecanismo. La presencia de grupos nitro en el anillo pirrólico implica una disminución de la densidad electrónica π del anillo, permitiendo que esta especie pueda reaccionar con diversos nucleófilos (Kito y Namiki, 1978; De Santis y Stegel, 1974).



Esquema 4.8. Reacción del ión hidróxido sobre la molécula de NMP.

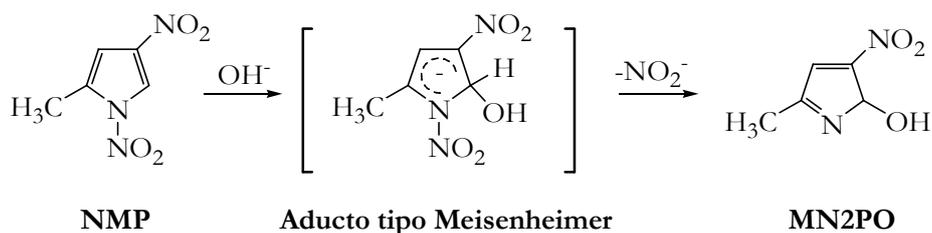
4.2.1.2. Reacción de alquilación de la NBP por el NMP

4.2.1.2.1. Identificación de las especies participantes en el mecanismo de reacción

Para evaluar la capacidad alquilante de 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) se ha empleado la molécula de NBP como sustrato de alquilación.

Como: (i) La molécula NMP es inestable en disolución acuosa y se descompone en medio débilmente alcalino (*cf.* Apartado 3.2.2.1.) y (ii) se observa un período de inducción bien definido en el perfil cinético de las reacciones de alquilación de la NBP por la NMP, se ha planteado la posibilidad de que el NMP no reaccione de forma directa con la NBP, siendo la especie alquilante efectiva algún producto de su descomposición. De ahí que sea necesario identificar las especies participantes en el mecanismo de alquilación y los posibles productos finales.

El ión OH^- reacciona con la molécula de NMP para formar un aducto tipo Meisenheimer que evoluciona con pérdida del grupo nitro sobre el nitrógeno del anillo pirrólico (Esquema 4.9).



Esquema 4.9. Reacción entre el ión hidróxido y el NMP para formar el aducto tipo Meisenheimer y la pérdida posterior del ión nitrito.

La Figura 4.21. muestra una superficie de isodensidad electrónica en función del potencial electrostático para el NMP. Se observa que el color azul es más intenso en el carbono en posición α respecto al nitrógeno del anillo lo que indica un mayor potencial positivo y, por tanto, una mayor electrofilia. Este resultado es acorde con el hecho de que el ión hidróxido reaccione con el NMP en el carbono señalado para formar el aducto tipo Meisenheimer. La región donde se aprecia un potencial más negativo (color rojo) y se corresponde con los oxígenos del grupo nitro.

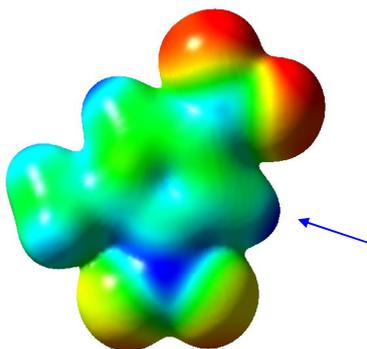


Figura 4.21. Densidad electrónica del NMP. DFT-B3LYP 6-31++G(2df,2pd).

En el aducto de Meisenheimer la carga está conjugada por todo el sistema π , especialmente en el C-Nitro (Figura 4.22).

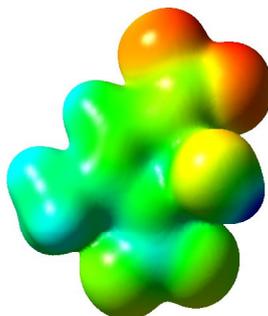
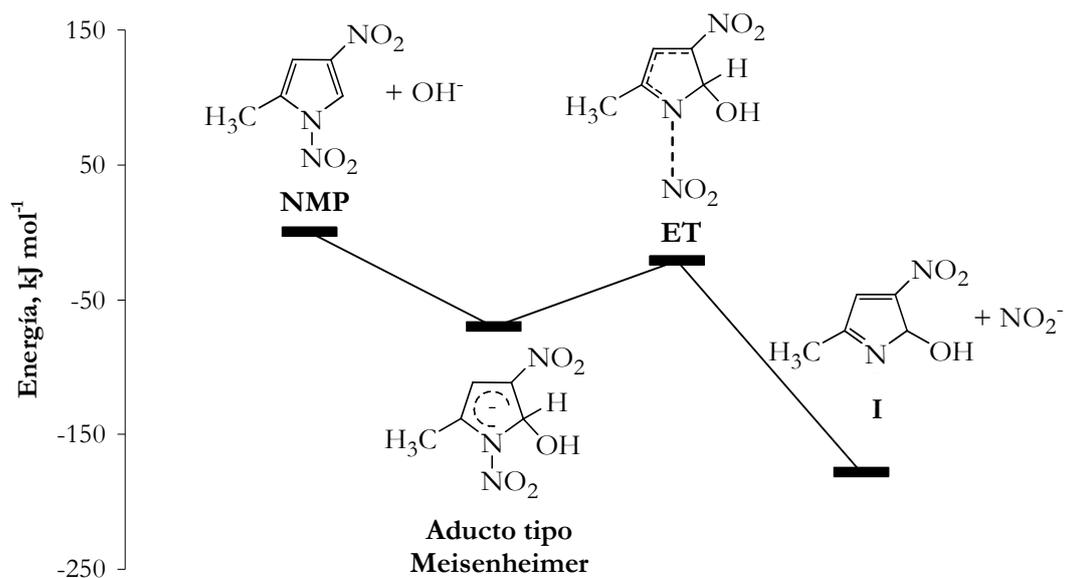


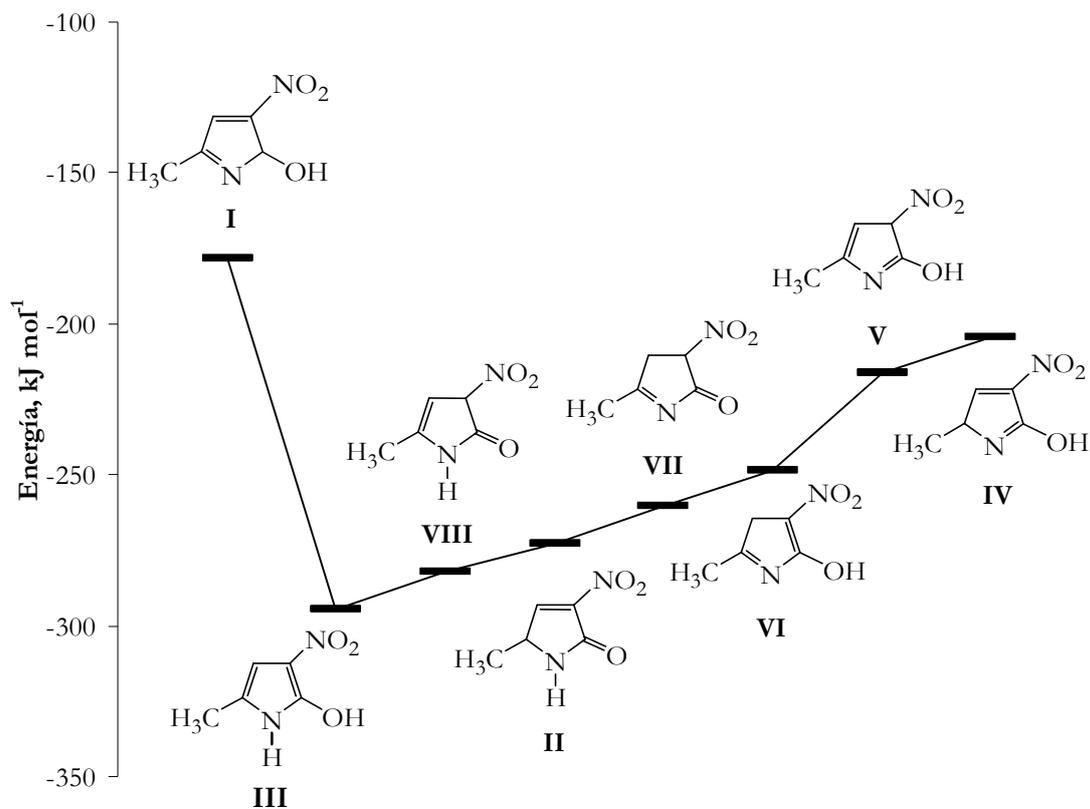
Figura 4.22. Densidad electrónica del aducto de Meisenheimer. DFT-B3LYP 6-31++G(2df,2pd).

En sustituciones nucleofílicas aromáticas el grupo nitro es buen grupo saliente (Annulli *et al.*, 1984) de modo que la pérdida del mismo sobre el nitrógeno pirrólico debe verse favorecida. El Esquema 4.10. muestra el estado de transición (ET) correspondiente a la pérdida del ión nitrito del aducto de Meisenheimer con una barrera de 48,5 kJ mol⁻¹ (se ha tomado como referencia la molécula de NMP y el OH) coherente con el hecho de que la pérdida del grupo nitro transcurre muy rápido. El producto resultante es la especie 5-metil-3-nitro-2*H*-pirrol-2-ol (MN2PO) o isómero **I**.

Como el MN2PO (**I**) es muy inestable se isomeriza. El isómero aromático (**III**), la especie 5-metil-3-nitro-1*H*-pirrol-2-ol (MN1PO) es el más estable debido a su aromaticidad. El Esquema 4.11. muestra las estructuras de los posibles isómeros formados. Se ha tomado como referencia al sistema NMP/OH, de modo que la energía predicha para un determinado isómero tiene en cuenta el ión nitrito que se libera.



Esquema 4.10. Barreras de energía obtenidas en la formación del aducto de Meisenheimer y la pérdida posterior del ión nitrito.



Esquema 4.11. Diferencias de energía calculadas entre los isómeros del MN1PO.

En la Tabla 4.15. se recogen las diferencias de energía de isomerización entre los distintos isómeros formados en el equilibrio ácido-base del MN1PO.

Tabla 4.15. Diferencias de energía entre los isómeros del MN1PO.

Compuesto	ΔG_{isom} (kJ mol ⁻¹)
VIII	12,8
II	21,8
VII	34,4
VI	46,1
V	78,3
IV	90,1
I	116,2

Como puede observarse en el Esquema 4.11. (véase Tabla 4.15.) los isómeros que poseen un hidrógeno sobre el nitrógeno pirrólico (**II**, **VIII** y **III**) son más estables. La Figura 4.23. muestra las superficies de isodensidad electrónica para estas tres especies.

En el isómero **II**, la 5-metil-3-nitro-1*H*-pirrol-2(5*H*)-ona (MN1P5N), se observa un color azul más intenso en el carbono 4 del anillo, lo que indica un mayor carácter electrófilo que favorecería el ataque nucleófilo en esta posición. De los tres isómeros, parece ser que el **II**, con la amida α,β -insaturada en su estructura, es la especie que reaccionaría con nucleófilos como agua o NBP.

La adición de la molécula de agua tendría lugar en el carbono 4 del anillo de la especie **II** mediante una adición al doble enlace de la amida α,β -insaturada, que a su vez, está favorecida por la presencia del grupo nitro en el anillo. El producto de hidrólisis resultante sería la 4-hidroxi-5-metil-3-nitro-pirrolidin-2-ona (4HMNPN) (Esquema 4.12.).

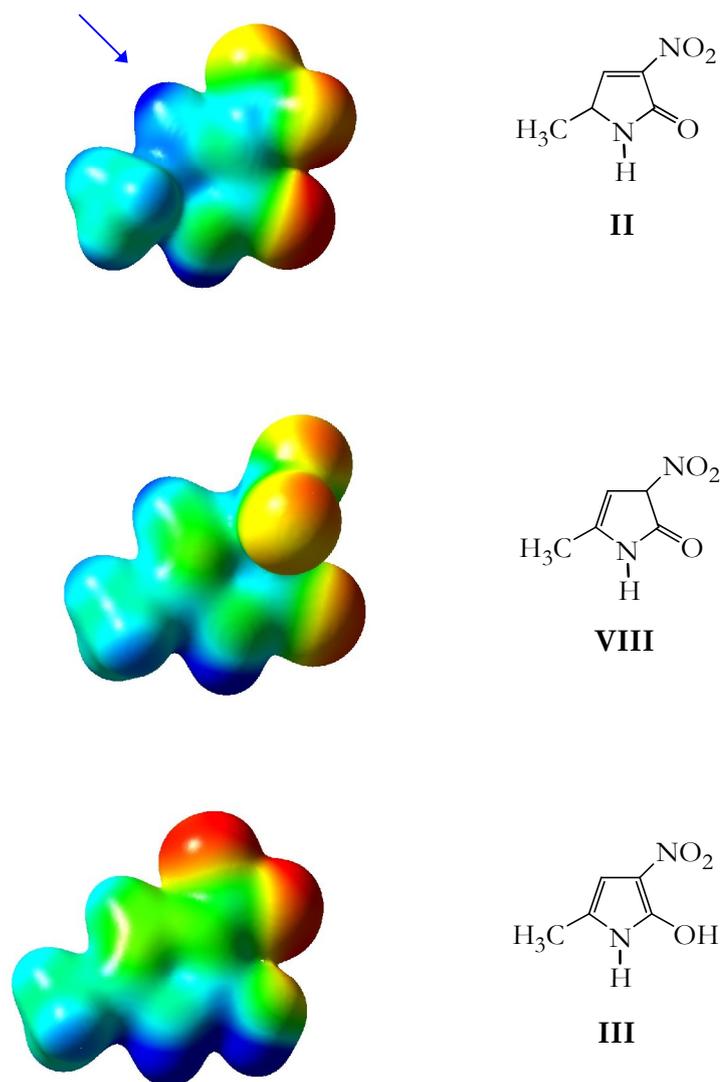
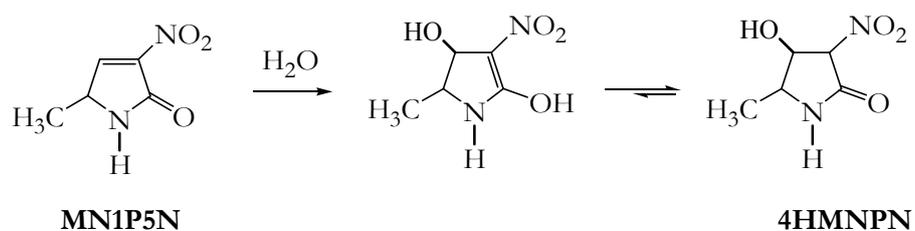


Figura 4.23. Densidad electrónica de los tres isómeros más estables, **II**, **VIII** y **III**. DFT-B3LYP 6-31++G(2df,2pd). Isodensidad = 0.01, ESP = -0.10 – 0.150.



Esquema 4.12. Reacción de hidrólisis del isómero II.

Mediante espectrometría de masas se ha observado un pico con relación $m/z = 161$, que correspondería al producto de hidrólisis del isómero MN1P5N, la especie 4HMNP. Se ha observado también un pico con relación $m/z = 144$ que coincide con la masa de los isómeros mostrados en el Esquema 4.11. La estructura del isómero más estable (**III**) se ha identificado con $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (*cf.* Apéndice B).

Una vez identificado el producto de hidrólisis del isómero **II**, todo parece indicar que la NBP reaccionará con esta especie en la misma posición donde lo hace la molécula de agua para formar el aducto NBP- MN1P5N (Figura 4.24.). Debido a la pequeña fracción de aducto formada (sólo un 7 % de especie alquilante, MN1P5N o isómero **II**, reacciona con la NBP) no ha sido posible su identificación directa por espectrometría de masas.

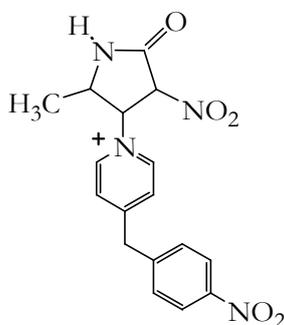
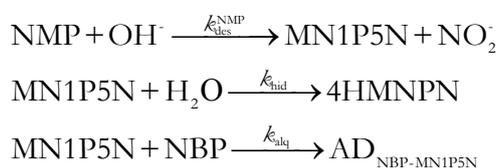


Figura 4.24. Estructura del aducto NBP- MN1P5N.

El coeficiente de absorción molar del aducto NBP- MN1P5N en medio 7:3, agua:dioxano se ha calculado mediante ajuste de los resultados experimentales a la Ec 51 (*cf.* Apartado 3.2.2.2.) obteniéndose el valor: $\epsilon_{\text{AD}} = 1,14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 575 \text{ nm}$).

El Esquema 4.13. muestra las etapas que configuran el mecanismo de reacción propuesto.



Esquema 4.13. Mecanismo de la reacción de alquilación del NBP por el MN1P5N.

4.2.1.2.2. Ecuación de velocidad

La ecuación de velocidad manejada para la reacción de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N (véase Apartado 3.2.2.2.) es:

$$v = \frac{d[AD]}{dt} = k_{\text{alq}} [\text{MN1P5N}][\text{NBP}] \quad (24)$$

Al integrar esta ecuación y expresar el resultado en términos de absorbancia resulta:

$$A_{\text{AD}} = \frac{k_{\text{alq obs}} [\text{NMP}]_o \varepsilon_{\text{AD}} l}{(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}})(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})} \left[(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) (1 - e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t}) - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} (1 - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t}) \right] \quad (34)$$

La Ec 34 se puede escribir de forma sencilla así:

$$y = a \left[b(1 - e^{-cx}) - c(1 - e^{-bx}) \right] \quad (35)$$

donde: $a = k_{\text{alq obs}} [\text{NMP}]_o \varepsilon_{\text{AD}} l / (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}})(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})$, $b = (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}})$ y $c = k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$.

La Figura 4.25. muestra, a modo de ejemplo, el ajuste de los resultados experimentales a la Ec 35.

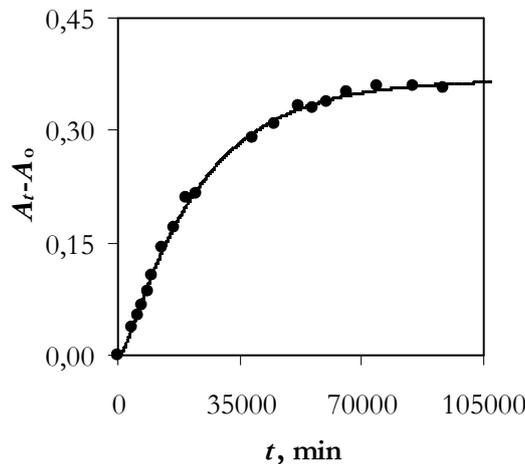


Figura 4.25. Variación de la absorbancia del aducto NBP-MN1P5N. Medio 7:3, agua:dioxano; pH 4,77; $T = 37,5$ °C; $[\text{NMP}]_o = 8,0 \times 10^{-4}$ M; $[\text{NBP}]_o = 1,5 \times 10^{-2}$ M; $A_o = 0.12$.

Como muestra la figura, los resultados experimentales se ajustan bien a la Ec 47. El valor de la absorbancia a tiempo t (A_t) se corrige con el valor de la absorbancia

a tiempo cero (A_0). Ello se debe a que se ha trabajado con exceso de NBP y, como consecuencia, la absorbancia medida a tiempo t es suma de la absorbancia del aducto a ese tiempo y la de la NBP, es decir, $A_t = A_{AD} + A_{NBP}$. Como la absorbancia de la NBP es la absorbancia medida inicialmente cuando no se ha formado una cantidad apreciable de aducto, podemos escribir: $A_t = A_{AD} + A_0$.

Para verificar el orden uno con respecto a la concentración de NBP se han manejado los parámetros a , b y c del ajuste no lineal de los resultados a la Ec 35, en la forma:

$$\frac{1}{a(b-c)} = \frac{[H_2O]}{[NMP]_0 \varepsilon_{AD} l} \left(\frac{k_{hid}}{k_{alq}} \right) \frac{1}{[NBP]_0} + \frac{1}{[NMP]_0 \varepsilon_{AD} l} \quad (36)$$

Al representar el primer término de la Ec 36 frente al inverso de la concentración de NBP, se obtiene una línea recta (Figura 4.26).

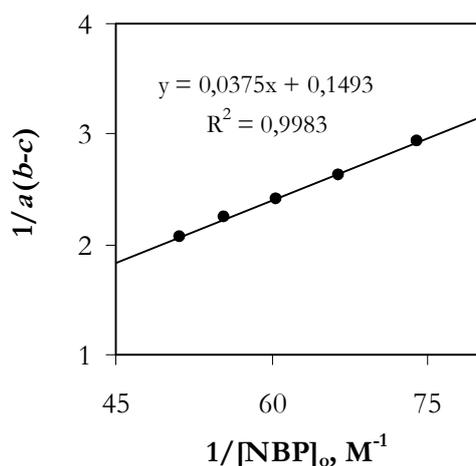


Figura 4.26. Ajuste de los resultados experimentales a la Ec 51. Medio 7:3 (tampón acético / acetato:dioxano) pH 4,77; $T = 37,5$ °C; $[NMP]_0 = 8,0 \times 10^{-4}$ M.

4.2.1.2.3. Estudio de la capacidad alquilante del NMP

Para evaluar la capacidad alquilante del NMP frente al sustrato NBP, se ha manejado el valor del cociente (k_{alq}/k_{hid}) obtenido a partir del ajuste de los resultados a la Ec 36. Con el valor de la pendiente y ordenada en el origen de la recta obtenida se puede conocer el valor de ese cociente y el coeficiente de absorción molar del aducto.

