



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**FACULTADE DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

***MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FOTOOXIDACIÓN DE  
COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOQUÍMICA Y  
MEDIOAMBIENTAL:***

- 1. HALOGENACIÓN DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS***
- 2. FOTODEGRADACIÓN DE BIOCIDAS TIPO TRIAZINA***

**MARÍA ISABEL FERNÁNDEZ PÉREZ**



**UNIVERSIDADE DA CORUÑA**

**FACULTADE DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I**

***MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FOTOOXIDACIÓN DE  
COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOQUÍMICA Y  
MEDIOAMBIENTAL:***

***1. HALOGENACIÓN DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS***

***2. FOTODEGRADACIÓN DE BIOCIDAS TIPO S-TRIAZINA***

Memoria presentada por:  
**MARÍA ISABEL FERNÁNDEZ PÉREZ**  
para optar al Grado de Doctor  
A Coruña, mayo de 2002

Tribunal que debe xulga-la presente Tese de doutoramento:

**Presidente**

**HUGH DOUGLAS BURROWS**

Catedrático de Universidade

Departamento de Química

Universidade de Coimbra

**Vocais**

**HOWARD MASKILL**

Senior Lecturer

Department of Chemistry

Universidade de Newcastle upon Tyne (Reino Unido)

**DIEGO ARMESTO VILA**

Catedrático de Universidade

Departamento de Química Orgánica I

Universidade Complutense de Madrid

**MARÍA FLOR RODRÍGUEZ PRIETO**

Catedrática de Universidade

Departamento de Química Física

Universidade de Santiago de Compostela

**Secretario**

**XOSÉ LUIS ARMESTO BARBEITO**

Catedrático de Universidade

Dpto. de Química Física e Enxeñería Química I

Universidade da Coruña



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

### DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

Campus de A Zapateira  
Rúa Alejandro de la Sota 1  
15008 A Coruña  
Tel. 981 16 70 00  
Fax. 981 16 70 65

**XOSÉ LUIS ARMESTO BARBEITO**, *Director do Departamento de Química Física e Enxeñería Química I da Universidade da Coruña,*

#### CERTIFICA

Que a Licenciada en Química Dona María Isabel Fernández Pérez, realizou neste Departamento, baixo a dirección do Dr. Moisés Canle López e do Dr. J. Arturo Santaballa López, o traballo que, baixo o título "*Mecanismos de oxidación y fotooxidación de compuestos de relevancia bioquímica y medioambiental: 1. Halogenación de aminoácidos azufrados. 2. Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina*" presenta para optar o grao de Doutor en Química.

E para que así conste, expido e asino a presente na cidade de A Coruña a 8 de abril de 2002.



*Xosé Luis Armesto Barbeito*  
X. L. Armesto Barbeito



## UNIVERSIDADE DA CORUÑA

### DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA E ENXEÑERÍA QUÍMICA I

Campus de A Zapateira  
Rúa Alejandro de la Sota 1  
15008 A Coruña  
Tel. 981 16 70 00  
Fax. 981 16 70 65

**Moisés Canle López e J. Arturo Santaballa López**, Profesores Titulares de Universidade  
*do Departamento de Química Física e Enxeñería Química I da Universidade da Coruña,*

### CERTIFICAN

Que o traballo de investigación orixinal titulado "*Mecanismos de oxidación y fotooxidación de compuestos de relevancia bioquímica y medioambiental: 1. Halogenación de aminoácidos azufrados. 2. Fotodegradación de biocidas tipo triazina*" foi realizado neste Departamento pola Licenciada en Química Dona María Isabel Fernández Pérez, e que como Directores do mesmo autorizamos-la súa presentación como memoria de Tese de Doutoramento co gallo de que sexa xulgada polo tribunal correspondente.

E para que así conste, expedimos e asinamos-la presente na cidade de A Coruña a 8 de abril de 2002.



Asdo. Moisés Canle López



Asdo. J. Arturo Santaballa López

Son muchos a los que quiero y debo agradecer el tiempo y el esfuerzo dedicado durante estos últimos años de trabajo.

En primer lugar agradecer a mis directores, los profesores Dr. Moisés Canle López y Dr. Arturo Santaballa López que me dieron la oportunidad de entrar y participar en el mundo de la investigación.

Por supuesto a Santi agradecerle su apoyo y su ayuda hasta los últimos minutos para que todo saliese lo mejor posible.

A Noemí, Tania, Guillín, Dani, Luz y Ana D. agradecerles que hayan hecho que estos años todo fuese más llevadero.

Agradecerles a Pitu, Hermógenes, Montse, Vicky, Pilar, Aurora y Luis el tiempo que hemos compartido en el laboratorio y sus sugerencias con las que han colaborado en el desarrollo de este trabajo.

Además durante estos últimos años han sido muchos los estudiantes Erasmus que han participado en la vida del laboratorio, en especial quiero agradecer a Elena, Emanuele y Rita su colaboración directa en diferentes partes de mi tesis.

A las niñas, Cris, Irene y Sandra agradecerles que siempre hayan estado ahí, ¡y ya van muchos años!

A los jóvenes valores que han sido fichados en los últimos meses por haberlos hecho divertidos.

No puedo olvidar agradecer al Prof. Dr. Steen Steenken que me hubiese dado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, en donde dispuse de los medios necesarios para desarrollar una gran parte del trabajo incluido en esta tesis.

También quiero agradecer a las diferentes instituciones, que durante estos años hayan financiado este trabajo.

Y por supuesto agradecer a mis padres y a mi hermana que desde siempre me hayan ayudado y apoyado en todo aquello que he decidido hacer, y que gracias a su esfuerzo he podido llevar a cabo.

## *Índice general*

I.	Introducción.	i
II.	Aportaciones.	v
III.	Main findings of this Thesis	ix
IV.	Abreviaturas.	xiii
<b>Parte I. HALOGENACIÓN</b>		
1.	Introducción.	1
2.	Reacciones de halogenación: antecedentes.	7
3.	Experimental.	51
4.	Métodos cinéticos.	61
5.	Estudio espectrofotométrico.	71
6.	Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: resultados.	85
7.	Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: discusión.	109
8.	Cloración de aminoácidos que contienen azufre: resultados.	129
9.	Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión.	143
10.	Análisis de productos: halogenación.	179
11.	Anexos halogenación.	193
<b>Parte II. FOTODEGRADACIÓN</b>		
12.	Química de la radiación.	225
13.	Fotoquímica.	245
14.	Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: antecedentes.	261
15.	Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: experimental.	299
16.	Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: resultados.	317
17.	Análisis de productos: fotodegradación.	347
18.	Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: discusión	355
19.	Anexos fotodegradación.	375
20.	Papers produced out of this thesis, so far.	399

La presente memoria de Tesis Doctoral resume el trabajo realizado en dos direcciones de investigación que, aunque aparentemente independientes, presentan una clara ligazón.

Por un lado, se ha pretende mimetizar *in vitro* la oxidación intracelular de aminoácidos y péptidos conteniendo azufre. Dicha oxidación tiene lugar, fundamentalmente, a través del sistema enzimático mieloperoxidasa / peróxido de hidrógeno / cloruro. Las reacciones implicadas han sido ampliamente discutidas, pero su mecanismo detallado escasamente analizado.

Las sustancias con las que se ha trabajado fueron seleccionadas en función de su relevancia bioquímica. Así, por ejemplo, el grupo tiol de la cisteína (Cys) interviene en un elevado número de procesos enzimáticos. También forma parte de centros Fe-S en proteínas que intervienen en los procesos de transferencia electrónica como pueden ser la respiración y la fotosíntesis. Otro tiol de interés biológico es el tripéptido glutatión (GSH), presente en elevadas concentraciones en los fluidos intracelulares. El GSH tiene propiedades detoxificantes y citoprotectoras, pudiendo resaltarse:

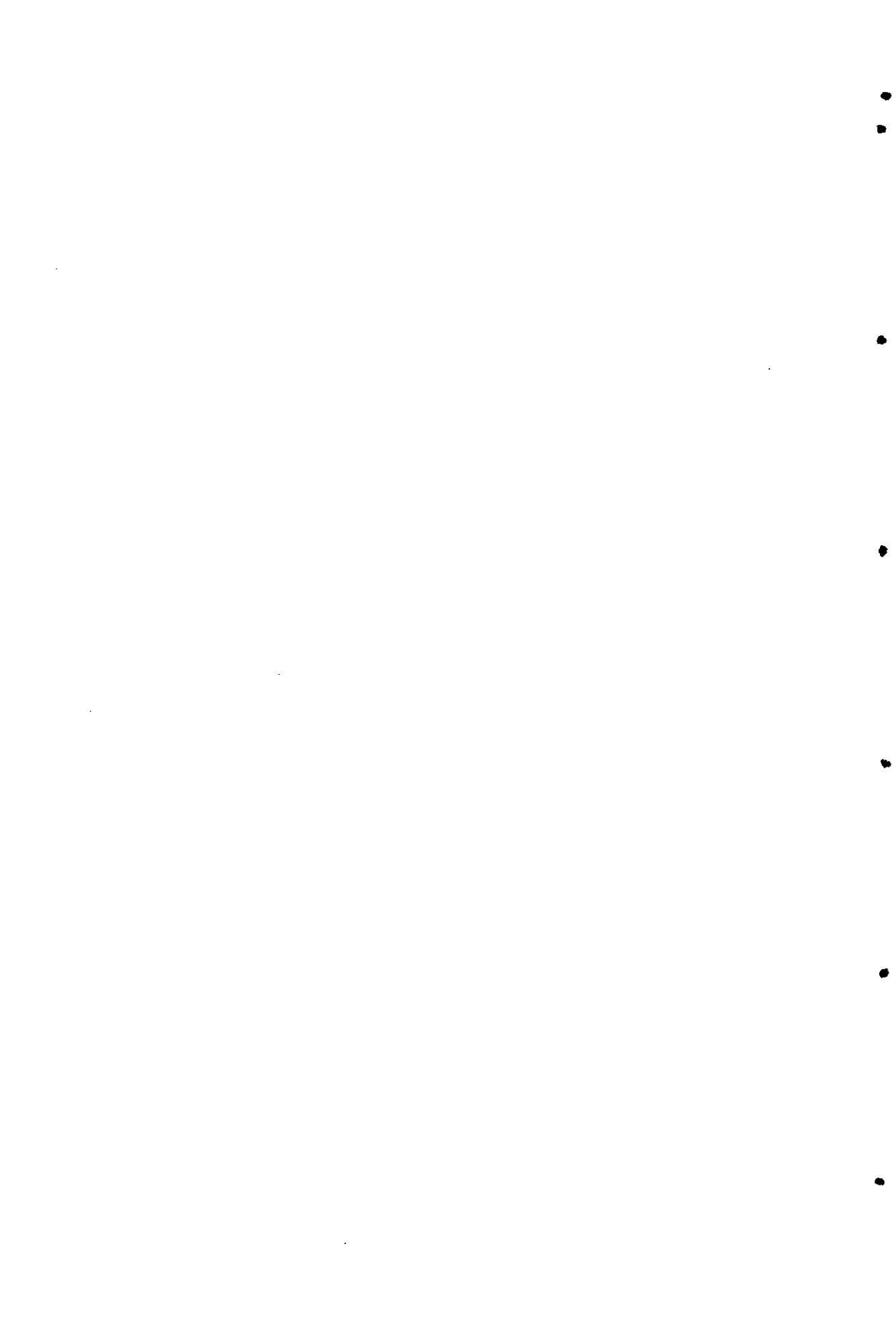
- eliminación del  $H_2O_2$
- reacciones de conjugación, principalmente neutralizando compuestos tóxicos (xenobióticos) como son los biocidas.

Un ejemplo de reacción de conjugación con GSH son los mecanismos que las plantas utilizan para metabolizar los herbicidas tipo s-triazina. Este punto conecta con la otra dirección de investigación que se ha seguido: el estudio de los mecanismos de fotooxidación de herbicidas basados en la estructura de la s-triazina. Dado que se ha propuesto que dicha reacción podría ocurrir vía radicales, se ha considerado relevante caracterizar espectroscópicamente y termodinámicamente los mismos, así como estudiar su reactividad.

Por otro lado debido al uso masivo de pesticidas en nuestros días, se ha considerado de interés el análisis de la fotodegradación de dichos herbicidas ya que, a pesar de que existen numerosos estudios acerca de los productos resultantes de su degradación, son muy escasos los que analizan en detalle los procesos a través de los que transcurre. Así, se ha realizado un estudio cinético sistemático de la fotodegradación de biocidas basados en la estructura de la s-triazina.



## II. Principales aportaciones de esta tesis



## Parte I

1. La reacción entre aminoácidos que contienen azufre y cloro acuoso en disolución neutra y básica tiene lugar por transferencia de cloro, mediante un proceso de orden dos, desde el átomo de oxígeno del HOCl al átomo de azufre. La reacción es mucho más rápida que la homóloga para la oxidación de aminoácidos que no contienen azufre.

2. Como consecuencia de la reacción de HOCl con tioles se genera el correspondiente cloruro de sulfenilo. En el caso de los sulfuros la reacción da lugar a la formación de cationes clorosulfonio. En este trabajo se presentan las primeras determinaciones cinéticas de la velocidad de las etapas elementales que conducen a la formación de ambos tipos de compuestos.

3. El cloruro de sulfenilo y el catión clorosulfonio son intermedios que, en medio alcalino, reaccionan rápidamente para producir el disulfuro y el sulfóxido respectivamente. Estos difieren de los productos de oxidación de aminoácidos que no contienen azufre, aldehídos, cetonas, cetoácidos, nitrilos, etc., y puede ser relacionado con los efectos antimutagénicos de los aminoácidos que contienen azufre.

4. Se ha comprobado que cuando se utiliza (*N*-Cl)-taurina como agente halogenante, la cloración desde el átomo de *N* hasta el *S* está asistida por dadores de protones. En el caso de la cloración de Cys y GSH, la cloración tiene además lugar por transferencia de *Cl* desde el HOCl que se genera a partir de la hidrólisis de (*N*-Cl)-taurina. Si bien la constante de hidrólisis es extremadamente pequeña, la elevada nucleofilia de los tiolatos es la causa de que esta vía se ponga de manifiesto. Este es el primer trabajo en donde se detalla el mecanismo de acción de (*N*-Cl)-taurina, un importante oxidante celular.

5. En medio básico y neutro, la cloración del sulfóxido de la metionina, de la sulfona de la metionina y del ácido cistéico tiene lugar sobre el átomo de nitrógeno, dando lugar al (*N*-Cl)-compuesto correspondiente.

## Parte II

6. Se ha acotado el valor del potencial de oxidación monoeléctrico de las s-triazinas ( $2,3 < E^0 < 2,6$  V vs. NHE) mediante estudio de su reactividad frente a diversos oxidantes monoeléctricos, tales como:  $SO_4^{\bullet-}$ ,  $UO_2^{2+}$ .

7. El radical  $HO^{\bullet}$  reacciona con las s-triazinas generando principalmente el aducto de OH. Se ha caracterizado espectroscópicamente el radical (s-triazina-OH) $^{\bullet}$  y se ha estimado el valor de su  $pK_a$ .

8. Se ha caracterizado espectroscópicamente el radical (s-triazina) $^{\bullet-}$ . La especie protonada de la s-triazina también se reduce, y lo hace más fácilmente que la correspondiente s-triazina neutra.

9. Se ha puesto de manifiesto que el proceso de fotodegradación de las s-triazinas es monofotónico cuando se emplea luz de 193 nm como radiación excitatriz, con un rendimiento cuántico de fotoionización inferior al 10%. Por el contrario, el proceso de fotodegradación es bifotónico cuando se emplean longitudes de onda menos energéticas.

10. Debido a que ninguno de estos compuestos puede ser degradado por acción de la luz solar, se han estudiado las características cinéticas de posibles métodos alternativos de fotodegradación, como pueden ser la reacción con  $HO^{\bullet}$  y la reducción monoeléctrica por reacción con electrón solvatado.

11. El proceso de fotodegradación de las s-triazinas genera radicales catiónicos que posteriormente sufren diferentes procesos, dando lugar a un amplio abanico de productos de reacción. Se ha establecido que el radical catiónico tiene un tiempo de vida sumamente breve, inferior a las posibilidades de detección de las técnicas empleadas en este estudio.

12. El análisis de los productos resultantes de la fotodegradación de s-triazinas, concuerda con los resultados previos disponibles en la bibliografía en forma de estudios analíticos, habiéndose verificado que los 2-OH y los desalquil derivados son los principales productos finales.

### III. Main findings of this thesis



## Part I

1. Sulfur-containing amino acids react with neutral and basic solutions of aqueous chlorine via a second order process, with chlorine transfer from the oxygen of HOCl to the sulfur of the amino acid. The reaction is considerably faster than the homologous oxidation of non-sulfur containing amino acids by aqueous chlorine.

2. The corresponding sulfenyl chlorides are generated upon reaction of HOCl with thiols. The reaction with sulfides leads to the formation of chlorosulfonium cations. This work reports the first kinetic determinations of the rate of the elementary steps leading to the formation of both compounds.

3. Sulfenyl chlorides and chlorosulfonium cations are intermediates that react readily in alkaline medium, yielding disulfides and sulfoxides, respectively. This is in contrast with the products derived from the oxidation of non-sulfur containing amino acids, *i.e.*: aldehydes, ketones, keto acids, nitriles, etc., and may be related to reported effects of reduction of mutagenicity by sulfur-containing amino acids.

4. When (*N*-Cl)-taurine is used as halogenating agent, the reaction takes place via proton-assisted chlorine transfer from *N* to *S*. The chlorination of Cys and GSH takes place also through hydrolysis of (*N*-Cl)-taurine followed by transfer of chlorine from the so-formed HOCl. Although the hydrolysis constant is very small, the presence of strong enough nucleophiles, such as the thiolates is the reason for this process to be observed. This is the first detailed report of the mechanism of action of (*N*-Cl)-taurine, a very important intracellular oxidant.

5. The chlorination of already oxidized sulfur-containing amino acids, such as methionine sulfoxide, methionine sulfone and cysteic acid, takes place on the nitrogen atom in basic and neutral medium, yielding the corresponding (*N*-Cl)-derivative.

## **Part II**

6. The one-electron oxidation for *s*-triazines has been limited to the interval ( $2,3 < E^0 < 2,6$  V vs. NHE) by studying their reactivity toward various one-electron oxidants, such as  $SO_4^{\cdot-}$  and  $UO_2^{2+}$ .

7. The hydroxyl,  $HO^{\cdot}$ , radical reacts with *s*-triazines, yielding mainly the corresponding OH adduct, (*s*-triazine-OH) $^{\cdot}$ , that has been spectrophotometrically characterized, and its  $pK_a$  obtained.

8. The one-electron reduction of *s*-triazines has been studied, and the corresponding radical anion, (*s*-triazine) $^{\cdot-}$ , spectrophotometrically characterized. Protonated *s*-triazines are also one-electron reduced, more readily than neutral *s*-triazines do.

9. It has been found that the photoionization of *s*-triazines is a monophotonic process when 193 nm light is used as excitation source, with a corresponding photoionization quantum yield lower than 10 %. On the contrary, the photoionization process is biphotonic when longer, less energetic wavelengths are used for excitation.

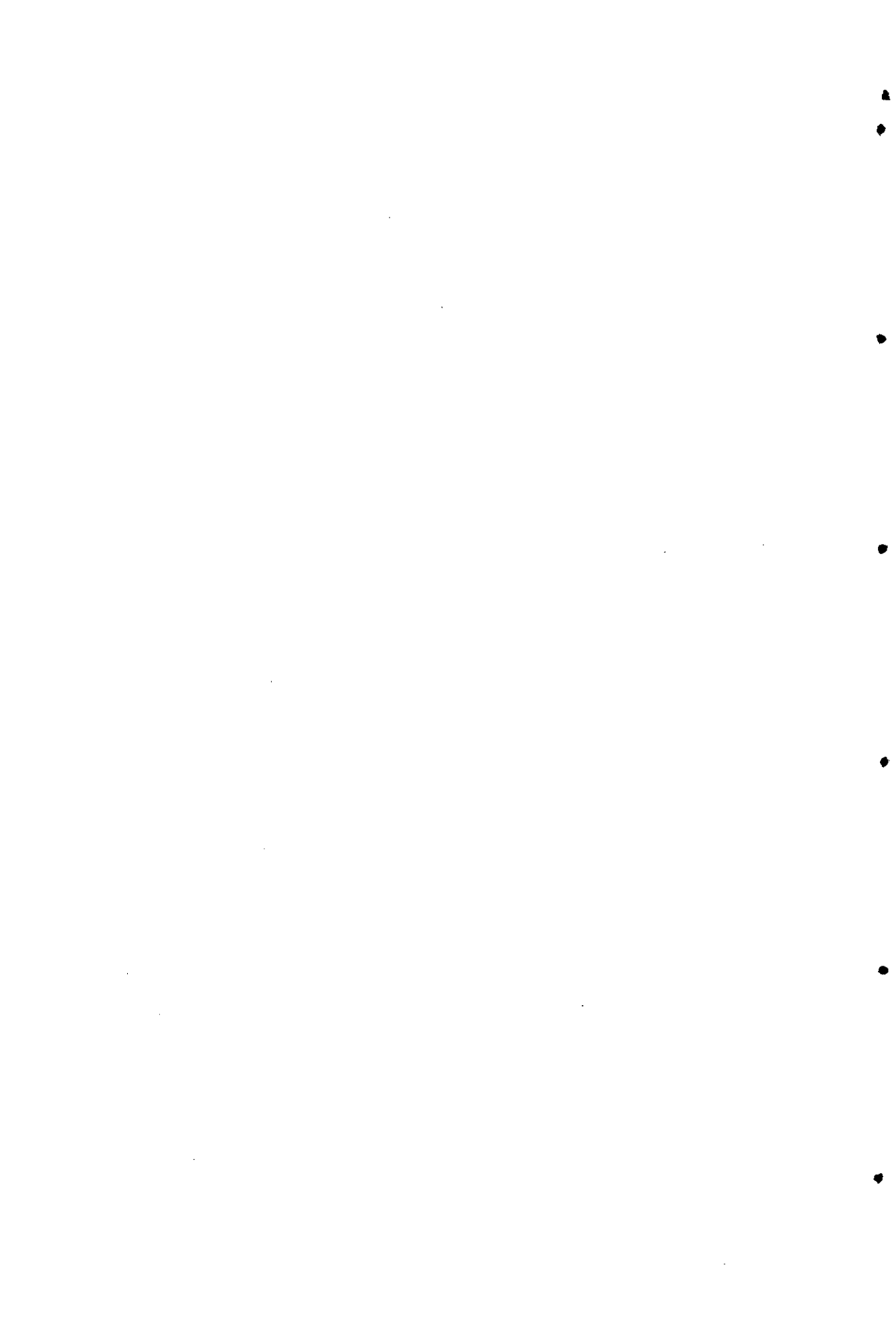
10. Since none of the studied triazine-based biocides can be photoionized by sunlight, the kinetic peculiarities of alternative photodegradation methods, such as the reaction with the hydroxyl radical,  $HO^{\cdot}$ , the one-electron oxidation by strong oxidants and the one-electron reduction by solvated electrons have also been studied.

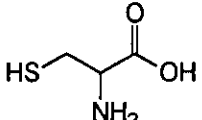
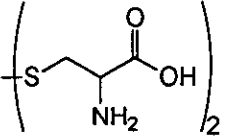
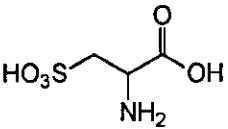
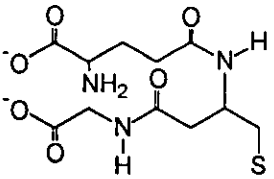
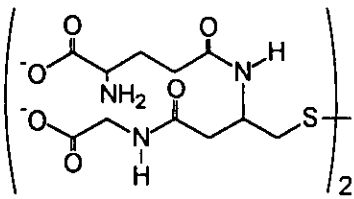
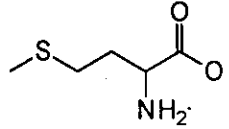
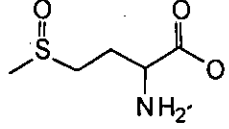
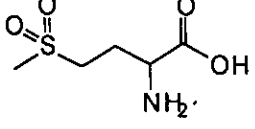
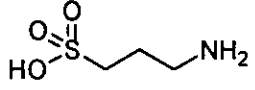
11. The photoionization process leads to radical cations, that then undergo different processes, leading to a wide range of products. It has been found that the radical cation has a very short lifetime, that has been limited to 2 ns, below the technical detection possibilities of the techniques used.

12. The product analysis of the different solutions of *s*-triazines after photolysis is in agreement with previous results from analytical studies, available in the literature. The main products of photolysis found have been the corresponding 2-OH and desalkyl derivatives.



#### IV. Abreviaturas

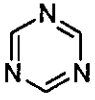
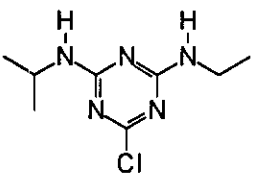
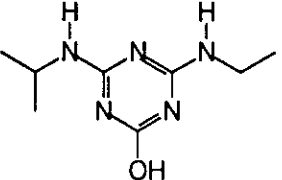
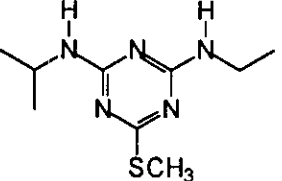
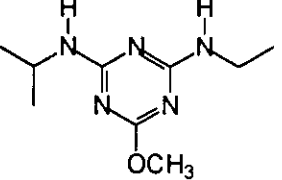
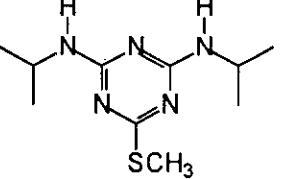
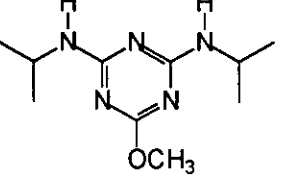


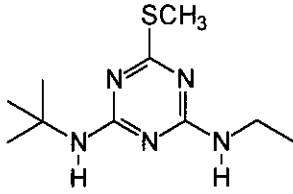
	Cisteína	Cys <sup>1</sup>
	Cistina	Cys <sup>1</sup> Cys   Cys^Cys <sup>2</sup>
	ácido cisteico	Cya <sup>1</sup>
	Glutation	GSH <sup>1</sup>
	Glutation disulfuro	GSSG <sup>1</sup>
	Metionina	Met <sup>1</sup>
	Metionina sulfóxido	MetSO <sup>1</sup>
	Metionina sulfona	MetSO <sub>2</sub> <sup>1</sup>
	Taurina	Tau

(1) IUPAC *Pure & Appl. Chem.* 1984, 56, 595-624.

(2) Para la cistina ésta ha sido la abreviatura utilizada.