Para conocer la influencia de la reacción de hidrólisis de la especie MN1P5N sobre su capacidad alquilante se ha manejado el parámetro, f , fracción de agente

alquilante que forma aducto. Este parámetro relaciona las constantes de velocidad de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N y la de hidrólisis del mismo según la Ec 78.

$$f = \frac{k_{\text{alq}} [\text{NBP}]}{k_{\text{alq}} [\text{NBP}] + k_{\text{hid}} [\text{H}_2\text{O}]} \quad (78)$$

Con el inverso de la Ec 78 podemos determinar el valor de f conocido el cociente $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$:

$$\frac{1}{f} = 1 + \frac{1}{(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})} \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NBP}]} \quad (79)$$

A pH 4,77 y $T = 37,5$ °C se han obtenido los resultados siguientes: $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}}) = 155 \pm 14$ y $f = 0,07$ ($[\text{NBP}]_0 = 2 \times 10^{-2}$ M).

Como no se conoce el valor de la constante de hidrólisis de la especie intermedia MN1P5N, para estimar su capacidad alquilante se ha manejado el cociente $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$. Para ver la influencia de la reacción de hidrólisis de la especie MN1P5N sobre la alquilación de la NBP se ha utilizado el parámetro f .

La fracción de agente alquilante, en este caso la especie MN1P5N, que forma aducto es muy pequeña (7%). Este resultado muestra que sólo una pequeña fracción de agente alquilante reacciona con la NBP para dar lugar al aducto, hidrolizándose el resto.

La Tabla 4.16. recoge los valores de $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$ y f para la especie MN1P5N y para otros agentes alquilantes como las lactonas β -propiolactona y β -butirolactona (Manso *et al.*, 2005) de carcinogenicidad probada (van Duuren, 1969).

Tabla 4.16. Comparativa de la capacidad alquilante de la especie MN1P5N con otros agentes alquilantes

Agente alquilante	$(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$	f
β -Propiolactona ^a	5395	0,76
β -Butirolactona ^a	3158	0,62
MN1P5N ^b	155	0,07

$[\text{NBP}]_0 = 2 \times 10^{-2}$ M; Medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5$ °C

^aManso *et al.*, 2005; $T = 35,0$ °C; ^bpH 4,77; $T = 37,5$ °C.

Las lactonas cancerígenas β -propiolactona y β -butirolactona reaccionan con la NBP un 76 y un 62 %, respectivamente, mientras que la MN1P5N reacciona solamente un 7 %. En esta última la fracción hidrolizada de la especie alquilante es mucho mayor que la de NBP que sufre alquilación.

Aunque estos resultados revelan una débil capacidad alquilante de la especie MN1P5N, producto de descomposición del NMP, estudios biológicos revelan una alta mutagenia de este último (Namiki *et al.*, 1980). La Tabla 4.17. muestra, comparativamente, la actividad biológica de especies mutágenas entre las que se encuentran el NMP y el ENA.

Tabla 4.17. Actividades biológicas de compuestos mutágenos

Compuesto	Ensayo Rec con <i>B. subtilis</i>		Test de Ames
	Inhibición del crecimiento		Revertientes/ μ g por placa
	Rec ⁺	Rec ⁻	TA100
Cafeína ^{a,b}	-	±	< 70/6000
Mitomicina C ^{a,b}	++	+++	< 70/1
N-Nitroso-N-metiluretano ^{a,b}	++	++++	
N-Metil-N ^o -nitro-N-nitrosoguanidina ^{a,b}	±	++	18700/2
N-Óxido de 4-nitroquinolina ^{a,b}	+	++	7640/0,5
Óxido de estireno ^b			1292/500
β -propiolactona ^b			6460/114
1,4-Dinitro-2-metil pirrol ^c	-	++	1704/100
Ácido etilnitrólico ^c	-	++	583/150

^aEnsayo Rec con *B.subtilis* (Kada *et al.*, 1972)

^bTest de Ames (McCann *et al.*, 1975)

^cNamiki *et al.*, 1980

Zona de inhibición: - sin inhibición; ± menos de 5 mm; + 5-10 mm; ++ más de 10 mm; +++ más de 20 mm; ++++ más de 30 mm.

De los compuestos mostrados en la Tabla 4.17. cabe destacar la elevada actividad en el ensayo Rec de la especie N-Nitroso-N-metiluretano con respecto a las especies NMP y ENA que presentan resultados similares a los observados para el compuesto N-Metil-N^o-nitro-N-nitrosoguanidina. Sin embargo, con el test de Ames se observa una mayor capacidad mutágena de este último como indica el número de revertientes por μ g de compuesto analizado.

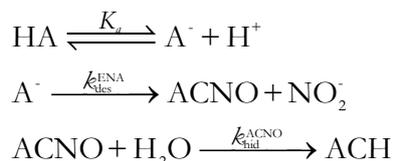
Este resultado podría interpretarse en términos de estabilidad del aducto NBP-MN1P5N formado: aunque sólo una pequeña parte del reactivo (un 7 %) reacciona con la NBP para formar aducto, éste permanece durante largo tiempo, dos meses aproximadamente (*cf.* Figura 4.31.) lo que hace que su efecto se prolongue en el tiempo.

4.2.2. Estudio de la reactividad del ácido etilnitrólico

4.2.2.1. Reacción de descomposición del ENA

4.2.2.1.1. Ecuación de velocidad

El ácido etilnitrólico (ENA) se descompone en disolución acuosa (*cf.* Apartado 3.2.3.1.). El Esquema 4.14. muestra las etapas que configuran el mecanismo propuesto.



Esquema 4.14. Etapas del mecanismo de la reacción de hidrólisis del ENA

La ecuación de velocidad de descomposición de la forma disociada del ácido etilnitrólico (A^-) se puede escribir así:

$$v = -\frac{d[\text{A}^-]}{dt} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} [\text{A}^-] \quad (37)$$

Al integrar la Ec 37 y expresar el resultado en términos de absorbancia resulta:

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty)e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} \quad (43)$$

La variación de la absorbancia con el tiempo permite conocer el valor de la pseudoconstante de velocidad de descomposición $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ (Figura 4.27.).

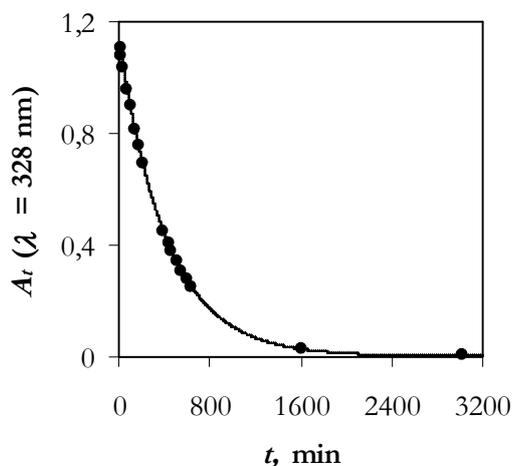


Figura 4.27. Determinación de $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ (Ec 7). Medio acuoso pH 9,52 (tampón borato); $T = 32,5^\circ\text{C}$; $[\text{ENA}]_0 = 1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

El buen ajuste de los resultados a la ecuación de velocidad (Figura 4.27.) confirma el orden uno respecto a la concentración de reactivo ENA. El valor obtenido para la pseudoconstante es: $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} (T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}) = (3,96 \pm 0,03) \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ a pH 9,52.

De acuerdo con el mecanismo propuesto, la ecuación de velocidad de formación del ácido acetohidroxiámico (ACH) es:

$$v = \frac{d[\text{ACH}]}{dt} = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}][\text{H}_2\text{O}] \quad (44)$$

Como el agua está en gran exceso, se puede definir la pseudoconstante de velocidad de orden uno de la forma: $k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{H}_2\text{O}]$.

Al integrar la Ec 44 y expresar el resultado en términos de absorbancia resulta:

$$A_{\text{ACH}} = \varepsilon_{\text{ACH}} l [\text{ENA}]_0 \left(1 + \frac{k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} t} - k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t}}{k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \right) \quad (52)$$

donde A_{ACH} es la absorbancia de la especie ACH a tiempo t .

La Ec 52 se puede escribir de forma simplificada según:

$$y = a \left(1 + \frac{be^{-cx} - ce^{-bx}}{c - b} \right) \quad (53)$$

de modo que el ajuste de los resultados a la Ec 53 (Figura 4.28.) permite calcular el valor de la pseudoconstante de velocidad de hidrólisis del ACNO $k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}}$ (parámetro c) una vez conocido el de $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ (parámetro b).

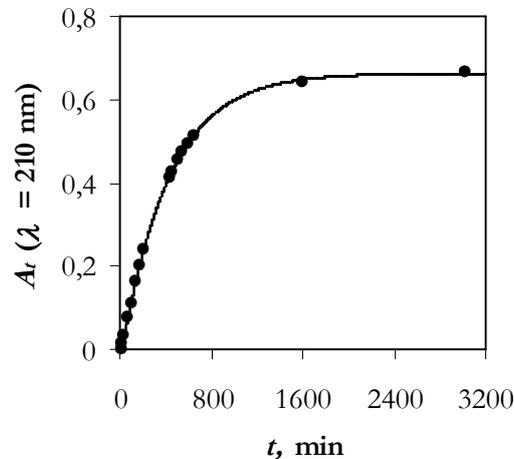


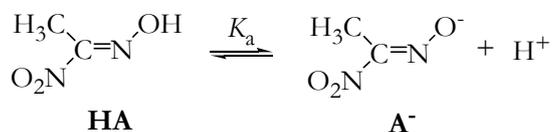
Figura 4.28. Determinación de $k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}}$ (Ec 16). Medio acuoso pH 9,52 (tampón borato); $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ENA}]_0 = 1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$.

El valor de la constante experimental de hidrólisis obtenido del ajuste mostrado en la Figura 4.28. es: $k_{\text{obs}}^{\text{ACNO}}(T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}) = (7,7 \pm 0,2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a pH 9,52.

4.2.2.1.2. Determinación del pK_a del ENA

Para determinar el valor de la constante de descomposición del ENA es necesario conocer la concentración de la forma básica del mismo, puesto que ésta es la especie que se descompone para dar lugar al óxido de acetonitrilo (Esquema 4.14.). Por ello se ha determinado el valor del pK_a del ENA en disolución acuosa.

El Esquema 4.15. muestra el equilibrio entre las formas ácida y básica del ENA.



Esquema 4.15. Estructuras de las especies ácida (HA) y básica (A⁻) del ENA

La determinación del pK_a del ENA en medios agua:dioxano se ha hecho espectrofotométricamente y mediante volumetría ácido base (*cf.* Apartado 3.1.2.2.2.).

4.2.2.1.2.1. Método espectrofotométrico

La Figura 4.29.a muestra los espectrogramas del ENA en disolución acuosa en el intervalo de pH 2,0-10,0. En pHs ≈ 2 todo el ácido se encuentra protonado y presenta un máximo en $\lambda = 240 \text{ nm}$, mientras que en pHs elevados (≈ 10) el ácido se encuentra totalmente disociado, con un máximo en $\lambda = 328 \text{ nm}$. A medida que aumenta el pH va desapareciendo el pico en 240 nm y aumentando el de 328 nm con presencia de un punto isobéptico en $\lambda = 282 \text{ nm}$. Este hecho sugiere la existencia de un equilibrio ácido-base entre las formas ácida y básica del ENA. Se ha trabajado en $\lambda = 350$ donde la absorción del anión es máxima y la de la forma neutra es prácticamente nula. La Figura 4.29.b muestra el buen ajuste de los resultados a la ecuación de Henderson-Hasselbalch. El valor obtenido de la constante de disociación del ácido etilnitroso en disolución acuosa es: $K_a = (4 \pm 1) \times 10^{-8} \text{ M}$ a $T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pK_a - \log \frac{A_{\lambda'} - A_{\lambda}}{A_{\lambda} - A_{HA}} \quad (13)$$

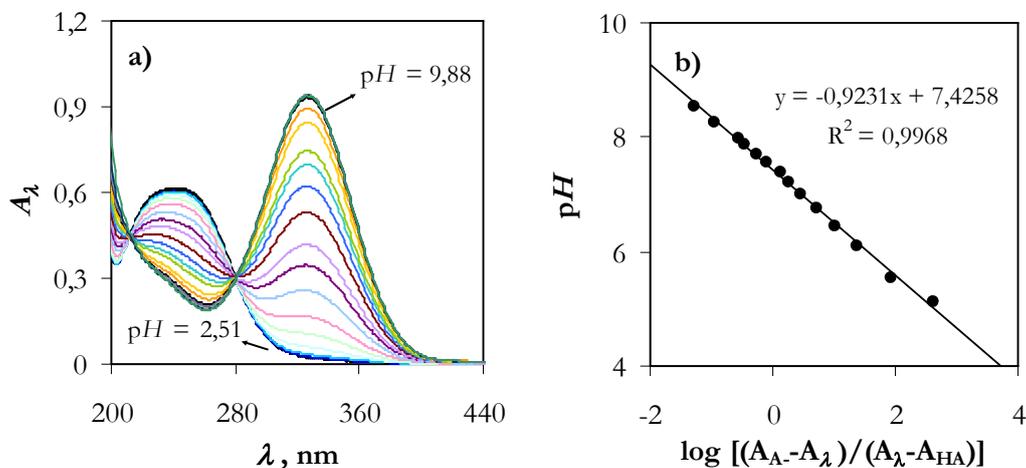


Figura 4.29. (a) Espectrogramas del ENA a diferentes valores de pH y (b) determinación del pK_a del ENA, $\lambda = 350$ nm en medio acuoso; $T = 25,0$ °C. $[ENA]_0 = 1,4 \times 10^{-4}$ M.

Como en el intervalo de trabajo, la variación de K_a con la temperatura es menor que el error experimental del método, no se ha tomado en consideración.

4.2.2.1.2.2. Método volumétrico

La Figura 4.30.a muestra la curva de valoración del ENA en disolución acuosa. Con el volumen de hidróxido sódico consumido en la valoración se ha calculado el valor del pK_a (Figura 4.30.b) mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{V}{V_{\max} - V} \quad (14)$$

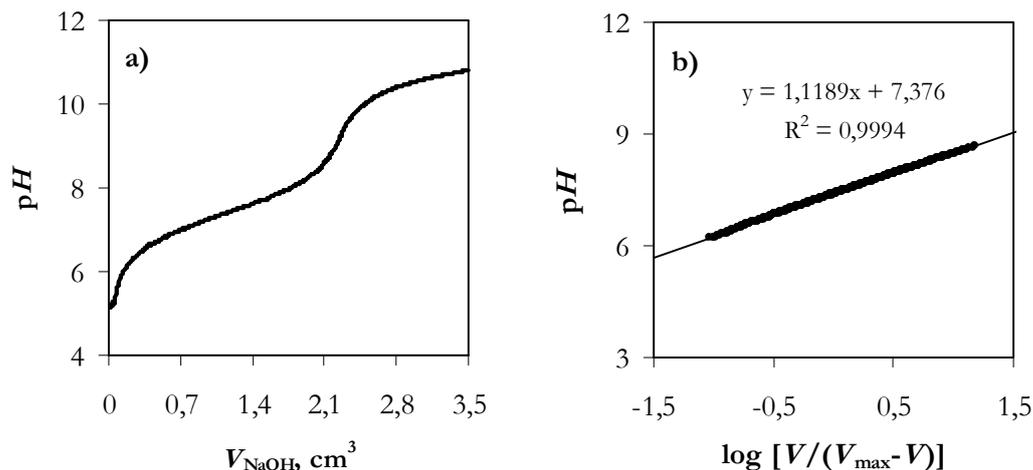


Figura 4.30. (a) Curva de valoración del ENA en disolución acuosa y (b) determinación del pK_a del ENA a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$. $[\text{ENA}]_0 = 2 \times 10^{-3}\text{ M}$; $[\text{NaOH}] = 9,38 \times 10^{-2}\text{ M}$.

El valor del pK_a obtenido en disolución acuosa es $pK_a = 7,4 \pm 0,1$ a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$, valor en excelente acuerdo con el medido mediante espectrofotometría.

La Tabla 4.17. recoge los valores de la constante de disociación del ENA, determinada espectrofotométricamente, en diferentes medios agua:dioxano.

Tabla 4.17. Valores de la constante de disociación del ácido etilnitrólico en diferentes medios agua:dioxano a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$.

Agua:dioxano (v/v)	$10^8 K_a^a$ (M)	$\varepsilon (T = 25,0\text{ }^\circ\text{C})^b$
10:0	$4,0 \pm 0,8$	78,49
9,5:0,5	$4,0 \pm 0,8$	74,09
9:1	$2,0 \pm 0,5$	69,71
8,5:1,5	$2,0 \pm 0,5$	65,23
8:2	$1,3 \pm 0,3$	60,84
7:3	$1,0 \pm 0,2$	51,92
6:4	$0,4 \pm 0,1$	42,99
5:5	$0,10 \pm 0,02$	34,27

^a Valor promedio

^b Resultados obtenidos de bibliografía (Timmermans, 1960; Akerlof y Sort, 1936) o calculados mediante interpolación lineal a partir de éstos.

Se ha observado una relación lineal entre la constante de disociación del ácido etilnitrólico y el parámetro de Onsager $(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1)$ en las diferentes mezclas agua:dioxano (v/v) (Figura 4.31). Este comportamiento apoya la idea que el equilibrio $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$ ocurre como se muestra en el Esquema 4.16. (véase Apartado 4.1.1.3.).

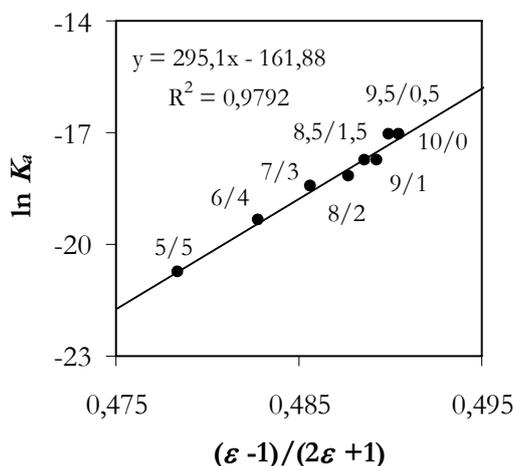
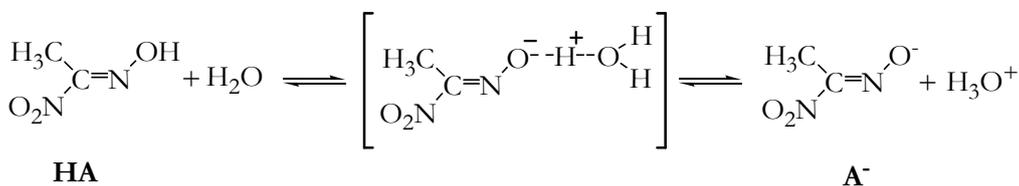


Figura 4.31. Variación de la constante de disociación del ENA en medios agua:dioxano con el coeficiente de Onsager a $T = 25,0^\circ\text{C}$.



Esquema 4.16. Formación de enlaces $\text{O} \cdots \text{H}$ en la reacción de disociación del ENA.

4.2.2.1.3. Influencia del pH

Como solamente la forma disociada del ácido etilnitrólico se descompone para generar óxido de acetonitrilo (Esquema 4.14.) la reacción de descomposición del ENA se ve influida por el pH del medio. En la Figura 4.32. se observa la variación de la pseudoconstante de descomposición del ENA con el pH del medio (Ec 41; *cfr.* Apartado 3.2.3.1.).

$$k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} \frac{K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (41)$$

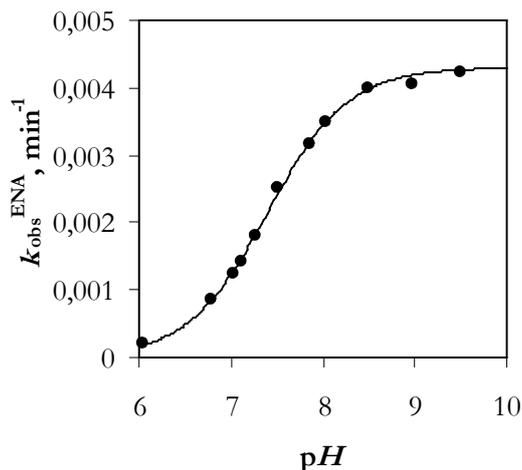


Figura 4.32. Variación de la pseudoconstante de velocidad de descomposición del ENA con el pH del medio en disolución acuosa a $T = 37,5$ °C.

Al representar los valores de k_{obs}^{ENA} frente al cociente $K_a/([H^+]+K_a)$ se obtiene una línea recta (Figura 4.33.) de ordenada en el origen no significativamente distinta de cero y cuya pendiente es la constante de descomposición k_{des}^{ENA} .

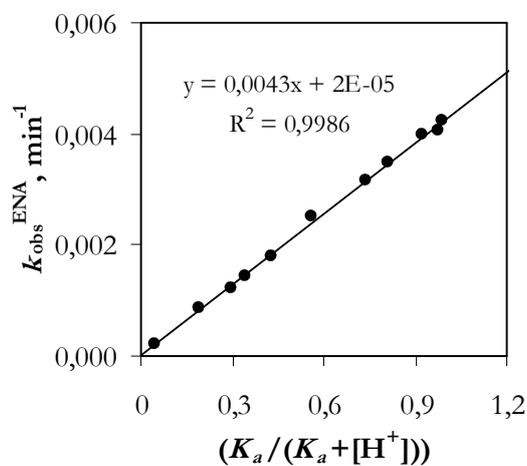


Figura 4.33. Determinación de la constante de descomposición del ENA k_{des}^{ENA} en disolución acuosa a $T = 37,5$ °C.

Al medir la constante de hidrólisis del óxido de acetonitrilo (ACNO) en el intervalo de pH 6,0-9,5, no se han observado variaciones significativas con la acidez del medio.

4.2.2.1.4. Influencia del medio y de la temperatura

La Tabla 4.18. recoge los valores de la constante de descomposición del ENA en medios agua:dioxano y su variación con la temperatura.

Tabla 4.18. Constantes de velocidad de descomposición del ácido etilnitrólico en función de la composición del medio y de la temperatura.

T (°C)	Agua:dioxano (v/v)					
	10/0	9/1	8/2	7/3	6/4	5/5
	$10^{5a} k_{\text{des}}^{\text{ENA}}$ (s ⁻¹)	$10^5 k_{\text{des}}^{\text{ENA}}$ (s ⁻¹)				
25,0	1,53 ± 0,03	1,39 ± 0,04	0,91 ± 0,04	0,69 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,44 ± 0,01
27,5	2,17 ± 0,05	1,79 ± 0,03	1,31 ± 0,01	0,99 ± 0,02	0,77 ± 0,01	0,57 ± 0,01
30,0	2,86 ± 0,04	2,61 ± 0,04	1,83 ± 0,02	1,37 ± 0,01	1,09 ± 0,01	0,87 ± 0,01
32,5	3,99 ± 0,03	3,92 ± 0,02	2,41 ± 0,02	1,87 ± 0,02	1,46 ± 0,02	1,12 ± 0,02
35,0	5,31 ± 0,04	4,97 ± 0,01	3,27 ± 0,02	2,59 ± 0,03	2,01 ± 0,02	1,59 ± 0,02
37,5	7,11 ± 0,04	6,36 ± 0,17	4,40 ± 0,03	3,59 ± 0,06	2,67 ± 0,03	2,08 ± 0,03

^aIntervalo de confianza del 95%

Los valores de la constante de descomposición del ENA en diferentes mezclas agua:dioxano (Tabla 4.18.) aumentan con el porcentaje de dioxano en el medio. El buen ajuste de los resultados a la correlación de Palm-Vizgert (Figura 4.34.) sugiere que la reacción de descomposición del ENA transcurre a través de un mecanismo común en todos los medios agua:dioxano estudiados.

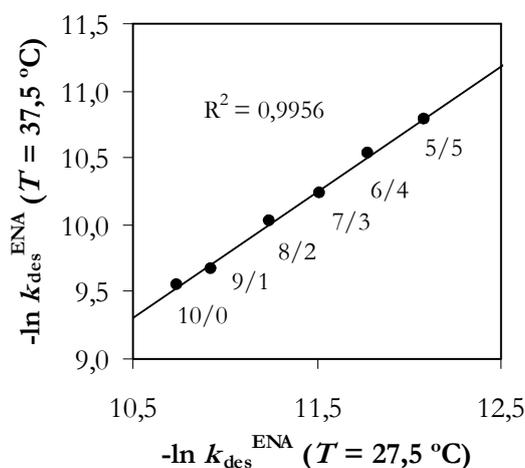


Figura 4.34. Correlación de Palm Vizgert para la reacción de descomposición del ENA en mezclas agua:dioxano.

Para conocer los valores de los parámetros de activación se han manejado las ecuaciones de Arrhenius y de Eyring-Wynne-Jones (*cf.* Apartado 3.1.2.). Las Figuras 4.35.a y b muestran el buen cumplimiento de las mismas.

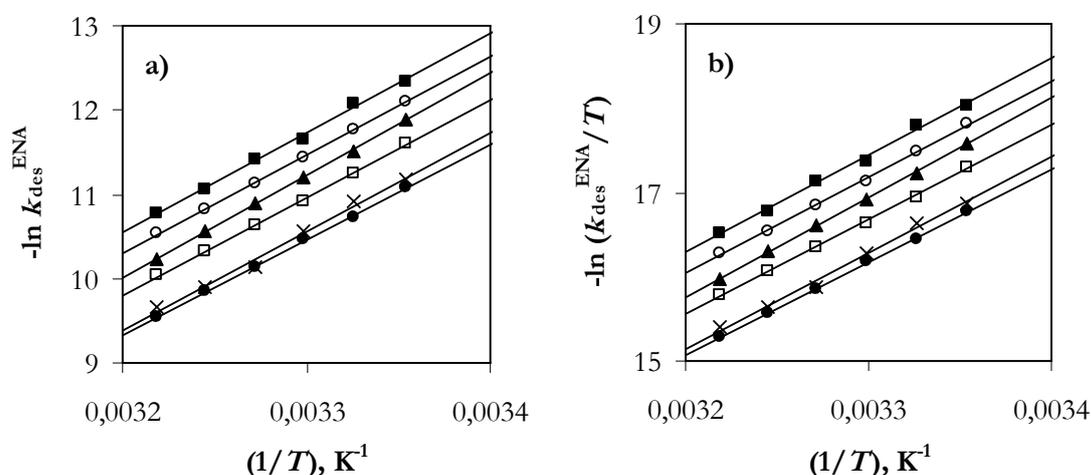


Figura 4.35. (a) Representación de Arrhenius y (b) Eyring para la reacción de descomposición del ENA en medios agua:dioxano: 10:0 (●), 9:1 (×), 8:2 (□), 7:3 (▲), 6:4 (○) y 5:5 (■).

Como puede observarse (Tabla 4.19.) los valores de los parámetros de activación no varían significativamente con la composición del medio.

Tabla 4.19. Parámetros de activación en función de la composición del medio para la reacción de descomposición del ácido etilnitroso

Agua:dioxano (v/v)	ENA			
	E_a^a (kJ mol ⁻¹)	ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹)	$-\Delta S^\ddagger$ (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	$\Delta G^\ddagger_{25^\circ\text{C}}$ (kJ mol ⁻¹)
10/0	94 ± 1	92 ± 1	30 ± 2	101 ± 1
9/1	97 ± 4	95 ± 4	20 ± 8	101 ± 4
8/2	96 ± 2	93 ± 2	28 ± 3	102 ± 2
7/3	101 ± 1	98 ± 1	14 ± 2	102 ± 1
6/4	97 ± 1	95 ± 1	27 ± 2	103 ± 1
5/5	98 ± 3	96 ± 3	26 ± 5	104 ± 3

^aDesviación estándar

El signo negativo de la entropía de activación sugiere que el estado de transición está más ordenado que los reactivos.

También se ha estudiado la influencia de la temperatura en la reacción de hidrólisis del óxido de acetonitrilo (ACNO) para formar ácido acetohidroxámico (ACH) (Esquema 4.14.). La Figura 4.36. muestra el buen cumplimiento de la ecuación de las ecuaciones de Arrhenius y Eyring.

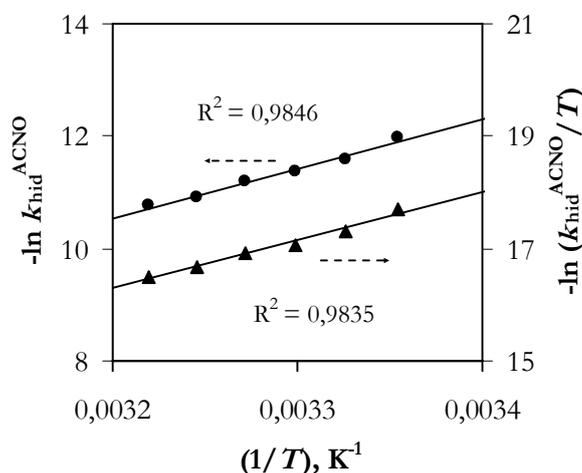


Figura 4.36. Representación de las ecuaciones de Arrhenius (●) y Eyring (▲) para la reacción de hidrólisis de la especie ACNO en disolución acuosa.

Se han determinado los parámetros de activación en disolución acuosa: $E_a = 73 \pm 5$ kJ mol⁻¹; $\Delta H^\ddagger = 71 \pm 5$ kJ mol⁻¹; $\Delta S^\ddagger = -106 \pm 17$ J K⁻¹ mol⁻¹; $\Delta G^\ddagger (T = 25,0 \text{ °C}) = 103 \pm 5$ kJ mol⁻¹.

El elevado valor negativo de la entropía de activación sugiere que el estado de transición está más ordenado que los reactivos, lo que podría explicarse en términos de solvatación del estado de transición.

4.2.2.1.5. Efecto cinético isotópico

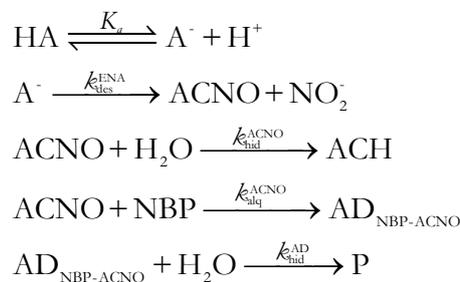
Para profundizar en el conocimiento del mecanismo de descomposición del ácido etilnitroso, se ha determinado su constante de descomposición en agua deuterada, tras medir previamente la constante de disociación del ENA en el mismo medio: $K_a = 8,1$ ($T = 25,0 \text{ °C}$; *cf.* Apéndice D). El valor obtenido en agua deuterada no difiere significativamente del valor observado en disolución acuosa, $k_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{ENA}} = 7,62 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $k_{\text{des H}_2\text{O}}^{\text{ENA}} = 7,11 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, de modo que $k_{\text{des H}_2\text{O}}^{\text{ENA}} / k_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{ENA}} \cong 1$.

4.2.2.2. Reacción de alquilación de NBP por ENA

4.2.2.2.1. Identificación de las especies presentes en el mecanismo de reacción

La reacción de alquilación de la NBP por el ácido etilnitrótico tiene lugar entre la molécula de NBP y el óxido de acetonitrilo, especie intermedia en la reacción de descomposición del ENA (*cf.* Apartado 3.2.3.2.).

Conocida la reactividad de los óxidos de nitrilo frente a nucleófilos neutros como las aminas para dar lugar a las correspondientes aldoximas (Dignam *et al.*, 1977; 1979) y su reacción de hidrólisis para formar ácidos hidroxámicos (Dignam *et al.*, 1978) se propone el siguiente mecanismo para la reacción de alquilación de la NBP por el ACNO (Esquema 4.17.):



Esquema 4.17. Mecanismo de reacción propuesto para la reacción de alquilación de la NBP por el ACNO

El coeficiente de absorción molar del aducto NBP-ACNO en medio 7:3, agua:dioxano se ha determinado por ajuste de los resultados experimentales a la Ec 68 (*cf.* Apartado 3.2.3.2.) obteniéndose el valor $\varepsilon_{\text{AD}} = 1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 519 \text{ nm}$). El máximo de absorción del aducto NBP-ACNO aparece en una longitud de onda más corta que las observadas con otras especies alquilantes del NBP (Epstein *et al.*, 1955; Sawicki *et al.*, 1963). Este resultado sugiere una mayor deslocalización electrónica en la estructura del aducto NBP-ACNO que, como puede observarse en la Figura 4.37., puede explicarse con la presencia del doble enlace del resto alquílico conjugado con el anillo aromático de la molécula de NBP.

El espectro de masas del aducto NBP-ACNO presenta un pico con relación m/z 272 (*cf.* Apéndice B) correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$, acorde con la estructura propuesta (Figura 4.37.). Se ha observado un pico con relación m/z 290 correspondiente a su producto de hidrólisis (P, *cf.* Apéndice B).

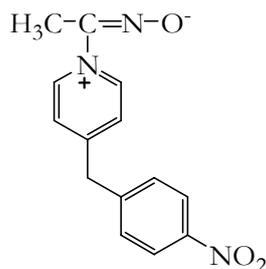


Figura 4.37. Estructura del aducto NBP-ACNO

4.2.2.2.2. Ecuación de velocidad

De acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto (Esquema 4.15.) la ecuación de velocidad de formación del aducto NBP-ACNO (véase Apartado 3.2.3.2) puede escribirse según:

$$v = \frac{d[\text{AD}]}{dt} = k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}] [\text{NBP}] - k_{\text{hid}}^{\text{AD}} [\text{AD}] \quad (54)$$

Para determinar la capacidad alquilante del óxido de acetonitrilo se ha manejado la ecuación integrada de velocidad en términos de absorbancia:

$$A_{\text{AD}} = \frac{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0}{(k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}) (k_{\text{hid}}^{\text{AD}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}})} \left(e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} - e^{-k_{\text{hid}}^{\text{AD}} t} \right) \quad (66)$$

La Ec 66 puede escribirse de forma simplificada así:

$$y = \frac{a}{b-c} \left(e^{-cx} - e^{-bx} \right) \quad (67)$$

donde $a = (\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0) / (k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}})$, $b = k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ y $c = k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$.

La Figura 4.38. muestra el ajuste no lineal de los resultados a la Ec 67.

El valor de la absorbancia a tiempo t (A_t) se ha corregido con el valor a tiempo infinito (A_∞). Como consecuencia de haber trabajado con exceso de NBP, la absorbancia a tiempo t es suma de la del aducto y la del NBP, es decir, $A_t = A_{\text{AD}} + A_{\text{NBP}}$. Como la absorbancia de la NBP es la absorbancia medida cuando todo el aducto ha desaparecido, es decir, a tiempo infinito, podemos escribir: $A_t = A_{\text{AD}} + A_\infty$.

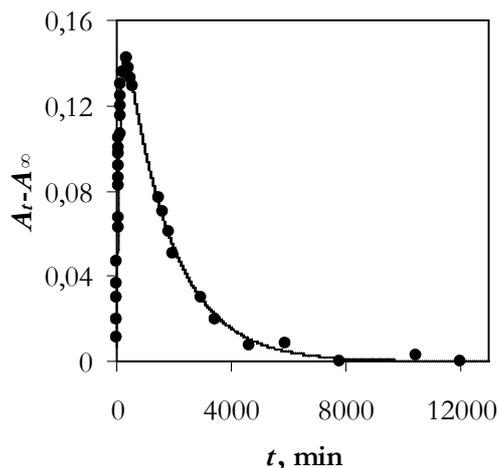


Figura 4.38. Variación de la absorbancia del aducto NBP-ACNO. Medio 7:3, agua:dioxano, pH 9,17; $T = 30,0\text{ }^\circ\text{C}$; $[\text{ENA}]_0 = 8,4 \times 10^{-4}\text{ M}$; $[\text{NBP}]_0 = 2,6 \times 10^{-2}\text{ M}$; $A_\infty = 0,037$.

Para confirmar el orden uno respecto a la concentración del reactivo limitante (ENA) se ha manejado el parámetro a , de modo que, al trabajar con diferentes concentraciones de dicho reactivo, mantenidas constantes las demás variables (pH, temperatura y concentración de NBP) la representación de los valores de a frente a la concentración de ENA debe ser una línea recta de ordenada en el origen no significativamente distinta de cero. La Figura 4.39a muestra los resultados. Con la forma logarítmica del parámetro a (Figura 4.39.b) se confirma el orden uno respecto a la concentración del reactivo ENA.

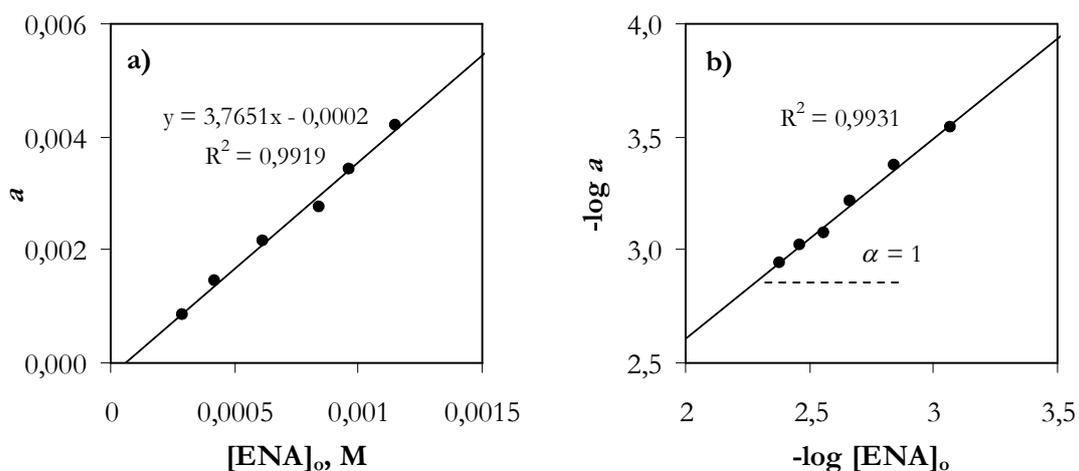


Figura 4.39. (a) Influencia de la concentración de ENA en el factor pre-exponencial y (b) verificación del orden uno con respecto a la concentración de ENA. Medio 7:3, agua:dioxano, pH 9,20; $[\text{NBP}]_0 = 2,0 \times 10^{-2}\text{ M}$; $T = 37,5\text{ }^\circ\text{C}$.

Con el inverso del factor preexponencial de la Ec 67 y como

$k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} = k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}} [\text{NBP}]$ y $k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{H}_2\text{O}]$ se puede escribir:

$$\frac{(b-c)}{a} [\text{ENA}]_0 = \frac{[\text{H}_2\text{O}] (k_{\text{hid}}^{\text{AD}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}})}{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \left(\frac{k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}}}{k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}} \right) \frac{1}{[\text{NBP}]} + \frac{(k_{\text{hid}}^{\text{AD}} - k_{\text{obs}}^{\text{ENA}})}{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \quad (68)$$

Al representar los valores del primer miembro de la Ec 68 frente a los de $1/[\text{NBP}]$, mantenidas constantes las demás variables (temperatura, pH y $[\text{ENA}]$) se obtiene la representación lineal que muestra la Figura 4.40. .

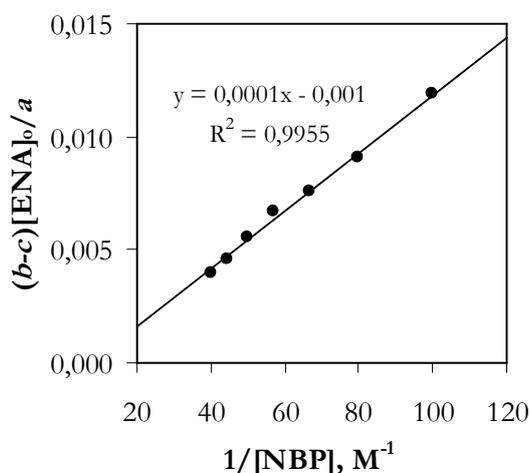


Figura 4.40. Ajuste de los resultados experimentales a la Ec 94. Medio 7:3, agua:dioxano, pH 9,20; $[\text{ENA}]_0 = 8,0 \times 10^{-4} \text{ M}$; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Verificado el orden uno respecto a $[\text{NBP}]$, con los valores de la pendiente y ordenada en el origen de la recta obtenida se puede conocer el valor del coeficiente de absorción molar del aducto NBP-ACNO y del cociente $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$, este último tomado como índice para interpretar las correlaciones entre reactividad química de la NBP y la capacidad mutágena de los agentes alquilantes objeto de estudio.

Como en medio ácido la constante de velocidad de la reacción de descomposición de ENA es muy pequeña ($k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} = 3,77 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ a pH 6,25 y $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$) y también mucho más pequeña que la constante de hidrólisis del aducto, es decir, $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} \ll k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$, la Ec 68 puede escribirse así (cfr. Apartado 3.2.3.2.):

$$A_{\text{AD}} = \frac{\varepsilon_{\text{AD}} l k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0}{(k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}) k_{\text{hid}}^{\text{AD}}} (1 - e^{-k_{\text{hid}}^{\text{AD}} t}) \quad (69)$$

La Ec 69 puede escribirse de forma sencilla así:

$$y = a(1 - e^{-bx}) + c \quad (70)$$

donde a , b y c son: $a = (\varepsilon_{AD} / k_{alq\ obs}^{ACNO} k_{obs}^{ENA} [ENA]_0) / [(k_{hid\ obs}^{ACNO} + k_{alq\ obs}^{ACNO}) k_{hid}^{AD}]$, $b = k_{hid}^{AD}$ y c un factor de ajuste.

La Figura 4.41. muestra el ajuste no lineal de los resultados a la Ec 70 (pH 4,83 y $T = 37,5$ °C).

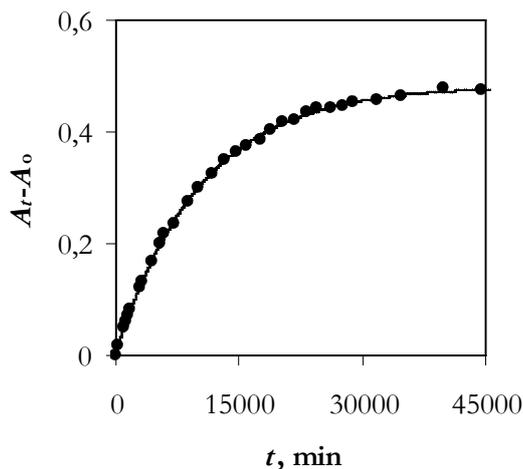


Figura 4.41. Variación de la absorbancia del aducto NBP-ACNO a un pH 4,83. Medio 7:3, agua:dioxano; $[NBP]_0 = 2,0 \times 10^{-2}$ M; $[ENA]_0 = 8,0 \times 10^{-4}$ M; $T = 37,5$ °C.

El valor de la absorbancia a tiempo t es suma de dos contribuciones: la absorbancia del aducto a ese tiempo (A_{AD}) y la del NBP (A_{NBP}) que puede aproximarse a la absorbancia inicial, puesto que la concentración de aducto formado a tiempo cero es cero. Así pues: $A_t = A_{AD} + A_o$.