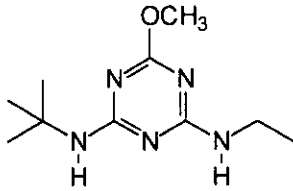
Abreviaturas

	1,3,5-triazina	s-triazina
	6-cloro- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	atrazina
	4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina-2-ol	atrazina-2-OH
	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina	ametryn
	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina	atraton
	<i>N,N'</i> -diisopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina	prometryn
	<i>N,N'</i> -diisopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina	prometon



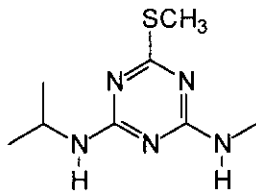
*N*-(*tert*-butil)-*N'*-etil-6-(metilsulfanil)-  
1,3,5-triazina-2,4-diamina

terbutryn



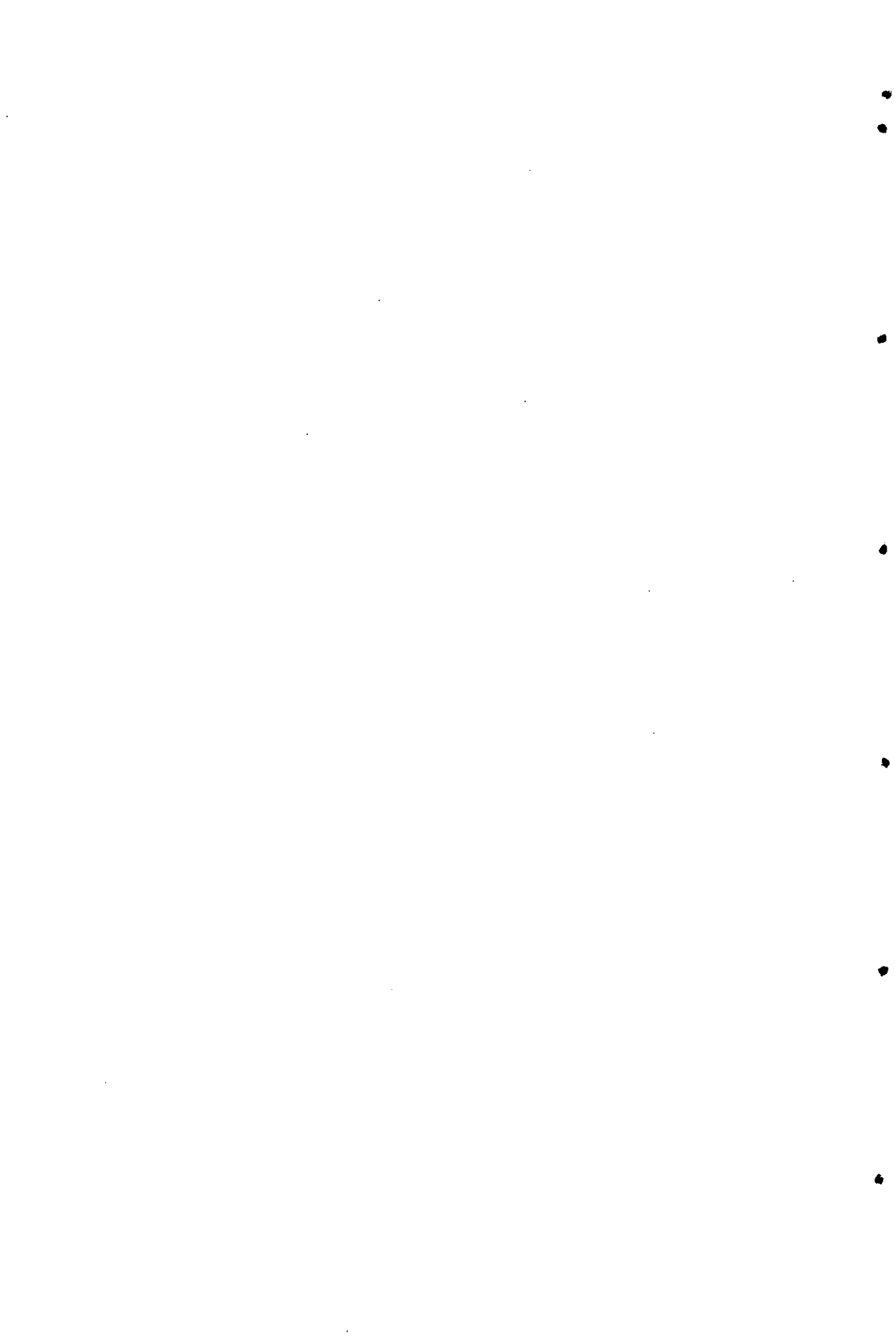
*N*-(*tert*-butil)-*N'*-etil-6-metoksi-1,3,5-  
triazina-2,4-diamina

terbumeton



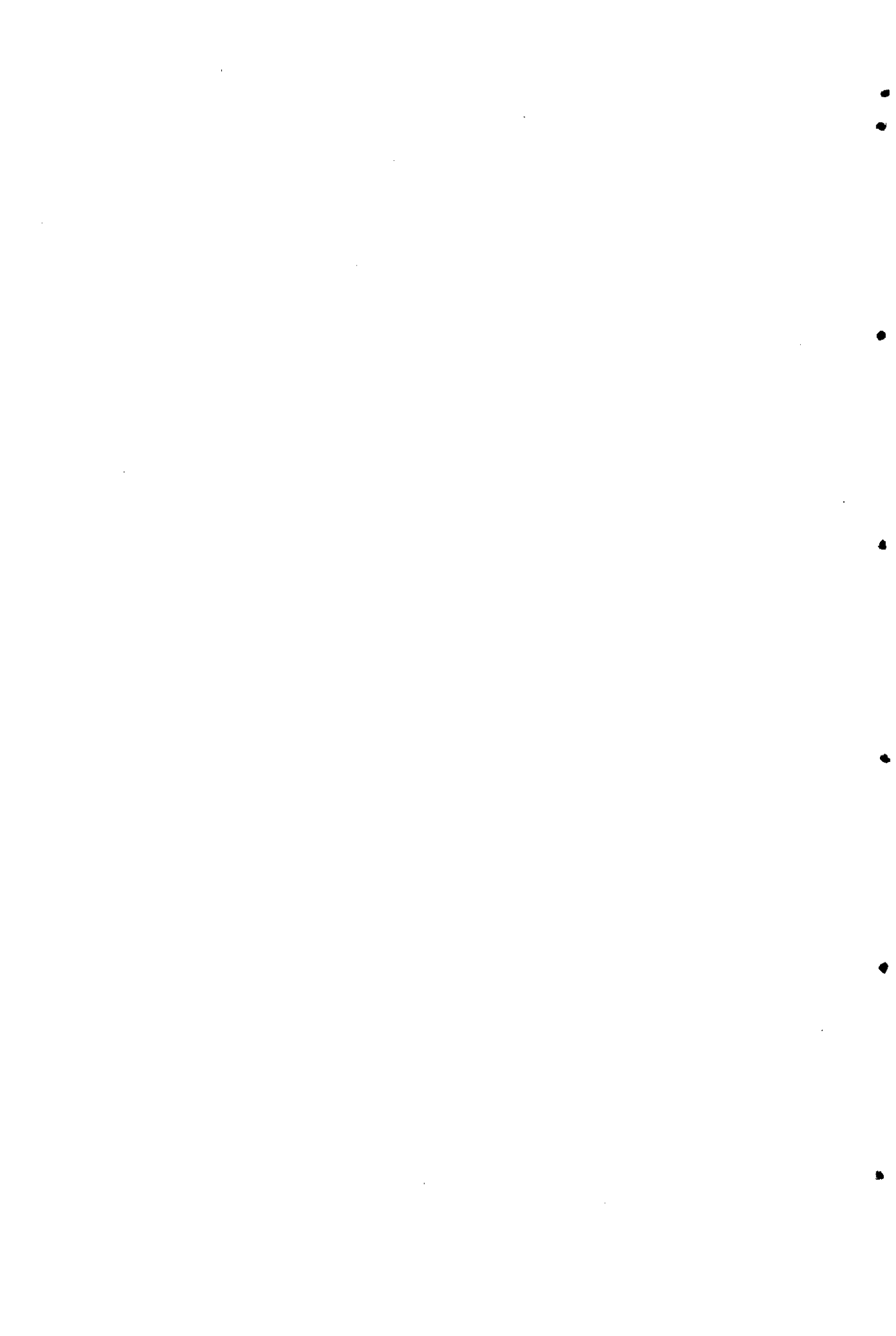
*N*-isopropil-*N'*-metil-6-(metilsulfanil)-  
1,3,5-triazina-2,4-diamina

desmetryn



***MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FOTOOXIDACIÓN DE  
COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOQUÍMICA Y  
MEDIOAMBIENTAL:***

***1. HALOGENACIÓN DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS.***





## Índice

1. Introducción.....	1
2. Reacciones de halogenación: antecedentes.....	7
2.1. Agentes halogenantes.....	9
2.1.1. Halógenos, ácidos hipohalogenosos e hipohalogenitos.....	9
2.1.2. N-halo-derivados.....	12
2.1.2.1. Monohaloaminas.....	12
2.1.2.2. (N-Cl)-Taurina.....	14
2.1.2.3. Dihaloaminas.....	16
2.2. Formación de N-haloderivados.....	16
2.2.1. Reacción con halógenos.....	16
2.2.2. Halogenación enzimática.....	18
2.3. Descomposición de N-halo-compuestos.....	20
2.3.1. Desproporción.....	20
2.3.2. Fragmentación.....	21
2.3.3. Reacciones de eliminación en $\beta$ .....	25
2.4. Eliminación en $\beta$ en N-halo-compuestos.....	33
2.5. Cloración de S-compuestos.....	36
2.6. Bibliografía.....	43
3. Experimental.....	51
3.1. Reactivos.....	53
3.2. Equipos.....	55
3.3. Preparación de las mezclas de reacción.....	58
3.3.1. Reacción de descomposición de (N-Cl)-compuestos.....	58
3.3.2. Reacción de formación de S-Cl-compuestos.....	58
3.4. Bibliografía.....	60
4. Métodos cinéticos.....	61
4.1. Reacciones de orden uno: descomposición de N-Cl-compuestos.....	63
4.2. Cloración de S-compuestos. Reacciones de orden dos.....	66
4.3. Bibliografía.....	69

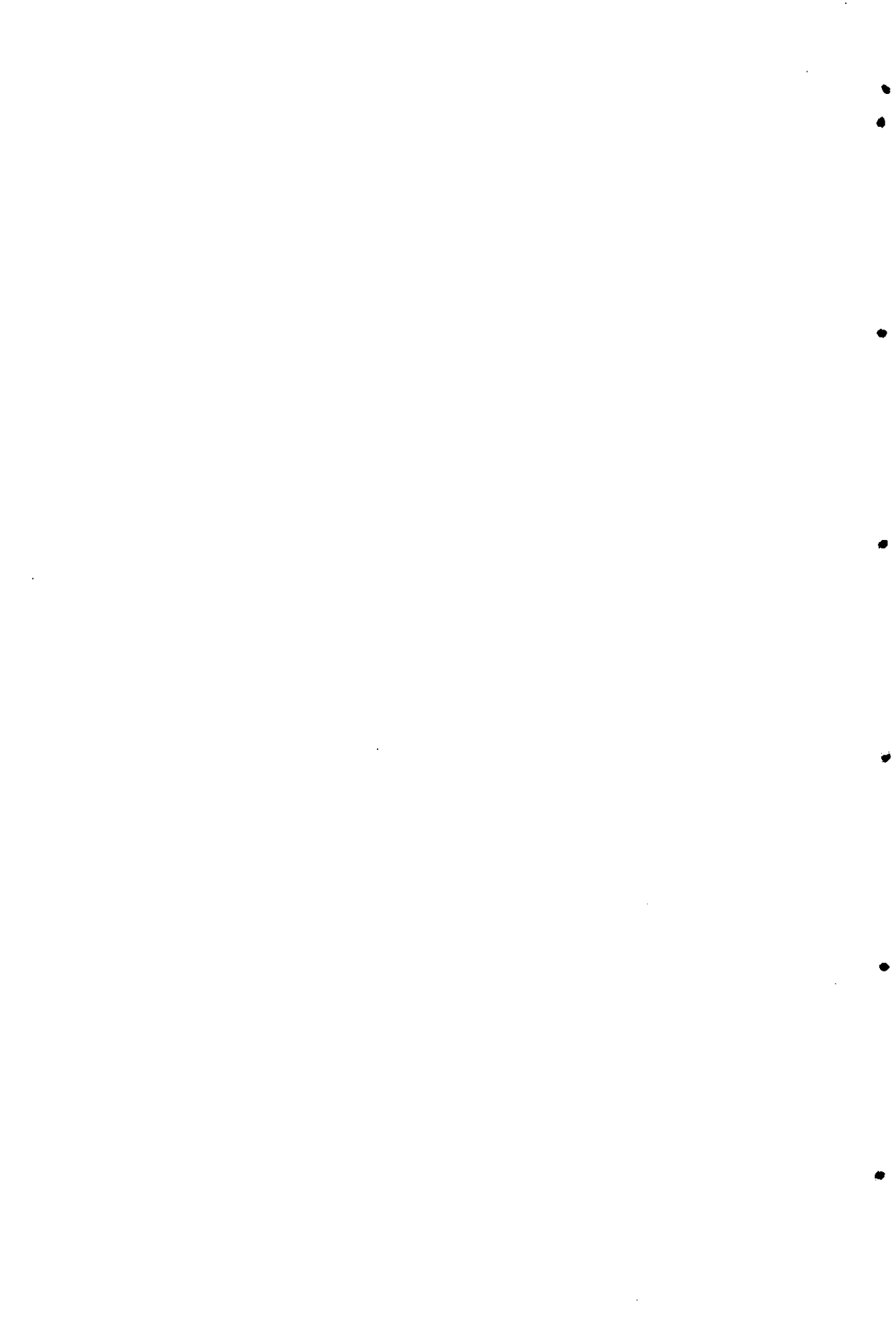
<b>5. Estudio espectrofotométrico.....</b>	<b>71</b>
<b>6. Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: resultados.....</b>	<b>85</b>
6.1. Descomposición de sulfóxido de la (N-Cl)-metionina.....	88
6.1.1. Catálisis por iones hidróxido.....	89
6.1.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.....	90
6.1.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	92
6.1.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	93
6.2. Descomposición de la sulfona de (N-Cl)-metionina.....	95
6.2.1. Catálisis por iones hidróxido.....	95
6.2.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.....	97
6.2.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	98
6.2.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	100
6.3. Descomposición de ácido (N-Cl)-cisteico.....	101
6.3.1. Catálisis por iones carbonato e hidrógeno carbonato.....	101
6.3.2. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	103
6.3.3. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	105
6.4. Bibliografía.....	107
<b>7. Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: discusión.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Cloración de aminoácidos que contienen azufre: resultados.....</b>	<b>129</b>
8.1. Cloración por HOCl.....	131
8.2. Transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina.....	136
8.3. Bibliografía.....	141
<b>9. Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión.....</b>	<b>143</b>
9.1. Cloración por HOCl.....	145
9.2. Transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina.....	167
9.3. Bibliografía.....	174
<b>10. Análisis de productos: Halogenación.....</b>	<b>179</b>
10.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	181
10.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) .....	181
10.3. Medida de fluorescencia de derivados de monobromobimano.....	189

Parte I - Halogenación

10.4. Bibliografía.....	191
<b>11. Anexos halogenación.....</b>	<b>193</b>



## 1. Introducción



## I. Introducción general





La presente memoria de Tesis Doctoral resume el trabajo realizado en dos direcciones de investigación que, aunque aparentemente independientes, presentan una clara ligazón.

Por un lado, se ha pretende mimetizar *in vitro* la oxidación intracelular de aminoácidos y péptidos conteniendo azufre. Dicha oxidación tiene lugar, fundamentalmente, a través del sistema enzimático mieloperoxidasa / peróxido de hidrógeno / cloruro. Las reacciones implicadas han sido ampliamente discutidas, pero su mecanismo detallado escasamente analizado.

Las sustancias con las que se ha trabajado fueron seleccionadas en función de su relevancia bioquímica. Así, por ejemplo, el grupo tiol de la cisteína (Cys) interviene en un elevado número de procesos enzimáticos. También forma parte de centros Fe-S en proteínas que intervienen en los procesos de transferencia electrónica como pueden ser la respiración y la fotosíntesis. Otro tiol de interés biológico es el tripéptido glutatión (GSH), presente en elevadas concentraciones en los fluidos intracelulares. El GSH tiene propiedades detoxificantes y citoprotectoras, pudiendo resaltarse:

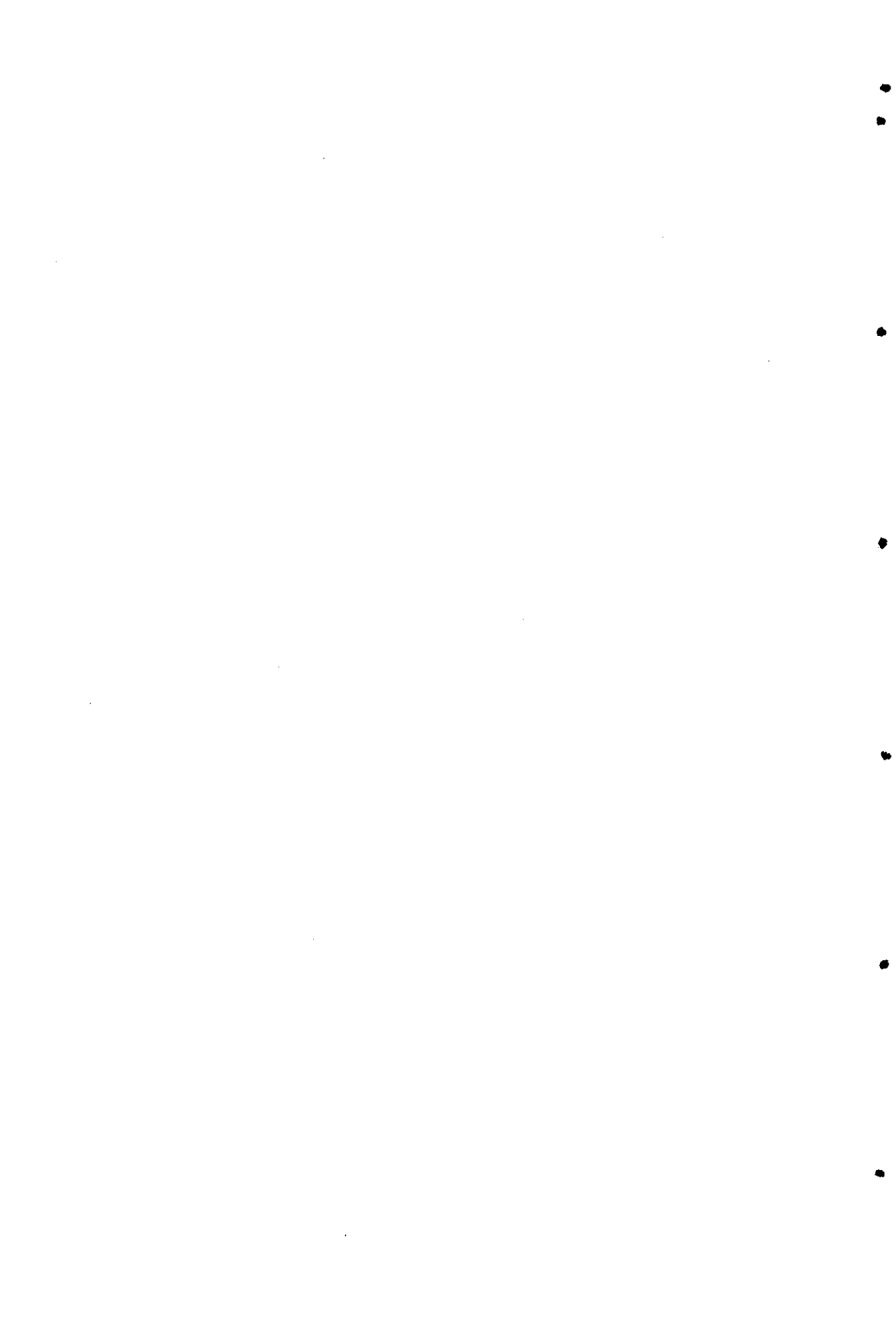
- eliminación del  $H_2O_2$
- reacciones de conjugación, principalmente neutralizando compuestos tóxicos (xenobióticos) como son los biocidas.

Un ejemplo de reacción de conjugación con GSH son los mecanismos que las plantas utilizan para metabolizar los herbicidas tipo s-triazina. Este punto conecta con la otra dirección de investigación que se ha seguido: el estudio de los mecanismos de fotooxidación de herbicidas basados en la estructura de la s-triazina. Dado que se ha propuesto que dicha reacción podría ocurrir vía radicales, se ha considerado relevante caracterizar espectroscópica y termodinámicamente los mismos, así como estudiar su reactividad.

Por otro lado debido al uso masivo de pesticidas en nuestros días, se ha considerado de interés el análisis de la fotodegradación de dichos herbicidas ya que, a pesar de que existen numerosos estudios acerca de los productos resultantes de su degradación, son muy escasos los que analizan en detalle los procesos a través de los que transcurre. Así, se ha realizado un estudio cinético sistemático de la fotodegradación de biocidas basados en la estructura de la s-triazina.



## II. Principales aportaciones de esta tesis



## Parte I

1. La reacción entre aminoácidos que contienen azufre y cloro acuoso en disolución neutra y básica tiene lugar por transferencia de cloro, mediante un proceso de orden dos, desde el átomo de oxígeno del HOCl al átomo de azufre. La reacción es mucho más rápida que la homóloga para la oxidación de aminoácidos que no contienen azufre.

2. Como consecuencia de la reacción de HOCl con tioles se genera el correspondiente cloruro de sulfenilo. En el caso de los sulfuros la reacción da lugar a la formación de cationes clorosulfonio. En este trabajo se presentan las primeras determinaciones cinéticas de la velocidad de las etapas elementales que conducen a la formación de ambos tipos de compuestos.

3. El cloruro de sulfenilo y el catión clorosulfonio son intermedios que, en medio alcalino, reaccionan rápidamente para producir el disulfuro y el sulfóxido respectivamente. Estos difieren de los productos de oxidación de aminoácidos que no contienen azufre, aldehídos, cetonas, cetoácidos, nitrilos, etc., y puede ser relacionado con los efectos antimutagénicos de los aminoácidos que contienen azufre.

4. Se ha comprobado que cuando se utiliza (*N*-Cl)-taurina como agente halogenante, la cloración desde el átomo de *N* hasta el *S* está asistida por dadores de protones. En el caso de la cloración de Cys y GSH, la cloración tiene además lugar por transferencia de *Cl* desde el HOCl que se genera a partir de la hidrólisis de (*N*-Cl)-taurina. Si bien la constante de hidrólisis es extremadamente pequeña, la elevada nucleofilia de los tiolatos es la causa de que esta vía se ponga de manifiesto. Este es el primer trabajo en donde se detalla el mecanismo de acción de (*N*-Cl)-taurina, un importante oxidante celular.

5. En medio básico y neutro, la cloración del sulfóxido de la metionina, de la sulfona de la metionina y del ácido cistéico tiene lugar sobre el átomo de nitrógeno, dando lugar al (*N*-Cl)-compuesto correspondiente.

## Parte II

6. Se ha acotado el valor del potencial de oxidación monoeléctrico de las s-triazinas ( $2,3 < E^0 < 2,6$  V vs. NHE) mediante estudio de su reactividad frente a diversos oxidantes monoeléctricos, tales como:  $SO_4^{\bullet-}$ ,  $UO_2^{2+}$ .

7. El radical  $HO^{\bullet}$  reacciona con las s-triazinas generando principalmente el aducto de OH. Se ha caracterizado espectroscópicamente el radical (s-triazina-OH) $^{\bullet}$  y se ha estimado el valor de su  $pK_a$ .

8. Se ha caracterizado espectroscópicamente el radical (s-triazina) $^{\bullet-}$ . La especie protonada de la s-triazina también se reduce, y lo hace más fácilmente que la correspondiente s-triazina neutra.

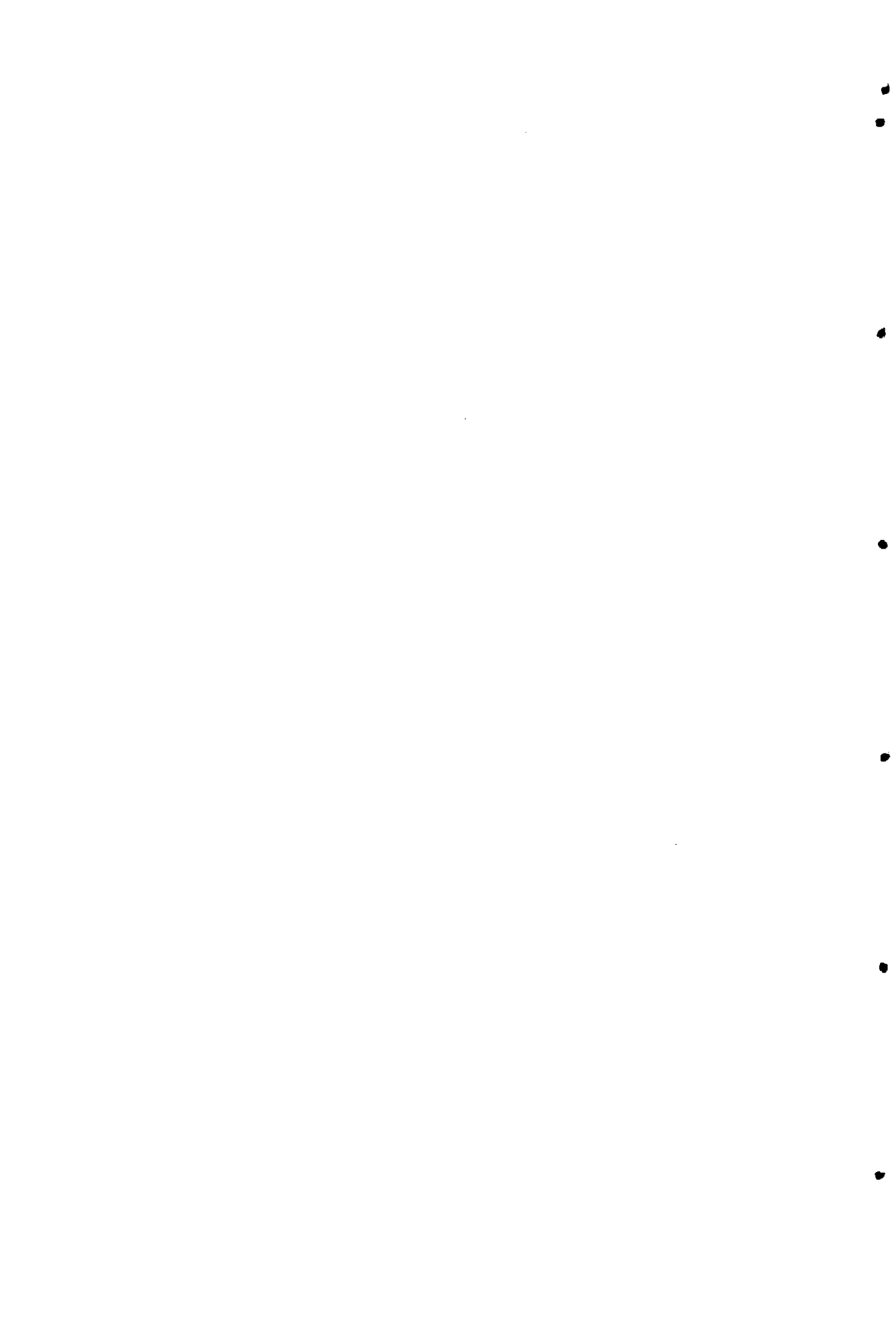
9. Se ha puesto de manifiesto que el proceso de fotodegradación de las s-triazinas es monofotónico cuando se emplea luz de 193 nm como radiación excitatriz, con un rendimiento cuántico de fotoionización inferior al 10%. Por el contrario, el proceso de fotodegradación es bifotónico cuando se emplean longitudes de onda menos energéticas.

10. Debido a que ninguno de estos compuestos puede ser degradado por acción de la luz solar, se han estudiado las características cinéticas de posibles métodos alternativos de fotodegradación, como pueden ser la reacción con  $HO^{\bullet}$  y la reducción monoeléctrica por reacción con electrón solvatado.

11. El proceso de fotodegradación de las s-triazinas genera radicales catiónicos que posteriormente sufren diferentes procesos, dando lugar a un amplio abanico de productos de reacción. Se ha establecido que el radical catiónico tiene un tiempo de vida sumamente breve, inferior a las posibilidades de detección de las técnicas empleadas en este estudio.

12. El análisis de los productos resultantes de la fotodegradación de s-triazinas, concuerda con los resultados previos disponibles en la bibliografía en forma de estudios analíticos, habiéndose verificado que los 2-OH y los desalquil derivados son los principales productos finales.

### III. Main findings of this thesis





## Part I

1. Sulfur-containing amino acids react with neutral and basic solutions of aqueous chlorine *via* a second order process, with chlorine transfer from the oxygen of HOCl to the sulfur of the amino acid. The reaction is considerably faster than the homologous oxidation of non-sulfur containing amino acids by aqueous chlorine.

2. The corresponding sulfenyl chlorides are generated upon reaction of HOCl with thiols. The reaction with sulfides leads to the formation of chlorosulfonium cations. This work reports the first kinetic determinations of the rate of the elementary steps leading to the formation of both compounds.

3. Sulfenyl chlorides and chlorosulfonium cations are intermediates that react readily in alkaline medium, yielding disulfides and sulfoxides, respectively. This is in contrast with the products derived from the oxidation of non-sulfur containing amino acids, *i.e.*: aldehydes, ketones, keto acids, nitriles, etc., and may be related to reported effects of reduction of mutagenicity by sulfur-containing amino acids.

4. When (*N*-Cl)-taurine is used as halogenating agent, the reaction takes place *via* proton-assisted chlorine transfer from *N* to *S*. The chlorination of Cys and GSH takes place also through hydrolysis of (*N*-Cl)-taurine followed by transfer of chlorine from the so-formed HOCl. Although the hydrolysis constant is very small, the presence of strong enough nucleophiles, such as the thiolates is the reason for this process to be observed. This is the first detailed report of the mechanism of action of (*N*-Cl)-taurine, a very important intracellular oxidant.

5. The chlorination of already oxidized sulfur-containing amino acids, such as methionine sulfoxide, methionine sulfone and cysteic acid, takes place on the nitrogen atom in basic and neutral medium, yielding the corresponding (*N*-Cl)-derivative.

## **Part II**

6. The one-electron oxidation for *s*-triazines has been limited to the interval ( $2,3 < E^0 < 2,6$  V vs. NHE) by studying their reactivity toward various one-electron oxidants, such as  $SO_4^{\cdot-}$  and  $UO_2^{2+}$ .

7. The hydroxyl,  $HO^{\cdot}$ , radical reacts with *s*-triazines, yielding mainly the corresponding OH adduct, (*s*-triazine-OH) $^{\cdot}$ , that has been spectrophotometrically characterized, and its  $pK_a$  obtained.

8. The one-electron reduction of *s*-triazines has been studied, and the corresponding radical anion, (*s*-triazine) $^{\cdot-}$ , spectrophotometrically characterized. Protonated *s*-triazines are also one-electron reduced, more readily than neutral *s*-triazines do.

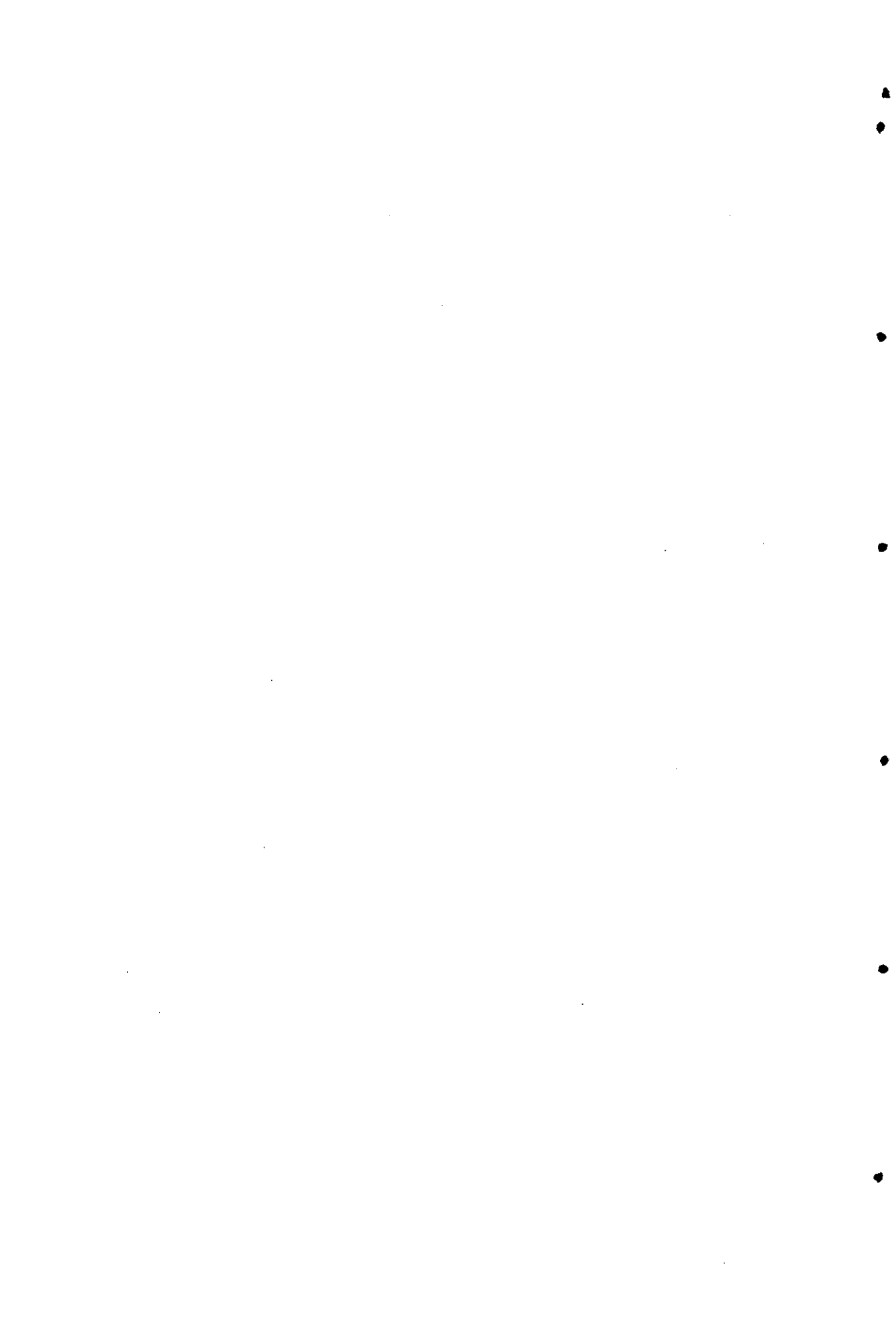
9. It has been found that the photoionization of *s*-triazines is a monophotonic process when 193 nm light is used as excitation source, with a corresponding photoionization quantum yield lower than 10 %. On the contrary, the photoionization process is biphotonic when longer, less energetic wavelengths are used for excitation.

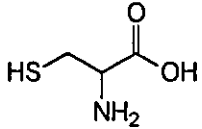
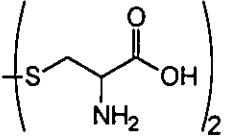
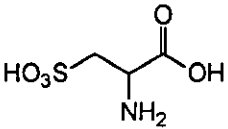
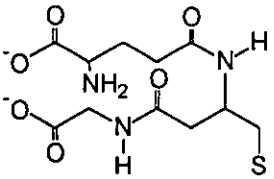
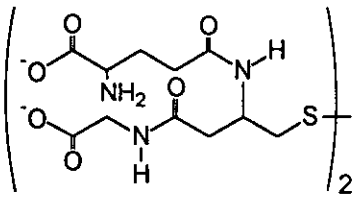
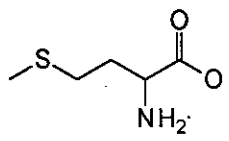
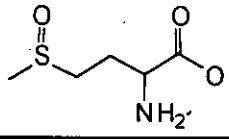
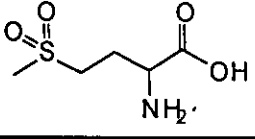
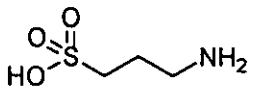
10. Since none of the studied triazine-based biocides can be photoionized by sunlight, the kinetic peculiarities of alternative photodegradation methods, such as the reaction with the hydroxyl radical,  $HO^{\cdot}$ , the one-electron oxidation by strong oxidants and the one-electron reduction by solvated electrons have also been studied.

11. The photoionization process leads to radical cations, that then undergo different processes, leading to a wide range of products. It has been found that the radical cation has a very short lifetime, that has been limited to 2 ns, below the technical detection possibilities of the techniques used.

12. The product analysis of the different solutions of *s*-triazines after photolysis is in agreement with previous results from analytical studies, available in the literature. The main products of photolysis found have been the corresponding 2-OH and desalkyl derivatives.

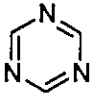
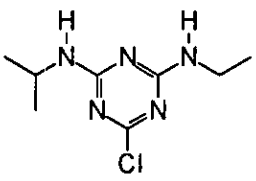
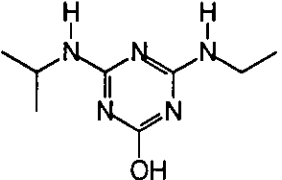
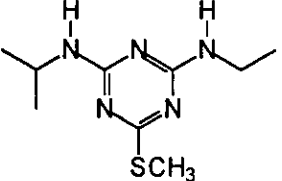
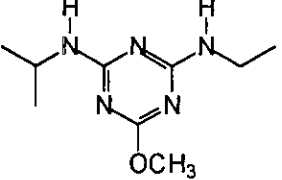
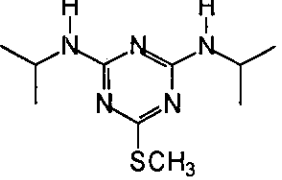
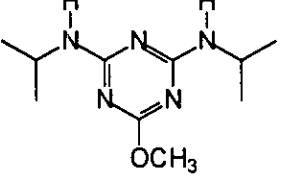
#### IV. Abreviaturas

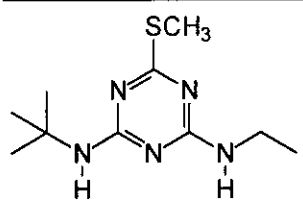
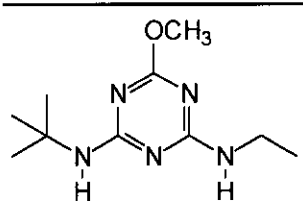
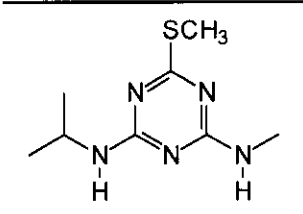


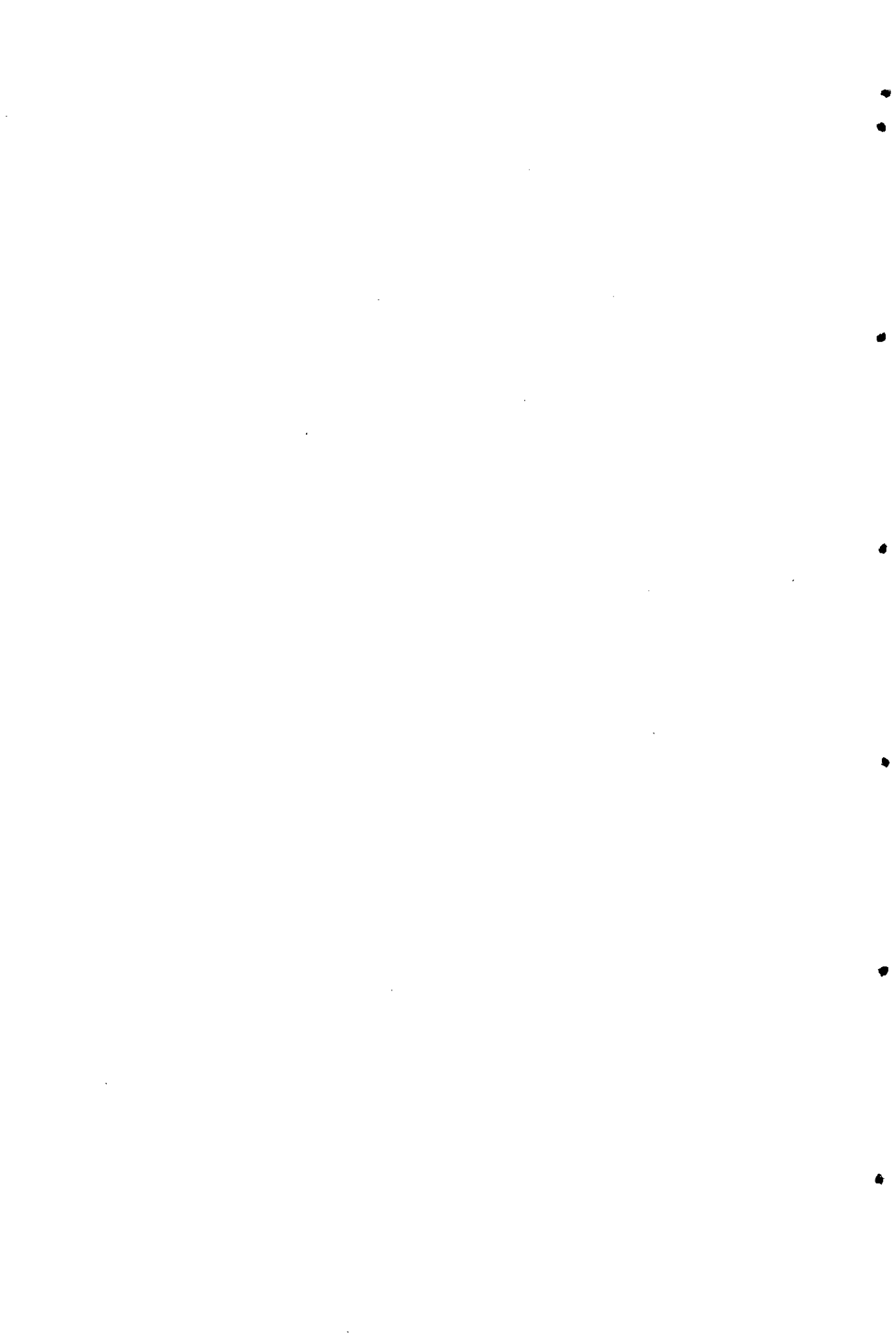
	Cisteína	Cys <sup>1</sup>
	Cistina	Cys <sup>1</sup> Cys   Cys <sup>2</sup> Cys <sup>2</sup>
	ácido cisteico	Cya <sup>1</sup>
	Glutation	GSH <sup>1</sup>
	Glutation disulfuro	GSSG <sup>1</sup>
	Metionina	Met <sup>1</sup>
	Metionina sulfóxido	MetSO <sup>1</sup>
	Metionina sulfona	MetSO <sub>2</sub> <sup>1</sup>
	Taurina	Tau

- (1) IUPAC *Pure & Appl. Chem.* 1984, 56, 595-624.  
(2) Para la cistina ésta ha sido la abreviatura utilizada.

Abreviaturas

	1,3,5-triazina	s-triazina
	6-cloro- <i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	atrazina
	4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina-2-ol	atrazina-2-OH
	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina	ametryn
	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -isopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina	atraton
	<i>N,N'</i> -diisopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina	prometryn
	<i>N,N'</i> -diisopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina	prometon

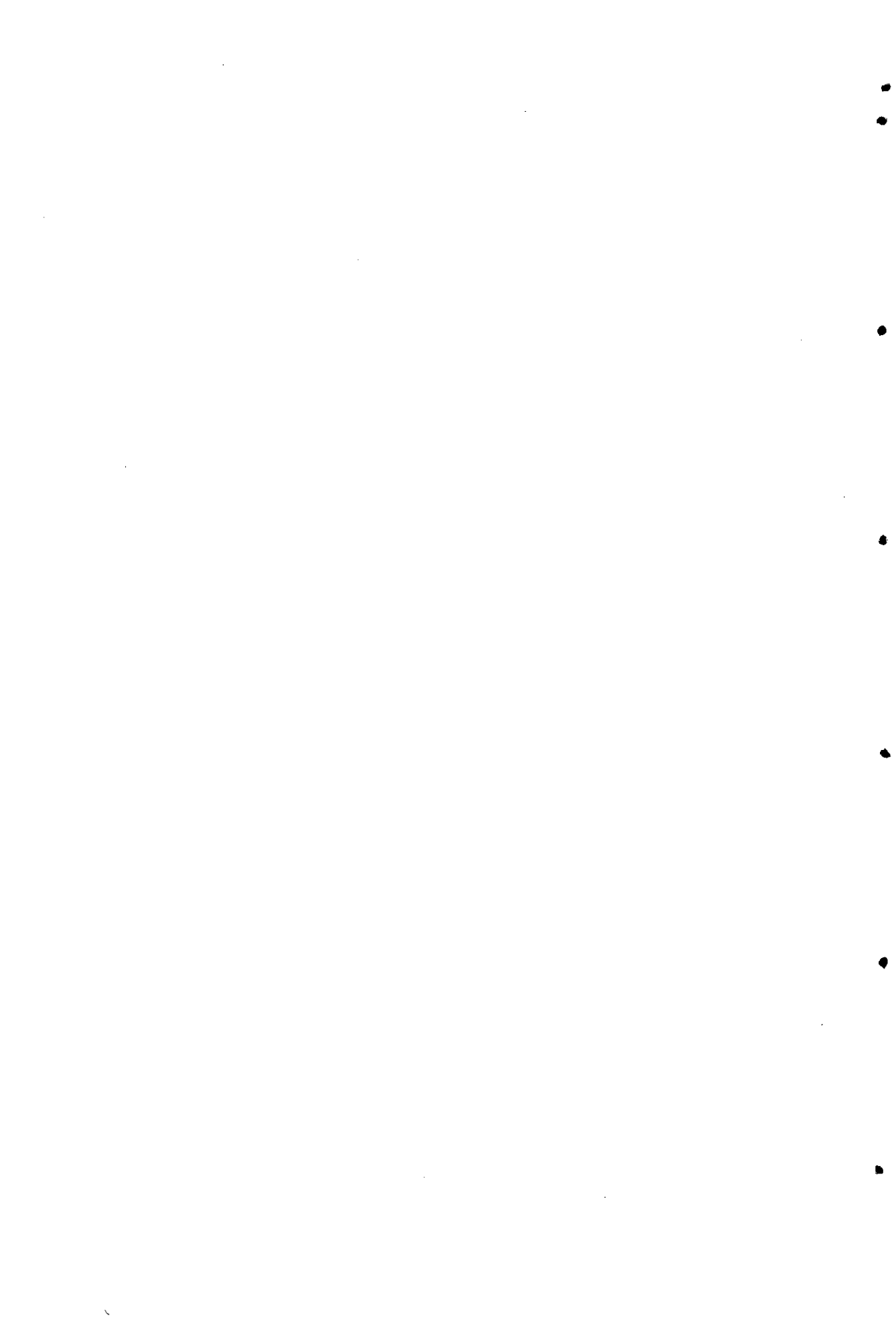
	<p><i>N</i>-(<i>tert</i>-butyl)-<i>N</i>'-etil-6-(metilsulfanil)- 1,3,5-triazina-2,4-diamina</p>	<p>terbutryn</p>
	<p><i>N</i>-(<i>tert</i>-butyl)-<i>N</i>'-etil-6-metoksi-1,3,5- triazina-2,4-diamina</p>	<p>terbumeton</p>
	<p><i>N</i>-isopropil-<i>N</i>'-metil-6-(metilsulfanil)- 1,3,5-triazina-2,4-diamina</p>	<p>desmetryn</p>





***MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FOTOOXIDACIÓN DE  
COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOQUÍMICA Y  
MEDIOAMBIENTAL:***

***1. HALOGENACIÓN DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS.***



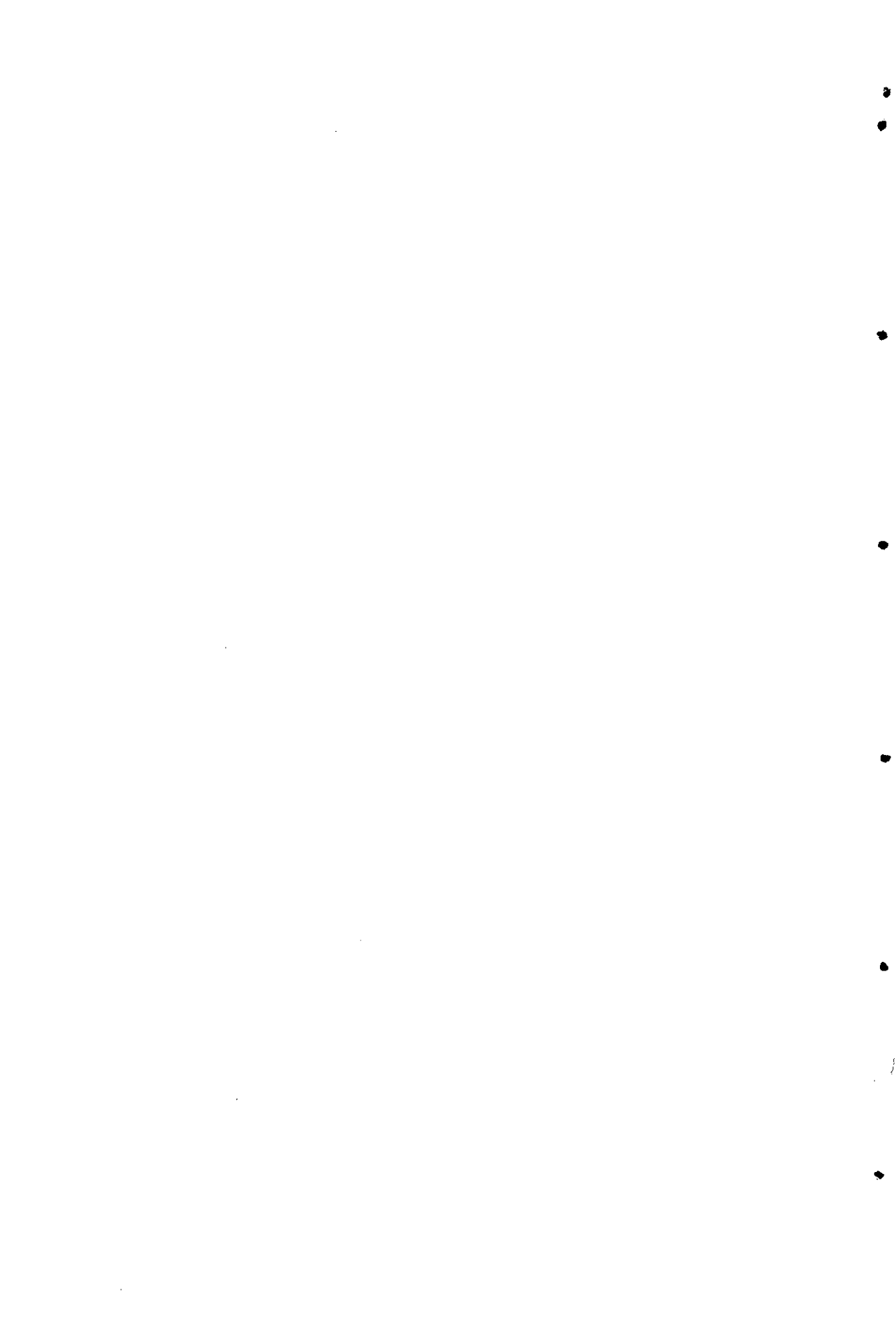
## Índice

1. Introducción.....	1
2. Reacciones de halogenación: antecedentes.....	7
2.1. Agentes halogenantes.....	9
2.1.1. Halógenos, ácidos hipohalogenosos e hipohalogenitos.....	9
2.1.2. N-halo-derivados.....	12
2.1.2.1. Monohaloaminas.....	12
2.1.2.2. (N-Cl)-Taurina.....	14
2.1.2.3. Dihaloaminas.....	16
2.2. Formación de N-haloderivados.....	16
2.2.1. Reacción con halógenos.....	16
2.2.2. Halogenación enzimática.....	18
2.3. Descomposición de N-halo-compuestos.....	20
2.3.1. Desproporción.....	20
2.3.2. Fragmentación.....	21
2.3.3. Reacciones de eliminación en $\beta$ .....	25
2.4. Eliminación en $\beta$ en N-halo-compuestos.....	33
2.5. Cloración de S-compuestos.....	36
2.6. Bibliografía.....	43
3. Experimental.....	51
3.1. Reactivos.....	53
3.2. Equipos.....	55
3.3. Preparación de las mezclas de reacción.....	58
3.3.1. Reacción de descomposición de (N-Cl)-compuestos.....	58
3.3.2. Reacción de formación de S-Cl-compuestos.....	58
3.4. Bibliografía.....	60
4. Métodos cinéticos.....	61
4.1. Reacciones de orden uno: descomposición de N-Cl-compuestos.....	63
4.2. Cloración de S-compuestos. Reacciones de orden dos.....	66
4.3. Bibliografía.....	69

<b>5. Estudio espectrofotométrico.....</b>	<b>71</b>
<b>6. Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: resultados.....</b>	<b>85</b>
6.1. Descomposición de sulfóxido de la (N-Cl)-metionina.....	88
6.1.1. Catálisis por iones hidróxido.....	89
6.1.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.....	90
6.1.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	92
6.1.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	93
6.2. Descomposición de la sulfona de (N-Cl)-metionina.....	95
6.2.1. Catálisis por iones hidróxido.....	95
6.2.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.....	97
6.2.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	98
6.2.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	100
6.3. Descomposición de ácido (N-Cl)-cisteico.....	101
6.3.1. Catálisis por iones carbonato e hidrógeno carbonato.....	101
6.3.2. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.....	103
6.3.3. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.....	105
6.4. Bibliografía.....	107
<b>7. Descomposición de N-halo-derivados de aminoácidos azufrados: discusión.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Cloración de aminoácidos que contienen azufre: resultados.....</b>	<b>129</b>
8.1. Cloración por HOCl.....	131
8.2. Transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina.....	136
8.3. Bibliografía.....	141
<b>9. Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión.....</b>	<b>143</b>
9.1. Cloración por HOCl.....	145
9.2. Transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina.....	167
9.3. Bibliografía.....	174
<b>10. Análisis de productos: Halogenación.....</b>	<b>179</b>
10.1. Cromatografía en capa fina (TLC).....	181
10.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	181
10.3. Medida de fluorescencia de derivados de monobromobimano.....	189

Parte I - Halogenación

10.4. Bibliografía.....	191
<b>11. Anexos halogenación.....</b>	<b>193</b>



## 1. Introducción





El azufre es un elemento esencial para la vida y crecimiento de todos los organismos, desde los microscópicos hasta el hombre.

Los aminoácidos que contienen azufre, son empleados por los organismos vivos como fuente de una enorme cantidad de compuestos organosulfurados de vital importancia bioquímica, tales como proteínas, glutatión, coenzima A, vitaminas como biotina y tiamina (parte del complejo vitamina B), ácido lipóico, y metabolitos de plantas y hongos, como la penicilina.

La química del azufre permite que estas transformaciones oxidación-reducción ocurran con relativa facilidad. La formación reversible de disulfuros a partir de tioles es un importante proceso bioquímico. Así, muchas proteínas y péptidos poseen grupos tiol (RSH) libres que les posibilitan para la formación de puentes disulfuro.

Dichos puentes juegan un papel determinante en el mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas, en las cuales las cadenas polipeptídicas se mantienen unidas mediante los citados puentes disulfuro entre cada dos unidades de Cys. Dos ejemplos importantes de proteínas que contienen puentes disulfuro son las hormonas insulina y vasopresina.

Teniendo en cuenta lo expuesto se ha considerado relevante el estudio del mecanismo de oxidación de diversos aminoácidos azufrados: Cys, Cys<sup>2</sup>Cys, Met, GSH y GSSG.

Como consecuencia del desarrollo industrial y del crecimiento de la población, se ha producido un importante deterioro en la calidad de las aguas, por la presencia de contaminantes orgánicos e inorgánicos, así como de microorganismos. Por ello ha sido necesario el desarrollo de técnicas que permitan mejorar la calidad de las aguas, tanto para el consumo humano como para su aplicación en la industria. De todas ellas la potabilización de las aguas por cloro acuoso es uno de los procesos más extendidos, ya que a pesar de sus riesgos, es un proceso simple y económico.<sup>1</sup> Teniendo en cuenta la cantidad y diversidad de compuestos orgánicos presentes en las aguas a tratar, el uso de este tratamiento puede conducir a una gran variedad de productos. constituidos principalmente por derivados clorados, compuestos cuya posible carcinogénesis y/o mutagénesis no ha sido suficientemente estudiada.<sup>2,3</sup> Conviene mencionar aquí el efecto antimutagénico que se ha atribuido a los aminoácidos azufrados.<sup>4,5</sup>

## Introducción

En conexión con lo anterior, durante los últimos años han aparecido numerosas publicaciones relacionadas con la halogenación *in vivo* con la intervención del sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, el cual genera HOCl<sup>6,7</sup>, dando lugar a procesos y productos similares a aquellos que se producen durante el tratamiento de agua.