En pH ácido una fracción importante de la NBP se encuentra protonada ($pK_{a1} = 4,3$ en medio 7:3 agua:dioxano). Por tanto, la concentración de la especie NBP, especie efectiva en la reacción de alquilación, puede determinarse a partir de la Ec 74 (cfr. Apartado 4.1.1.).

$$[NBP] = [NBP]_{total} \frac{1}{10^{4,3} [H^+] + 1} \quad (74)$$

Para calcular la capacidad alquilante del ACNO en medio ácido se ha manejado el inverso del factor preexponencial de la Ec 70. Como $k_{alq\ obs}^{ACNO} = k_{alq}^{ACNO} [NBP]$ y $k_{hid\ obs}^{ACNO} = k_{hid}^{ACNO} [H_2O]$, se puede escribir:

$$\frac{1}{a}[\text{ENA}]_0 = \frac{[\text{H}_2\text{O}]\kappa_{\text{hid}}^{\text{AD}}}{\varepsilon_{\text{AD}} l \kappa_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \left(\frac{\kappa_{\text{hid}}^{\text{ACNO}}}{\kappa_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}} \right) \frac{1}{[\text{NBP}]} + \frac{\kappa_{\text{hid}}^{\text{AD}}}{\varepsilon_{\text{AD}} l \kappa_{\text{obs}}^{\text{ENA}}} \quad (71)$$

La representación del primer miembro de la Ec 71 frente a $1/[\text{NBP}]$, mantenidas constantes las demás variables (pH , temperatura y $[\text{ENA}]$) es una línea recta (Figura 4.42.). Así, al mismo tiempo que se verifica el orden uno respecto a la concentración de NBP, con los valores de la pendiente y ordenada en el origen de la recta obtenida, se puede calcular el cociente $\kappa_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/\kappa_{\text{hid}}^{\text{ACNO}}$ y conocer el coeficiente de absorción molar del aducto NBP-ACNO.

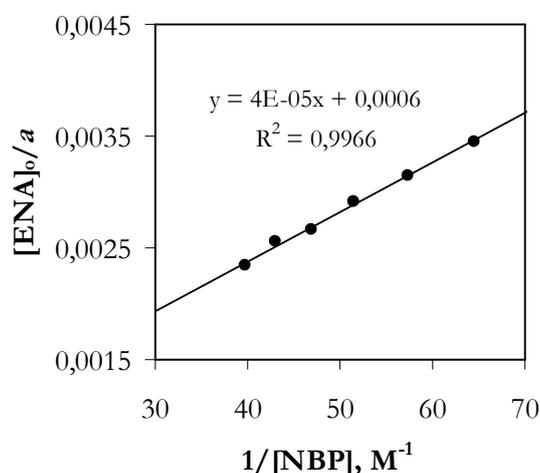


Figura 4.42. Influencia de la concentración de NBP a pH 5,80. Medio 7:3 (Tampón acético/acetato:dioxano); $T = 37,5$ °C; $[\text{ENA}]_0 = 8,0 \times 10^{-4}$ M;

4.2.2.2.3. Influencia del pH

Para investigar la influencia del pH del medio sobre la capacidad alquilante de la NBP se ha trabajado en el intervalo pH 4,5-10,0. La Tabla 4.20. muestra los valores del cociente $(\kappa_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/\kappa_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ en medios de diferente acidez.

Como no se ha podido medir el valor de la constante de hidrólisis del ACNO, no se conoce el valor de la constante de alquilación de la NBP por el ACNO. Por ello se ha manejado el cociente $(\kappa_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/\kappa_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$, que permite evaluar capacidad alquilante del ACNO sobre la NBP, y la influencia de la reacción de hidrólisis del agente alquilante que compite con la alquilación.

Como queda reflejado en la Tabla 4.20., el valor del cociente $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ disminuye al aumentar el valor del pH del medio de reacción. Esta variación se debe a la dependencia de la constante de hidrólisis del ACNO con la acidez del medio de reacción. Para valores de $\text{pH} > 6$ se ha observado una relación lineal entre el inverso de $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ y la concentración de iones hidróxido.

Tabla 4.20. Influencia del pH en la reacción de alquilación de la NBP por el ACNO en medio 7:3 agua:dioxano; $T = 37,5 \text{ }^\circ\text{C}$

pH	$(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})^c$	f	$10^3 k_{\text{hid}}^{\text{AD}c}$ (min^{-1})	AL (min)
4,83 ^a	648 ± 7	0,25	0,096 ± 0,001	2608,2
5,30 ^a	688 ± 9	0,26	0,262 ± 0,007	996,2
5,80 ^a	538 ± 5	0,22	0,66 ± 0,02	326,9
6,25 ^a	270 ± 15	0,12	1,89 ± 0,05	64,5
8,66 ^b	372 ± 11	0,16	9,3 ± 0,5	17,3
9,19 ^b	301 ± 8	0,13	19 ± 1	7,0
9,68 ^b	179 ± 24	0,08	28 ± 2	3,0

[ENA]_o = $8,0 \times 10^{-4}$ M; [NBP]_o = $2,0 \times 10^{-2}$ M

^a Tampón Acetato; ^b Tampón Borato

^c Desviación estándar

Para valorar cuantitativamente la influencia de la hidrólisis del ACNO sobre su potencial alquilante efectivo, se ha utilizado el parámetro f que se relaciona con las constantes de velocidad de alquilación por ACNO y de hidrólisis del mismo según la Ec. 78.

$$f = \frac{k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}} [\text{NBP}]}{k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}} [\text{NBP}] + k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{H}_2\text{O}]} \quad (78)$$

Conocido el valor de $(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})$ se puede conocer el de f con la Ec

78 escrita en la forma:

$$\frac{1}{f} = 1 + \frac{1}{(k_{\text{alq}}^{\text{ACNO}}/k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}})} \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{NBP}]} \quad (79)$$

La fracción f de ACNO que forma aducto varía con la acidez del medio (Tabla 4.20). Al aumentar el valor del pH disminuye el de f . En el intervalo pH 4,5-10,0 los valores de f son inferiores al 50%, es decir, la fracción de ACNO hidrolizada es mayor que la que reacciona con la NBP para formar aducto.

Tanto el cociente $(k_{alq}^{ACNO} / k_{hid}^{ACNO})$ como la fracción de ACNO que da lugar a aducto, permiten conocer la influencia de la reacción de hidrólisis del ACNO sobre su capacidad alquilante. En algunos casos el aducto formado es inestable, siendo esta eventual inestabilidad un factor a tener en cuenta al evaluar la actividad alquilante de un determinado compuesto. Con tal objeto se ha introducido un nuevo parámetro, denominado tiempo de vida (AL), que toma en consideración la hidrólisis del aducto NBP-ACNO. El tiempo de vida del aducto valora la cantidad total de aducto presente a lo largo de la reacción por unidad de concentración de agente alquilante y se ha definido como el cociente entre el área bajo la curva $[AD]/t$ y la concentración de agente alquilante (Eq 80). Al aumentar el área bajo la curva aumenta AL y, con él, la efectividad temporal del agente alquilante.

$$AL = \frac{\int_0^{\infty} [AD] dt}{[ENA]_o} = \frac{k_{alq}^{ACNO} [NBP]}{(k_{alq}^{ACNO} [NBP] + k_{hid}^{ACNO} [H_2O]) k_{hid}^{AD}} = \frac{f}{k_{hid}^{AD}} \quad (80)$$

El valor de AL permite valorar cómo la inestabilidad del aducto influye en la capacidad alquilante del ACNO e integra tres contribuciones: la alquilación de NBP por ACNO, la hidrólisis de éste y la estabilidad del aducto formado.

Conocidos los valores de f y de la constante de hidrólisis del aducto, se puede calcular el de AL (Ec 80). El valor de la constante de hidrólisis del aducto NBP-ACNO se calcula directamente del ajuste no lineal a las Ecs 68 ó 71 (en medios básico o ácido, respectivamente; *cf.* Apartado 3.2.3.2.).

La Tabla 4.20. recoge los valores de la constante de hidrólisis del aducto k_{hid}^{AD} y de AL a diferentes pH s.

Al disminuir la acidez del medio de reacción crece la constante de hidrólisis del aducto. Esta variación, junto con la observada para el parámetro f , se refleja en el tiempo de vida del aducto. El valor de AL se mueve entre 2.600 min a pH 4,8 y 3 min a pH 9,7. Se observa así que el tiempo de vida del aducto es un buen indicador de la eficacia de alquilación de agentes como el ACNO, puesto que tiene en cuenta las tres

contribuciones: alquilación de la NBP por ACNO, hidrólisis competitiva del mismo e hidrólisis del aducto NBP-ACNO.

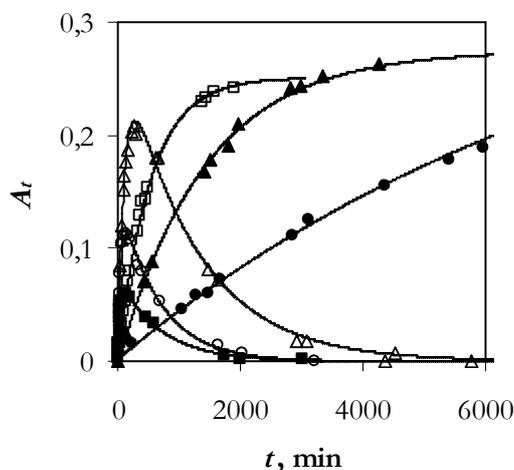


Figura 4.43. Influencia del pH en los perfiles cinéticos observados en la reacción de alquilación de la NBP por el ACNO. Medio 7:3 (●) pH 4,83; (▲) pH 5,80; (□) pH 6,25; (Δ) pH 8,66; (○) pH 9,19; (■) pH 9,68. $[ENA]_0 = 8,0 \times 10^{-4}$ M; $[NBP]_0 = 2,0 \times 10^{-2}$ M; $T = 37,5$ °C.

4.2.2.2.4. Influencia de la temperatura

La Tabla 4.21. recoge los valores de $(k_{alq}^{ACNO} / k_{hid}^{ACNO})$, f y AL y los de la constante de hidrólisis del aducto NBP-ACNO a diferentes temperaturas.

Tabla 4.21. Influencia de la temperatura en la reacción de alquilación de la NBP por el ACNO en medio 7:3 agua:dioxano

T (°C)	$(k_{alq}^{ACNO} / k_{hid}^{ACNO})^a$	f	$10^2 k_{hid}^{AD}^a$ (min ⁻¹)	AL (min)
37,5	301 ± 8	0,13	1,9 ± 0,1	7,0
35,0	391 ± 8	0,17	1,59 ± 0,08	10,5
32,5	283 ± 13	0,13	1,14 ± 0,05	11,1
30,0	264 ± 18	0,12	1,02 ± 0,03	11,7
27,5	259 ± 7	0,12	0,76 ± 0,08	15,6
25,0	238 ± 57	0,11	0,56 ± 0,02	19,4

$[ENA]_0 = 8,0 \times 10^{-4}$ M; $[NBP]_0 = 2,0 \times 10^{-2}$ M; tampón Borato pH 9,20

^aDesviación estándar

En el intervalo $T = 25,0\text{-}37,5$ °C se ha observado una notable variación de la pseudoconstante de velocidad de hidrólisis con la temperatura (Tabla 4.21.). Esta dependencia se refleja en el valor de AL, observándose una apreciable disminución del mismo al aumentar la temperatura ($AL_{\text{max}} \approx 19$ min) a $T = 25,0$ °C.

4.2.2.2.5. Estudio comparativo de la capacidad alquilante de diversas especies

Con objeto de comparar la capacidad alquilante del ACNO con la de otras especies estudiadas investigadas en nuestro grupo de trabajo: β -propiolactona y β -butirolactona (Manso *et al.*, 2005), dicetena (Gómez-Bombarelli *et al.*, 2008) y *N*-alquil-*N*-nitrosoureas (*N*-metil, *N*-etil, *N*-propil y *N*-butilnitrosourea, donde el agente alquilante es el correspondiente ion alquildiazonio; Manso *et al.*, 2008), se han determinado los valores de los parámetros reflejados en la Tabla 4.22. En ella se recogen los valores de $(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$, de f y de AL en aquellos casos en que el aducto es inestable y se hidroliza.

Tabla 4.22. Estudio comparativo de la capacidad alquilante del óxido de acetonitrilo comparada con otros agentes alquilantes

Agente alquilante	$(k_{\text{alq}}/k_{\text{hid}})$	f	AL (min)
β -Propiolactona ^a	5395	0,76	Aducto estable
β -Butirolactona ^a	3158	0,62	Aducto estable
Ión Metildiazonio ^b	12878	0,87	Aducto estable
Ión Etildiazonio ^b	10809	0,85	Aducto estable
Ión Propildiazonio ^b	4691	0,71	Aducto estable
Ión Butildiazonio ^b	3204	0,62	Aducto estable
Dicetena ^c	500000	1	1,2
Óxido de acetonitrilo ^d	391	0,17	10,5

$[\text{NBP}]_0 = 2,0 \times 10^{-2}$ M; Medio 7:3 (agua:dioxano); $T = 35,0$ °C

^aManso *et al.*, 2005; ^bManso *et al.*, 2008; ^cGómez-Bombarelli *et al.*, 2008

^dpH 9,20

El valor del parámetro f para la reacción de alquilación de la NBP por el óxido de acetonitrilo, es pequeño ($f = 0,17$) comparado con el calculado para los demás agentes alquilantes, que oscila de 0,6 a 0,9 para los iones alquildiazonio y las lactonas BPL y

BBL y es la unidad en el caso de la dicetena, donde la reacción de hidrólisis no compite de forma significativa con la reacción de alquilación.

Como las especies BPL, BBL y los iones alquildiazonio forman aductos estables con la NBP, el cálculo de AL es ocioso. Sin embargo, en el caso de la dicetena o del propio óxido de acetonitrilo, el valor de AL debe tenerse en cuenta, debido a la inestabilidad de los aductos que forman con NBP. Los bajos valores del tiempo de vida encontrados en estos casos reflejan (Tabla 4.22.) la gran inestabilidad de los aductos. En el caso de la dicetena, el tiempo de vida de su aducto con NBP es muy pequeño (~ 1 min) coherente con su inactividad como carcinógeno (Van Duuren, 1969).

Puede concluirse así que la pequeña fracción de aducto NBP-ACNO formado y la hidrólisis del mismo, podrían ser las causas de la baja capacidad alquilante del ACNO comparada con la que presentan otros agentes alquilantes.

-
- Akerlof, G.; Sort, O. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1241.
Annulli, A.; Mencarelli, P.; Stegel, F. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4065.
De Santis, F.; Stegel, F. *Tetrahedron Letters* **1974**, 1079.
Dignam, K.J.; Hegarty, A. F.; Quain, P. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1977**, 1457.
Dignam, K.J.; Hegarty, A. F.; Quain, P. L. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 388.
Dignam, K.J.; Hegarty, A. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1979**, 1437.
Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* **1955**, *27*, 1435.
Espenson, J. H. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms* 2ª Ed McGraw-Hill International Edition 1995.
Gómez-Bombarelli, R.; González-Pérez, M.; Pérez-Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1964.
Kada, T.; Tutikawa, K.; Sadaie, Y. *Mut. Res.* **1972**, *16*, 165.
Kito, Y.; Namiki, M. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 505.
Llor, J.; Sánchez-Nevado, M.; Asensio, S.; Cortijo, M. *Anal. Quim.* **1987**, *83*, 317.
Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1161.
Manso, J. A.; Pérez-Prior, M. T.; García-Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 932.
McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1975, *72*, 5135.
Namiki, M.; Kada, T. *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1335.
Namiki, M.; Uda, S.; Osawa, T.; Tsuji, K.; Kada, T. *Mut. Res.* **1980**, *73*, 21.
Namiki, M.; Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, K.; Tsuji, K. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 407.
Oh, H. K.; Jeong, E. M.; Lee, I. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1998**, *19*, 1334.
Palm, V. A.; Vizgert, R. V. *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.* **1962**, *142*, 1091.
Sawicki, E.; Bender, D. F.; Hauser, T. R.; Wilson, R. M.; Meeker, J. E. Jr; Meeker, J. E. *Anal. Chem.* **1963**, *35*, 1479.
Timmermans, J. *Physico-Chemical Constants of Binary Systems, Interscience*, New York, 1960, pp16.
Van Duuren, B. L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1969**, *163*, 633.
Yew, K. H.; Koh, H. J.; Lee, H. W.; Lee, I. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1995**, 2263.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

5. Conclusiones

I. Capacidad alquilante del ácido sórbico y sus sales

El estudio cinético de la capacidad alquilante del ácido sórbico y sus sales sobre la molécula 4-(p-nitrobencil)piridina (NBP) ha conducido a las siguientes conclusiones:

1. Las mezclas ácido sórbico/sorbato sódico y ácido sórbico/sorbato potásico muestran actividad alquilante sobre la NBP, molécula de nucleofilia análoga a la de las bases del ADN. La reacción de alquilación cumple la siguiente ecuación de velocidad: $v = k_{\text{alq}} [\text{H}^+] [\text{S}] [\text{NBP}] / (K_a + [\text{H}^+])$, donde K_a la constante de disociación del ácido sórbico.

2. La adición de la NBP en el carbono C5 de la molécula de ácido sórbico se ve favorecida energéticamente frente a la adición en C3.

3. En los sistemas HS+NBP+KOH y HS+NBP+NaOH la especie alquilante efectiva es la forma no disociada del ácido sórbico (HS).

4. La reactividad de la mezcla sórbico/sorbato aumenta al disminuir el pH, con una actividad alquilante máxima en el intervalo de pH 5-6. En el pH celular (~7) el porcentaje de la especie alquilante efectiva (HS) es despreciable.

5. El sorbato potásico muestra capacidad alquilante sobre la molécula de NBP. La ecuación de velocidad es análoga a la de alquilación de la NBP por el ácido sórbico, siendo la forma sin disociar de este último la especie alquilante efectiva.

6. El coeficiente de absorción del aducto formado con la NBP es: $\epsilon_{\text{AD}} = 215 \pm 18 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 580 \text{ nm}$).

II. Reacción entre el ácido sórbico y el nitrito sódico: reactividad de 1,4-dinitro-2-metil pirrol

El estudio de la descomposición de 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) y de la alquilación de NBP por NMP ha conducido a las siguientes conclusiones:

7. En la reacción de descomposición del NMP, el ión hidróxido reacciona con esta molécula para formar un aducto tipo Meisenheimer según la ecuación de velocidad: $v = k_{\text{des}}^{\text{NMP}} [\text{OH}^-] [\text{NMP}]$. El efecto cinético isotópico inverso, $k_{\text{des H}_2\text{O}}^{\text{NMP}} / k_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{NMP}} = 0,7$, sugiere que el ión hidróxido actúa como nucleófilo sobre la molécula de NMP.

8. El NMP se encuentra en su forma neutra en el intervalo de pH 7-10 ($K_a = (2,5 \pm 0,5) \times 10^{-11} \text{ M a } T = 25,0 \text{ }^\circ\text{C}$).

9. Se ha encontrado una dependencia lineal entre $\ln k_{\text{des}}^{\text{ENA}}$ y $1/\varepsilon$ en los diferentes medios agua:dioxano estudiados, observándose una buena correlación de Palm-Vizgert que sugiere la existencia de un mecanismo común.

10. En la reacción entre la NBP y el NMP la especie alquilante efectiva es la 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2(5H)-ona (MN1P5N) producto de descomposición del NMP.

11. La reacción de alquilación de la NBP por la MN1P5N obedece a la ecuación de velocidad: $v = d[\text{AD}]/dt = \left[k_{\text{alq obs}} k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} [\text{NMP}]_0 \left(e^{-k_{\text{obs}}^{\text{NMP}} t} - e^{-(k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}}) t} \right) \right] / (k_{\text{hid obs}} + k_{\text{alq obs}} - k_{\text{obs}}^{\text{NMP}})$, donde $k_{\text{alq obs}}$ y $k_{\text{hid obs}}$ son la pseudoconstantes de velocidad de alquilación de la NBP por la especie MN1P5N y la de hidrólisis de la misma, respectivamente, y $k_{\text{obs}}^{\text{NMP}}$ la pseudoconstante de velocidad de descomposición del NMP.

12. Los pequeños valores del cociente entre la constante de alquilación y de hidrólisis y el de la fracción de agente alquilante que forma aducto, comparados con los que se observan para otras especies alquilantes como algunas lactonas, revelan una menor capacidad alquilante del MN1P5N.

III. Estudio de la reactividad del ácido etilnitrólico

El estudio cinético de la reacción de hidrólisis del ácido etilnitrólico (ENA) y de la alquilación de NBP por ENA ha conducido a las conclusiones siguientes:

13. La reacción de descomposición del ENA cumple la siguiente ecuación de velocidad: $v = k_{\text{des}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}] K_a / (K_a + [\text{H}^+])$ donde K_a es la constante de disociación del ácido etilnitrólico.

14. La constante de disociación del ENA disminuye al aumentar la proporción de dioxano en el medio de reacción, observándose una relación lineal entre el log K_a y el parámetro de Onsager, coherente con la hipótesis de que el equilibrio entre las formas disociada y no disociada del ENA se alcanza a través de un intermedio con formación de enlaces $\text{O} \cdots \text{H}$.

15. La buena correlación de Palm Vizgert sugiere que la reacción de descomposición del ENA transcurre a través de un mecanismo común en todos los medios agua:dioxano estudiados.

16. El óxido de acetonitrilo (ACNO) producto de descomposición del ENA, se hidroliza según la ecuación de velocidad: $v = k_{\text{hid}}^{\text{ACNO}} [\text{ACNO}] [\text{H}_2\text{O}]_{\text{des D}_2\text{O}}^{\text{NMP}}$.

17. La relación entre las pseudoconstantes de velocidad de descomposición del ENA e hidrólisis del ACNO es: $(7,1 \pm 0,5) \times 10^{-2} / (4,23 \pm 0,01) \times 10^{-3} = 17$ ($T = 37,5$ °C y pH 9,49) respectivamente.