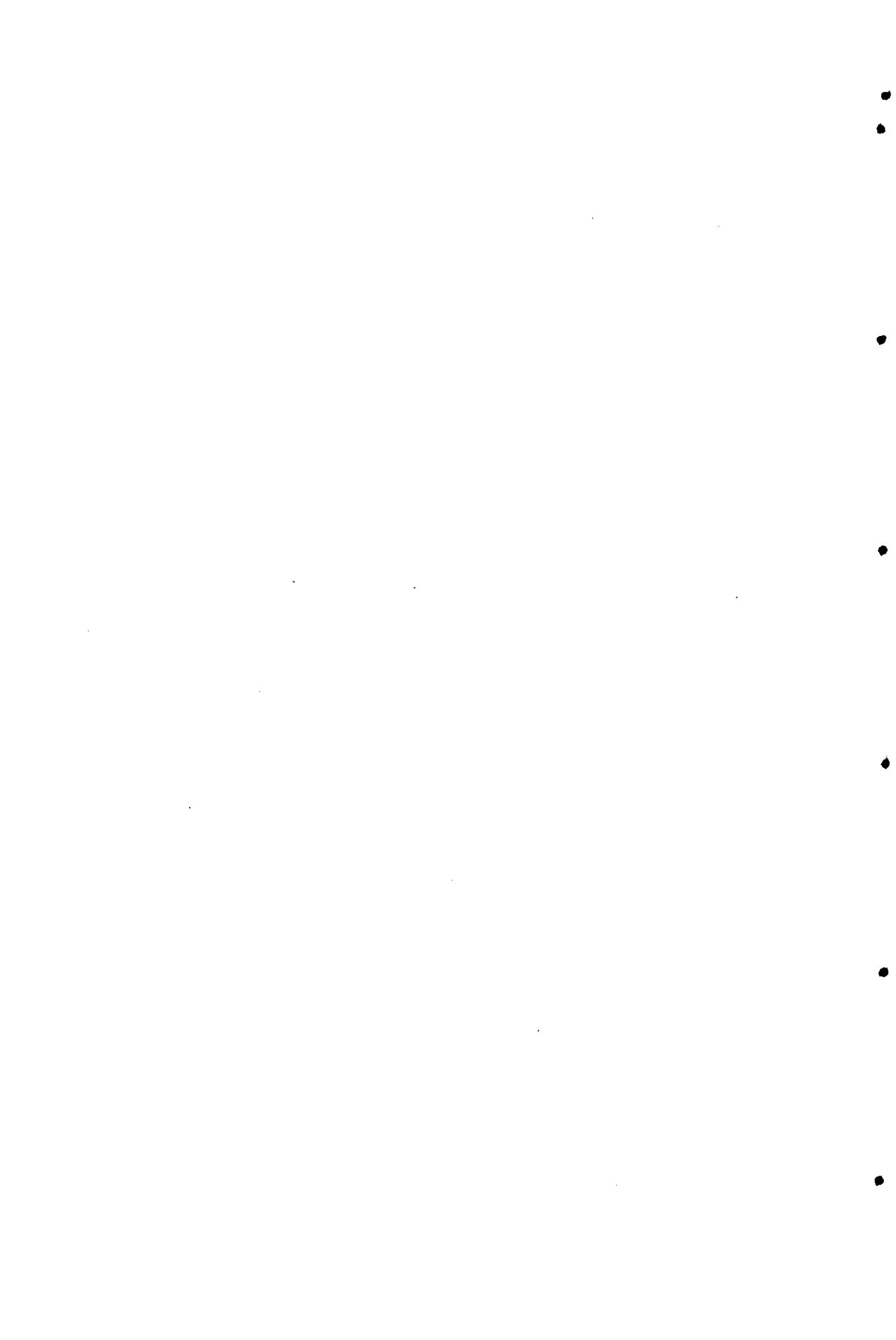
El HOCl reacciona rápidamente con un amplio número de moléculas biológicas, tales como tioles, tioéteres, grupos amino, etc. La reacción con el grupo amino induce la formación de cloraminas, quienes actúan extendiendo la toxicidad del HOCl. La taurina es un aminoácido que se encuentra en elevada concentración en las células, actuando como trampa del HOCl generado por el sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> formando N-Cl-taurina, que puede seguir actuando como oxidante pero con mucha menor reactividad que el HOCl.

Existen diversos estudios acerca del uso de electrófilos, halógenos, para la oxidación de compuestos de azufre, tales como: aminoácidos que contienen azufre, péptidos,<sup>8-11</sup> tioles,<sup>12</sup> sulfuros,<sup>9,13,14</sup> sulfóxidos,<sup>15</sup> sulfona,<sup>9</sup> etc. En la mayoría de estos trabajos no se detallan estudios mecanicistas de estos procesos; es particularmente llamativa la falta de evidencias cinéticas, para mecanismos que suponen como intermedios de estos proceso haluros de sulfenilo y cationes halosulfonio.<sup>16-18</sup> Esto es debido, al menos es parte, a la conocida inestabilidad de estos compuestos en disolución.<sup>16</sup> Los haluros de sulfenilo son muy propensos al ataque por nucleófilos, y en presencia de mercaptanos pueden generar el correspondiente disulfuro.<sup>19</sup>

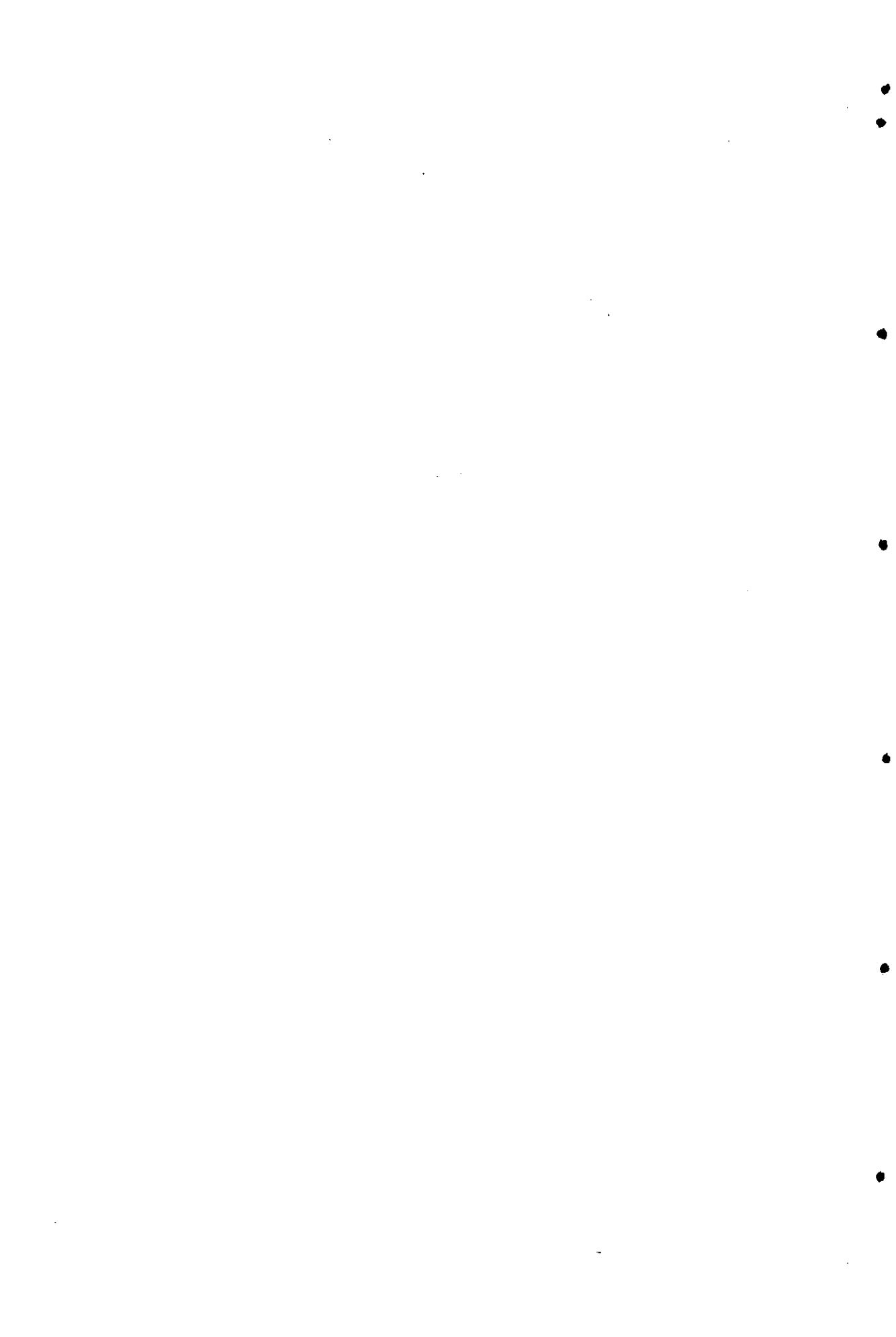
Considerando la relevancia bioquímica de estos procesos, se ha tratado de determinar los mecanismos de reacción de compuestos modelo que contienen azufre frente a halógenos, y las razones de su implicación como agentes reductores de los procesos mutagénicos. Para ello se ha estudiado el mecanismo de oxidación de Cys, Met, Cys<sup>^</sup>Cys, GSH, GSSG, por derivados halogenados, así como las reacciones de descomposición de los (N-Cl)-derivados de algunos de los productos resultantes de la halogenación de los compuestos anteriores. Como agentes halogenantes se utilizaron HOCl y (N-Cl)-taurina, ya que son las especies que se encuentran en los medios celulares cuando como respuesta a agresiones externas se produce la activación del sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> presente en los neutrófilos de los mamíferos.

**Bibliografía.**

- (1) Miller, S. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, 27, 2292.
- (2) Cantor, K. P. *Cancer Causes Control* **1997**, 8, 292-308.
- (3) Vile, G. F.; Rothwell, L. A.; Kettle, A. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000**, 377, 122-128.
- (4) Mathy-Hartet, M.; Deby-Dupont, G.; Deby, C.; Jadoul, L.; Vandenberghe, A.; Larny, M. *Mediators of Inflammation* **1995**, 4, 437.
- (5) Lindvall, S.; Rydell, G. *Chemico-Biological Interactions* **1995**, 97, 53-62.
- (6) Carr, A. C.; van der Berg, J. M.; Winterbourn, C. C. *Archives of biochemistry and biophysics* **1996**, 332, 63-69.
- (7) Prütz, W. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **1996**, 332, 110-120.
- (8) Cuq, J. L.; Aymard, C.; Cheffel, C. *Food. Chem.* **1978**, 2, 309-314.
- (9) Young, P. R.; Till, M. J. *Org. Chem.* **1982**, 47, No. 8., 1416-1418.
- (10) Winterbourn, C. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 840, 204-210.
- (11) Dudina, Y. I.; Formazyuk, V. Y.; Sergiyenko, V. I.; Gorshkova, T. *N. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* **1995**, 31-33.
- (12) Field, L. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p chap. 7.
- (13) Schank, K. In *The syntheses of sulphones, sulphoxides and cyclic sulphides*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York (U.S.A.), 1994, p Chap. 1.
- (14) Weber, J. V.; Schneider, M.; Salami, B.; Paquer, D. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. **1986**, 105/3, 99-102.
- (15) Mahadevappa, D. S.; Ananda, S.; Murthy, A. S. A.; Rangappa, K. *S. Tetrahedron* **1984**, 40, 1673-1682.
- (16) Armesto, X. L.; Canle, M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **2000**, 1103-1109.
- (17) Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, 30, No.5.
- (18) Davies, M. J.; Hawkins, C. L. *Free Rad. Res.* **2000**, 33.
- (19) Capozzi, G.; Modena, G. In *The chemistry of the thiol group*; Patai, S., Ed.; John Wiley and Sons: London, 1974, p 785-840.



## 2. Reacciones de halogenación: antecedentes



Si bien los halógenos en disolución acuosa y sus derivados son todavía ampliamente utilizados en el mundo como desinfectantes, en los últimos años el tratamiento de aguas basado en el uso de halogenantes se ha hecho cada vez más impopular. La mayoría de los países desarrollados se han esforzado en desarrollar nuevas técnicas para la desinfección del agua que evitasen el uso de los mismos. Sin embargo la situación está todavía lejos de su fin y los procesos de tratamiento con agentes halogenantes continuarán siendo utilizados en el futuro.

Este hecho da una idea clara de la importancia que la química de los halógenos en medio acuoso presenta desde el punto de vista medioambiental.

Los procesos de halogenación pueden tener lugar tanto en los sistemas de tratamiento de aguas como en los sistemas biológicos.

Seguidamente se aborda una revisión de los aspectos relevantes en relación con el trabajo realizado. Por una parte se analiza, la química de los agentes halogenantes tanto empleados en el tratamiento de aguas como generados *in vivo*, dando luego paso a la descripción de los procesos de formación de N-halo y S-halo compuestos.

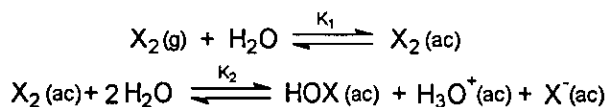
## 2.1. Agentes halogenantes.

### 2.1.1. Halógenos ( $X_2$ ), ácidos hipohalogenosos (HOX) y aniones hipohalogenitos ( $XO^-$ ).

La química de los halógenos en medio acuoso ha sido ampliamente estudiada y recogida por diferentes autores en libros de química ambiental de carácter general.<sup>2,3</sup> También existen diversas publicaciones que se refieren a los problemas ambientales y de salud debidos a este método de tratamiento de aguas.<sup>4</sup>

Los halógenos en medio acuoso presentan un elevado poder oxidante. Entre éstos los derivados clorados son los más empleados en los procesos de tratamiento de aguas. Igualmente son los derivados clorados los que participan en mayor medida en los sistemas biológicos ya que el anión  $Cl^-$  es el haluro más abundante en los medios celulares de los mamíferos superiores.<sup>5,6</sup>

La disolución de los halógenos en agua puede dar lugar halógenos solvatados, o bien puede conducir, por hidrólisis, a ácidos hipohalogenosos (HOX) de acuerdo a los siguientes equilibrios:

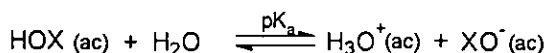


Las constantes para ambos equilibrios a 298 K se recogen en la siguiente tabla.<sup>4,7,8</sup>

**Tabla 2.1**

X <sub>2</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> / M <sup>-2</sup>
Cl <sub>2</sub>	0.062	4,2·10 <sup>-4</sup>
Br <sub>2</sub>	0.21	7,2·10 <sup>-9</sup>
I <sub>2</sub>	0.0013	2,0·10 <sup>-13</sup>

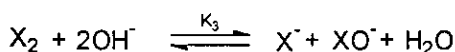
Los ácidos HOX son débiles e inestables, y se disocian según el equilibrio:



así, por ejemplo, el pK<sub>a</sub> de HOCl a 298 K y I=0.7 mol·dm<sup>-3</sup> es 7.26±0.04.<sup>9</sup>

La extensión en la que se producen estas reacciones depende en gran medida del pH. Si la disolución es fuertemente ácida, el halógeno se encuentra como especie solvatada, mientras que en disolución alcalina la especie mayoritaria es el anión hipohalito.

Los aniones hipohalito también se pueden generar disolviendo los halógenos en un medio básico de acuerdo con:



la reacción es muy rápida y las constantes de equilibrio muy favorables a la formación del hipohalito.<sup>8</sup>

**Tabla 2.2**

X <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>
Cl <sub>2</sub>	7.5·10 <sup>15</sup>
Br <sub>2</sub>	2.0·10 <sup>8</sup>
I <sub>2</sub>	30



La siguiente figura muestra la especiación de cloro en disolución acuosa a 15°C y una concentración analítica de cloro igual a  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

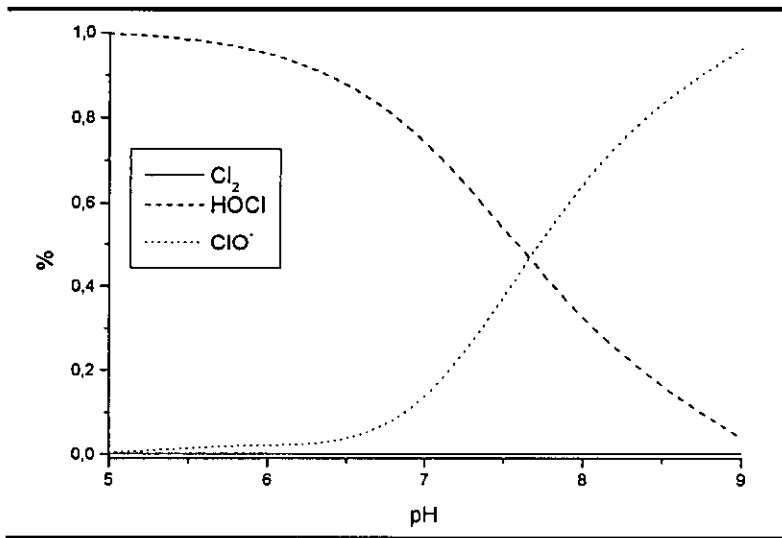


Figura 2.1

Esta figura muestra que a  $\text{pH} > 7$  la especie mayoritaria es el ión hipoclorito, llegando a ser aproximadamente el 50% a  $\text{pH}=7,5$ ; a  $5 < \text{pH} < 7$  la especie mayoritaria es el ácido hipocloroso. Como se observa a los pH típicos de las aguas naturales, el  $\text{Cl}_2(\text{aq})$  no debe existir en concentraciones significativas.

Se ha propuesto la existencia de otras especies derivadas del cloro en disolución acuosa, como el catión hipoclorosacido ( $\text{H}_2\text{OCl}^+$ ), el catión clorinio ( $\text{Cl}^+$ ), si bien aún en las condiciones adecuadas las concentraciones de estas especies son despreciables. También se ha propuesto la existencia del anión tricloruro ( $\text{Cl}_3^-$ ), para el que se consigue la mayor concentración a pH próximo a 2, condiciones en las que representa aproximadamente el 0,44% de la concentración de cloro total.

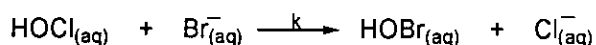
El HOCl interviene en la destrucción de las células de las bacterias.<sup>2,10,11</sup> Se cree que el mecanismo de acción es de tipo físico-químico, penetrando a través de las paredes celulares con una facilidad similar a la del agua debido principalmente a su bajo peso molecular y a su electroneutralidad.<sup>2</sup> Una vez dentro de la célula gracias a su fuerte poder oxidante puede reaccionar con gran número de moléculas biológicas como aminoácidos, grupos hemo, ácidos nucleicos, proteínas, GSH, etc. Estudios *in vitro* muestran que a bajas

concentraciones de HOCl, se produce rápidamente la oxidación de los grupos sulfhidrido de la membrana plasmática, alterando sus funciones y pudiendo llegar a producir la lisis celular.<sup>9</sup>

Los iones hipoclorito tienen un bajo poder desinfectante, atribuido principalmente a que la carga eléctrica negativa dificulta su transporte a través de la pared celular.<sup>2,12</sup>

También es relevante el estudio de los derivados del bromo debido a la relativa abundancia de ion bromuro en las aguas naturales, especialmente en el agua de mar; un buen ejemplo es la cloración que se hace del agua de mar que es usada en los sistemas de refrigeración de las estaciones generadoras de energía eléctrica con el fin de controlar el crecimiento de algas y otros organismos que interfieren en la transferencia de calor en los intercambiadores.<sup>2</sup>

En presencia de ión bromuro, puede tener lugar el siguiente proceso:



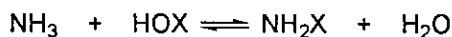
donde  $k = 2.95 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  ( $T=298 \text{ K}$ ;  $\text{pH}=8.3$ )<sup>2</sup>

Las reacciones de los ácidos hipohalosos están vinculadas a su fuerte carácter oxidante, teniendo, por ejemplo, el ácido hipocloroso mayor poder oxidante que el  $\text{ClO}^{-}$ .<sup>13,14</sup> Respecto a la oxidación de especies inorgánicas presentes en las aguas naturales, el cloro es capaz de oxidar  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$  y  $\text{Mn}^{4+}$ , nitritos a nitratos y sulfuros y sulfitos a sulfatos.<sup>15</sup> Reacciona también con compuestos orgánicos mediante oxidación, adición y sustitución electrófila con formación de enlaces N-Cl y R-Cl. También son interesantes por su impacto ambiental las reacciones en las que se forman derivados halogenados, como haloaminas, cloruros de sulfenilo, etc.

## 2.1.2. N-Halo-derivados.

### 2.1.2.1. Monohaloaminas.

Las monohaloaminas se forman rápidamente por reacción entre el correspondiente ácido hipohalogenoso y amoníaco de acuerdo con la reacción

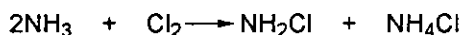


Por lo general la monocloramina se forma cuando  $\text{pH}>8$  y cuando la relación  $[\text{HOCl}]/[\text{NH}_3] \leq 1$ . La reacción es de orden dos global, uno respecto al ácido

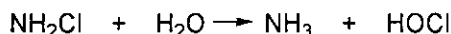
hipohalogenoso y al amoníaco. Weil y Morris proponen un mecanismo concertado con un estado de transición eléctricamente neutro.<sup>16</sup>

Isaac y Morris<sup>17</sup> estimaron una constante de velocidad promedio para la reacción anterior de  $k \sim 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

La monocloramina se puede generar también por reacción con  $\text{NaClO}_{(\text{aq})}$  y  $\text{Cl}_{2(\text{g})}$ .

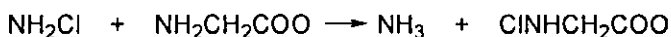


En medio acuoso la monocloramina se hidroliza lentamente



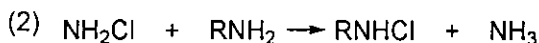
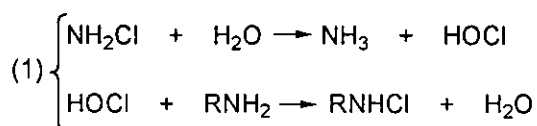
el valor de la constante de velocidad fue estimado en  $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .<sup>18</sup>

La monocloroamina actúa como agente halogenante de compuestos de nitrógeno en disolución acuosa; Margerum y col. estudiaron la transferencia de cloro desde la monocloroamina hasta el nitrógeno de la glicina.<sup>18</sup>



obteniendo un valor de  $1.5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  para la constante de velocidad entre pH 4 y 9 a 298 K.

Yoon y col. han estudiado la transferencia de cloro entre cloraminas y compuestos nitrogenados, proponiendo que la reacción tiene lugar mediante la hidrólisis previa de la monocloramina(1) o por transferencia directa desde la monocloramina(2).<sup>19</sup>



Snyder y Margerum concluyen que la transferencia de cloro desde la cloroamina a aminoácidos y péptidos tiene lugar de modo directo en el intervalo  $2 < \text{pH} < 10$ .<sup>20</sup>

Los procesos de transferencia son muy importantes en el campo de tratamiento de aguas, ya que pueden implicar una pérdida de capacidad desinfectante de los agentes halogenantes, las cloraminas son muy abundantes en las aguas naturales debido a la presencia en éstas compuestos

nitrogenados. Este proceso de transferencia es también importante en los sistemas celulares biológicos; como veremos, la formación de una monohaloamina, la (N-Cl)-taurina, está involucrada en los procesos de defensa contra microorganismos por el sistema inmune de los mamíferos.<sup>21</sup>

#### 2.1.2.2. (N-Cl)-taurina.

La taurina, ácido 2-aminoetanosulfónico, no participa en la síntesis de proteínas, pero es abundante en el citoplasma de la mayoría de las células.<sup>22</sup> La taurina interviene en la eliminación de microorganismos extraños por el sistema inmune.<sup>21</sup> Entre sus otras funciones cabe destacar su función como neurotransmisor, protector de los fotorreceptores de la retina, antioxidante, etc. Es ampliamente utilizado como aditivo en preparados alimenticios infantiles, comida para animales, tónicos y colirios.<sup>23-28</sup>

La concentración de taurina en células, neutrófilos y leucocitos es elevada, lo que hace pensar que juega un papel importante. Parece que la taurina actúa como trampa del HOCl producido por el sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> de los leucocitos formando un oxidante bastante estable, la N-clorotaurina (TauNHCl), que es menos reactivo y tóxico que el HOCl.<sup>29,30</sup>

La TauNHCl, se acumula en el medio extracelular y no inhibe las funciones de los neutrófilos, pudiendo continuar moderando la actividad citotóxica de los neutrófilos tiempo después de que el HOCl haya sido eliminado. La reacción de taurina con HOCl previene que otros componentes celulares sean atacados por el HOCl.<sup>29</sup> Sin embargo cuando la concentración de TauNHCl y N,N-diclorotaurina (TauNCl<sub>2</sub>) es elevada pueden actuar ambos oxidando grupos hemo y sulfidrido de las proteínas, inhibiendo el metabolismo energético.<sup>29</sup> Podría hidrolizarse lentamente regenerando HOCl.<sup>6</sup> La clorotaurina es un oxidante que puede reaccionar rápidamente con tioles, proteínas y lípidos.<sup>22</sup>

Si bien se puede encontrar abundante bibliografía sobre la importancia de la N-clorotaurina en los sistemas biológicos, y trabajos relacionados con la formación de N-cloroaminas,<sup>13</sup> no existe mucha información sobre el mecanismo de formación de este cloroderivado. El estudio de la cloración de taurina, ha mostrado que la reacción es de orden dos, orden uno con respecto al agente clorante y orden uno respecto al aminoácido. Se ha observado que hay una notable dependencia de la velocidad de reacción con el pH del medio

(figura 2.2). El valor de la constante bimolecular obtenido para la reacción de cloración por ácido hipocloroso es  $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ .<sup>31</sup>

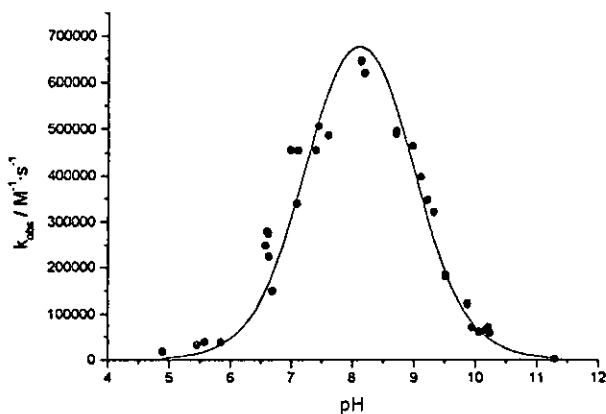
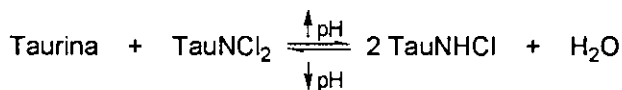


Figura 2.2

En medio ácido, o en presencia de exceso de ácido hipocloroso podría añadirse un segundo átomo de cloro dando lugar a la *N,N*-diclorotaurina ( $\text{TauNC}_2$ ). Antelo y col. han estudiado la desproporción de *N*-clorotaurina en medio ácido que genera *N,N*-diclorotaurina

Thomas y col. han concluido que la  $\text{TauNC}_2$  es mucho más eficaz como agente halogenante que la  $\text{TauNHCl}$ .<sup>29</sup>

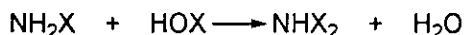
El balance entre diclorotaurina y la menos tóxica monoclorotaurina depende no solamente de la relación taurina- $\text{HOCl}/\text{ClO}^-$  si no también del pH.<sup>22</sup>



Cloraminas como la monoclorotaurina, Cloramina-T,  $\text{NH}_2\text{Cl}$  y *N*-cloramidas reaccionan con NADH generándose los mismos productos que los obtenidos con HOCl. Comparada con la rápida oxidación del NADH por HOCl  $k \sim 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  a  $\text{pH}=7.2$ , la oxidación por cloraminas es cinco órdenes de magnitud más lenta y para las cloramidas sobre cuatro órdenes de magnitud. La constante observada aumenta al incrementarse la concentración de protones o disolución reguladora, es decir, la reacción está sujeta a catálisis general básica, mientras que la oxidación con cloramidas es independiente del pH.<sup>32</sup>

### 2.1.2.3. Dihaloaminas.

Las dihaloaminas se forman mediante la reacción:



Los compuestos dihalogenados se generan cuando la concentración del agente halogenante es mayor que la del N-compuesto<sup>33</sup> o por desproporción a pH bajo.

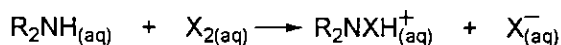
Morris y col. determinaron para la formación de la dicloramina una constante de velocidad de  $3.4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a 298 K. Se ha sugerido que primero tiene lugar la formación del monohaloderivado que reacciona de nuevo con halogenante. La reacción es mucho más lenta debido a la baja basicidad del grupo N-halo-amino respecto a la amina.<sup>13</sup>

La dicloramina es un agente bactericida dos veces más eficaz que la monocloramina, pero su presencia en las aguas hace que estas presenten sabor y olor característicos, por lo que se trata de evitar su producción durante los procesos de tratamiento.<sup>2</sup>

## 2.2. Formación de N-Halo-derivados.

### 2.2.1. Reacción con halógenos.

La formación de los monohaloderivados tiene lugar cuando la concentración de la especie halogenante y el N-compuesto es 1:1 o mayor. En medio ácido la halogenación es debida a  $\text{X}_{2(\text{aq})}$ <sup>18,34</sup> y el mecanismo propuesto es el siguiente:



Las constantes de reacción bimolecular tienen valores muy altos, próximos incluso al control por difusión.

Tal y como se estableció en el apartado anterior (Tabla 2.3) a partir de  $\text{pH} > 5$  la concentración de  $\text{X}_{2(\text{aq})}$  empieza a ser despreciable, siendo la especie mayoritaria el HOX para  $5 < \text{pH} < 7$ . A  $\text{pH} > 7$  la especie mayoritaria es el  $\text{XO}^-$ , llegando a ser aproximadamente el 50% a  $\text{pH} = 7.5$ . Las especies activas en medio neutro son, por tanto, el HOX y  $\text{XO}^-$ . En estas condiciones la formación de (N-Cl)-compuestos sigue una ley cinética de orden dos, orden uno con respecto al agente halogenante y orden uno respecto al N-compuesto. Además

de una marcada dependencia de la velocidad de formación de (N-Cl)-derivado con el pH del medio (figura 2.3).<sup>35-37</sup>

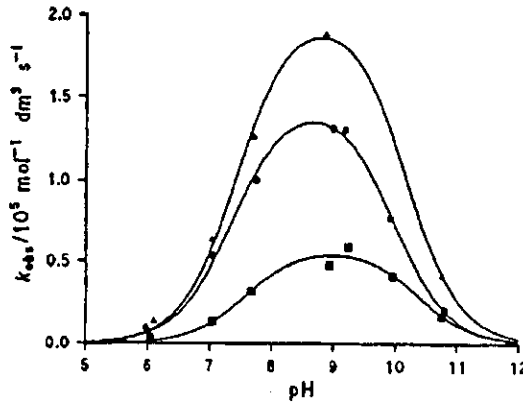
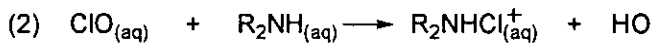
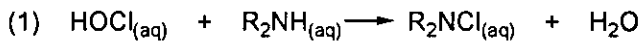


Figura 2.3 Dependencia de la velocidad de cloración de  $\alpha$ -aminoácidos por HOCl.<sup>35</sup>  
 (●) isoleucina, (■) ácido amino isobutírico, (▲) glicina.

Se han propuesto dos posibles procesos elementales a través de los que podría tener lugar la reacción entre el agente halogenante y el N-compuesto, un proceso molecular (1) y un proceso iónico (2) cinéticamente indistinguibles.



Mediante el estudio detallado de las especies que intervienen en ambos, y la comparación con otros procesos análogos se identifica el proceso molecular (1) como el que tiene lugar en la cloración. Se deduce la siguiente ecuación para la dependencia del pH con la  $k_{obs}$

$$k_{obs} = k \cdot K_{a2} \cdot \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{(K_{a2} + [\text{H}_3\text{O}^+]) \cdot (K_c + [\text{H}_3\text{O}^+])} \quad \text{Ec.2.}$$

donde  $k$  es la constante de velocidad de orden dos para la reacción de cloración,  $K_{a2}$  y  $K_c$  son, respectivamente, las constantes de equilibrio para la desprotonación del grupo amino y del HOCl.

Al igual que se indicó para las dihaloaminas (apartado 2.1.2.3.) los compuestos dihalogenados se forman cuando la concentración de agente halogenante es mayor que la del N-compuesto. La dihalogenación tiene lugar por reacción entre el compuesto monohalogenado y el agente halogenante, siguiendo un mecanismo similar al proceso de monohalogenación. La reacción

es mucho más lenta debido a la baja basicidad de los grupos N-halo-amino respecto al grupo amino.

### 2.2.2. Halogenación enzimática.

Los neutrófilos<sup>a</sup> humanos pueden utilizar la enzima mieloperoxidasa (MPO) junto con iones haluro y agua oxigenada (sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>) para generar potentes oxidantes con actividad antimicrobiana y antitumoral.<sup>38</sup> La mieloperoxidasa contiene hierro que puede estar en diversos estados de oxidación tal como se muestra en la figura 2.4.<sup>39</sup> La MPO (Fe<sup>+3</sup>) reacciona rápida e irreversiblemente con peróxido de hidrógeno para formar el sistema enzimático intermedio "Compuesto I". Los iones cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato son sustratos efectivos del sistema MPO; sin embargo debido a que el ion Cl<sup>-</sup> está presente en mayor concentración en los medios extracelulares<sup>5,6</sup>, y es eficientemente oxidado por el compuesto I ( $k = 5 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )<sup>5</sup>, el Cl<sup>-</sup> es considerado como el principal sustrato fisiológico para este sistema enzimático.

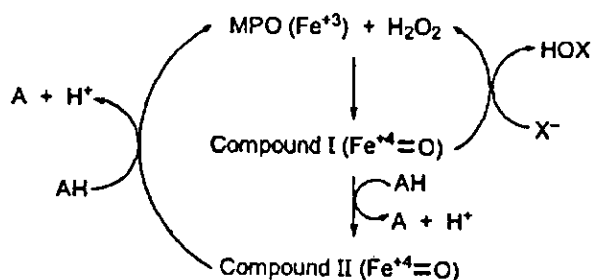


Figura 2.4 Sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> en su actividad halogenante<sup>39</sup>

A su vez en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el enzima MPO cataliza la oxidación de Cl<sup>-</sup> a HOCl, que oxida a otras especies presentes en el medio. Debido a que el HOCl es muy reactivo reacciona rápidamente con amonio, aminas y otros compuestos nitrogenados para dar mono- y di-N-cloraminas<sup>38,40</sup>. Habida cuenta de que: el HOCl es un potente agente oxidante y clorante, la concentración de

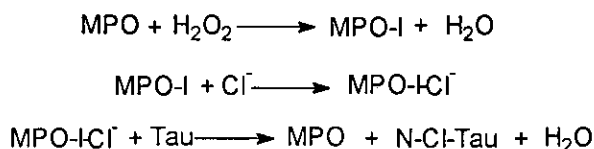
<sup>a</sup> Los neutrófilos son uno de los leucocitos más abundantes en los mecanismos de defensa del cuerpo humano. Contienen una peroxidasa específica que cataliza las reacciones del peróxido de hidrógeno con los halógenos.



los N-compuestos es elevada, y la reacción del HOCl con éstos es muy rápida<sup>13</sup> resulta improbable que el HOCl actúe directamente como agente tóxico. La toxicidad vendrá dada por los N-Cl-derivados,<sup>13,40-42</sup> que actúan extendiendo la toxicidad del HOCl, pudiendo reaccionar con otras moléculas de importancia biológica, como ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos, etc.<sup>38</sup>

El HOCl causa lenta, pero eficazmente, la desnaturalización del ADN, debido a la cloración de los grupos amino y grupos NH heterocíclicos de las bases del ADN, produciendo la disociación de la doble cadena como consecuencia de la pérdida de los enlaces hidrógeno.<sup>43</sup> Reacciona rápidamente con  $\text{NH}_4^+$  para producir  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , *in vivo*, que es altamente tóxico y al igual que el HOCl, es capaz de atravesar las membranas biológicas debido a sus propiedades hidrofílicas, destruyendo el sistema de transporte electrónico de las mitocondrias.<sup>44</sup> Estos N-Cl derivados reaccionan con muchos componentes celulares, entre ellos los grupos sulfhidrilo, que suelen estar en concentración elevada respecto a otros componentes celulares, son especialmente susceptibles al ataque oxidativo. Existe una buena correlación entre la pérdida de las funciones celulares y la oxidación de los grupos sulfhidrilo celulares.<sup>40</sup>

Aunque se asume que el HOCl es el agente halogenante en la oxidación catalizada por MPO del  $\text{Cl}^-$ , Marquez y col.<sup>30</sup> no excluyen la posibilidad de que tenga lugar la formación de un complejo intermedio enzima-agente halogenante.



Estos autores sostienen que la formación de este complejo explica como se previene la oxidación indiscriminada por HOCl en los leucocitos. La rápida formación de monoclorotaurina es consistente con el papel de la taurina como protector frente a oxidantes, el cual podría ser indiscriminado si fuese llevado a cabo por el HOCl libre.

Los aminoglicósidos Gentamicin y Tobramycin convierten el HOCl en cloraminas no citotóxicas y protegen las células epiteliales de los pulmones contra el daño por oxidación por la acción de la MPO. Antibióticos conteniendo tioéteres, por ejemplo el Ticarcillin y el Ceftazidime, y probablemente otras

penicilinas y cefalosporinas, son potentes captadores de HOCl y protegen a las células epiteliales pulmonares, concretamente a los grupos sulfhidrilo y metionina, de la oxidación por HOCl. Estas propiedades antioxidantes de los antibióticos pueden contribuir a la protección de tejidos en pacientes con fibrosis quística.<sup>45</sup>

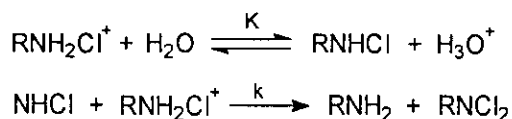
Experiencias *in vitro* muestran que las dicloraminas tienen mayor actividad mutagénica que las cloraminas.<sup>46</sup>

### 2.3. Descomposición de N-halo-compuestos.

La mayoría de los estudios de descomposición se refieren a la descomposición de N-Cl y N-Br-derivados, ya que la formación de N-I derivados es difícil y son bastante inestables.<sup>13</sup> Una vez que se han formado, los N-halo-derivados pueden sufrir diferentes procesos dependiendo de las condiciones del medio: desproporción, fragmentación y eliminación.

#### 2.3.1. Desproporción.

La desproporción de N-cloraminas es una reacción de orden dos respecto a la monocloramina y muestra catálisis general ácida.<sup>47-49</sup> A partir de la dependencia de la constante de velocidad con el pH se establece un mecanismo que supone la protonación de la monocloramina en una primera etapa, para que a continuación tenga lugar la reacción entre una cloramina neutra y una protonada para dar lugar a la correspondiente dicloramina, recuperándose la amina.



Antelo y col. han estudiado la desproporción de la N-Clorotaurina (TauNHCl) para dar lugar a la N,N-diclorotaurina (TauNCl<sub>2</sub>). Estos autores sugieren que en la etapa lenta tiene lugar la abstracción de un protón por una base,



$\text{B} + \text{TauNHCl} + \text{TauNH}_2\text{Cl} \xrightarrow{k} \text{TauNH}_2 + \text{TauNCl}_2 + \text{BH}^+$   
y proponen un mecanismo concertado en el cual la desprotonación y la transferencia de cloro ocurre simultáneamente en el estado de transición.<sup>1</sup>

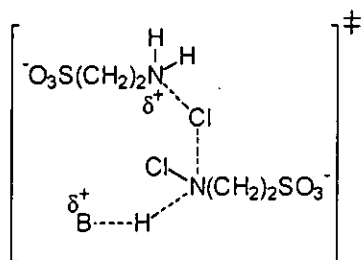
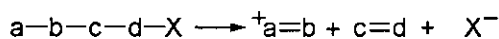


Figura 2.5

### 2.3.2. Fragmentación.

Según Grob<sup>50</sup> y Una reacción de fragmentación heterolítica es aquel proceso en el que tiene lugar la ruptura de una molécula en tres fragmentos:



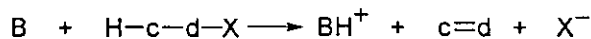
Los grupos a-b y X se denominan grupo electrógeno y grupo nucleógeno respectivamente, refiriéndose al proceso de ruptura de los enlaces.

Son electrógenos típicos el dióxido de carbono, el nitrógeno, los iones iminio, carbonio, etc.; el electrógeno abandona la molécula cediendo el par electrónico de enlace y ganando una unidad de carga positiva, puede formar un catión estable o bien una molécula neutra según cuál sea su carga inicial.

El grupo intermedio c-d da lugar a moléculas insaturadas, frecuentemente olefinas, iminas y nitrilos.

El nucleógeno X abandona la molécula con el par electrónico del enlace, por lo general en forma de anión haluro, carboxilato, o sulfonato.

De acuerdo con la definición antes dada para la fragmentación heterolítica, ésta presenta ciertas similitudes con los procesos de eliminación en  $\beta$ , en los que tiene lugar la abstracción de un grupo electrógeno por un nucleófilo y la salida de un grupo neutrógeno de la molécula:

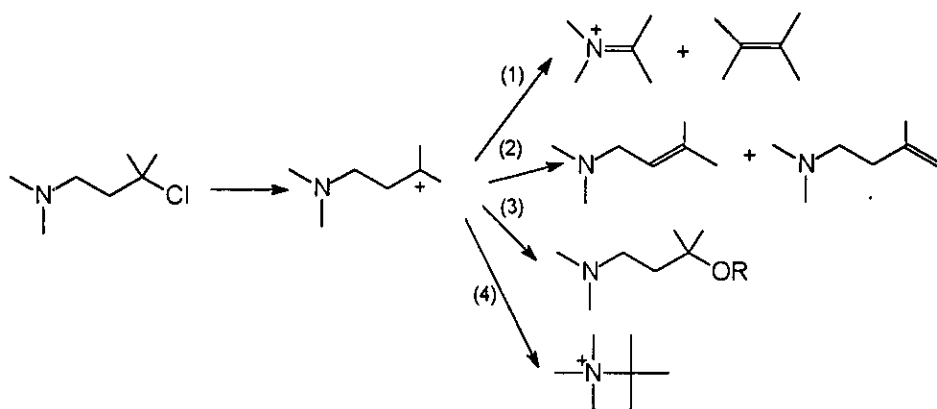


Las reacciones de eliminación son procesos bimoleculares en los que el electrógeno suele ser un átomo, por lo general de hidrógeno, mientras que las reacciones de fragmentación son procesos unimoleculares en los que el electrógeno suele ser un grupo de átomos.

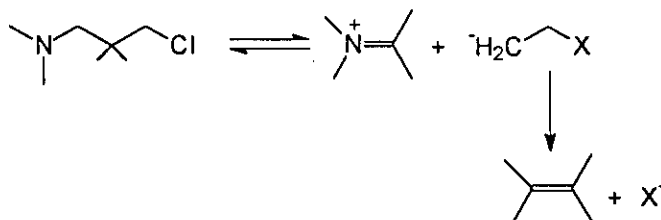
El proceso de fragmentación puede ocurrir a través de tres mecanismos:  $(D_E+D_N^*)$ ,  $(D_E^*+D_N)$  y  $(D_E D_N)$ .<sup>51</sup>

▪ ( $D_E + D_N^*$ ). Este proceso comienza con la pérdida del nucleóforo ( $-X$ ) para formar un  $\gamma$ -aminocarbocatión en el caso de los compuestos nitrogenados, que posteriormente se rompe en un paso rápido dando lugar a un ión azometino y un alqueno. El paso determinante es la formación del carbocatión ya que la velocidad varía según el nucleóforo  $Cl > Br > I$ , la tendencia a ionizarse dependerá de la estabilización de este carbocatión.

El carbocatión puede sufrir además de fragmentación(1), procesos de eliminación(2), sustitución(3) o cierre de anillo(4).

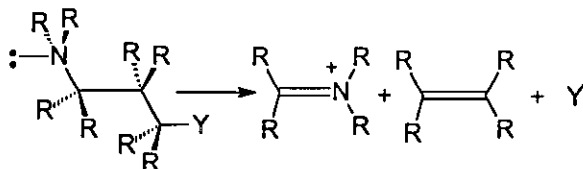


▪ ( $D_E^* + D_N$ ). Este proceso comienza con la ruptura del enlace C-C y la consiguiente pérdida de un ión azometino en un proceso reversible, posteriormente la ruptura del carbanión para generar un alqueno e ión cloruro. Este mecanismo ocurre únicamente si el carbanión que se forma está estabilizado y el grupo nucleóforo es mal grupo saliente. El grupo nucleóforo no influye sobre la velocidad de reacción.

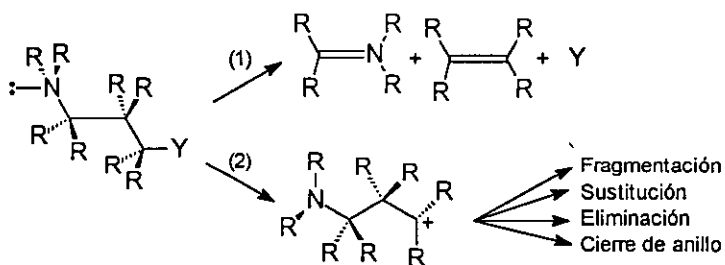


▪ ( $D_E D_N$ ). En este caso la ruptura del enlace C-C y  $\text{N-X}$  tiene lugar de modo concertado. El compuesto debe adoptar una conformación espacial en la que tanto el enlace con el nucleóforo como el enlace con el electróforo, o

el par electrónico no enlazante, sean antiperiplanares, de modo que el solapamiento de los orbitales p sea idóneo para el cambio de hibridación  $sp^3$  a  $sp^2$  y formación de doble enlace.



La fragmentación concertada ocurre si la constante de fragmentación(1) es mayor que la constante de formación del  $\gamma$ -carbocatión(2) que posteriormente se fragmenta.

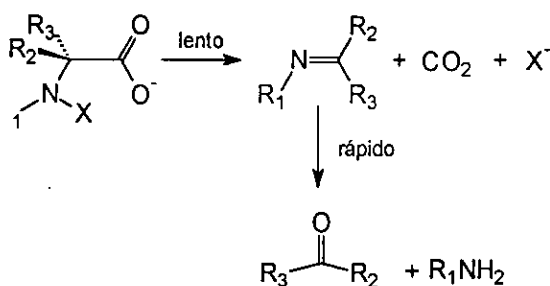


### 2.3.2.1. Fragmentación de Grob en N-halo-derivados.

La mayoría de los estudios de fragmentación se han realizado sobre N-halo- $\alpha$ -aminoácidos, en condiciones de pH próximas a la neutralidad<sup>52-54</sup>. En estas condiciones de pH los (N-X)- $\alpha$ -aminoácidos se encuentran principalmente en la forma aniónica.

Los productos resultantes de la fragmentación de Grob de (N-X)- $\alpha$ -aminoácidos son aldehídos o cetonas, dióxido de carbono, amonio o aminas primarias e ión haluro.<sup>54-56</sup> La descomposición tiene lugar en dos etapas consecutivas. La primera es un proceso unimolecular de fragmentación de N-halo-aminoácido, que da lugar a la formación de haluro,  $\text{CO}_2$  e imina, que rápidamente se hidroliza para dar lugar al compuesto carbonílico y amina correspondiente.<sup>54-56</sup>

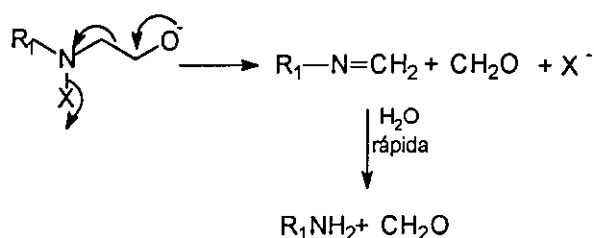
Reacciones de halogenación: antecedentes



Armesto y col. estudiaron la descomposición de N-halo- $\alpha$ -aminoácidos (en medio ligeramente ácido, básico y neutro) encontrando que la constante de velocidad es independiente del pH y de la fuerza iónica.<sup>54,57,58</sup> El proceso es de primer orden respecto al N-Cl-aminoácido. Mediante el estudio del efecto de grupos alquilo en C $\alpha$  y en el N, y comparando el comportamiento de los N-Cl- y N-Br-derivados estos autores describen el estado de transición como tipo carbaniónico más próximo a los productos que los reactivos, lo que explica el pequeño efecto que observan con el cambio del nucleóforo. El mecanismo sigue un proceso concertado no sincrónico (D<sub>E</sub>D<sub>N</sub>). En el estado de transición el grupo -CO<sub>2</sub><sup>-</sup> y el grupo -X adoptan una disposición antiperiplanar, en donde la ruptura del enlace C $\alpha$ -CO<sub>2</sub><sup>-</sup> está ligeramente adelantada respecto a la ruptura del enlace N-X.<sup>13</sup> Estudios teóricos han avalado posteriormente la interpretación anterior.<sup>59</sup>

Queralt y col. han realizado el estudio teórico y experimental de la fragmentación de Grob para diferentes (N-halo)-2-amino cicloalcanocarboxilatos. Ambos estudios indican que el proceso tiene lugar a través de un mecanismo unimolecular concertado casi sincrónico. En el estado de transición la ruptura del enlace N-X está ligeramente adelantada respecto a la ruptura del enlace C-C. Estos enlaces se encuentran en una disposición antiperiplanar en el estado de transición y será esta disposición la que dirija la descomposición.<sup>60</sup>

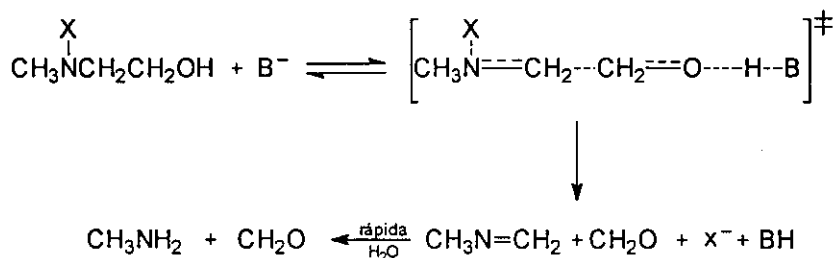
Armesto y col. han estudiado la descomposición de N-halo-alcoholaminas en medio básico. En estas condiciones de pH tiene lugar una reacción de fragmentación donde el grupo nucleóforo es el ión haluro, y el electróforo un compuesto carbonílico, en este caso formaldehído. Los autores proponen el siguiente mecanismo.



En estas condiciones se forma una imina, que rápidamente se hidróliza para dar lugar a lugar a los productos finales.

La velocidad de fragmentación de (N-Cl)-alcoholaminas es mayor que para (N-Cl)- $\alpha$ -aminoácidos similares, sin embargo a la vista de los mecanismos involucrados, *vide supra*, a pH 7 las alcoholaminas no fragmentan y los N-halo-aminoácidos si.<sup>13</sup>

Armesto y col.<sup>61</sup> estudiaron la descomposición de (N-halo)-N-metiletanolamina en medio básico, y encontraron que el proceso tiene lugar a través de una eliminación intramolecular que da lugar a la amina y al compuesto carbonílico correspondiente. Esta eliminación la describen mediante un mecanismo concertado y ligeramente asincrónico, donde la abstracción del H del grupo hidroxilo está adelantada a la ruptura del enlace N-X.

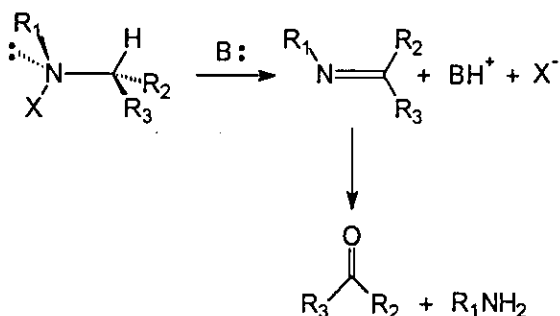


El proceso sufre catálisis general básica y además comprueban que la velocidad de descomposición de la N-halo-N-etanolamina es mucho más rápida que la N-Halo-amina correspondiente.

### 2.3.3. Reacciones de eliminación en $\beta$ .

Estas reacciones se caracterizan por la pérdida de dos átomos o grupos moleculares a partir de dos átomos de carbono contiguos; en el caso de los N-halo-derivados, un átomo de carbono y un heteroátomo vecinos, con la formación de un doble enlace. Para los N-halo-derivados la formación de un

doble enlace implica la generación de una imina, que rápidamente se hidroliza originando como productos finales de reacción aldehído o cetona y amina.



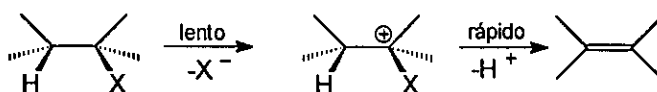
En este tipo de reacciones se produce la ruptura y formación de varios enlaces por lo que se puede establecer distintos mecanismos de acuerdo con el orden y grado de ruptura de los enlaces con el halógeno y con el hidrógeno:

	Ingold	IUPAC
Bimolecular	$E_2$	$A_{xH}D_H D_N^*$
Unimolecular	$E_1$	$D_N^* + A_{xH}D_H$
	$(E_1cB)_{irr}$	$A_{xH}D_H^* + D_N$
	$(E_1cB)_{rev}$	$A_{xH}D_H + D_N^*$
	$(E_1cB)_{ip}$	$A_{xH}D_H^* D_N^*$

Estos mecanismos son en cierto modo análogos a los descritos para la reacción de fragmentación. La diferencia básica es que mientras en la eliminación el proceso está promovido por un segundo reactivo, generalmente una base, la fragmentación es un proceso unimolecular.<sup>51</sup>

### 2.3.3.1. Mecanismo unimolecular $D_N^* + A_{xH}D_H$ .

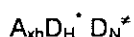
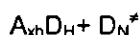
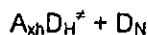
Este mecanismo transcurre a través de la formación en la primera etapa de un ion nitrenio por la ruptura del enlace N-X o un carbocatión si se rompe el enlace C-X. A continuación tiene lugar la ruptura del enlace C-H formándose así el doble enlace. Sigue una ley cinética de orden uno



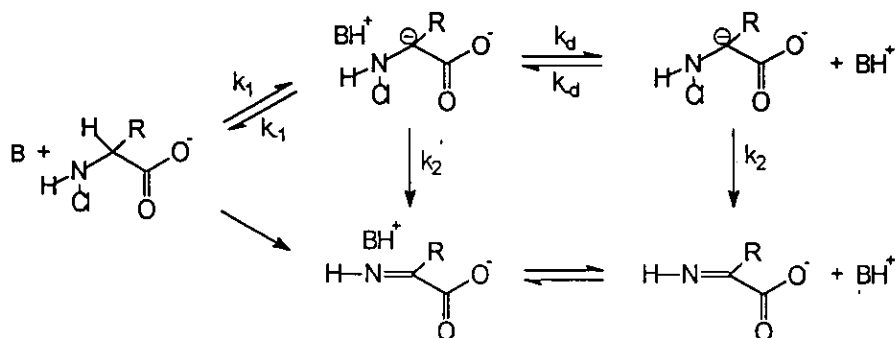


2.3.3.2. Mecanismo unimolecular  $A_{xh}D_H + D_N$ .

Este mecanismo transcurre a través de la formación de un carbanión como intermedio de reacción. Este mecanismo a su vez se puede dividir en tres en función de la etapa limitante:



El mecanismo ( $A_{xh}D_H^{\ddagger} + D_N$ ) presenta como etapa limitante la transferencia protónica en la formación del carbanión ( $k_1$ ). En este supuesto el complejo ión-molécula formado puede descomponerse directamente ( $k_2'$ ) o bien a través del carbanión libre ( $k_2$ ). La otra posibilidad ( $A_{xh}D_H + D_N^{\ddagger}$ ) tiene como etapa limitante la expulsión del grupo saliente, a partir del carbanión libre. El tercero de los posibles mecanismos, ( $A_{xh}D_H^{\ddagger} D_N^{\ddagger}$ ) es menos común, en él la etapa limitante es  $k_2'$ , de forma que la ruptura del par es más rápida que la difusión del ácido conjugado fuera del par de encuentro.