18. En la reacción entre la NBP y el ENA, la especie ACNO es el agente alquilante efectivo.

19. La reacción de alquilación de la NBP por el ACNO se ajusta a la ecuación de velocidad: $v = d[\text{AD}]/dt = \left(k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} [\text{ENA}]_0 e^{-k_{\text{obs}}^{\text{ENA}} t} - k_{\text{hid}}^{\text{AD}} [\text{AD}] \right) / \left(k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}} + k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}} \right)$, donde $k_{\text{alq obs}}^{\text{ACNO}}$ y $k_{\text{hid obs}}^{\text{ACNO}}$ son las pseudoconstantes de velocidad de alquilación de la NBP por el ACNO y la de hidrólisis de este último, respectivamente, $k_{\text{obs}}^{\text{ENA}}$ la pseudoconstante de descomposición del ENA y $k_{\text{hid}}^{\text{AD}}$ la constante de hidrólisis del aducto ACNO-NBP (AD) formado.

20. La fracción de ACNO que forma aducto y el tiempo de vida del mismo disminuyen al aumentar el pH del medio en el intervalo de pH 4,5-10,0. En medio ácido (pH 4,8) solamente el 25 % del ACNO reacciona con la NBP para formar un aducto cuyo tiempo de vida no supera los dos días.

21. La reducida capacidad alquilante del ACNO, comparada con la de otras especies (como algunas lactonas o N-alkil-N-nitrosoureas) se ha interpretado en términos de la pequeña fracción de NBP que sufre alquilación y de la hidrólisis del aducto NBP-ACNO formado.

CAPÍTULO 6

Bibliografía

6. Bibliografía citada en esta memoria

- Adams, J. B.; Langley, F. M. Interacción between additives in food systems Campden y Chorleywood Food Research Asociación, R y D Report 20, 1995.
- Adams, J. B. *Food Chem.* 1997, 59, 401.
- Agree, A. M.; Meeker, R. L. *Talanta*, 1966, 13, 1151.
- Akerlof, G.; Sort, O. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1936, 58, 1241.
- Allen, R. R.; Kummerow, F. A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1951, 28, 101.
- Aminabhavi y Gopalakrishna, *J. Eng. Data* 1995, 40, 856.
- Andersen, F. A. *Int. J. Toxicol.* 2008, 27, 77.
- Annulli, A.; Mencarelli, P.; Stegel, F. *J. Org. Chem.* 1984, 49, 4065.
- Apelblat, A. *J. Mol. Liquids* 2002, 95, 99.
- d'Aquino M.; Santini, P. *Archivos latino-americanos de nutrición* 1977, 27, 411.
- Arya, S. S. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, 1246.
- Arya, S. S.; Thakur, B. R. *Food Chem.* 1988, 29, 41.
- Arya, S. S.; Thakur, B. R. *Proteins in Life and Environment* Srinivasan, A. y Abraham, E. C., Universidad de Madrás, India, 1991.
- Baldock, J. D.; Frank, P. R.; Graham, P. P.; Ivey, F. J. *J. Food Prot.* 1979, 42, 780.
- Banerjee, T. S.; Giri, A. K. *Toxicology Letters* 1986, 31, 101.
- Binstok, G.; Campos, C.; Varela, O.; Gerschenson, L. N. *Food Res. Int.* 1998, 31, 581.
- Bolin, H. R.; King Jr., A.D.; Stafford, A. E. *J. Food Sci.* 1980, 45, 1434.
- Boyd, J. W.; Tarr, H. L. *A. Food Technol.* 1955, 9, 411.
- Braun, C. E.; Seydel, P. V.; Sauer, C. W.; Dubin, I. M.; Chao, Y. T.; Lemiey, J. D.; Mass. Inst. of Technol., Cambridge, Mass. MIT-MR N° 177, September 21. 1945 (resultados sin publicar).
- Brown, W. G. Office of Scientific Research and Development, OSRD 140, September 22. 1941 (resultados sin publicar).
- Brzezinski, B.; Zundel, G. *J. Phys. Chem.* 1983, 87, 5461.
- Buncel, E.; Symons, E. A. *Can. J. Chem.* 1966, 44, 771.
- Calle, E.; Casado, J.; Cinos, J. L.; García Mateos, F. J.; Tostado, M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 1992, 987.
- Casado, J. Nitrosation reactions; Invited Lecture. In *Fast Reactions in Solution*; Royal Society of Chemistry, Annual Meeting, 1994.
- Casado, J.; González Alatorre, G.; Izquierdo, C.; Brunner, C. *Int. J. Chem. Kinet.* 1996, 28, 307.
- Casado, J. Chemistry of Nitrosation Reactions in Solution; Invited Lecture. In *Kolloquien der Ortsverbände, Universität Leipzig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie*, 1997.
- Chu, K. C.; Patel, K. M.; Lin, A. H.; Tarone, R. E.; Linhart, M. S.; Dunkel, V. C. *Mut. Res.* 1981, 85, 119.
- CWS Field Lab., Memo 1-2-16, July 1943 (resultados sin publicar).
- Czukor, B. *Konzerv-paparikaip.* 1976, 4, 154; *Chem. Abstr.* 1977, 87, 166233.
- Dacosta, Y. *L'acide sorbique et les sorbates* CDIUPA, Massy, France, 1994.
- Damant, A.; Reynolds, S.; Macrae, R. *Food Addit. Contam.* 1989, 6, 273.
- Davies, C. G. A.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1992, 9, 471.
- Davis, R. E. Mechanisms of sulphur reactions. In *Inorganic Sulphur Chemistry* ed. G. Nickless, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 1968.
- De Santis, F.; Stegel, F. *Tetrahedron Letters* 1974, 1079.
- Dignam, K.J.; Hegarty, A. F.; Quain, P. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1977, 1457.
- Dignam, K.J.; Hegarty, A. F.; Quain, P. L. *J. Org. Chem.* 1978, 43, 388.
- Dignam, K.J.; Hegarty, A. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1979, 1437.
- Doddi, G.; Illuminati, G.; Stegel, F. *Chem. Comm.* 1972, 1143.
- Doddi, G.; Illuminati, G.; Stegel, F. *Tetrahedron Letters* 1973, 3221.
- Doddi, G.; Poretti, A.; Stegel, F. *J. Heterocycl. Chem.* 1974, 11, 97.
- Doesburg, J. J.; Lamprecht, E. C.; Elliot, M. C.; Reid, D. A. *J. Food Technol.* 1969, 4, 339.
- Druckrey, H.; Preussmann, R.; Ivankovic, S.; Schmahl, D. *Krebsforsch* 1967, 69, 103.

- Dulog, L.; Tsobanidis, K. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 1981, 2, 407; *Chem. Abstr.* 1981, 95, 133396.
- Egan, E.; Clery, M.; Hegarty, A. F.; Welch, A. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1991, 249.
- Eklund, T. J. *Appl. Bacteriol.* 1983, 54, 383.
- Epstein, J.; Rosenthal, R. W.; Ess, R. J. *Anal. Chem.* 1955, 27, 1435.
- Erickson, L. E. *J. Food Prot.* 1982, 45, 484.
- Espenson, J. H. *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms 2ª Ed McGraw-Hill International Edition* 1995.
- Fernández Rodríguez, E.; Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Int. J. Chem. Kinet.* 2007, 39, 591.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 487.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *J. Agric. Food Chem.* 2000a, 48, 3605.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Amino Acids* 2000b, 18, 251.
- Ferrand, C.; Marc, F.; Fritsch, P.; Cassand, P.; de Saint Blanquat, G. *Toxicology in vitro* 2000c, 14, 423.
- Food Safety and Hygiene; *Bulletin for the Australian Food Industry*, June 2003; p2.
- Fritsch, J.; Zundel, G. *J. Phys. Chem.* 1981, 87, 556.
- García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 7506.
- García Santos, M. P.; González Mancebo, S.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 2177.
- Gaunt, I. F.; Butterworth, K. R.; Hardy, J.; Gangolli, S.D.; *Food and Cosmetics Toxicology* 1975, 13, 31.
- Gehauf, B. *Chemical Warfare Service. CWS Field Lab., Memo 1-2-8*, 1943.
- Gerschenson, L. N.; Alzamora, S.; Chirife, J. *J. Food Sci.* 1986, 51, 1028.
- Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* 1994, 26, 1167.
- Gil, R.; Casado, J.; Izquierdo, C. *Int. J. Chem. Kinet.* 1997, 29, 495.
- Goddard, S. J.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1992, 9, 485.
- Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, 1964.
- Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Pérez Prior, M. T.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* 2009 doi 10.1021/jo900645h
- González Mancebo, S.; Calle, E.; García Santos, M. P.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 334.
- González Mancebo, S.; García Santos, M. P.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2235.
- González Mancebo, S.; Lacadena, J.; García Alonso, Y.; Hernández Benito, J.; Calle, E.; Casado, J. *Monatsh. Chem.* 2002, 133, 157.
- González Pérez, M., 'Estudio cinético de la capacidad alquilante del óxido de estireno', *Grado de Salamanca*, 2008.
- Guerrero, S.; Alzamora, S. M.; Gerschenson, L. N. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1990, 23, 271.
- Hartman, P. E. *Environ. Mutagen.* 1983, 5, 217.
- Hasegawa, M. M.; Nishi, Y.; Ohakawa, Y.; Inui, N. *Fd. Chem. Toxic.* 1984, 22, 501.
- Hayatsu, H. *Mut. Res.* 1975, 30, 417.
- Hemminki, K. *Chem. Biol. Interact.* 1981, 34, 323.
- Heintze, K. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1971, 4, 64.
- Heintze, K. *Ind. Obst-Gemüseverwert.* 1973, 58, 187; *Chem. Abstr.* 1973, 79, 41049x.
- Heintze, K. *Ind. Obst-Gem.* 1976, 61, 555; *Food Sci. Technol. Abstr.* 1977, 9, 6H1042.
- Hendy, R. J.; Hardy, J.; Gaunt, I. F.; Kiss, I. S.; Butterworth, K.R. *Food and Cosmetics Toxicology* 1976, 14, 381.
- Hernández Benito, J., 'Influencia de las ciclodextrinas en los mecanismos de hidrólisis y aminólisis de nitritos de alquilo', *Tesis Doctoral*, 2003.
- Hollaender, A. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection Plenum*, Vol 1, Nueva York, 1971.
- Iglesias, E.; Williams, D. L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1988, 1035.
- Iglesias, E.; García Río, L.; Leis, J. R.; Casado, J. *Recent. Res. Devel. Phys. Chem.* 1997, 1, 403.
- Iglesias, E.; Casado, J. *Int. Rev. Phys. Chem.* 2002, 21, 37.

- Ishidate, M.; Jr, Sofuni, T.; Yoshikawa, K.; Hayashi, M.; Nohmi, T.; Sawada, M.; Matsuoka, A. *Fd. Chem. Toxic.* 1984, 22, 623.
- Jones, R. A.; Spotswood, T. M.; Cheuychit, P. *Tetrahedron* 1967, 23, 4469.
- Jung, R.; Cojocel, C.; Müller, W.; Böttger, D.; Lück, E. *Fd. Chem. Toxic.* 1992, 30, 1.
- Kada, T.; Tutikawa, K.; Sadaie, Y. *Mut. Res.* 1972, 16, 165.
- Kada, T. *Annu. Rep. Natl. Inst. Genet.* 1974, 24, 43.
- Kagami, M. *Fukushima Daigaku Kvoikugakubu Rika Hokoku* 1967, 17, 68; *Chem. Abstr.* 1969, 70, 31647.
- Kalsi, S.; Laframboise, R.; Scott, R. M. *Can. J. Chem.* 1987, 65, 563.
- Kawachi, T.; Komatsu, T.; Kada, T.; Ishidate, M.; Sasaki, M.; Sugiyama, T.; Tazima, Y. *Applied Methods in Oncology* 1980, 3, 253.
- Khandelwal, G. D.; Wedzicha, B. L. *Food Addit. Contam.* 1990a, 7, 685.
- Khandelwal, G. D.; Wedzicha, B. L. *Food Chem.* 1990b, 37, 159.
- Kheddis, B.; Bahibah, D.; Hamdi, M.; Périe, J. J. *Bulletin de la Société Chimique de France* 1981, 34(II), 135.
- Khoudokormoff, B. *Mut. Res.* 1978, 53, 208.
- Kim, J. H.; Thomas, J. J. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1992, 49, 879.
- Kito, Y.; Namiki, M. *Tetrahedron* 1978, 34, 505.
- Klofutar, C.; Šegatin, N. J. *Solution Chem.* 2007, 36, 879.
- Koenigs, E.; Kohler, K.; Blindow, K. *Ber.* 1925, 58, 933.
- Kroyer, G. *Ernährung/Nutrition* 1986, 10, 557.
- Lafont, P.; Lafont, J. *Med. Nutr.* 1979, 15, 195.
- LBI Litton Biogenics Incorporated Mutagenic evaluation of compared FDA 74-4, potassium sorbate, prepared for Food and Drug Administration US Dept of Commerce, National Technical Information Service, Nov. 1974, PB 245434.
- Lee, W. H.; Wheaton, R. J. *J. Chem. Soc. Faraday I* 1979, 75, 1128.
- Leraux, E.; Vautier, E. Etude par spectroscopie et moments dipolaires de diènes conjugués du type $\text{CH}_3\text{-HC=CH-CH=CH-Y}$ C. R. Académies des sciences de Paris, 1333-1336, 1970.
- Li, Z.; Alli, I.; Kermasha, S. J. *Food Sci.* 1989, 54, 674.
- Lijinsky, W. *Chemistry and Biology of N-Nitroso Compounds* Cambridge Univ. Press: Cambridge, 1992.
- Llor, J.; Sánchez-Nevado, M.; Asensio, S.; Cortijo, M. *Anal. Quim.* 1987, 83, 317.
- Loepky, R. N.; Michejda, C. J. *Nitrosamines and Related N-Nitroso Compounds: Chemistry and Biochemistry* ACS Symposium Series N° 553, Am. Chem. Soc., Washington, 1994.
- Lück, E. *Int. Flavours Food Additiv.* 1976, 7, 122.
- Lück, E. *Antimicrobial Food Additives* (Springer-Verlag, Nueva York, 1980).
- Maekawa, T.; Tsujisawa, H.; Yokoyama, T. *Ann. Rept. Wakayama Prefect. Res. Cent. Environ. Pub. Health* 1984, 30, 75; *Food Sci. Technol. Abstr.* 1984, 18, 10S105.
- Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Br. J. Cancer* 1956, 10, 114.
- Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Chem. Res. Toxicol.* 2005, 18, 1161.
- Manso, J. A.; Pérez Prior, M. T.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *Phys. Org. Chem.* 2008, 21, 932.
- Matt, C.; Gissot, A.; Wagner, A.; Miokowski, C. *Tetrahedron Letters* 2000, 41, 1191.
- McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975, 72, 5135.
- McCarthy, J. J.; Eagles, P. F. K. *Toiletries* 1976, 91, 33.
- McCormick, J. E.; McElhinney, R. S. *Eur. J. Cancer* 1990, 26, 202.
- Meier, I.; Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Mutat. Res.* 1990, 238, 193.
- Melnick, D.; Luckman, F. H.; Gooding, C. M. *Food Res.* 1953, 19, 33.
- Meyer, V. *Ber.* 1873, 6, 1492.
- Mirvish, S. S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975, 31, 325.
- Mirvish, S. S. *Cancer Lett.* 1995, 93, 17.
- Mora Díez, N.; Senent, M. L.; García, B. *Chem. Phys.* 2005, 324, 350.
- Morita, K.; Ishigaki, M.; Abe, T. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists, Japan* 1981, 15, 243.
- Mpountoukas, P.; Vantarakis, A.; Sivridis, E.; Lialiaris, T. *Fd. Chem. Toxic.* 2008, 46, 2390.
- Mukherjee, A.; Giri, A. K.; Talukder G.; Sharma, A. *Toxicology Letters* 1988, 42, 47.
- Münzner, R. C.; Tilch, H. W.; Renner, H. W. *Fd. Chem. Toxic.* 1990, 28, 397.

- Nación Academy of Sciences, Nación Academy Press, Washington, DC, 1981.
- Namiki, M.; Kada, T. *Agr. Biol. Chem.* 1975, 39, 1335.
- Namiki, M.; Uda, S.; Osawa, T.; Tsuji, K.; Kada, T. *Mut. Res.* 1980, 73, 21.
- Namiki, M.; Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, K.; Tsuji, K. *J. Agric. Food Chem.* 1981, 29, 407.
- Nguyen, M. T.; Malone, S.; Hegarty, F.; Williams, I. I. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 3683.
- Oh, H. K.; Jeong, E. M.; Lee, I. *Bull. Korean Chem. Soc.* 1998, 19, 1334.
- Okan, S. E.; Champeney, D. C. *J. Solution Chem.* 1997, 26, 405.
- Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* 1936, 58, 1486.
- Osawa, T.; Kito, Y.; Namiki, M.; Tsuji, K. *Tetrahedron Lett.* 1979, 4399.
- Osawa, T.; Ishibashi, H.; Namiki, M.; Kada, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 95, 835.
- Osawa, T.; Namiki, M. *Agric. Biol. Chem.* 1982, 46, 2299.
- Palm, V. A.; Vizgert, R. V. *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.* 1962, 142, 1091.
- Paulmier, C.; Simonnin, M. P.; Chatrousse, A. P.; Terrier, F. *Tetrahedron Letters* 1973, 1123.
- Pekkarinen, L.; Rissanen, P. *Suomen Kemistilehti B* 1966, 39, 50; *Chem. Abstr.* 1966, 65, 7016.
- Pekkarinen, L.; Porkka, E. *Suomen Kemistilehti B* 1967, 40, 54; *Chem. Abstr.* 1967, 67, 26385.
- Pekkarinen, L. *Lebensm. Z. Unters. Forsch.* 1968, 23, 139.
- Pekkarinen, L. *Suom. Kemistilehti B* 1969, 42, 147; *Chem. Abstr.* 1969, 71, 12288.
- Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; García Santos, M. P.; Calle, E.; Casado, J. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 420.
- Pérez Prior, M. T.; Manso, J. A.; Gómez Bombarelli, R.; González Pérez, M.; Caballero, M. C.; Calle, E.; Casado, J. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 11824.
- Pethybridge, A. D.; Taba, S. S. *J. Chem. Soc. Faraday I* 1980, 76, 368.
- Po, H. N.; Senozan, N. M. *J. Chem. Ed.* 2001, 78, 1499.
- Reger, D. L.; Habib, M. M. *J. Phys. Chem.* 1980, 84, 177.
- Robach, M. C.; Meydav, S.; To, E. C.; Cook, C. F. *J. Food Sci.* 1980a, 45, 638.
- Robach, M. C.; Owens, J. L.; Paquette, M. W.; Sofos, J. N.; Busta, F. F. *J. Food Sci.* 1980b, 45, 1280.
- Robach, M. C.; Sofos, J. N. *J. Food Prot.* 1982, 45, 374.
- Roberts, J. R.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* 1973, 95, 3228.
- Sawicki, E.; Bender, D. F.; Hauser, T. R.; Wilson, R. M.; Meeker, J. E. Jr.; Meeker, J. E. *Anal. Chem.* 1963, 35, 1479.
- Saxby, M. J.; Stephens, M. A.; Reid, R. G. *Food Chem.* 1982, 9, 283.
- Senent, M. L.; Niño, A.; Muñoz Caro, C.; Ibeas, S.; García, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Venturini, M. J. *Org. Chem.* 2003, 68, 6535.
- Seow, C. C.; Cheah, P. B. *Food Chem.* 1985, 18, 71.
- Shephard, S. E.; Lutz, W. K. *Cancer Surv.* 1989, 8, 401.
- Simonin, M.P.; Terrier, F.; Paulmier, C. *Tetrahedron Letters* 1973, 2803.
- Smith, S. G.; Fainberg, A. H.; Winstein, S. J. *Am. Chem. Soc.* 1961, 83, 618.
- Sofos, J. N.; Busta, F. F. *J. Food Prot.* 1981, 44, 614.
- Sofos, J. N. *Sorbate Food Preservatives* CRC Press, Boca Raton, FL, 1989.
- Spinelli, D.; Armanino, V.; Corrao, A. J. *Heterocyclic Chem.* 1970, 7, 1441.
- Swift, E. H.; Gould, C. W.; Holzman, G.; Sease, J. W.; Niemann, C. *Chemical Warfare Service.*
- Sykes, P. *A Guidebook to Mechanism in Organic Chemistry* (2^a ed. Longmans, Londres, 149-155, 1965).
- Thakur, B. R.; Arya, S. S. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1991, 26, 157.
- Thakur, B. R.; Semwal, A. D.; Arya, S. S. *Indian Food Packer* 1992, 46, 53.
- Thakur, B. R.; Singh, K.; Arya, S. S. *Food Rev. Int.* 1994, 10, 71.
- Timmermans, J. *Physico-Chemical Constants of Binary Systems*, Interscience, Nueva York, 1960, pp16.
- Tompkin, R. B.; Christiansen, L. N.; Shaparis, A.B.; Bolin, H. *Appl. Microbiol.* 1974, 28, 262.
- U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. *FDA List of Food Additives that are Generally Recognized as Safe (GRAS)*; U.S. GPO: Washington, DC, 2005.
- Van Duuren, B. L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1969, 163, 633.
- Vaneven, V.; Haulait-Pirson, M. C. *J. Solution Chem.* 1977, 6, 757.
- Vera, A.; Montes, M.; Usero, J. L.; Casado, J. J. *Pharm. Sci.* 1992, 81, 791.
- Verbiscar, A. J. Campbell, K. N. *J. Org. Chem.* 1964, 29, 2472.
- Vidyasagar, K.; Arya, S. S. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 1262.
- Vidyasagar, K.; Arya, S. S. *J. Food Technol.* 1984, 19, 447.
- Wedzicha, B. L.; Rumbelow, S. J. *J. Sci. Food Sci. Agric.* 1981, 32, 699.

- Wedzicha, B. L. Chemistry of Sulphur Dioxide in Food Elsevier Applied Science, Londres, 1984.
- Wedzicha, B. L.; Brook, M.A. Food Chem. 1989, 31, 29.
- Wedzicha, B. L.; Zeb, A. Int. J. Food Sci. Technol. 1990, 25, 230.
- Werner, A.; Buss, H. Chem. Ber. 1894, 27, 2193.
- Wieland, H.; Semper, L. Ber. 1906, 39, 2522.
- Williams, D. L. H. Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide Elsevier Applied Science, Amsterdam, 2004.
- Würgler, F. E.; Schlatter, J.; Maier, P. Mutat. Res. 1992, 283, 107.
- Yang, S.F. Food Chem. 1984, 15, 113.
- Yew, K. H.; Koh, H. J.; Lee, H. W.; Lee, I. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1995, 2263.
- Zatsepina, N. N.; Kaminsky, Yu. L.; Tupitsyn, I. F. Reakts. Sposobnost Org. Soedin., Tartu Gos. Univ. 1969, 3, 753.

CAPÍTULO 7

Apéndices

Apéndice A. Síntesis del ENA y del NMP

1. Síntesis del NMP

El espectro ^1H -RMN obtenido de la especie NMP en cloroformo deuterado se muestra en la Figura A.1.

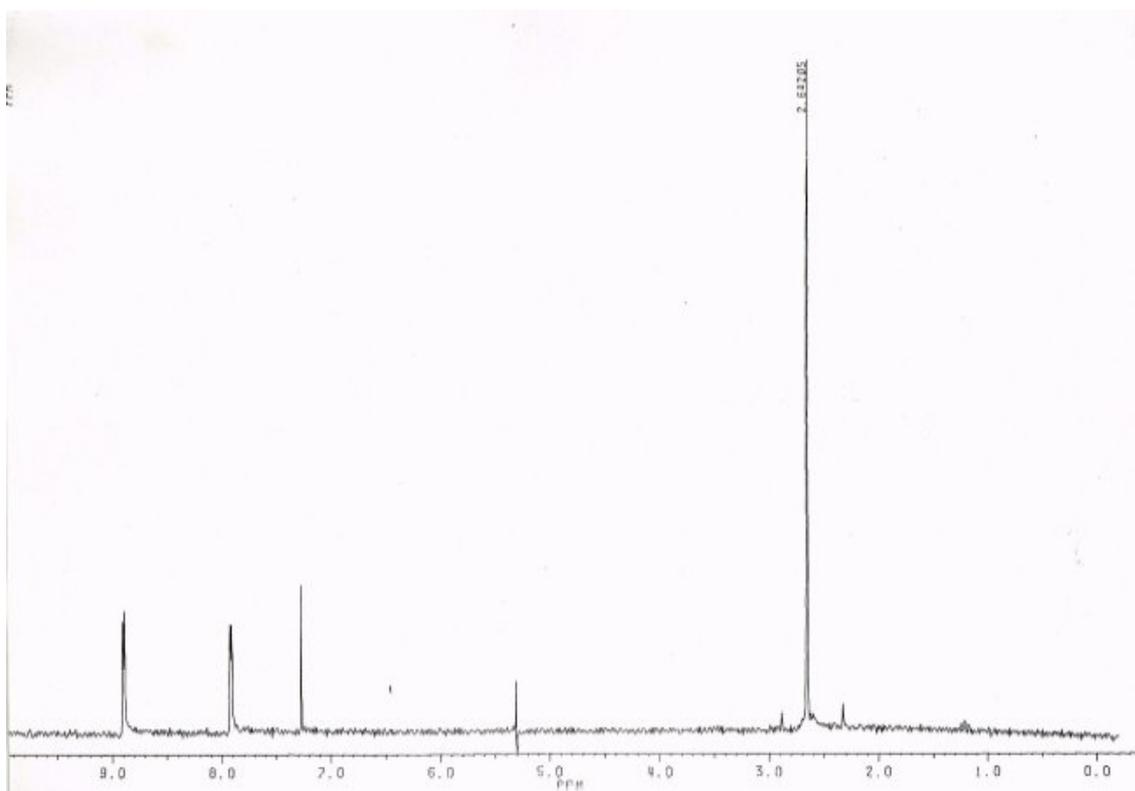


Figura A.1. Espectro de ^1H -RMN del NMP en CDCl_3 .

La determinación del coeficiente de absorción molar del NMP en disolución acuosa se ha llevado a cabo espectrofotométricamente. Los espectrogramas obtenidos a diferentes concentraciones de reactivo en disolución acuosa a $T = 25,0\text{ }^\circ\text{C}$ quedan reflejados en la Figura A.2.a. En la Figura A.2.b. se muestra el buen cumplimiento de los resultados a la ecuación de Lambert-Beer, que nos permitirá determinar el valor del coeficiente de absorción del NMP a diferentes longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción de dicha especie.

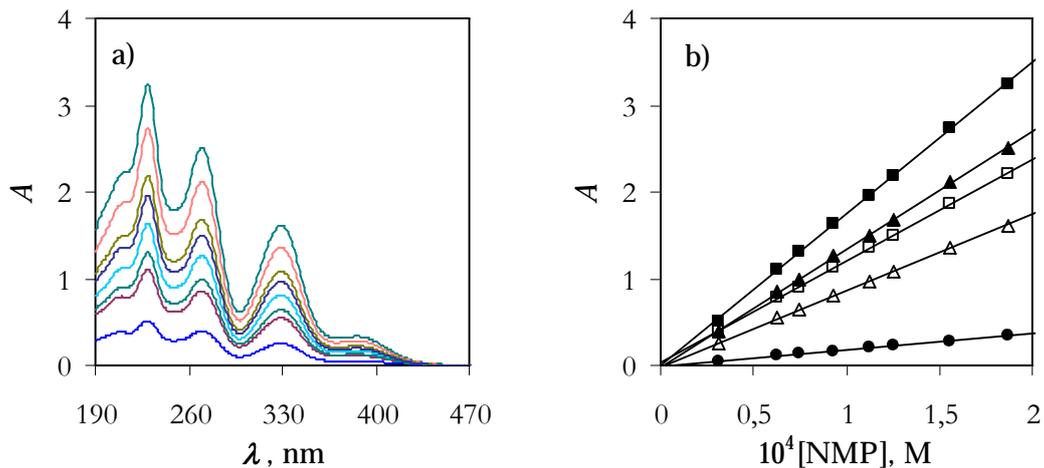


Figura A.2. (a) Espectrogramas del NMP en disolución acuosa a $T = 25,0$ a diferentes concentraciones de reactivo. (b) Determinación del coeficiente de absorción molar del NMP a diferentes longitudes de onda. λ (nm) = 209 (\square), 229 (\blacksquare), 270 (\blacktriangle), 329 (\triangle), 385 (\bullet).

2. Síntesis del ENA

El espectro ^1H -RMN obtenido de la especie ENA en cloroformo deuterado se muestra en la Figura A.3.

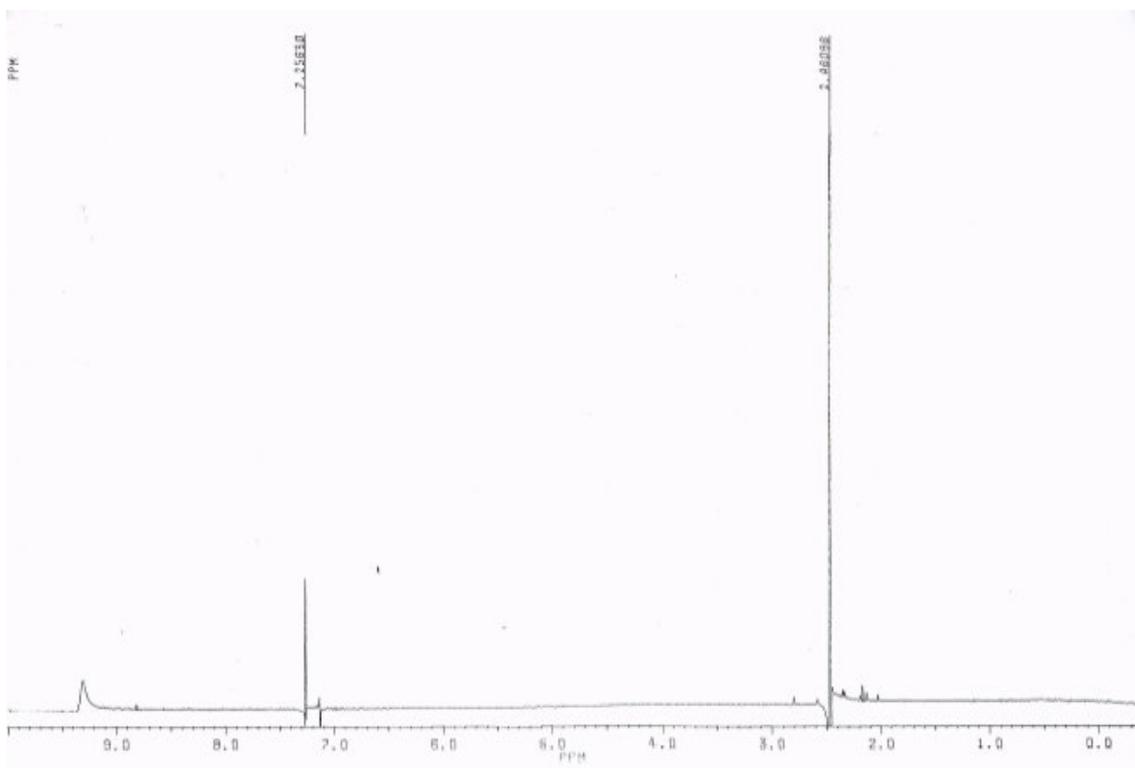


Figura A.3. Espectro de ^1H -RMN del ENA en CDCl_3 .

El coeficiente de absorción molar del ENA se ha determinado para las formas disociada y no disociada del mismo. Teniendo en cuenta el valor del pK_a de la especie ENA en disolución acuosa, $pK_a = 7,4$ a $T = 25,0$ °C (véase Apartado 4.2.3.1.) se ha trabajado en medio ácido a pH inferior a dicho valor ($pH = 3,06$) para determinar el valor del coeficiente de absorción molar de la forma no disociada. En la Figura A.4. se muestran los espectrogramas observados en medio ácido al modificar la concentración de reactivo ENA y el cumplimiento de la ecuación de Lamber-Beer para dicha especie.

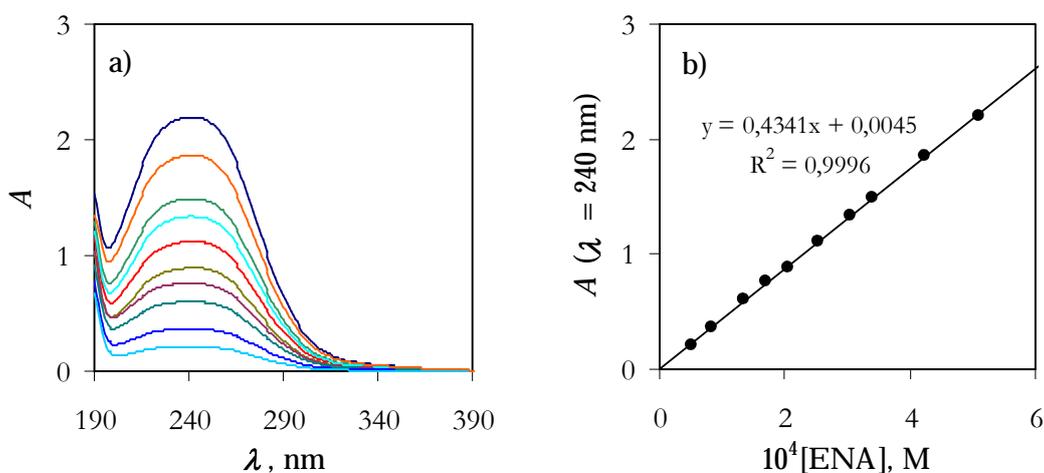


Figura A.4. (a) Espectrogramas del ENA en disolución acuosa a $pH = 3,06$ para diferentes concentraciones de reactivo. (b) Determinación del coeficiente de absorción molar de la forma no disociada del ENA a una longitud de onda $\lambda = 240$ nm. $[HCl] = 10^{-3}$ M; $T = 25,0$ °C

En relación con la forma disociada del ENA, se ha determinado el coeficiente de absorción molar de la misma a un pH superior al valor del pK_a del ENA - $pH = 11,97$ -. Debido a la inestabilidad de la forma básica del ENA, se preparaba una disolución madre de esta especie en disolución acuosa. Para alcalinizar el medio, se tomaban diferentes alícuotas de dicha disolución que se añadían a un volumen determinado de hidróxido sódico 0,1 M y finalmente, para alcanzar un volumen final común en todas las experiencias se añadía agua. Los espectrogramas obtenidos a diferentes concentraciones de ENA y el ajuste de los resultados a la ecuación de Lambert-Beer se muestran en la Figura A.5.

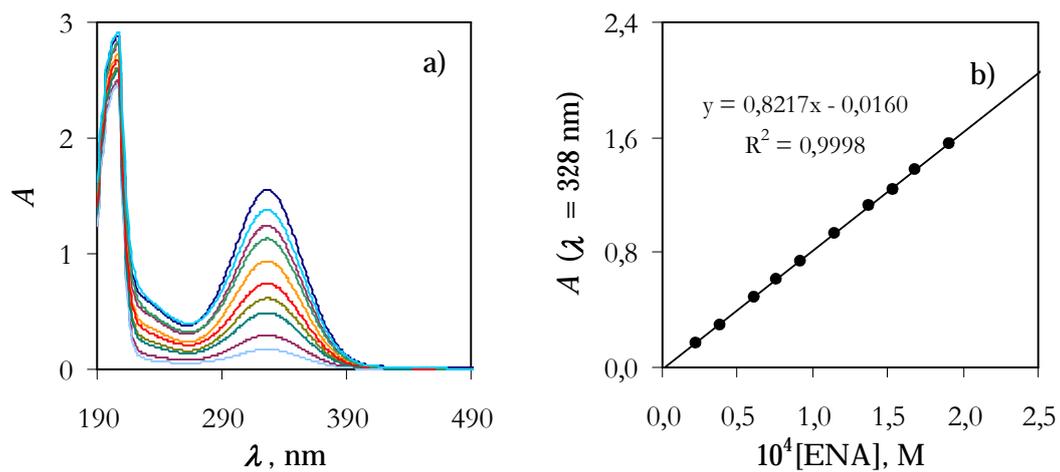


Figura A.5. (a) Espectrogramas del ENA en disolución acuosa a pH 11,97 a diferentes concentraciones de reactivo. (b) Determinación del coeficiente de absorción molar de la forma disociada del ENA a una longitud de onda $\lambda = 328$ nm. $[\text{NaOH}] = 0,1$ M;

Apéndice B. Identificación de especies

1. Especies intermedias y productos resultantes de la reacción de hidrólisis del NMP

Las Figuras B1 y B2 muestran los espectros del NMP obtenidos en disolución acuosa a tiempo $t = 0$ y 2 h.

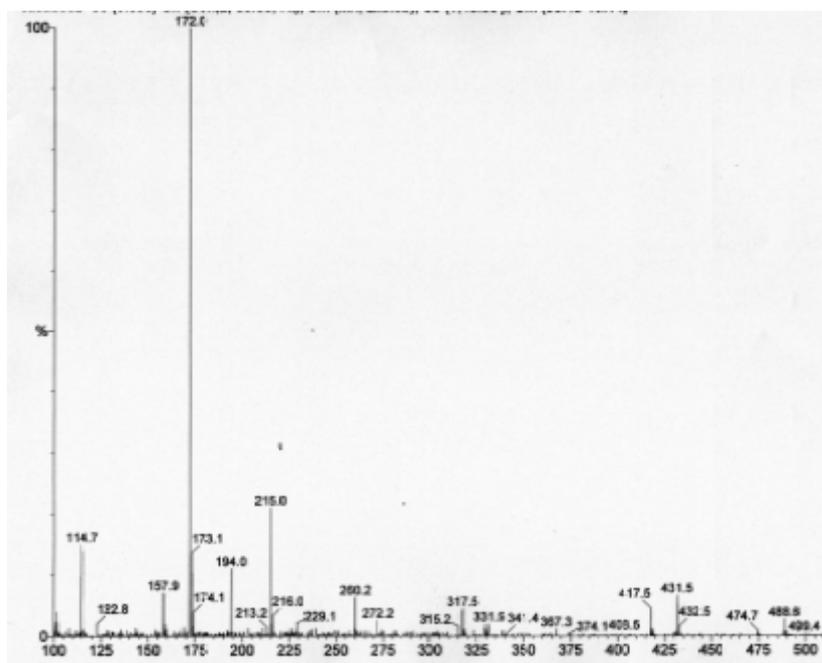


Figura B.1. Espectro de masas del NMP a $t = 0$ h. Disolución acuosa pH 11 (NaOH).

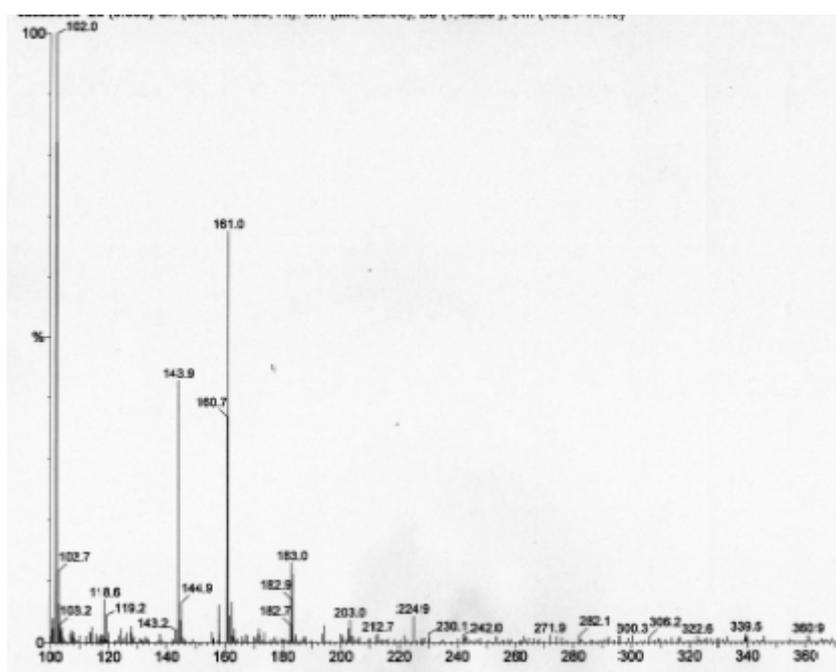


Figura B.2. Espectro de masas del NMP a $t = 2$ h. Disolución acuosa pH 11 (NaOH).

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del isómero más estable de la descomposición del NMP, la especie 5-metil-3-nitro-1H-pirrol-2-ol (MN1PO) se muestran en las Figuras B3 y B4, respectivamente.

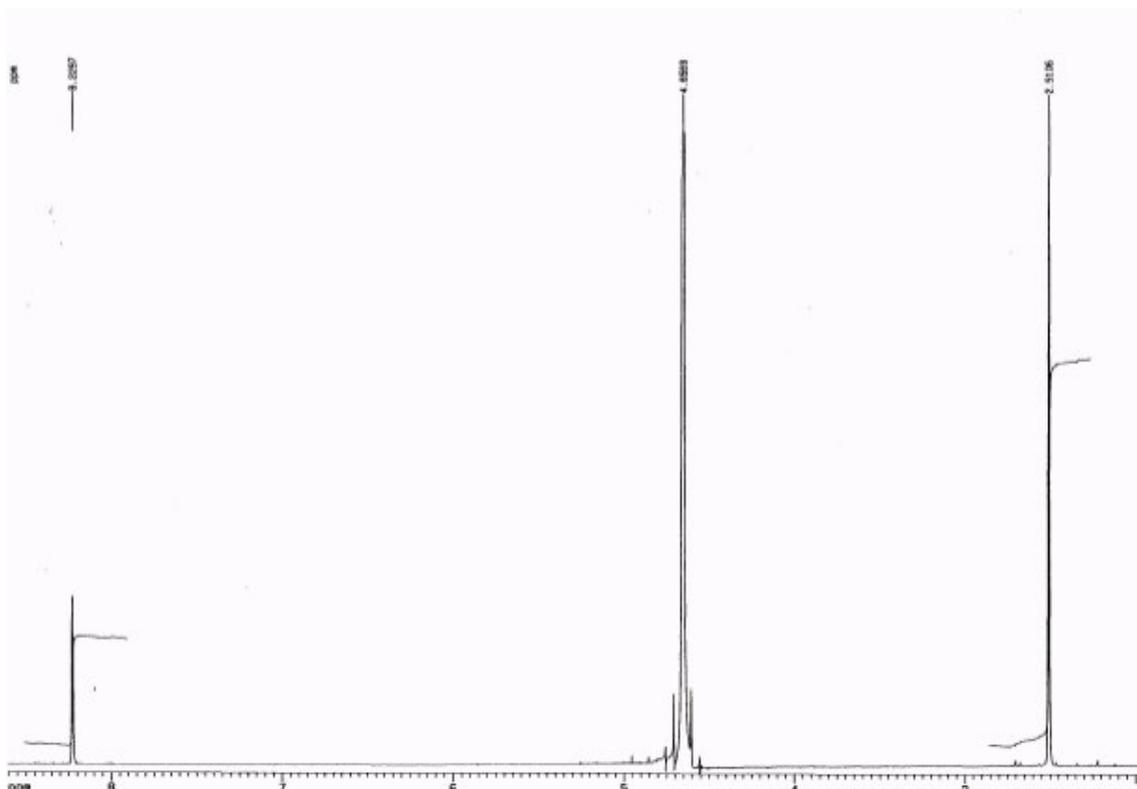


Figura B.3. Espectro de ^1H -RMN de la especie MN1PO en D_2O .