2.3.3.3. Mecanismo bimolecular  $A_{xh}D_H D_N^{\ddagger}$ .

Este mecanismo transcurre en una sola etapa, a través de un estado de transición concertado. Sigue una ley cinética de orden dos, y presenta catálisis general básica. No existe intermedio de reacción y en el estado de transición se produce la formación y ruptura de enlaces simultáneamente sin ser necesariamente sincrónicos, pudiendo el estado de transición mostrar múltiples estructuras en función del distinto desarrollo de las modificaciones en los enlaces. Para un E2 cabe esperar un amplio espectro de estados de transición

que variarán entre un carbanión y el carbocatión (o nitrenio) pasando por un proceso sincrónico.

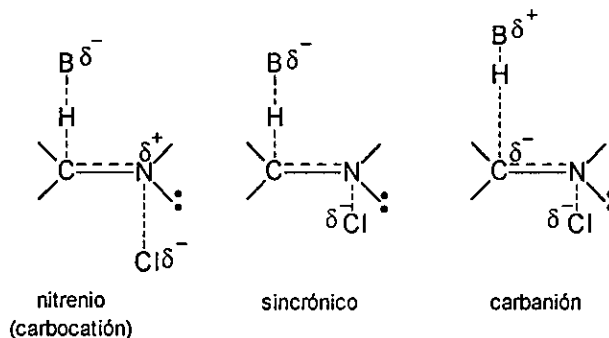


Figura 2.6

### 2.3.3.3.1. Estados de transición asincrónicos.

Dewar<sup>62</sup>, a través de la aproximación de Evans-Polanyi<sup>63</sup>, pone de manifiesto la dificultad de que un proceso que implique la modificación de varios enlaces transcurra sincrónicamente ya que la barrera energética que es necesario superar es mayor que para un proceso análogo en varias etapas.

Define un proceso sincrónico como aquel en el que se forman y rompen enlaces al unísono, alcanzando un grado de desarrollo similar en el estado de transición, mientras que considera como proceso concertado a aquel que transcurre en una sola etapa pero en el estado de transición no existe un grado de ruptura y formación de enlaces similar. Este autor indica que un proceso será sincrónico si no es posible un proceso en dos etapas (figura 2.7(a)), en el cual la etapa limitante es la formación del producto a partir del intermedio, o concertado en dos fases (figura 2.7(b)), donde la conversión del intermedio no requiere energía de activación.

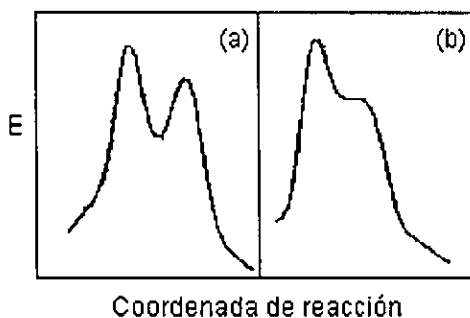


Figura 2.7

Según esto siempre que una reacción evolucione a través de un mecanismo concertado y ocurra más de un evento molecular relevante, cabe esperar que estos se desarrollarán de forma no sincrónica. Esta situación es denominada por Jencks.<sup>64</sup> como estado de transición asincrónico y se puede considerar como una situación general en las reacciones de eliminación  $E_2$ , donde en función del evento molecular que experimente mayor desarrollo en el estado de transición, éste puede presentar múltiples estructuras que tienen como límites la formación de un carbanión, cuando la ruptura del enlace C-H está adelantada a la ruptura del enlace con el grupo saliente, de un carbocatión, en este caso está adelantada la ruptura del enlace con el grupo saliente. Entre ambas situaciones existen infinitas coordenadas de reacción, y por ende otros tantos estados de transición, de las cuales tan solo una corresponde al proceso completamente sincrónico.

#### 2.3.3.4. Caracterización del estado de transición.

Existen varios modelos que establecen la relación entre la estructura del estado de transición y los cambios energéticos en los reactivos, los intermedios y los productos. El más utilizado es el desarrollado por More O'Ferrall, basándose en un trabajo previo de Thornton y que, posteriormente han ampliado Jencks y otros.

##### 2.3.3.4.1. Diagrama de More O'Ferrall.

More O'Ferrall desarrolló un modelo sobre la base de las reacciones de los derivados de 9-fluorenilmetileno para determinar las características del estado de transición de las reacciones de eliminación.<sup>65</sup> En este modelo los reactivos, productos y los correspondientes estados de transición en sus configuraciones límite se representan en un diagrama como el que se muestra en la figura 2.8

A lo largo del eje X se representa la ruptura del enlace  $C_{\alpha}-X$ , y en el eje Y la ruptura del enlace  $C_{\beta}-H$ . Los reactivos se encuentran en el vértice inferior izquierdo y los productos de la reacción en el vértice superior derecho. La ruptura del enlace  $C_{\beta}-H$  corresponde a un movimiento vertical a lo largo del eje y que conduce a la formación de una de las configuraciones límites del estado de transición: un carbanión, extremo superior izquierdo.

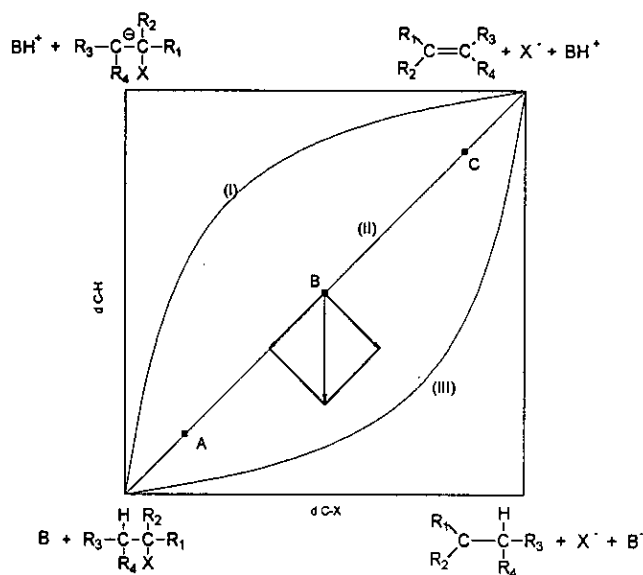


Figura 2.8

En un mecanismo  $A_{\text{N}}D_{\text{H}} + D_{\text{N}}$  esta etapa se combina con el movimiento de izquierda a derecha por el eje superior hasta la formación de productos. La ruptura del enlace  $C_{\alpha}\text{-X}$  se visualiza a lo largo del eje X en cuyo extremo se sitúan el carbocatión y el anión  $X^-$ . En una eliminación  $E1$ , este movimiento horizontal es seguido del desplazamiento vertical, por el eje izquierdo, hasta la formación de productos.

Un proceso concertado, que tiene lugar con ruptura simultánea de ambos enlaces,  $C_{\beta}\text{-H}$  y  $C_{\alpha}\text{-X}$ , transcurrirá a través de alguna de las múltiples vías intermedias de las que, en la figura anterior, se representan sólo tres (I), (II) y (III). La ruta (II) representa un proceso en que el grado de ruptura de ambos enlaces en el estado de transición es idéntico. Habitualmente al hacer referencia a una eliminación que transcurre a través de la diagonal se indica que ésta es sincrónica.

Hay que hacer notar, sin embargo, que en el diagrama de More O'Ferrall no se aporta ninguna información acerca del grado de desarrollo del doble enlace, y éste no ha de ser forzosamente sincrónico con el resto del proceso. Si el máximo de energía potencial, que se corresponde con la posición del estado de transición, se encuentra equidistante de productos y reactivos (punto B), se clasificará como proceso concertado central. Si el máximo de energía se encuentra cercano a los reactivos (punto A) o a los productos (punto C), se

consignará como mecanismo concertado con estado de transición próximo a reactivos o productos respectivamente.

Las rutas de reacción denominadas (I) y (III) en la figura anterior representan procesos concertados en los que el estado de transición se asemeja a un carbanión y a un carbocatión respectivamente. En situaciones como éstas el mecanismo de eliminación es similar a un  $A_{\text{Xb}}D_{\text{H}}+D_{\text{N}}$  en el caso de la ruta (I), y a un  $(D_{\text{N}}^{\ddagger}+A_{\text{Xb}}D_{\text{H}})$  si el proceso transcurre según (III). En ambos casos el estado de transición puede ser próximo a los reactivos, a los productos o central.

Con este modelo se puede predecir el efecto que sobre el estado de transición produce un cambio en los sustituyentes, para ello se aplican tres reglas propuestas por Thornton <sup>66</sup>:

1) Si se estabiliza alguna de las especies, productos o reactivos, situada en un vértice a lo largo de la coordenada de reacción, el efecto será el desplazamiento del estado de transición, alejándolo del vértice que se estabiliza, por lo que el estado de transición tendrá una configuración parecida a aquella especie que tenga una energía parecida. Este efecto se denomina efecto paralelo o efecto Hammond.

2) Si se estabiliza alguna de las especies respecto de los vértices correspondientes a la formación neta de un nitrenio o un carbanión (perpendicular a la coordenada de reacción), el efecto es el de aproximar el estado de transición al vértice estabilizado. Este efecto se denomina efecto perpendicular, antiparalelo o efecto Thornton.

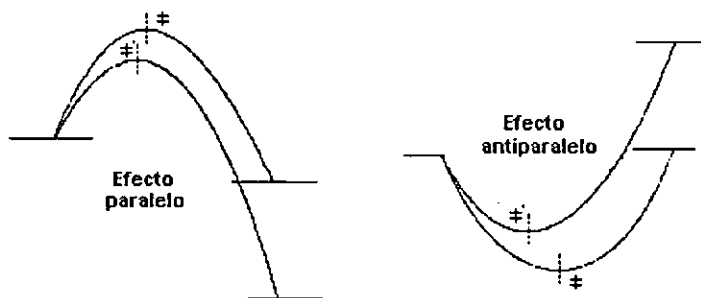


Figura 2.9

3) Cuando se estabilizan varias especies el efecto resultante es la suma de los efectos individuales.

#### 2.3.3.4.2. Diagrama de More O'Ferrall-Jencks.

Jencks proponía que el progreso a lo largo de la coordenada de reacción podría ser representado a partir de parámetros experimentales basados en las correlaciones de energía libre.<sup>64,67,68</sup> El razonamiento teórico implícito en esta aproximación empírica se basa en el efecto de los sustituyentes en el estado de transición. Si un sustituyente tuviera un cierto efecto en el desarrollo de carga sobre un átomo contiguo, capaz de ser determinado experimentalmente por algún parámetro, dicho parámetro aunque no fuera una medida absoluta de la transferencia de carga sí sería útil para comparar estados de transición. Los ejes del diagrama de More O'Ferrall-Jencks representan los parámetros que relacionan la estructura y reactividad y que tienen su origen en las correlaciones de energía libre de Gibbs, tales como el parámetro  $\beta_H$  de Brönsted, el  $\beta_{lg}$  o el  $\rho$  de Hammet.

▪ Parámetro de Brönsted,  $\beta_H$ .<sup>69</sup> Este parámetro fue establecido de forma empírica para las reacciones sujetas a catálisis básica, sobre la base de las representaciones del logaritmo de la constante de ionización de derivados del ácido benzoico frente al  $pK_a$  del derivado en cuestión. Este análisis se puede extender a las constantes de velocidad. En relación con las reacciones de eliminación, este parámetro se considera una medida de la transferencia protónica entre el protón unido al carbono  $\beta$  y la base.

$$\log k = \beta \cdot pK_a + \text{cte}$$

▪ Parámetro  $\beta_{lg}$ . Este parámetro, formalmente similar al  $\beta_H$  de Brönsted, se define sobre la base de la linealidad encontrada al representar el logaritmo de la constante de velocidad para una reacción de eliminación con diferentes grupos salientes frente al  $pK_a$  correspondiente a estos grupos salientes. Este parámetro se interpreta como un indicador del grado de ruptura del enlace entre el átomo de nitrógeno y el grupo saliente en el estado de transición.

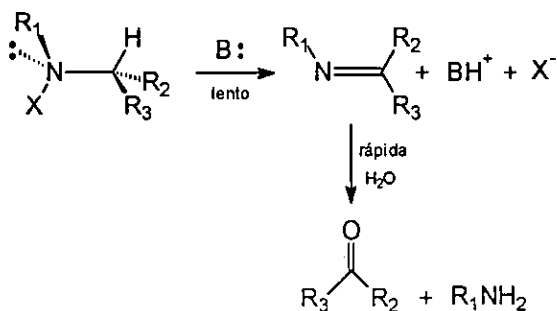
$$\beta_{lg} = \frac{\log k}{pK_{a(lg)}}$$

La óptima utilización de este parámetro implica la máxima similitud estructural entre los nucleófilos.

Los cambios en los parámetros que correlacionan la estructura con la reactividad determinados experimentalmente se interpretan mediante movimientos de la posición del estado de transición sobre la superficie en la dirección paralela y perpendicular a la coordenada de reacción. Cualquier cambio en la posición del estado de transición se puede explicar como el resultado de dos componentes, una asociada a movimientos paralelos a la coordenada de reacción, efecto Hammond, y otra ligada a movimientos perpendiculares a la coordenada de reacción, efecto Thornton.

#### 2.4. Eliminación $\beta$ en N-halo-compuestos.

En presencia de bases, los N-halo-compuestos pueden dar lugar a procesos de eliminación. La reacción de eliminación de N-halo-aminas sigue una ley cinética de orden dos, orden uno con respecto al N-halo-compuesto y la base.<sup>70,71</sup> Muestra catálisis general básica y una marcada influencia de la fuerza iónica. Se ha propuesto el siguiente mecanismo:



Un primer paso supone la transferencia protónica desde el  $C_{\alpha}$ , y la expulsión del  $X^-$ , con la formación de una imina.<sup>72,73</sup> En el segundo paso, tiene lugar una rápida hidrólisis para dar lugar a amina, y el correspondiente compuesto carbonílico. A partir de parámetros de estructura reactividad y el modelo de More O'Ferrall-Jencks, el proceso de eliminación de las N-halo-aminas se puede describir como un proceso concertado asincrónico ( $A_{xH}D_HD_N$ ), y el estado de transición es tipo ión nitrenio, y al mismo tiempo se parece más a los reactivos.<sup>71,74-76</sup>

En el caso de los N-halo- $\alpha$ -amino ácidos, los parámetros estructura-reactividad y los valores del efecto isotópico indican que el proceso de eliminación tiene lugar a través de un proceso concertado asincrónico  $A_{\text{N}}D_{\text{H}}D_{\text{N}}$ ,<sup>56</sup> en donde la ruptura del enlace N-X está ligeramente adelantado respecto a la ruptura del enlace C-H. El proceso muestra un importante efecto perpendicular (figura 2.10), así al variar los sustituyentes en la posición alfa el estado de transición cambia desde una estructura ligeramente carbaniónica a un estado de transición tipo ión nitrenio (figura 2.11).

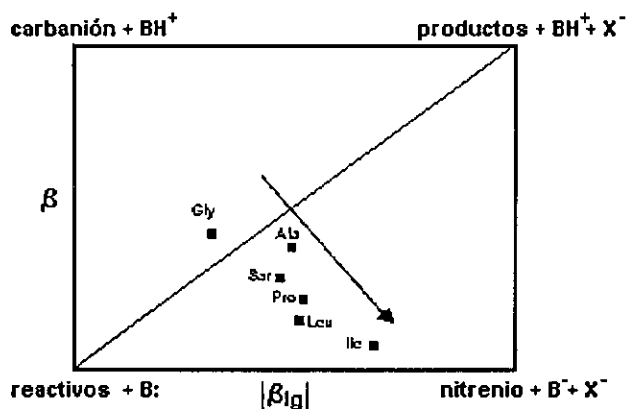


Figura 2.10

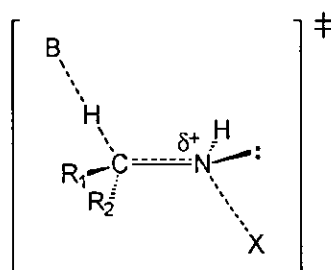


Figura 2.11

El mecanismo propuesto es similar al anterior, con formación de una imina que rápidamente se hidroliza dando lugar a una amina y a un  $\alpha$ -ceto ácido.

Para el caso de la descomposición N-halo-dipéptidos, la reacción sigue un mecanismo semejante al de los N-halo- $\alpha$ -amino ácidos, esto es mediante un proceso  $A_{\text{N}}D_{\text{H}}D_{\text{N}}$ ,<sup>77,78</sup> pero en este caso el estado de transición es tipo reactivos.<sup>77,78</sup> La modificación del estado de transición es muy diferente como



Parte I - Halogenación

se ve en la figura 2.12. La presencia del enlace peptídico hace el proceso de eliminación sea más rápido que para los N-halo-aminas y aminoácidos y que la hidrólisis de la imina derivada de los N-halo-dipéptidos sea más lenta que las iminas correspondientes a los N-halo-aminas y aminoácidos.

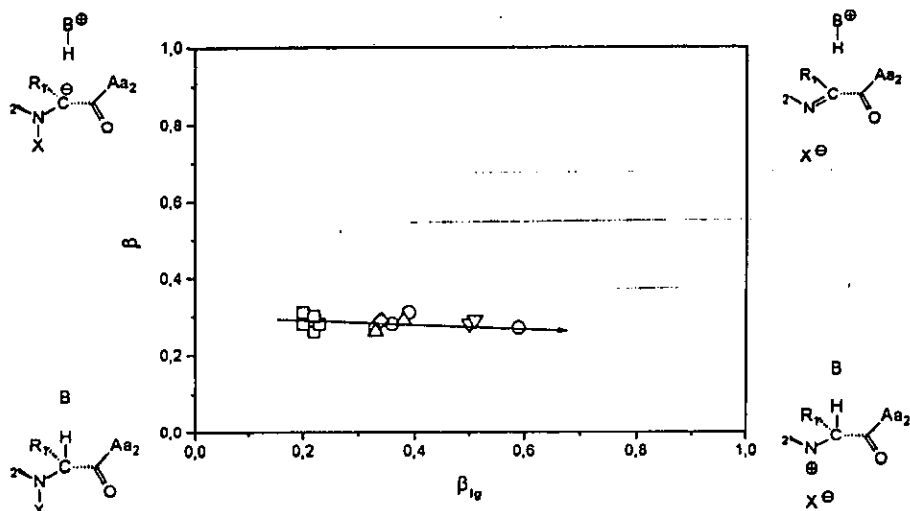
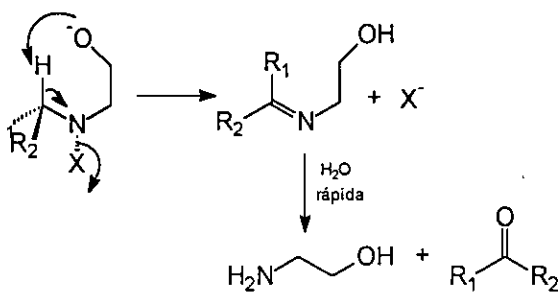
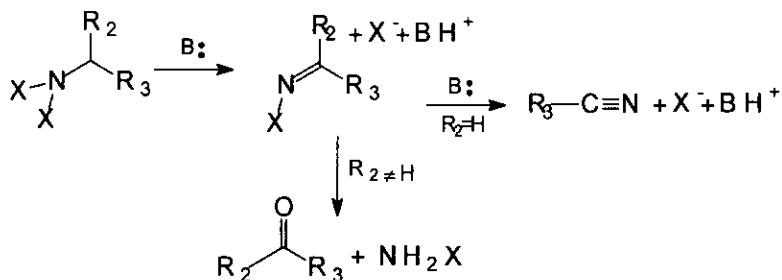


Figura 2.12 (tomada de la referencia)<sup>78</sup>

La descomposición de N-Cl-amino alcoholes tiene lugar mediante un proceso de eliminación intramolecular.<sup>79</sup>



No existen estudios mecanicistas sistemáticos acerca de la descomposición de N,N-dihalo-compuestos. Los mecanismos propuestos sugieren la existencia de dos procesos consecutivos de deshidrohalogenación, como intermedio se propone la formación de una N-halo-imina.<sup>33</sup>

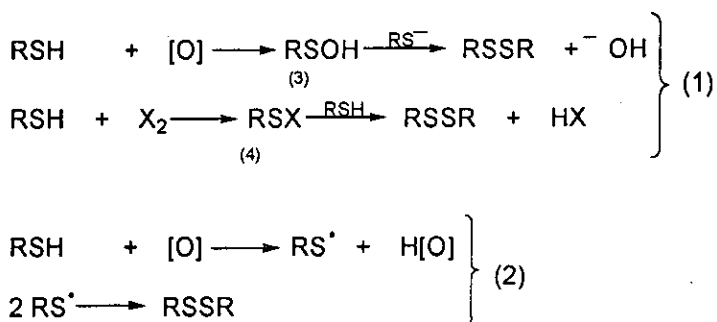


Esta N-halo-imina puede dar lugar a una nueva reacción de eliminación generándose el correspondiente derivado ciano, o bien puede hidrolizarse dando lugar a un compuesto carbonílico y  $\text{NH}_2\text{X}$ .<sup>13</sup>

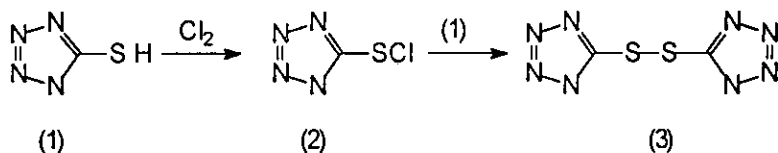
## 2.5. Cloración de S-compuestos.

En la mayoría de los trabajos en los que se estudia el uso de halogenantes como oxidantes de compuestos de azufre, tales como: aminoácidos que contienen azufre, péptidos,<sup>80-83</sup> tioles,<sup>84</sup> sulfuros,<sup>81,85-94</sup> sulfóxidos,<sup>81,95-98</sup> sulfonas,<sup>81</sup> etc, no se incluyen estudios mecanicistas del proceso, siendo reseñable el hecho de que se propongan a los haluros de sulfenilo y a cationes halosulfonio como intermedios, sin evidencias cinéticas que los justifiquen.<sup>11,91,99-103</sup> Los haluros de sulfenilo son fácilmente atacados por nucleófilos así en presencia de mercaptanos pueden generar el correspondiente disulfuro<sup>104</sup>; son además inestables en disolución.<sup>14</sup>

Los tioles son rápidamente oxidados a su correspondiente disulfuro, por oxígeno, halógenos o sales de Fe(III). Según se muestra en el siguientes esquema, el mecanismo de oxidación puede ser polar (1) o a través de radicales (2). El mecanismo polar probablemente implique un intermedio sulfénico (3) y (4).<sup>105</sup>



La oxidación de feniltetrazoletiol (1) por cloro da lugar a la formación del cloruro de sulfenilo correspondiente (2), que en presencia de tiol(1) reacciona generando bis(feniltetrazolil)disulfuro (3).<sup>106</sup>



Davies y col. sugieren el papel de los cloruros de sulfenilo de un amplio número de tioles como intermedios de la formación de radicales tiolo. La detección de estos radicales requiere la reacción bimolecular de HOCl con los grupos tiol libres.<sup>11</sup>

El glutatión (GSH) reacciona muy rápidamente con HOCl, probablemente vía formación del un derivado GSCl inestable.<sup>43</sup> En las células rojas humanas, el GSH es oxidado a glutatión disulfuro (GSSG); por lo tanto el GSH probablemente actúa como protector de las células contra la toxicidad del HOCl.<sup>107</sup>

Vissers y col. expusieron las células rojas humanas a bajas dosis de ácido hipocloroso, produciéndose la pérdida de GSH intracelular. La desaparición de GSH precede a la oxidación de los tioles de la membrana, la formación de cloraminas. El GSH perdido se convierte en GSSG. Estos autores indican que en células metabólicamente activas el GSH se recupera, así que podría actuar como protector de los componentes de las células frente al daño por HOCl.<sup>108</sup>

Winterbourn y col. han estudiado la cloración de GSH por HOCl, encontrando como productos de oxidación junto a GSSG, glutatión tiosulfonato (GSO<sub>2</sub>SG) y la sulfonamida correspondiente. Estos autores proponen el siguiente mecanismo.

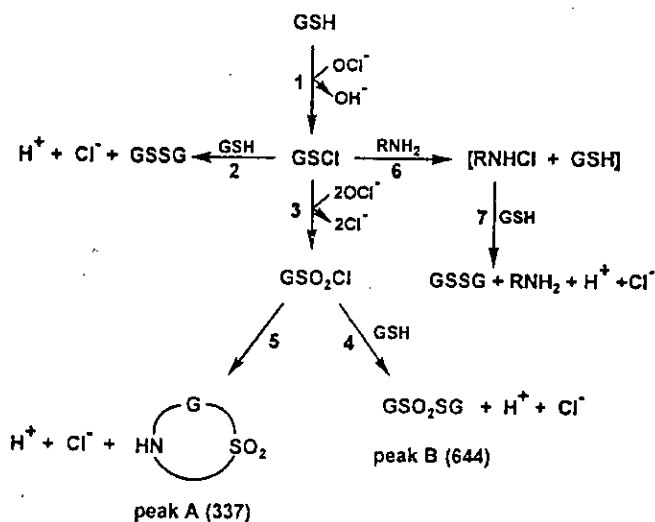


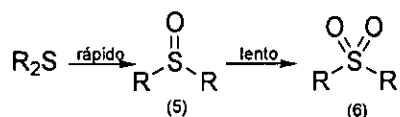
Figura 2.13 (tomada de la publicación)

Suponen la rápida formación de cloruro de sulfenilo (GSCI), que reacciona preferentemente con más GSH para dar lugar a GSSG.<sup>109</sup> En un trabajo posterior Pullar y col. obtienen como producto mayoritario de la oxidación de GSH por HOCl, en células endoteliales, la correspondiente sulfonamida cíclica, observando un incremento muy pequeño de GSSG y ácido glutatión sulfónico tanto en el medio extra como en el intracelular<sup>110</sup>.

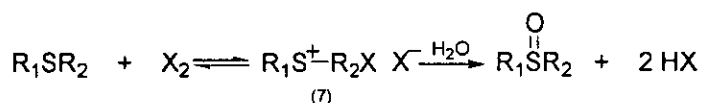
Lindvall y col. han estudiado la influencia de los tioles sobre la capacidad clorante del sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>. Para los tioles estudiados, cisteamina [HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>], cisteína, metionina, penicilamina [HSC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH], encontraron que el efecto inhibitor es notablemente dependiente de la presencia de grupos -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> en la molécula. La sustitución del grupo -SH en la cisteamina por un grupo -SO<sub>3</sub>H disminuye apreciablemente el grupo inhibitor. Y la metilación del grupo -NH<sub>2</sub> en este mismo compuesto da lugar a una inhibición igual que la de la propia cisteamina, es decir que la basicidad del grupo -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> aumenta la reactividad del grupo -SH.<sup>111</sup>

Los sulfuros son fácilmente oxidados por electrófilos; en el proceso de oxidación, el azufre utiliza sus orbitales d dando lugar a compuestos de azufre hipervalentes. El producto de oxidación es el sulfóxido (5) cuya posterior oxidación puede dar lugar a la correspondiente sulfona (6).<sup>105</sup>

Parte I - Halogenación

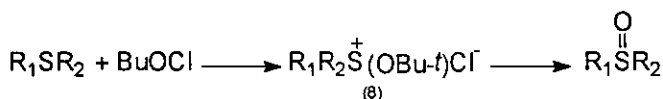
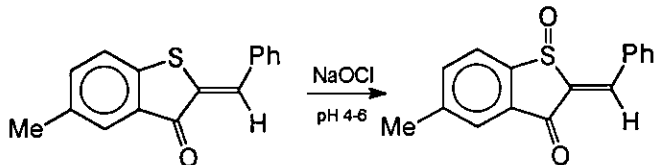


La oxidación de sulfuros es el procedimiento que suele utilizar para la obtención de sulfóxidos. La oxidación se puede realizar mediante halógeno molecular o compuestos que contengan halógenos "electropositivos".<sup>112</sup> Para la oxidación con halógeno molecular se propone como intermedio la formación de sales de halosulfonio (7),<sup>113</sup> que rápidamente se hidrolizarían para dar lugar a la formación del sulfóxido.