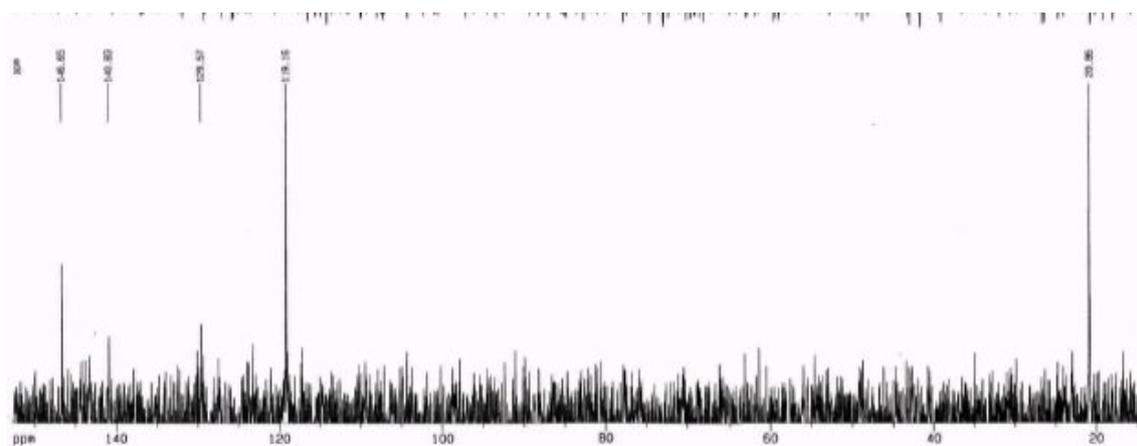


Figura B.4. Espectro de ^{13}C -RMN de la especie MN1PO.

3. Aducto NBP-ENA

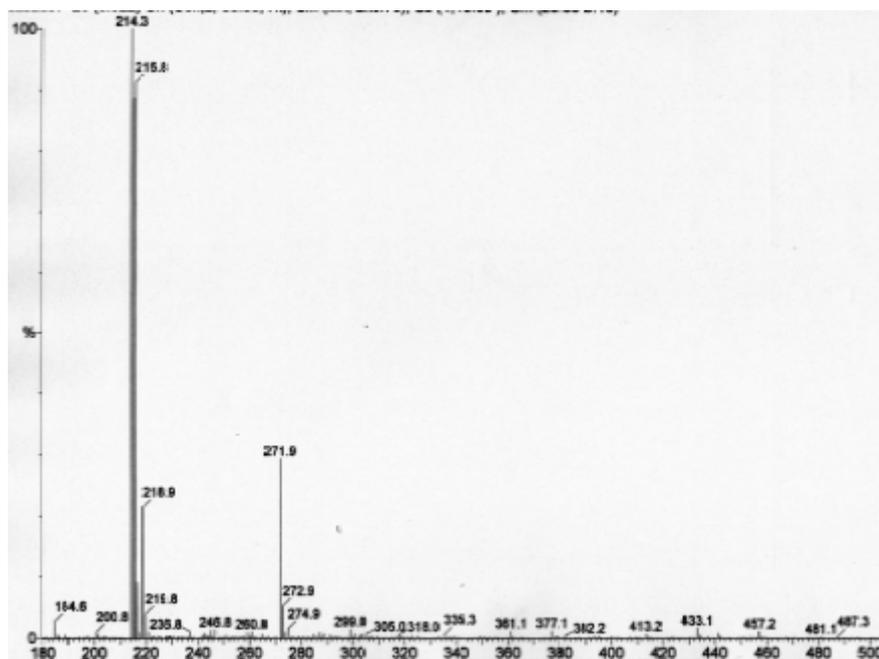


Figura B.5. Espectro de masas del aducto NBP-ACNO

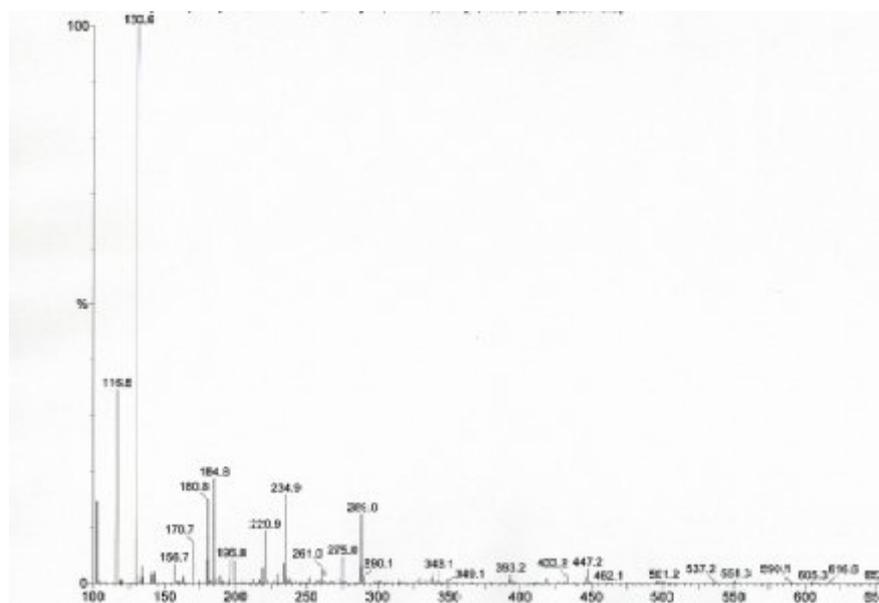


Figura B.6. Espectro de masas del producto de hidrólisis del aducto NBP-ACNO

Apéndice C. Tablas de constantes

1. Constante dieléctrica en mezclas agua:dioxano (v/v)

La Tabla C1 recoge los valores de ε obtenidos de bibliografía o determinados por interpolación lineal de los encontrados en bibliografía (Akerlof y Sort, 1936).

Tabla C1. Variación de ε con la temperatura en mezclas agua:dioxano (v/v)

Agua:dioxano	T (°C)					
	25,0	27,5	30,0	32,5	35,0	37,5
10:0	78,49	77,60	76,68	75,80	74,93	74,07
9,5:0,5	74,09	73,20	72,32	71,46	70,60	69,76
9:1	69,71	68,85	68,00	67,16	66,33	65,52
8,5:1,5	65,23	64,43	63,63	62,85	62,07	61,31
8:2	60,84	60,06	59,30	58,54	57,80	57,06
7:3	51,92	51,22	50,54	49,87	49,20	48,54
6:4	42,99	42,39	41,80	41,22	40,65	40,08
5:5	34,27	33,78	33,30	32,83	32,36	31,90

2. Constante de autoprotólisis del agua en mezclas agua:dioxano (v/v)

Los valores de K_w en las mezclas agua:dioxano mostradas en la Tabla C2 se han determinado por interpolación lineal de los encontrados en bibliografía (Llor et al., 1987).

Como las densidades de las mezclas agua:dioxano no varían significativamente al modificar la proporción de este último (Aminabhavi y Gopalakrishna, 1995; Tabla C3) el porcentaje en volumen es prácticamente igual a su porcentaje en peso.

Tabla C2. Variación de K_w con la temperatura en mezclas agua:dioxano (v/v)

T (°C)	Agua:dioxano ^a				
	10:0	8:2	7:3	6:4	5:5
25,0	14,00	14,58	14,93	15,37	15,98
27,5	13,92	14,49	14,85	15,30	15,90
30,0	13,83	14,40	14,76	15,22	15,81
32,5	13,76	14,34	14,71	15,16	15,72
35,0	13,68	14,27	14,65	15,09	15,63
37,5	13,61	14,16	14,53	14,97	15,53

^aPorcentaje en peso

Tabla C3. Densidad de las mezclas agua dioxano a $T = 25\text{ °C}$ ^a

X peso dioxano	ρ (g/cm ³)	X volumen dioxano
0	0,9973	0
0,2	1,0342	0,201
0,3	1,0372	0,303
0,4	1,0368	0,403
0,5	1,0356	0,503

^aInterpolación lineal de los valores tomados de bibliografía (Aminabhavi y Gopalakrishna, 1995)

Akerlof, G.; Sort, O. A. J. Am. Chem. Soc. 1936, 58, 1241.
 Llor, J.; Sánchez-Nevado, M.; Asensio, S.; Cortijo, M. Anal. Quim. 1986, 83, 317.
 Aminabhavi y Gopalakrishna, J. Eng Data 1995, 40, 856.

Apéndice D. Cálculo de pK_a 1. Determinación del pK_a del ácido sórbico*Método espectrofotométrico*

La Tabla D1 recoge los resultados pH-A obtenidos en la determinación espectrofotométrica de la constante de disociación del ácido sórbico en medio 7:3, agua:dioxano (v/v), utilizándose como bases hidróxido sódico e hidróxido potásico.

Tabla D1. Determinación de la constante de disociación del ácido sórbico en la mezcla 7:3 agua:dioxano a $T = 25,0$ °C en presencia de las bases NaOH y KOH.

NaOH		KOH	
pH	A ($\lambda = 265$ nm)	pH	A ($\lambda = 265$ nm)
3,80	0,6332	-	-
3,91	0,6284	3,98	0,6775
4,02	0,6317	4,06	0,6731
4,26	0,6183	4,12	0,6705
4,42	0,6152	4,25	0,6677
4,54	0,6004	4,41	0,6620
4,67	0,6153	4,66	0,6521
4,81	0,6054	4,92	0,6437
5,00	0,5935	5,31	0,6079
5,22	0,5739	5,46	0,5836
5,42	0,5445	5,65	0,5601
5,75	0,5081	5,74	0,5463
5,93	0,4820	5,97	0,5201
6,34	0,4475	6,10	0,5049
6,65	0,4361	6,36	0,4806
6,90	0,4248	6,60	0,4653
7,11	0,4196	6,82	0,4604
7,55	0,4151	6,93	0,4576
8,59	0,4165	7,27	0,4532
8,97	0,4133	8,74	0,4500
9,24	0,4119	9,28	0,4479

Método volumétrico

Las siguientes figuras muestran los perfiles pH - A obtenidos en las valoraciones ácido base del ácido sórbico en diferentes medios agua:dioxano así como la representación $\Delta pH / \Delta V_{NaOH}$ frente al V_{NaOH} que nos permite determinar el volumen de hidróxido gastado en el punto final de la valoración (V_{max}).

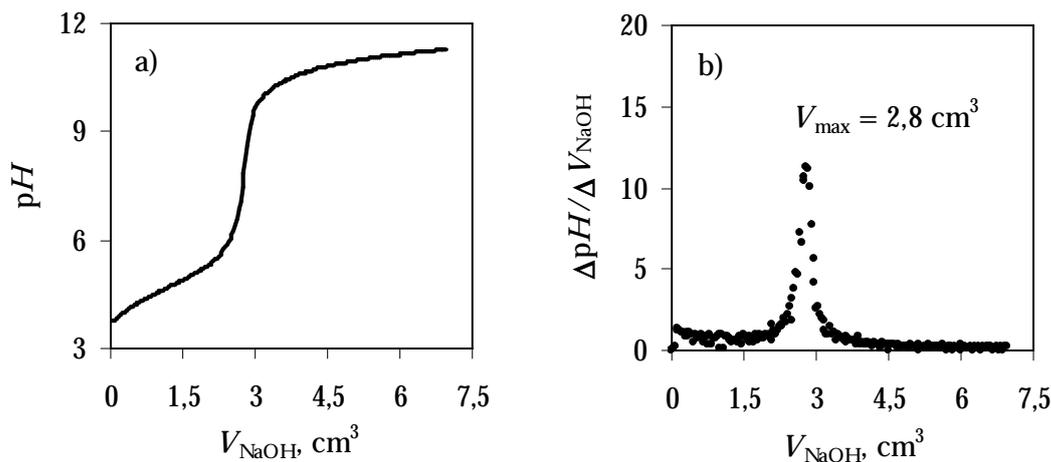


Figura D1. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta pH / \Delta V_{NaOH} - V_{NaOH}$ (b) en disolución acuosa.

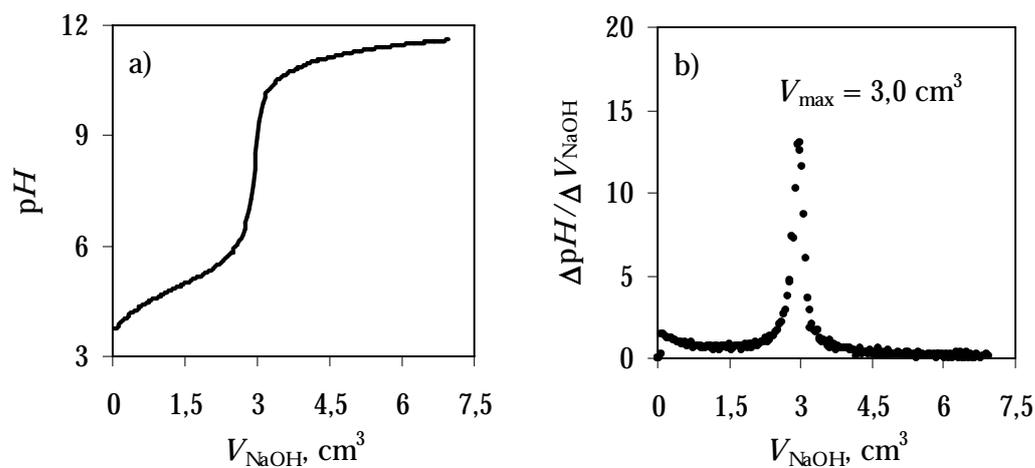


Figura D2. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta pH / \Delta V_{NaOH} - V_{NaOH}$ (b) en medio 9:1, agua:dioxano.

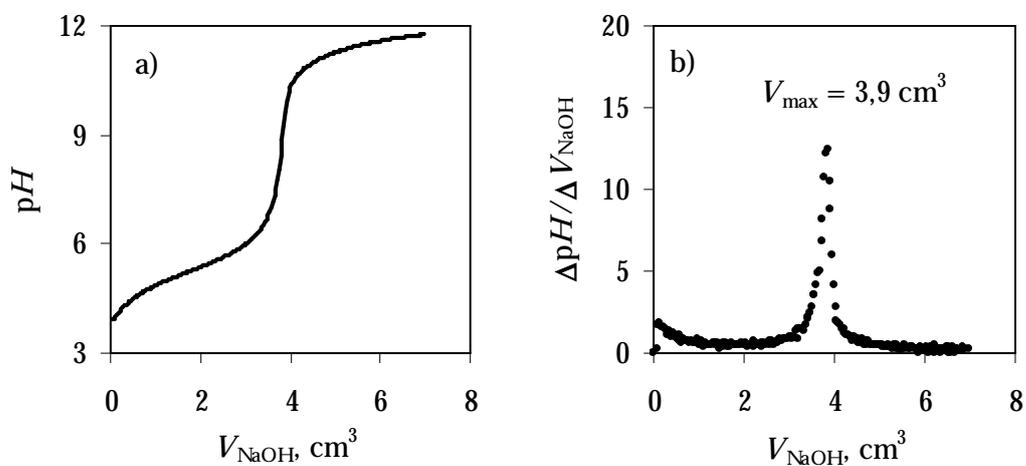


Figura D3. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en medio 8:2, agua:dioxano.

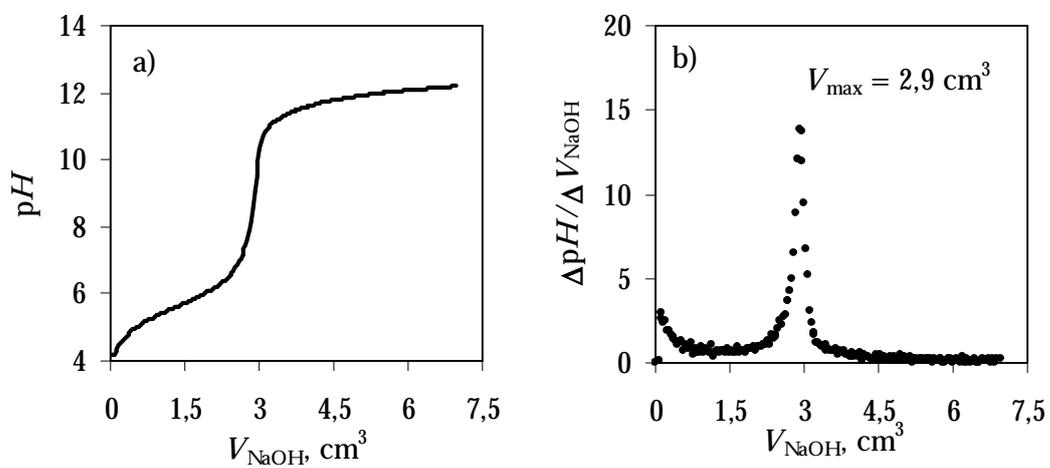


Figura D4. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en medio 7:3, agua:dioxano.

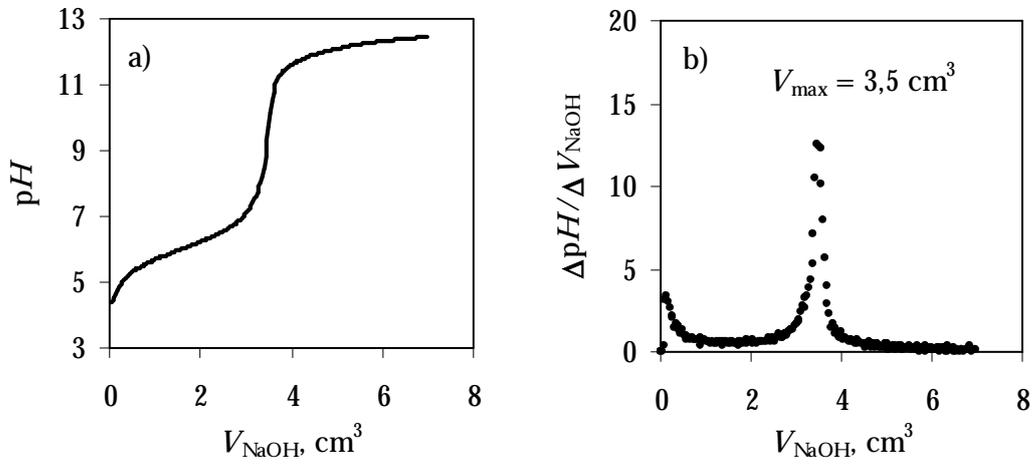


Figura D5. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en medio 6:4, agua:dioxano.

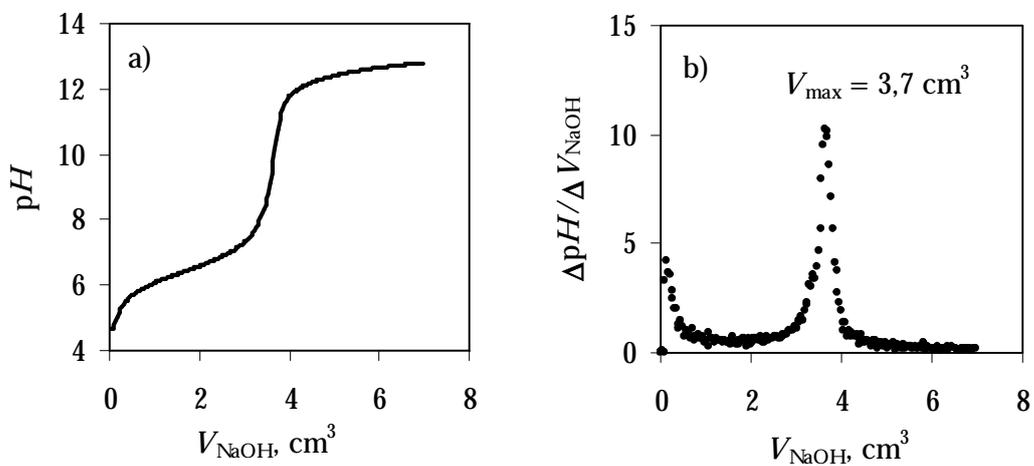


Figura D6. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en medio 5:5, agua:dioxano.

2. Determinación del pK_a del NMP

La Tabla D2 recoge los valores pH-A obtenidos en la determinación espectrofotométrica del pK_a de 1,4-dinitro-2-metil pirrol (NMP) en medio 7:3, agua:dioxano.

Tabla D2. Determinación de la constante de disociación del NMP en la mezcla 7:3 agua:dioxano a $T = 25,0$ °C.

pH	A ($\lambda = 361$ nm)
1,29	0,1786
2,25	0,1778
3,22	0,1783
4,24	0,1708
5,50	0,1822
5,60	0,1848
5,50	0,1770
5,60	0,1837
7,30	0,1895
9,87	0,2767
10,30	0,4476
10,64	0,5547
10,75	0,6553
11,03	0,8267
11,10	0,8606
11,45	1,0119
12,40	1,0212
12,44	1,0393
13,28	1,0195

3. Determinación del pK_a del ENA

Método espectrofotométrico

La Tabla D3 recoge los valores pH-A obtenidos en la determinación del pK_a del ácido etilnitrólico (ENA) en diferentes medios, agua:dioxano (v/v).

Tabla D3. Determinación de la constante de disociación del ENA en mezclas agua:dioxano (v/v) a T = 25,0 °C.