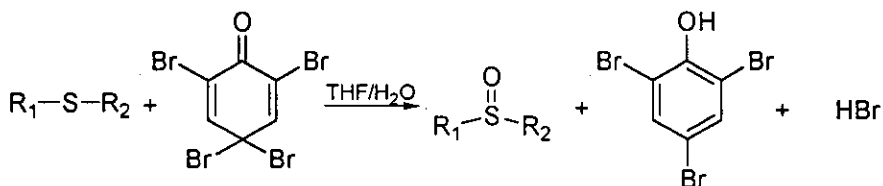


Otros de los oxidantes utilizados son:

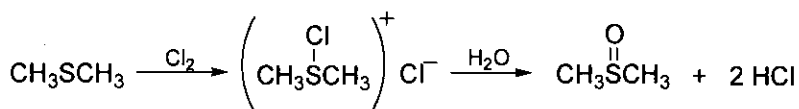
- El hipoclorito inorgánico NaOCl y el *t*-butil hipoclorito. Para este último se propone como intermedio la formación de la sal de alcoxisulfonio (8) que rápidamente se descompone. Los productos finales en ambos casos son los sulfóxidos correspondientes.<sup>94,112</sup>



- 2,4,4,6-tetrabromo ciclohexadiona.<sup>112</sup>

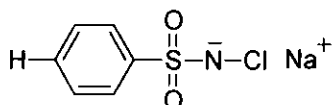


Bennett y col. estudiaron la cloración de dimetilsulfuro en presencia de agua, encontrando como producto principal el dimetilsulfóxido.<sup>91</sup>

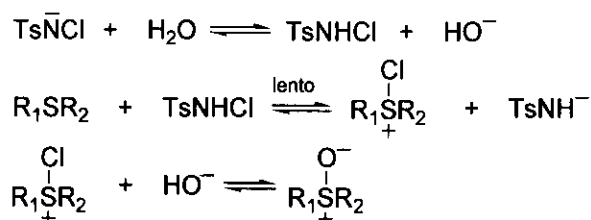


Los autores proponen la formación muy rápida del catión clorosulfonio como intermedio que rápidamente se hidroliza para dar lugar al dimetilsulfóxido.

Otro de los posibles halogenantes que se han utilizado para generar sulfóxidos a partir de sulfuros en la Cloramina T.<sup>114,115</sup>



La reacción es de segundo orden, y la correlación de Hammett muestra que los sulfuros actúan como nucleófilos. La etapa determinante para el mecanismo propuesto supone la formación de un intermedio clorosulfonio.<sup>114</sup>



Tsan ha estudiado la oxidación de metionina (Met) por  $\text{ClO}^-$  generado mediante el sistema  $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ , encontrando como producto de oxidación metionina sulfóxido (MetSO).<sup>116</sup>

La Met es uno de los aminoácidos más fácilmente oxidables, junto con la cisteína (Cys) y el triptófano, constituyentes de las proteínas. Es atacado por radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ), hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), cloraminas, todos oxidantes producidos *in vivo*. Numerosas proteínas pierden su actividad por la oxidación de Cys y Met.<sup>117,118</sup> El producto resultante de su oxidación es la MetSO que puede ser reducido de nuevo a Met por acción de un enzima (Met sulfóxido reductasa), y a su vez puede oxidarse para dar lugar a la metionina sulfona ( $\text{MetSO}_2$ ), si bien este último paso requiere condiciones más drásticas siendo además biológicamente irreversible. Raramente se encuentra  $\text{MetSO}_2$  en los sistemas biológicos.<sup>117</sup>

Garner y col. han estudiado el estado de oxidación de Met y Cys, en pacientes normales y con cataratas, encontrando que en ojos con cataratas severas el 60% o más de la Met se encontraba como MetSO principalmente,

aunque también encontró  $\text{MetSO}_2$  como producto de oxidación, si bien en una cantidad muy baja respecto al sulfóxido. La mayoría de la Cys se encuentra como cistina ( $\text{Cys}^+\text{Cys}$ ) e incluso como ácido cisteico (Cya).<sup>119</sup> Estos autores indican que la reacción puede ser debida a la presencia de sistemas enzimáticos ( $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$ ) o bien tratarse de un proceso fotoquímico.

Los tioles de bajo peso molecular, tales como GSH, y aminoácidos que contienen azufre, Cys,  $\text{Cys}^+\text{Cys}$ , Met en proteínas son el principal blanco del HOCl. Los residuos de Cys son rápidamente transformados por HOCl a ácido sulfónico y  $\text{Cys}^+\text{Cys}$ ,<sup>120</sup> mientras que los residuos de metionina son oxidados a sulfóxido.<sup>121</sup>

Peskin y col. han estudiado la cloración por clorotaurina de varios tioles y metionina, encontrando que la velocidad de reacción en el caso de los tioles depende del  $\text{pK}_a$  del grupo  $-\text{SH}$ ; serán más activos, pues, los tioles que estén ionizados.

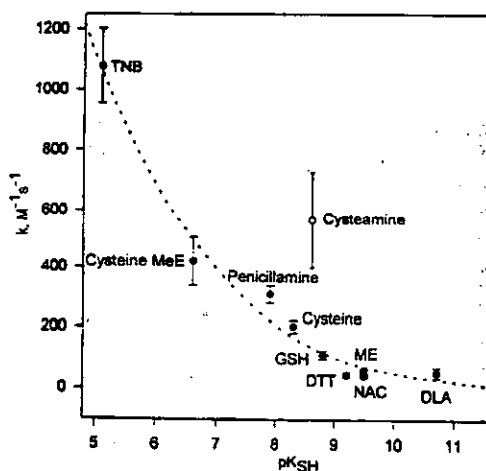


Figura 2.14

De lo anterior se sigue que las proteínas con grupos funcionales tiol con bajo  $\text{pK}$  podrían estar favorecidas frente al ataque por cloraminas.<sup>103</sup>

Se ha señalado como mecanismo de oxidación (ver figura 2.15) de metionina por clorotaurina la formación del catión clorosulfonio, que a continuación se hidroliza para dar lugar al sulfóxido correspondiente, y para los tioles a través de la formación del cloruro de sulfenilo<sup>103</sup>, tal y como se ha

propuesto en trabajos en donde estos compuestos son oxidados usando como compuesto halogenante HOCl.<sup>14</sup>

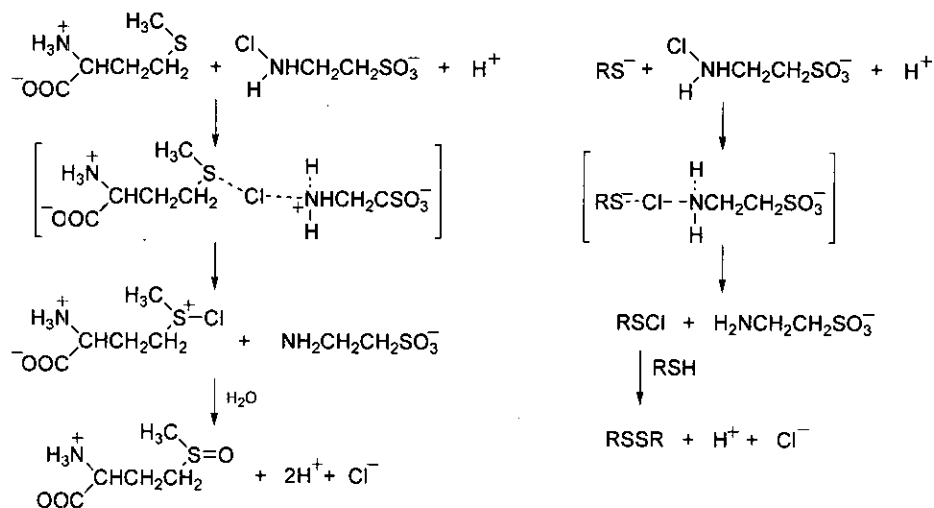


Figura 2.15 (tomada de la bibliografía)<sup>103</sup>



## 2.6. Bibliografía.

- (1) Antelo, J. M.; Arce, F.; Calvo, P.; Crugeiras, J.; Ríos, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2000**.
- (2) White, G. C. *Handbook of chlorination and alternative disinfectants*; 3th ed.; Van Nostrand Reinhold: New York, 1992.
- (3) Stumm, W.; Morgan, J. J. *Aquatic Chemistry. Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*; 3rd edition ed.; John Wiley & Sons: New York, 1996.
- (4) Jolley, R. L.; Condie, L. W.; Johnson, J. D.; Katz, S.; Minear, R. A.; Maticce, J. S.; Jacobs, V. A. In *Water Chlorination: Chemistry, Environmental and Health Effects*; Lewis Publishers: Michigan, 1990; Vol. 6.
- (5) Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. *Redox Report* **1997**, *3*, 3-15.
- (6) Weiss, S. J.; Klein, R.; Slivka, A.; Wei, M. *J. Clin. Invest.* **1982**, *70*, 598-607.
- (7) Arotzky, J.; Symons, M. C. R. *Quart. Rev. Chem. Soc.* **1962**, *16*, 282-297.
- (8) Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry*; 4th edition ed.; John Wiley & Sons: New York, 1986.
- (9) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Gazz. Chim. Ital.* **1994**, *124*, 519.
- (10) Schraufstätter, I. U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H. *Journal of Clinical Investigation* **1990**, *85*, 554-562.
- (11) Davies, M. J.; Hawkins, C. L. *Free Rad. Res.* **2000**, *33*.
- (12) Morris, J. C. *Water chlorination. Environmental Impact and Health Effects*; Ann. Arbor. Science: Michigan. Estados Unidos., 1983; Vol. 4.
- (13) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 453-460.
- (14) Armesto, X. L.; Canle, M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **2000**, 1103-1109.
- (15) Morris, J. C. In *Modern Chemical Methods in Water and Wastewater Treatment. International Course in Sanitary Engineering*.

International Institute for Hydraulic and Environmental Engineering. Delft, Holanda, 1978.

- (16) Weil, I.; Morris, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1664-1671.
- (17) Isaac, R. A.; Morris, J. C. *Env. Sci. Technol* **1983**, *17*, 738-742.
- (18) Margerum, D. W.; Gray, E. T.; Huffman, R. P. In *Organometals and Organometalloids Occurrence and Fate in the Environment. ACS Symposium Series*; Brickman, F. E., Bellama, J. M., Eds.; American Chemical Society: Washington DC, 1978; Vol. 82, p 278-291.
- (19) Yoon, J.; Jensen, J. N. *Environ. Sci. Tech.* **1993**, *27*.
- (20) Snyder, M. P.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 2545-2550.
- (21) Thomas, E. L.; Grisham, M. B.; Jefferson, M. M. *J. Clin. Invest.* **1983**, *72*, 441-454.
- (22) Cantin, A. *J. Clin. Invest.* **1994**, *91*, 606-614.
- (23) *Taurine and neurological disorders*; Barbeau, A.; Huxtable, R. J., Eds.; Raven Press: New York, 1978.
- (24) *Taurine biological actions and clinical perspectives*; Oja, S. S.; Kontro, P.; Ahtee, L.; Paasonen, M. K., Eds.; Allan R. Liss, Inc.: New York, 1985.
- (25) Lombardini, J. B.; Schaffer, S. W.; Azuma, J., Eds., 1992; Vol. 315.
- (26) *Sulfur amino acids: Biochemical and clinical aspects*; Kuriyama, K.; Huxtable, R. J.; Iwata, H., Eds.; Allan R. Liss, Inc: New York, 1985.
- (27) Huxtable, R. J. *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 101-163.
- (28) Trachtman, H.; Futterweit, S.; Bienkowski, R. S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *191*, 759-765.
- (29) Thomas, E. L.; Grisham, M. B.; Melton, D. F.; Jefferson, M. M. *The Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 3321-3329.
- (30) Marquez, L. A.; Dunford, H. B. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 7950-7956.
- (31) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M.V.; Ramos, D. R.; Santaballa, J. A., En proceso de publicación.
- (32) Prütz, W. A.; Kissner, R.; Koppenol, W. H. *Archives of biochemistry and biophysics* **2001**, *393*(2).

- (33) Fox, T. C.; Keefe, D. J.; Scully, F. E.; Laikter, A. *Environ. Sci. Tech.* **1997**, *31*, 1979.
- (34) Gazda, M.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*.
- (35) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275-284.
- (36) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Rodríguez, S.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 608-612.
- (37) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 521-530.
- (38) Carr, A. C.; van der Berg, J. M.; Winterbourn, C. C. *Archives of biochemistry and biophysics* **1996**, *332*, 63-69.
- (39) Andrews, P. C.; Krinsky, N. I. *Methods in Enzymology* **1986**, *132*, 369-378.
- (40) Thomas, E. L.; Grisham, M. B.; Jefferson, M. M. *Methods in Enzymology* **1986**, *132*, 585-593.
- (41) Weiss, S. J.; Lampert, M. B.; Test, S. T. *Science (Wash. D. C.)* **1983**, *222*, 625-628.
- (42) Nickelsen, M. G.; Nweke, A.; Scully Jr, F. E.; Ringhand, H. P. *Chem. Res. Toxicol.* **1991**, *4*, 94-101.
- (43) Prütz, W. A. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* **1996**, *332*, 110-120.
- (44) Yoshimura, Y.; Hoshino, H.; Uchiyama, K.; Watanabe, T.; Imaeda, K.; Ohsawa, K.; Kuroda, S. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1995**, *18*.
- (45) Cantin, A.; Woods, D. E. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, January, 38-45.
- (46) Thomas, E. L.; Jefferson, M. M.; Bennett, J. J.; Learn, D. B. *Mutat. Res* **1987**, *188*, 35.
- (47) Morris, J. C. In *Principles and Applications of Water Chemistry*, Faust, S. D., J.V.Hunter, Eds.; John Wiley & Sons: N.Y., 1967, p 23-53.
- (48) Antelo, J. M.; Arce, F.; Crugeiras, J.; Franco, J.; Rodríguez, P.; Varela, A. *Int. J. Chem. Kin.* **1989**, *21*.
- (49) Antelo, J. M.; Arce, F.; Parajó, M.; Rodríguez, P.; Varela, A. *Int. J. Chem. Kin.* **1992**, *24*.
- (50) Grob, C. A. *Angewandte Chemie International Edition.* **1969**, *8*, No. 8., 535-546.

- (51) Guthrie, R. D.; Jencks, W. P. *Accounts of Chemical Research* **1989**, *22*, 343-349.
- (52) Hand, V. C.; Synder, M. P.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4022.
- (53) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, P.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2265.
- (54) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4659.
- (55) Canle López, M. Tesis doctoral, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1994.
- (56) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, *9*, 552-560.
- (57) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1993**, *25*, 331.
- (58) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Gamper, A. M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10509-10520.
- (59) Andrés, J.; Queralt, J. J.; Safont, V. S.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 3561-3568.
- (60) Queralt, J. J.; Andrés, J.; Canle L., M.; Cobas, J. H.; Santaballa, J. A.; Sambrano, J. R. *Chemical Physics* **2002**, (en imprenta).
- (61) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Ramos, D. R.; Santaballa, J. A., En proceso de publicación.
- (62) Dewar, M. J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*.
- (63) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Trans. Faraday Soc.* **1938**, *34*.
- (64) Jencks, W. P. *Chemical Reviews* **1985**, *85*, 511.
- (65) O'Ferrall, R. A. M. *J. Chem. Soc. B* **1970**, 274.
- (66) Thornton, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2915.
- (67) Jencks, W. P. *Chemical Reviews.* **1972**, *72*, No. 6., 705-718.
- (68) Jencks, W. P.; Gilbert, H. F. *Journal of the American Chemical Society.* **1977**, *99*:24, 7931-7947.
- (69) Brønsted, J. N.; Pedersen, K. J. *Z. Phys. Chem.* **1924**, *108*, 185.
- (70) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1041-1053.

- (71) Abia Aguila, L. Tesis doctoral, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1993.
- (72) Hoffman, R. V.; Bartsch, R. A.; Cho, B. R. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 211.
- (73) Meng, Q.; Thibblin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1224.
- (74) Rodríguez, S. Tesis de licenciatura, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1996.
- (75) Fernández, I. Tesis de licenciatura, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1996.
- (76) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Fernández, I.; Rodríguez, S.; Losada, M.; Santaballa, J. A. In *36th IUPAC Congress.*; Chimia.: Geneva, Switzerland, 1997; Vol. 51, No. 7., p 498.
- (77) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12615-12620.
- (78) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Rodríguez, S.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5692-5700.
- (79) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Carretero, P.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2565-2572.
- (80) Cuq, J. L.; Aymard, C.; Cheftel, C. *Food. Chem.* **1978**, *2*, 309-314.
- (81) Young, P. R.; Till, M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, No. 8., 1416-1418.
- (82) Winterbourn, C. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *840*, 204-210.
- (83) Dudina, Y. I.; Formazyuk, V. Y.; Sergiyenko, V. I.; Gorshkova, T. N. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* **1995**, 31-33.
- (84) Field, L. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p chap. 7.
- (85) Schank, K. In *The syntheses of sulphones, sulphoxides and cyclic sulphides*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York (U.S.A.), 1994, p Chap. 1.
- (86) Weber, J. V.; Schneider, M.; Salami, B.; Paquer, D. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas.* **1986**, *105/3*, 99-102.
- (87) Grossert, J. S.; Hardstaff, W. R.; Langler, R. F. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 421-426.

- (88) Harville, R.; Samuel F. Reed, J. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3976-3977.
- (89) Skattebøl, L.; Boulette, B.; Solomon, S. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3111-3114.
- (90) Higuchi, T.; Gensch, K. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3874.
- (91) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; McGregor, W. S. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2485.
- (92) Benes, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1171.
- (93) Kwart, H.; Miller, R. K. *Journal of American Chemical Society.* **1956**, *78*, 5008-5011.
- (94) Montanari, F.; Cinquini, M. **1968**, *3*, 121.
- (95) Oae, S. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chapter 8.
- (96) Truce, W. E.; Klingler, T. C.; Brand, W. W. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chap. 10.
- (97) Mahadevappa, D. S.; Ananda, S.; Murthy, A. S. A.; Rangappa, K. *S. Tetrahedron* **1984**, *40*, 1673-1682.
- (98) Ganapathy, K.; Jayagandhi, P. *International Journal of Chemical Kinetics.* **1983**, *15*, 129-139.
- (99) Böhme, H.; Fischer, H.; Grank, R. *Justus Liebigs Ann. Chem* **1949**, 563, 54.
- (100) Böhme, H.; Boll, E. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1957**, 290, 17.
- (101) Magee, P. S. In *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*, Senning, A., Ed.; Marcel Dekker: New York (U.S.A.), 1971; Vol. 1.
- (102) Russ, C. R.; Doublas, I. B. In *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*, Senning, A., Ed.; Marcel Dekker: New York (U.S.A.), 1971; Vol. 1.
- (103) Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. *Free Radical Biology & Medicine* **2001**, *30*, No.5.
- (104) Capozzi, G.; Modena, G., p 785-839.
- (105) Cremlyn, R. J. *An Introduction to Organosulfur Chemistry*, John Wiley & Sons: Chichester (England), 1996.
- (106) Akhmetov, M. A.; Movchan, A. I.; Yarkova, E. G.; Chmutova, G. A. *Russ. J. Org. Chem.* **1998**, 34(5).

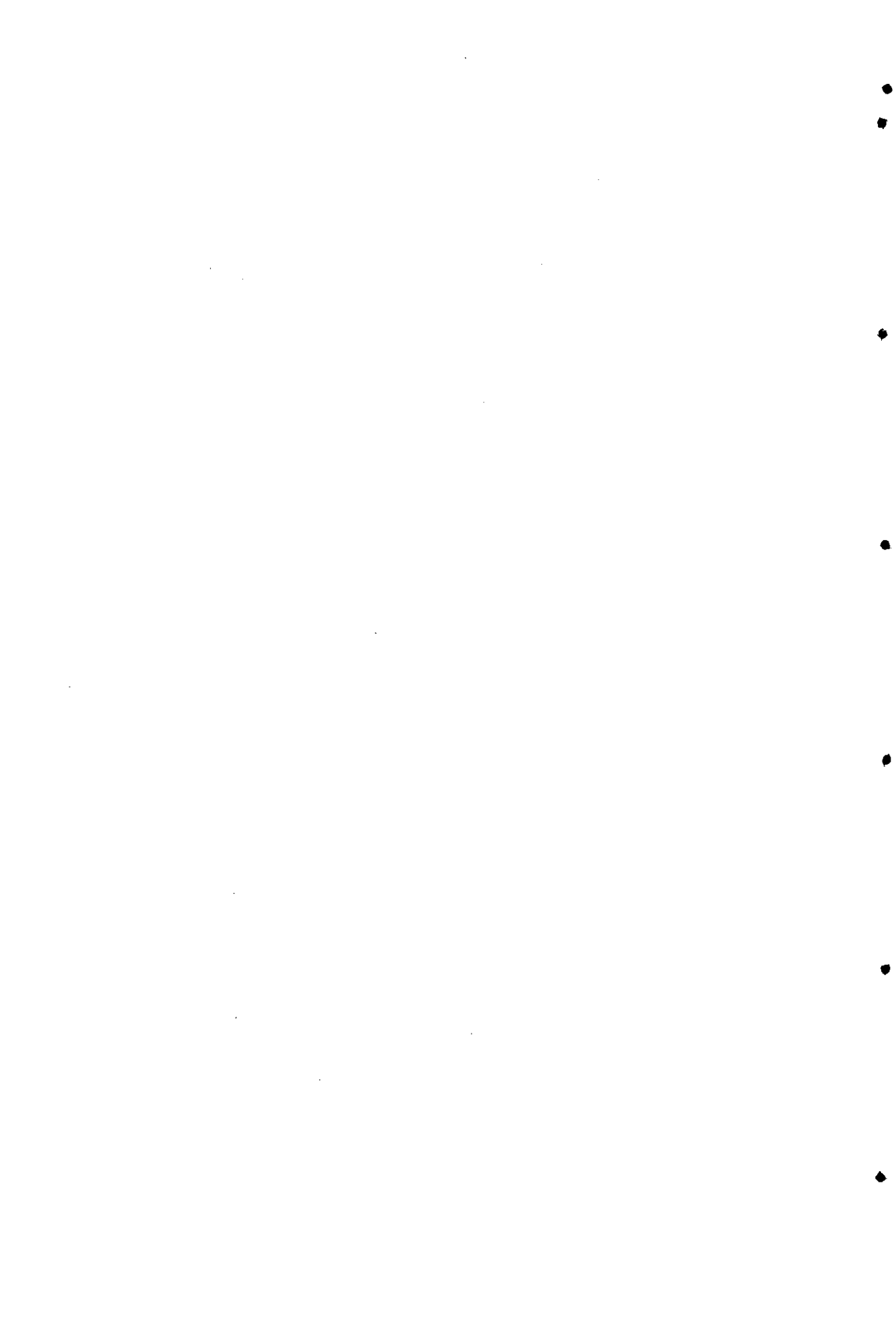
Parte I - Halogenación

- (107) Harlan, J. M.; Levine, J. D.; Callahan, K. S.; Schwartz, B. R. *J.Clin.Invest.* **1984**, *73*, 706-713.
- (108) Vissers, M. C. M.; Winterbourn, C. C. *Biochem. J.* **1995**, *307*, 57-62.
- (109) Winterbourn, C. C.; Brennan, S. O. *Biochem. J.* **1997**, 326.
- (110) Pullar, J. M.; Vissers, M.; Winterbourn, C. C. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*(25).
- (111) Lindvall, S.; Rydell, G. *Chemico-Biological Interactions* **1995**, *97*, 53-62.
- (112) Capozzi, G.; J.Drabowicz; Kielbasinski, P.; Mikolajczyk, M.; Menichetti, S.; Nativi, C.; Schank, K.; Schott, N.; Zoller, U. In *The Chemistry of Functional Groups.*; Rappoport., S. P. a. Z., Ed.; An Interscience Publication.: Jerusalem, 1994, p 40.
- (113) Marino, J. P. In *Topics in Sulfur Chemistry.*; Senning, A., Ed.; Georg Thieme Publishers Stuttgart.: 1976; Vol. 1, p 48-107.
- (114) Campbell, M. M.; Johnson, G. *Chemical Reviews* **1978**, *78*, 65-79.
- (115) Padma, D. K.; Shaw, R. A.; Vasudeva Murthy, A. R.; Woods, M. *Int. J. Sulfur Chem., A* **1971**, *1*.
- (116) Tsan, M.-F. *Journal of Cellular Physiology.* **1982**, *111*, 49-54.
- (117) Vogt, W. *Free Radical Biology & Medicine* **1995**, *18*, 93-105.
- (118) Naskalski, J. W. *Ann. Biol. Clin.* **1994**, *52*, 451-456.
- (119) Garner, M. H.; Spector, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1980**, *77*, 1274-1277.
- (120) Drozd, R.; Naskalski, J. W.; Sznajd, J. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1988**, *957*, 47-52.
- (121) Maier, K.; Leuschel, L.; Costabel, U. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *143*, 271-274.





### 3. Experimental

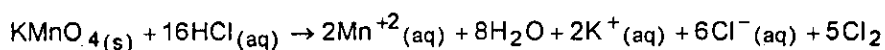


En este capítulo se recoge, la preparación de reactivos así como el instrumental utilizado para llevar a cabo el trabajo.

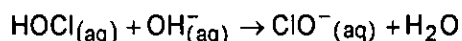
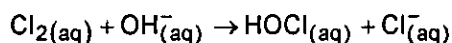
### 3.1. Reactivos.

#### 3.1.1. Hipoclorito sódico.

El hipoclorito sódico se obtuvo haciendo gotear ácido clorhídrico concentrado desde un embudo de presión compensada, sobre un balón de dos bocas en donde hay permanganato potásico para formar cloro. La reacción que tiene lugar es la siguiente:



El gas liberado pasa primero por un frasco lavador que contiene ácido sulfúrico concentrado, y a continuación se recoge en otro frasco lavador que contiene una disolución de hidróxido sódico aproximadamente  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , en donde tienen lugar las siguientes reacciones



La disolución de hipoclorito sódico así preparada, se conserva en la oscuridad y en la nevera. La concentración de hipoclorito se determina espectrofotométricamente por medición de la absorbancia a 292 nm, y sabiendo que a esta longitud de onda el coeficiente de absortividad molar es  $350 \pm 2 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$  para valores de  $\text{pH} > 12$ .<sup>1</sup>

Los reactivos utilizados fueron:

- NaOH Merck, calidad *p.a.*
- HCl Merck, calidad *p.a.*
- $\text{KMnO}_4$  Panreac, calidad *p.a.*

#### 3.1.2. (N-Cl)-Taurina.

Como agente halogenante también se utilizó (N-Cl)-Taurina. Este compuesto se generó en el momento de su utilización a partir de disoluciones de taurina y HOCl, ambas a pH 9, preparadas a partir de disoluciones acuosas de estos compuestos a las que se le añadieron  $\text{NaOH}(\text{aq})$  y  $\text{HCl}(\text{aq})$  respectivamente hasta

alcanzar ese pH. Se mezclaron los volúmenes apropiados de estas disoluciones de modo que la relación Tau:HOCl sea 1:1 estrictamente. También se trabajó en condiciones en las que la Taurina estaba en exceso respecto al halogenante.

Se verificó la estabilidad de la (N-Cl)-Taurina espectrofotométricamente, comprobando que esas condiciones de pH ese (N-Cl)-compuesto es estable durante varios días y que no quedaban residuos de HOCl/CLO<sup>•</sup>.

### 3.1.3. Disolución de aminoácidos.

Las disoluciones de aminoácidos, preparadas por pesada directa del producto comercial y disolución directa en agua, se almacenaban en el frigorífico durante varios días. Debido a la inestabilidad de sus disoluciones acuosas a los valores de pH resultantes de la disolución, en el caso de la cistina fue necesario modificar el pH, se llevó a pH~9 añadiendo NaOH<sub>(aq)</sub>.

Las disoluciones de Cys, GSH, Cys^Cys y GSSG en medio alcalino no son estables, oxidándose tras varios días en estas condiciones.

A continuación se indican los aminoácidos empleados.

▪ L-Cisteína	Sigma	>99%
▪ L-Cistina	Sigma	>99%
▪ L-Metionina	Merck (para bioquímica)	>99%
▪ DL-Metionina sulfóxido	Aldrich	>99%
▪ DL-Metionina sulfona	Sigma	>99%
▪ L-Ácido cisteico	Sigma	98%
▪ Taurina	Aldrich	99%
▪ Glutation	Sigma	mínimo 98%
▪ Glutation, oxidado	Sigma	aprox. 98%

Los productos utilizados fueron de la mayor pureza comercialmente disponible, y se utilizaron sin posterior purificación.