10:0 ^a		9,5:0,5		9:1	
pH	A (λ = 350 nm)	pH	A (λ = 356 nm)	pH	A (λ = 357 nm)
2,51	0,0127	4,70	0,0102	-	-
2,61	0,0116	4,90	0,0098	5,51	0,0192
2,81	0,0106	5,06	0,0114	5,8	0,0214
3,75	0,0116	5,26	0,0117	6,04	0,0285
4,74	0,0122	5,77	0,0200	6,26	0,0357
5,11	0,0128	5,98	0,0327	6,57	0,0489
5,54	0,0188	6,26	0,0441	6,78	0,0687
6,09	0,0372	6,56	0,0787	6,97	0,1044
6,45	0,0697	6,76	0,1096	7,12	0,1382
6,74	0,1128	6,95	0,1519	7,25	0,162
7,01	0,1771	7,14	0,2048	7,43	0,2063
7,21	0,2407	7,3	0,2508	7,6	0,2576
7,37	0,2909	7,44	0,2887	7,79	0,3097
7,55	0,3699	7,51	0,3094	7,97	0,3947
7,71	0,4357	7,61	0,3427	8,17	0,4552
7,87	0,4909	7,69	0,3647	8,32	0,4911
7,99	0,5246	7,84	0,4077	8,51	0,5123
8,27	0,5945	7,91	0,4268	8,7	0,5422
8,52	0,6297	8,00	0,4446	8,84	0,5567
8,85	0,6557	8,13	0,4615	9,07	0,5708
9,03	0,6621	8,26	0,4835	9,19	0,5748
9,24	0,6642	8,51	0,5100	9,27	0,5758
9,47	0,6606	8,68	0,5247	9,44	0,578
9,88	0,6608	8,92	0,5327	9,58	0,578
10,1	0,6581	9,07	0,5341	9,73	0,5792

Tabla D3. Continuación

8,5:1,5		8:2		7:3	
pH	A ($\lambda = 357$ nm)	pH	A ($\lambda = 359$ nm)	pH	A ($\lambda = 360$ nm)
4,44	0,0101	5,03	0,0112	4,66	0,0136
4,55	0,0104	5,45	0,0126	5,19	0,0139
4,99	0,0113	5,69	0,0149	5,96	0,0179
5,27	0,0124	5,85	0,0183	6,43	0,0307
5,57	0,0158	6,16	0,0282	6,7	0,0399
5,98	0,024	6,49	0,0438	6,99	0,0605
6,36	0,0448	6,88	0,0784	7,24	0,0865
6,6	0,072	7,05	0,0978	7,45	0,1229
6,85	0,1022	7,2	0,1246	7,6	0,1575
7,02	0,132	7,33	0,1539	7,73	0,1947
7,12	0,1652	7,54	0,2319	7,91	0,2571
7,2	0,1923	7,67	0,2681	8,03	0,3018
7,32	0,2224	7,93	0,3866	8,19	0,3749
7,41	0,2424	8,18	0,4989	8,32	0,4307
7,54	0,2935	8,38	0,5775	8,49	0,4991
7,6	0,3219	8,61	0,648	8,63	0,5648
7,71	0,3623	8,91	0,7109	8,79	0,6135
7,87	0,4163	9,09	0,7229	8,91	0,6425
7,95	0,4513	9,45	0,755	9,24	0,7064
8,14	0,5278	9,78	0,7654	9,46	0,7321
8,24	0,5616	9,95	0,767	9,69	0,7542
8,34	0,5914	-	-	9,86	0,7567
8,51	0,6319	-	-	10,04	0,763
8,6	0,6546	-	-	10,16	0,7661
8,76	0,673	-	-	10,28	0,7646
9	0,7002	-	-	10,49	0,7663
9,16	0,707	-	-	10,66	-
9,4	0,7154	-	-	-	-
9,6	0,7196	-	-	-	-
9,75	0,7202	-	-	-	-
9,85	0,7205	-	-	-	-

Tabla D3. Continuación

6:4		5:5	
pH	A ($\lambda = 363 \text{ nm}$)	pH	A ($\lambda = 365 \text{ nm}$)
5,01	0,0072	5,08	0,0092
5,2	0,0069	6,34	0,0124
5,57	0,0074	6,72	0,0145
6,05	0,0104	7,31	0,032
6,48	0,0156	7,75	0,0468
7,07	0,0391	8,06	0,0706
7,53	0,0707	8,3	0,1016
7,78	0,1071	8,45	0,1273
8	0,1475	8,6	0,1714
8,15	0,1821	8,75	0,2182
8,33	0,2415	8,89	0,2591
8,53	0,3255	9,09	0,3324
8,62	0,3489	9,32	0,4285
8,71	0,397	9,49	0,4679
8,86	0,4494	9,68	0,5388
9,05	0,5062	9,84	0,577
9,17	0,5535	9,92	0,5783
9,38	0,5978	10,06	0,6081
9,45	0,6082	10,32	0,6427
9,7	0,6469	10,51	0,6499
9,9	0,6618	10,63	0,6571
9,95	0,6679	10,81	0,6619
10,2	0,6815	11,08	0,6686
10,45	0,6926	11,25	0,6692
10,65	0,6904	11,44	0,6698
10,8	0,6912		

La Tabla D4 recoge los valores obtenidos en agua deuterada.

Tabla D4. Determinación de la constante de disociación del ENA en agua deuterada a $T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH	A ($\lambda = 350\text{ nm}$)
3,49	0,0148
4,15	0,0155
5,01	0,0170
5,44	0,0211
5,83	0,0308
6,33	0,0579
6,70	0,1003
6,98	0,1486
7,18	0,2043
7,36	0,2664
7,50	0,3263
7,63	0,3861
7,75	0,4524
7,87	0,5121
8,03	0,5882
8,16	0,6440
8,32	0,7039
8,50	0,7598
8,68	0,7995
8,88	0,8247
9,01	0,8327
9,16	0,8409
9,30	0,8420
9,42	0,8402
9,63	0,8398
9,90	0,8352

Método volumétrico

Las Figuras D7 y D8 recogen los perfiles V_{NaOH} -pH y la determinación del volumen de hidróxido sódico gastado en el punto final de la valoración (V_{max}) del ácido etilnitrólico en los medios 10:0 y 7:3 agua:dioxano (v/v), respectivamente.

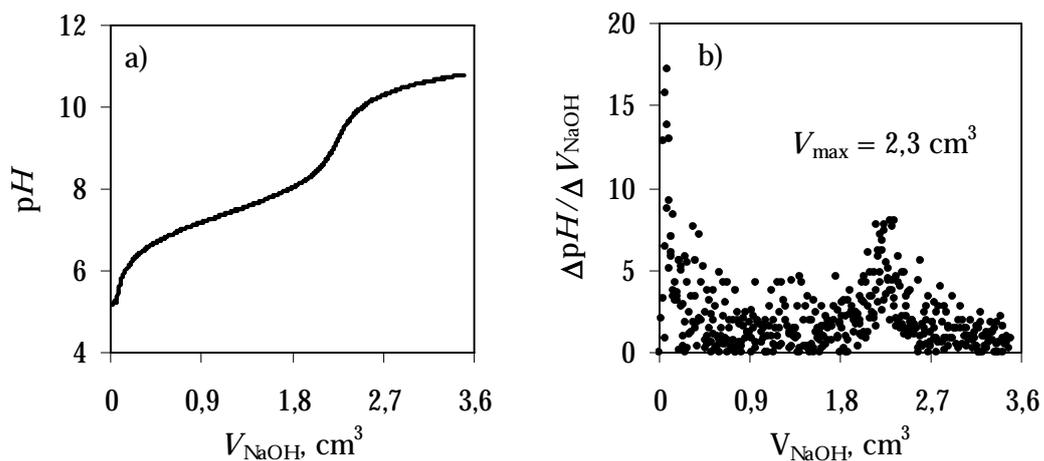


Figura D7. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en disolución acuosa.

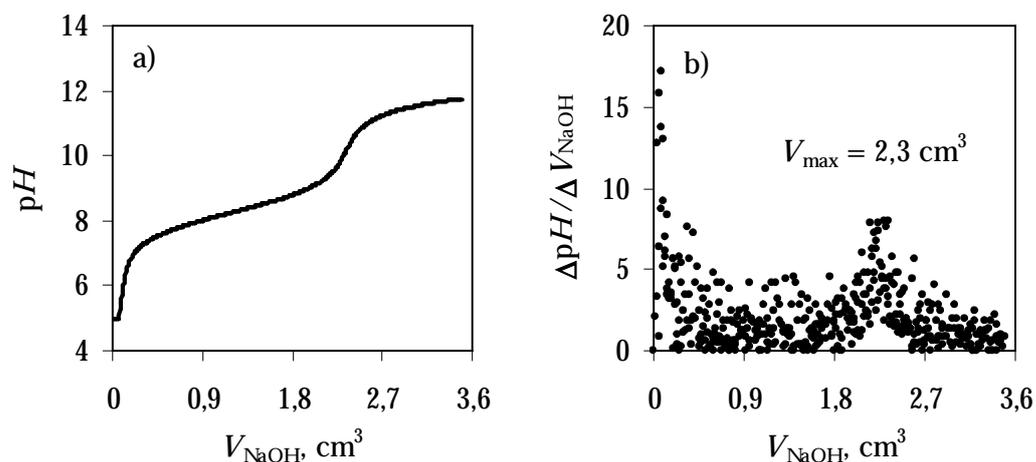


Figura D8. Perfil pH - A (a) y determinación del volumen de NaOH gastado en el punto final de la valoración con la representación $\Delta\text{pH} / \Delta V_{\text{NaOH}} - V_{\text{NaOH}}$ (b) en medio 7:3, agua:dioxano.

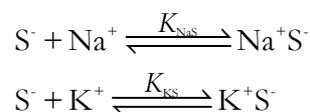
Apéndice E. Conductividad

La Tabla E1 recoge los valores de las conductividades eléctricas (K) y molares (Λ) de las sales sorbato sódico (NaS) potásico (KS) a diferentes concentraciones de las mismas.

Tabla E1. Conductividades eléctricas y molares de las sales sorbato sódico (NaS) y potásico (KS) en disolución acuosa a $T = 25,0$ °C.

Sorbato sódico			Sorbato potásico		
$10^3 c_{\text{NaS}}$	K_{NaS}	Λ_{NaS}	$10^3 c_{\text{KS}}$	K_{KS}	Λ_{KS}
(M)	($\mu\text{S cm}^{-1}$)	($\text{S mol}^{-1} \text{cm}^2$)	(M)	($\mu\text{S cm}^{-1}$)	($\text{S mol}^{-1} \text{cm}^2$)
0,79	65,37	82,74	0,80	84,57	105,23
1,58	129,56	82,00	1,61	166,99	103,89
2,37	192,67	81,30	2,41	247,94	102,83
3,16	253,82	80,32	3,21	327,81	101,97
3,95	316,54	80,14	4,02	406,70	101,20
7,90	617,4	78,15	8,04	790,86	98,40
11,8	909,44	76,75	12,06	1161,30	96,33
15,8	1177,96	74,56	16,07	1514,10	94,19
19,7	1449,42	73,39	20,09	1867,88	92,96

Para estudiar la conductividad molar del sorbato sódico o potásico, se considera un proceso de asociación iónico (Klofutar y Šegatin, 2007), los iones (Na^+ o K^+ y S^-) se encuentran en equilibrio con el par iónico asociado (Na^+S^- o K^+S^-) como se muestra en el Esquema E1.



Esquema E1. Equilibrio de asociación entre los iones y el par iónico Na^+S^- o K^+S^- .

La constante de equilibrio de asociación en ambos casos quedaría definida según las Ec 80 y 81.

$$K_{\text{NaS}} = \frac{a_{\text{Na}^+\text{S}^-}}{a_{\text{Na}^+} a_{\text{S}^-}} \quad (80)$$

$$K_{\text{KS}} = \frac{a_{\text{K}^+\text{S}^-}}{a_{\text{K}^+} a_{\text{S}^-}} \quad (81)$$

donde $a_{\text{K}^+\text{S}^-}$, $a_{\text{Na}^+\text{S}^-}$, a_{K^+} , a_{Na^+} y a_{S^-} son las actividades de los pares iónicos y de los iones K^+ , Na^+ y S^- , respectivamente.

Las Ec 80 y 81 pueden escribirse de la forma:

$$K_{\text{NaS}} = \frac{(1-\gamma) f_{\text{Na}^+\text{S}^-}}{\gamma^2 c_{\text{NaS}} f_i^2} \quad (83)$$

$$K_{\text{KS}} = \frac{(1-\gamma) f_{\text{K}^+\text{S}^-}}{\gamma^2 c_{\text{KS}} f_i^2} \quad (84)$$

donde γ es la fracción de iones no disociados en disolución y f_i es el coeficiente de actividad de las especies correspondientes ($i = \text{Na}^+$, K^+ , S^- , Na^+S^- y K^+S^-) siendo: $f_i^2 = f_{\text{Na}^+} f_{\text{S}^-}$ en el caso de la sal sódica y $f_i^2 = f_{\text{K}^+} f_{\text{S}^-}$ en la sal potásica. Las Ec 83 y 84 pueden simplificarse considerando que: $f^2 \cong 1$.

Se ha manejado la ecuación de Lee-Wheaton en la forma descrita por Pethybridge y Taba (Pethybridge y Taba, 1980) para estudiar la dependencia de la conductividad molar del sorbato sódico y potásico con su concentración (Ec 85 y 86). Esta ecuación es válida para concentraciones superiores a 0,1 M y electrolitos 1:1 (Lee y Wheaton, 1979).

$$\Lambda = \gamma \Lambda_{\text{NaS}}^{\circ} \left[1 + C_1 (\beta\kappa) + C_2 (\beta\kappa)^2 + C_3 (\beta\kappa)^3 \right] - \frac{\rho\kappa}{(1+\kappa d)} \left[1 + C_4 (\beta\kappa) + C_5 (\beta\kappa)^2 + \frac{\kappa d}{12} \right] \quad (85)$$

$$\Lambda = \gamma \Lambda_{\text{KS}}^{\circ} \left[1 + C_1 (\beta\kappa) + C_2 (\beta\kappa)^2 + C_3 (\beta\kappa)^3 \right] - \frac{\rho\kappa}{(1+\kappa d)} \left[1 + C_4 (\beta\kappa) + C_5 (\beta\kappa)^2 + \frac{\kappa d}{12} \right] \quad (86)$$

siendo $\Lambda_{\text{NaS}}^{\circ}$ y $\Lambda_{\text{KS}}^{\circ}$ las conductividades molares límite de las sales sódica y potásica del ácido sórbico, respectivamente, ρ , κ y β son parámetros definidos de la forma:

$$\rho = \frac{|z| F e}{(299,79)(3 \pi \eta)} \quad (87)$$

donde z , F , e y η son la carga de los iones, la constante de Faraday, la carga del electrón y la viscosidad del disolvente, en este caso el agua, respectivamente. Para estudiar la variación

de la viscosidad del disolvente con la temperatura se ha considerado la siguiente ecuación

empírica: $\eta = 2,414 \times 10^{-5} \times 10^{\frac{247,8}{T-140}}$.

$$\kappa = \left(\frac{8 \pi N_A e^2 |z|^2}{D k T} \right)^{1/2} (\gamma c)^{1/2} \quad (88)$$

D y k son la constante dieléctrica y la constante de Boltzmann, respectivamente y c la concentración de la sal sódica o potásica del ácido sórbico. Se ha manejado una ecuación empírica para estudiar la variación de la constante dieléctrica con la temperatura: $8,85 \times 10^{-12} [87,91 - 0,40 (T - 273,15) + 9,59^{-4} (T - 273,15)^2 - 1,33 \times 10^{-6} (T - 273,15)^3]$.

$$\beta = \frac{z^2 e^2}{D k T} \quad (89)$$

Los coeficientes C_1, C_2, C_3, C_4 y C_5 son funciones complejas del producto $t = \kappa d$ (Pethybridge y Taba, 1980) definidas según:

$$C_1 = -0,09753 + 0,8185t - 0,04144t^2 + 0,01114t^3 \quad (90)$$

$$C_2 = 0,11798 - 0,18737t + 0,09052t^2 - 0,02393t^3 + 0,08358 \ln t \quad (91)$$

$$C_3 = -0,19454 + 0,39764t - 0,37557t^2 + 0,25118t^3 - 0,07843t^4 - 0,10296 \ln t \quad (92)$$

$$C_4 = -0,04724 + 0,06445t - 0,07419t^2 + 0,01784t^3 + 0,12428 \ln t + 0,09863t \ln t \quad (93)$$

$$C_5 = 0,084185 - 0,90051t + 0,07809t^2 - 0,05333t^3 + 0,50097 \ln t + 0,45252t \ln t \quad (94)$$

Los coeficientes de actividad de los iones, f_i , se pueden calcular con la ecuación de Debye-Hückel para electrolitos 1:1 en la forma:

$$\ln f_i = -\frac{\kappa \beta}{2(1 + \kappa d)} \quad (95)$$

Para calcular el valor de f_i se ha considerado el siguiente valor para la distancia entre los iones: $d = 0,5$ nm (Klofutar y Šegatin, 2007). La influencia del radio utilizado sobre los resultados finales es muy pequeña.

La Figura E1. muestra la variación de la conductividad molar de las sales sódica y potásica del ácido sórbico (Λ) en función de la concentración de las mismas (c). Con el ajuste de los resultados experimentales a las ecuaciones Ec 85 y 86, teniendo en cuenta las expresiones Ec 87-95 así como la definición de constante de asociación (Ec 83 y 84) podemos determinar la conductividad molar límite del sorbato sódico y potásico - $\Lambda_{\text{NaS}}^\circ$ y $\Lambda_{\text{KS}}^\circ$ - así como las constantes de asociación en ambas sales - K_{NaS} y K_{KS} - (Tabla 4.7.)

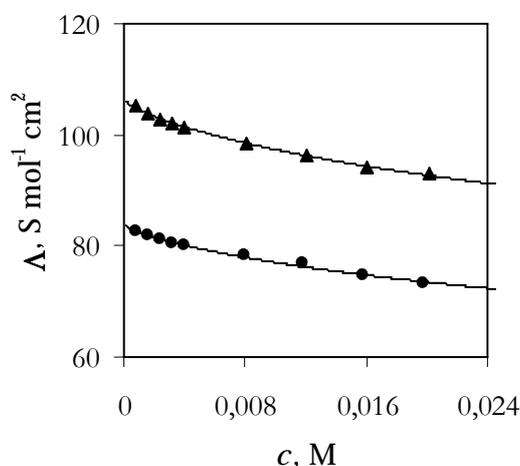


Figura E1. Variación de las conductividades molares Λ_{NaS} (●) y Λ_{KS} (▲) con la concentración de la sal.

Tabla E2. Conductividad molar límite de las sales sódica y potásica del ácido sórbico y del anión sorbato y constante de asociación iónica

Compuesto	Λ° (S cm ² mol ⁻¹) ^a	K	λ_s° (S cm ² mol ⁻¹)
Sorbato sódico	84,0 ± 0,2	5,7 ± 0,4	33,9
Sorbato potásico	106,5 ± 0,2	6,2 ± 0,3	33,0

$T = 25,0$ °C

^aDesviación estándar

La conductividad molar límite del anión sorbato (λ_s°) puede determinarse a partir de la ley de Kohlrausch de la migración independiente de los iones a dilución infinita conocida la conductividad molar límite de las sales sódica y potásica del ácido sórbico (Ec 96 y 97).

$$\Lambda_{\text{NaS}}^{\circ} = \lambda_{\text{Na}^+}^{\circ} + \lambda_{\text{S}^-}^{\circ} \quad (96)$$

$$\Lambda_{\text{KS}}^{\circ} = \lambda_{\text{K}^+}^{\circ} + \lambda_{\text{S}^-}^{\circ} \quad (97)$$

Conocido el valor de la conductividad molar límite de los iones Na^+ y K^+ , $\lambda_{\text{Na}^+}^{\circ} = 50,08 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ y $\lambda_{\text{K}^+}^{\circ} = 73,48 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (Okan y Champeney, 1997), respectivamente, podemos determinar la conductividad molar límite del anión sorbato a partir de los valores de la conductividad molar límite del sorbato sódico y potásico - $\Lambda_{\text{NaS}}^{\circ}$ y $\Lambda_{\text{KS}}^{\circ}$ -. El valor obtenido a partir de ambas sales no varía significativamente, $\lambda_{\text{S}^-}^{\circ} = 33,9$ y $33,0 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, en presencia del catión Na^+ y K^+ , respectivamente (Tabla 4.6.).

La Tabla E3. recoge los valores de la conductividad molar límite de algunos aniones de ácidos carboxílicos (Apelblat, 2002) para poder comparar con el obtenido para el anión sorbato.

Los aniones procedentes de ácidos monobásicos presentan conductividades molares límite comprendidas entre 14 y $55 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$, observándose un valor medio de $30,8 \pm 4,7 \text{ S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ -este valor está calculado considerando una gran variedad de ácidos orgánicos muy distintos, desde el punto de vista estructural, y con sustituyentes diferentes- (Apelblat, 2002).

Tabla E3. Conductividad molar límite de algunos aniones de ácidos monobásicos en disolución acuosa

Anión ^a	λ° ($\text{S cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)
n-Pentanoato	33,68
n-Hexanoato	31,09
2-Hexenoato	28,20
4-Hexenoato	27,54
Acrilato	35,89
3,3-Dimetil acrilato	34,91
Benzoato	33,26
2-Metilbenzoato	32,33
2-Etilbenzoato	29,35

$T = 25,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$

^aApelblat, 2002.

-
- Apelblat, A. J. *Mol. Liquids* **2002**, *95*, 99.
Klofutar, C; Šegatin, N. *J. Solution Chem.* **2007**, *36*, 879.
Lee, W. H.; Wheaton, R. J. *J. Chem. Soc. Faraday I* **1979**, *75*, 1128.
Okan, S. E.; Champeney, D. C. *J. Solution Chem.* **1997**, *26*, 405.
Pethybridge, A. D.; Taba, S. S. *J. Chem. Soc. Faraday I* **1980**, *76*, 368.