### 3.1.4. Disoluciones de electrolito inerte.

Las disoluciones fueron preparadas por pesada directa del producto comercial. Se utilizaron para mantener la fuerza iónica constante los siguientes productos

## Parte I - Halogenación

- KCl Merck, calidad *p.a.*
- NaClO<sub>4</sub> Merck, calidad *p.a.*
- NaCl Merck, calidad *p.a.*

### 3.1.5. Disoluciones reguladoras.

Para cubrir el intervalo de pH en el que se trabajó, se hizo necesaria la utilización de diferentes disoluciones reguladoras.

Los reactivos empleados fueron

- Hidróxido sódico Merck, calidad *p.a.*
- 2,2,2-trifluoroetanol Aldrich, 99%
- 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol Sigma, 99%
- Hidróxido potásico Merck, calidad *p.a.*
- Hidrógeno carbonato sódico Merck, calidad *p.a.*
- Dihidrógeno fosfato potásico Merck, calidad *p.a.*

Las disoluciones se prepararon por pesada directa de los reactivos anteriores.

### 3.1.6. Otros reactivos.

El agua empleada en todos los casos se obtuvo de un bidestilador Aquatron A4D.

Para las valoraciones ácido-base se utilizó hidróxido sódico, hidróxido potásico y ácido clorhídrico todos ellos Merck, calidad *p.a.*. Se empleó como patrón primario en la valoración de las disoluciones de NaOH, biftalato potásico Merck calidad *p.a.*, y para valorar las disoluciones de HCl, se usó la disolución valorada de NaOH.

## 3.2. Equipos.

### 3.2.1. Espectrofotómetros Vis-UV.

El seguimiento de las reacciones de descomposición de sulfóxido (*N*-Cl)-metionina, sulfona (*N*-Cl)-metionina y ácido (*N*-Cl)-cisteico, se hizo mediante espectrofotometría UV-Vis, para lo que se utilizaron los equipos: Beckman DU-70 y Uvikon 941. El primero es de un solo haz y el otro de doble haz. Ambos disponen de un carro portacubetas termostatzable con capacidad para seis

## Experimental

cubetas. Los dos están conectados a termostatos lo que permite regular la temperatura en  $\pm 0.1^\circ\text{C}$

Las cubetas empleadas son de cuarzo de forma prismática de 1 cm de camino óptico y 3.5 mL de capacidad, y se mantenían cerradas durante la realización de las medidas con tapones de teflón.

Las reacciones de formación se siguieron utilizando un espectrofotómetro de flujo detenido modelo SF-61 y otro de mezclado múltiple modelo SF-61X, ambos marca Hi-Tech Scientific equipados con sistemas de termostatación.

Todos estos equipos disponen de un sistema de recogida de datos así como la posibilidad de transformar los datos obtenidos al formato ASCII, lo que permite posteriormente emplear distintos programas informáticos para el ajuste matemático de los datos experimentales. Programas que utilizan métodos de optimización no lineal de Levenberg-Marquardt (apartado 4.2)

### 3.2.2. Determinaciones potenciométricas.

#### 3.2.2.1. Medida de pH.

Para medir el pH se utilizó un pH-metro Hanna Instruments HI 9318 y un electrodo combinado de vidrio HI 76405. Para calibrar el electrodo se utilizaron disoluciones reguladoras de la marca Crison de  $\text{pH}=7.02\pm 0.01$  a  $25^\circ\text{C}$  (tampón fosfato) y otra de  $\text{pH}=4.00\pm 0.01$  a  $25^\circ\text{C}$  (tampón ftalato).

Cuando para controlar la fuerza iónica el electrolito empleado era  $\text{NaClO}_4$ , se utilizó  $\text{NaCl}$  como electrolito de relleno en el electrodo de referencia, evitando así la precipitación de  $\text{KClO}_4$  en el puente salino

En las reacciones en que intervienen alcóxidos, la concentración del mismo en la mezcla de reacción se determina mediante la expresión

$$[\text{B}] = \frac{[\text{B}]_{\text{total}}}{1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})}}$$

donde  $[\text{B}]$  y  $[\text{B}]_{\text{total}}$  son las concentraciones de ión alcóxido y total de alcohol respectivamente, y el  $\text{pK}_a$  es el  $\text{pK}_a$  del alcohol.

3.2.2.2. Determinación de  $\text{Cl}^-$  empleando un electrodo selectivo de iones cloruro.

La concentración de iones cloruro se cuantificó empleando un electrodo selectivo de cloruro Ingold y un electrodo de referencia Crison conectados al pH-metro antes mencionado.

Se utilizó como electrolito una disolución de  $\text{KNO}_3$  (Merck, calidad *p.a.*)  $1.0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , para el electrodo de referencia.

Para controlar la fuerza iónica se utilizó una disolución de  $\text{NaNO}_3$  (Merck, calidad *p.a.*)  $5.0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Todas las disoluciones preparadas, tanto las disoluciones patrón como las muestras, tenían la misma fuerza iónica  $\sim 0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, 298 K, agitación e iluminación para la determinación de  $\text{Cl}^-$  de muestras y disoluciones patrón.

Para la cuantificación previamente se realizó un calibrado, mostrado en la figura 3.1, con cloruro sódico (Merck, calidad *p.a.*). El cloruro sódico se tuvo durante dos horas a  $120^\circ\text{C}$  antes de preparar las muestras patrón.

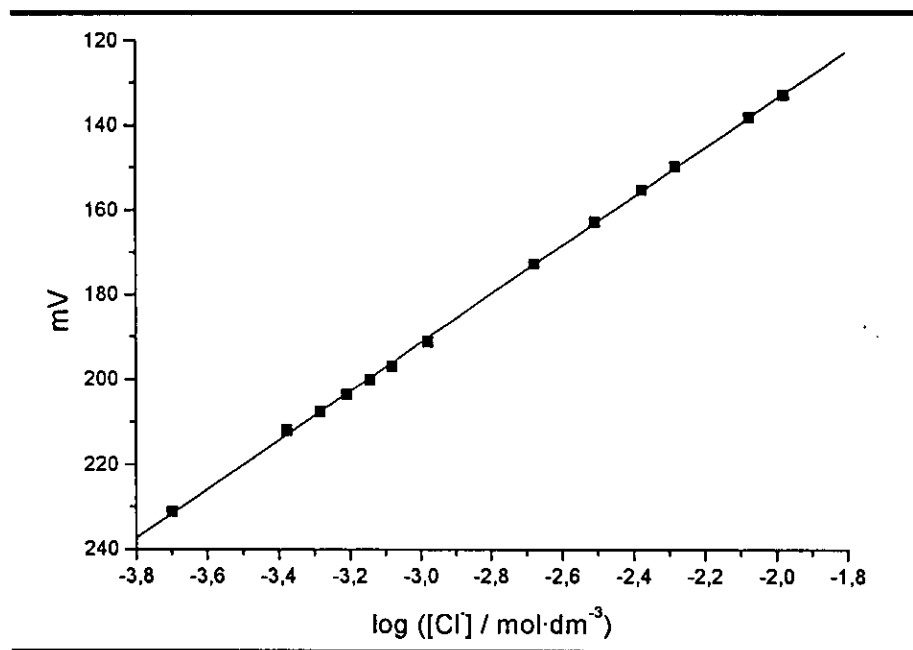


Figura 3.1 Calibrado del electrodo selectivo de iones cloruro.

### 3.3. Preparación de las mezclas de reacción.

#### 3.3.1. Reacciones de descomposición de (N-Cl)-compuestos.

Puesto que los (N-Cl)-compuestos se preparan *in situ*, en la preparación de la muestra de reacción hay que tener en cuenta la velocidad de formación del N-Cl-compuesto, que depende del pH del medio.<sup>2-4</sup> Las condiciones elegidas fueron aquellas en las que se favorecía la formación, en las que la velocidad de reacción era suficientemente alta como para que no hubiera interferencias con la reacción de descomposición objeto de estudio.

Se comprobó que para valores de pH cercanos a 9 la reacción era mucho más rápida que la reacción de interés. Así que el hipoclorito generado tal y como se describe en el apartado 3.1.1 y que se encuentra a un pH >12 se lleva hasta un valor de pH próximo a 9 mediante la adición de ácido clorhídrico; por su parte, al N-compuesto se le añadía hidróxido sódico acuoso para alcanzar ese pH.

En las cubetas se añadía el N-compuesto, el electrolito inerte y el agua necesaria, se homogenizaba y se introducían en el espectrofotómetro para termostatar la mezcla. En el baño termostático se introducían el agente halogenante y la disolución reguladora o hidróxido sódico. Una vez que las disoluciones alcanzaban la temperatura deseada, se añadía primero el agente halogenante, se homogeneizaba rápidamente para evitar un exceso local de halogenante, impidiendo así la formación de N,N-diclorocompuestos; posteriormente se añadía la disolución utilizada para alcanzar el pH de trabajo.

#### 3.3.2. Reacciones de formación de S-Cl-compuestos.

Para estudiar la cloración de los aminoácidos azufrados, se utilizó la técnica de flujo detenido con un sistema de mezcla sencilla, compuesto por dos jeringas, en una de ellas se añadía el S-compuesto y en la otra en agente halogenante, en ambos casos dichas disoluciones contenían las especies apropiadas para fijar el pH y el electrolito inerte necesario para mantener la fuerza iónica constante. Se dejaban el tiempo suficiente para alcanzar la temperatura de trabajo, y a continuación se mezclaban.



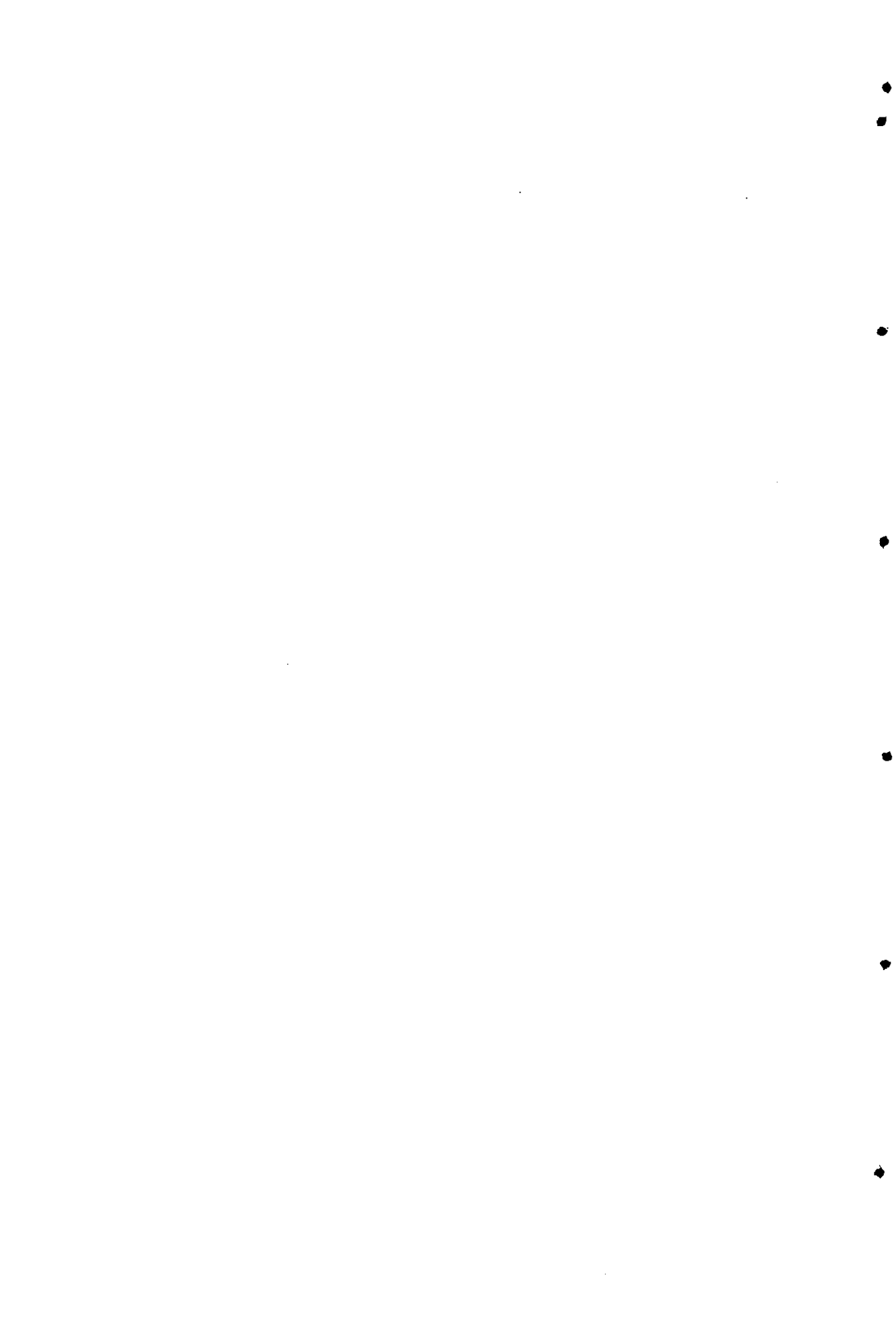
Debido a las velocidades de reacción tan elevadas que se encontraron para los sistemas estudiados, y teniendo en cuenta el tiempo necesario para obtener una mezcla homogénea de las dos disoluciones, se utilizó más pequeño volumen de mezcla que permitiese realizar las medidas en el menor tiempo posible.

Cuando se estudió la reacción de transferencia de Cl desde *N*-Cl-aurina a los *S*-compuestos, el (*N*-Cl)-compuesto se preparaba momentos antes de cada experiencia cinética tal y como se indicó en el apartado 3.1.2.

**3.4. Bibliografía.**

- (1) Morris, J. C. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3798-3805.
- (2) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275-284.
- (3) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 521-530.
- (4) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 453-460.

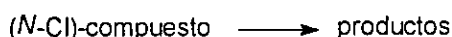
## 4. Métodos cinéticos



#### 4.1. Reacciones de orden uno: descomposición de (N-Cl)-compuestos.

Para estudiar la reacción de descomposición del sulfóxido *N*-Cl-metionina, de la sulfona *N*-Cl-metionina y del ácido *N*-Cl-cisteico se utilizó el método de aislamiento que consiste en mantener uno de los reactivos en manifiesto exceso respecto al otro.

De forma genérica la reacción de descomposición de los *N*-clorocompuestos es la siguiente:



A partir de estudios previos se puede tomar como punto de partida la siguiente ecuación de velocidad: <sup>1,2</sup>

$$v = -\frac{d[(N-Cl)\text{-compuesto}]}{dt} = k_{\text{exp}} \cdot [(N-Cl)\text{-compuesto}] \cdot [\text{Base}] \quad \text{Ec.4.1}$$

y trabajando con la base en exceso se puede escribir de la siguiente manera

$$v = -\frac{d[(N-Cl)\text{-compuesto}]}{dt} = k'_{\text{exp}} \cdot [(N-Cl)\text{-compuesto}] \quad \text{Ec.4.2}$$

donde  $k'_{\text{exp}}$  es la constante de pseudoorden uno respecto a la concentración de *N*-clorocompuesto.

Se utilizó el método cinético de integración para el tratamiento de los datos experimentales, lo que supone el seguimiento temporal de la variación de la concentración de alguno de los reactivos o productos implicados en la reacción o alguna propiedad física que varíe linealmente con ella. Generalmente la propiedad física que se utilizó para estudiar las reacciones de descomposición de los *N*-clorocompuestos fue la absorbancia, que se relaciona linealmente con la concentración tal y como indica la ecuación de Lambert-Beer

$$\text{Abs} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Ec.4.3}$$

Por tanto será necesario que la formación de un producto o la desaparición de un reactivo vaya acompañada de una variación apreciable en la absorbancia, lo cual ocurre en las reacciones aquí estudiadas, véase el capítulo siguiente; ello permite realizar el estudio espectrofotométrico dinámico.

Durante el transcurso de las reacciones estudiadas se cumple

$$\text{Absorbancia} = A_{(N-Cl)\text{-compuesto}} + A_{\text{Base}} + A_{\text{productos}} + A_{\text{fondo}} \quad \text{Ec.4.4}$$

como se trabaja en exceso de base, la variación que experimenta ésta en el transcurso de la reacción es despreciable, pudiendo incluirla dentro de la absorbancia de fondo ( $A_{\text{fondo}}$ ), entonces la expresión anterior se puede escribir:

$$\text{Absorbancia} = A_{(N-Cl)\text{-compuesto}} + A_{\text{productos}} + A_{\text{fondo}}^* \quad \text{Ec.4.5}$$

En el momento en que se inicia la reacción la absorbancia del sistema estudiado es:

$$A_{(t=0)} = A_{((N-Cl)\text{-compuesto})_0} + A_{\text{fondo}}^* = \varepsilon_{(N-Cl)\text{-compuesto}} \cdot b \cdot [(N-Cl)\text{-compuesto}]_0 + A_{\text{fondo}}^* \quad \text{Ec.4.6}$$

mientras que al final de la misma se cumple que:

$$A_{(t=\infty)} = A_{\text{productos}} + A_{\text{fondo}}^* = \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot [(N-Cl)\text{-compuesto}]_0 + A_{\text{fondo}}^* \quad \text{Ec.4.7}$$

De las ecuaciones 4.6 y 4.7 se obtiene

$$[(N-Cl)\text{-compuesto}]_0 = \frac{A_0 - A_\infty}{(\varepsilon_{(N-Cl)\text{-compuesto}} - \varepsilon_{\text{productos}}) \cdot b} = \frac{A_0 - A_\infty}{\Delta \varepsilon \cdot b} \quad \text{Ec.4.8}$$

El valor de la absorbancia del sistema en un tiempo  $t$  viene dado por:

$$A_t = \varepsilon_{(N-Cl)\text{-compuesto}} \cdot b \cdot [(N-Cl)\text{-compuesto}]_t + \varepsilon_{\text{productos}} \cdot b \cdot ([(N-Cl)\text{-compuesto}]_0 - [(N-Cl)\text{-compuesto}]_t) + A_{\text{fondo}}^* \quad \text{Ec.4.9}$$

A partir de las ecuaciones anteriores resulta:

$$[(N-Cl)\text{-compuesto}]_t = \frac{A_t - A_\infty}{(\varepsilon_{(N-Cl)\text{-compuesto}} - \varepsilon_{\text{productos}}) \cdot b} = \frac{A_t - A_\infty}{\Delta \varepsilon \cdot b} \quad \text{Ec.4.10}$$

Por integración de la ecuación 4.2 se llega a que:

$$\ln[(N-Cl)\text{-compuesto}]_t = \ln[(N-Cl)\text{-compuesto}]_0 - k \cdot t \quad \text{Ec.4.11}$$

expresión que se puede escribir en términos de absorbancia utilizando las ecuaciones 4.8 y 4.10:

$$\ln(A_t - A_\infty) = \ln(A_0 - A_\infty) - k \cdot t \quad \text{Ec.4.12}$$

Esta ecuación corresponde a una línea recta de pendiente  $k$  y ordenada en el origen  $\ln(A_0 - A_\infty)$ . El valor de  $A_\infty$  se determina por medida de la absorbancia transcurrido un tiempo suficientemente grande respecto a la vida media de la reacción o bien se calcula acudiendo a métodos matemáticos de optimización.

A modo de ejemplo se presenta el comportamiento observado en el estudio de descomposición del ácido (N-Cl)-Cya; la representación de los datos según la ecuación 4.12 implica que se trata de orden de reacción uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto.

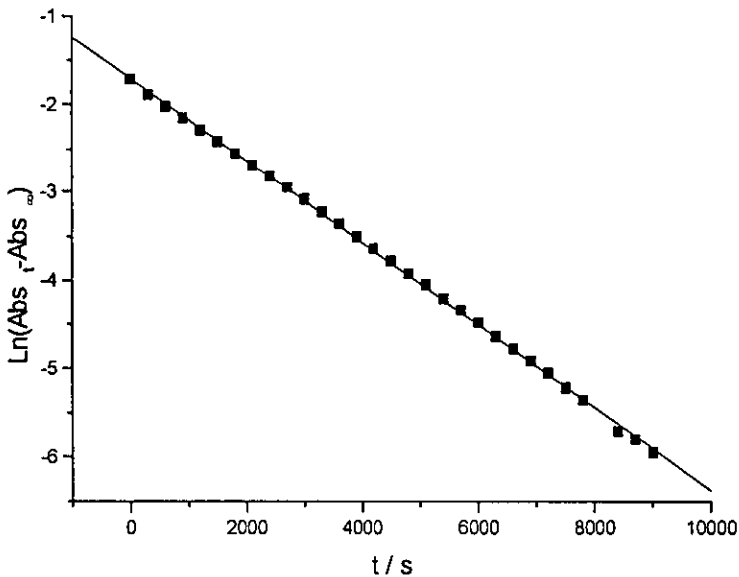


Figura 4.1 Descomposición del ácido (N-Cl)-cisteico catalizado por  $\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7/\text{HPO}_4^{2-}$ . Comprobación del orden uno respecto al N-Clorocompuesto.  $[\text{MetSO}] = [\text{NaClO}] = 0.001 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $I = 0.500 \text{ mol dm}^{-3}$  (NaCl);  $T = 298.0 \text{ K}$

#### 4.2. Cloración de S-compuestos. Reacciones de orden dos.

Para el estudio de las reacciones de cloración de aminoácidos azufrados se trabajó en condiciones de orden dos con concentraciones iguales de los dos reactivos. Genéricamente la reacción es del tipo:



Si se trata de un proceso de orden dos, procede tomar de partida la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = -\frac{d[\text{S-compuesto}]}{dt} = k_{\text{exp}}[\text{Halogenante}][\text{S-compuesto}] \quad \text{Ec.4.13}$$

Cuando son iguales las concentraciones de ambos reactivos,  $([\text{Halogenante}]_0 = [\text{S-compuesto}]_0 = [A]_0)$ , la ecuación anterior se simplifica a:

$$v = -\frac{d[A]_0}{dt} = k_{\text{exp}}[A]_0^2 \quad \text{Ec.4.14}$$

donde  $k_{\text{exp}}$  es la constante de orden dos, uno respecto al agente halogenante y orden uno respecto al S-compuesto.

Al igual que el apartado 4.1, se utilizó el método de integración para el tratamiento de los datos experimentales, con lo que la ecuación 4.14 se puede escribir así:

$$\frac{1}{[A]_0} - \frac{1}{[A]_t} = k \cdot t \quad \text{Ec.4.15}$$

Aplicando las ecuaciones 4.8-4.10, se puede expresar la concentración en términos de absorbancia y sustituyendo en la ecuación 4.15, resulta :

$$\frac{1}{A_t - A_\infty} = \frac{1}{A_0 - A_\infty} + \frac{k \cdot t}{\Delta \epsilon \cdot b} \quad \text{Ec.4.16}$$

Esta ecuación corresponde a una línea recta. Al igual que en el apartado anterior, el valor de  $Abs_\infty$  se determina por medida de la absorbancia transcurrido un tiempo suficientemente grande respecto a la vida media de la reacción, o bien se puede estimar mediante métodos de optimización.



A modo de ejemplo se presenta en la figura 4.2 el proceso de formación de S-clorocompuestos, donde resulta patente que se trata de un proceso de orden dos.

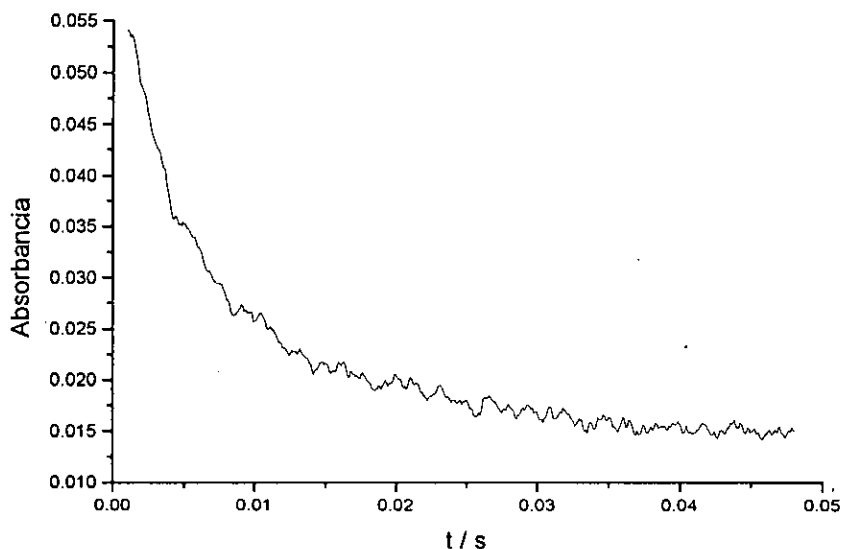


Figura 4.2 Formación de S-Cl-Cys.  $[HClO]=[Cys]=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $\text{pH}=10.3$ ;  $\lambda=292 \text{ nm}$ ;  $T=298.0 \text{ K}$

Puesto que con esa sola evidencia no se establece si se trata de orden uno respecto a cada uno de los reactivos, resulta necesario verificar el orden de reacción respecto a uno de ellos. Como ejemplo se presenta aquí la comprobación respecto al S-compuesto. En este caso se trabajó en condiciones de pseudoorden uno, estando en exceso el S-compuesto; asumiendo orden uno respecto a la concentración de dicho sustrato, la ecuación de velocidad se puede escribir como:

$$v = k_{\text{exp}} \cdot [\text{Met}]^n \cdot [\text{HOCl}] = k'_{\text{exp}} \cdot [\text{HOCl}] \quad \text{Ec. 4.17}$$

donde

$$k'_{\text{exp}} = k_{\text{exp}} \cdot [\text{Met}]^n \quad \text{Ec. 4.18}$$

y, por tanto,

$$\log k'_{\text{exp}} = \log k_{\text{exp}} + n \cdot \log [\text{Met}] \quad \text{Ec. 4.19}$$

Esta ecuación corresponde a una línea recta de pendiente  $n$ , siendo este valor el que indica el orden de reacción respecto a Met.

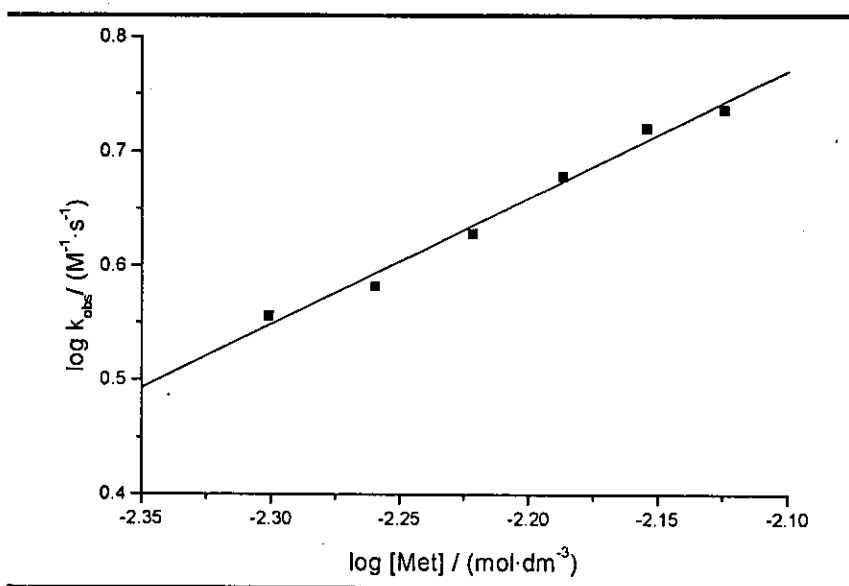


Figura 4.3 Orden de reacción para cloración de metionina.  $[Met] \gg [HOCl]$ ,  $I=0.5M(NaCl)$ ,  $pH=12$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

Se obtiene que  $n=1.1 \pm 0.1$ , lo que confirma que la reacción es de orden uno respecto al S-compuesto y, como consecuencia, uno también respecto al halogenante, esto es dos global.

Cualesquiera que fueran las condiciones de trabajo, de forma general se efectuaba el registro experimental de los valores absorbancia-tiempo. El porcentaje de reacción que se consideraba, era en todos los casos lo suficientemente amplio ( $>6 \cdot t_{1/2}$ ).

Posteriormente se realizaba el ajuste matemático de las distintas ecuaciones a los datos experimentales con objeto de estimar la constante de velocidad. Dicha operación se efectuó mediante algoritmos de optimización no lineal integrados en programas informáticos de cálculo científico (Origin 5.0 Professional, Programa de ajuste del espectrofotómetro de flujo detenido SF-61 y SF-61X).

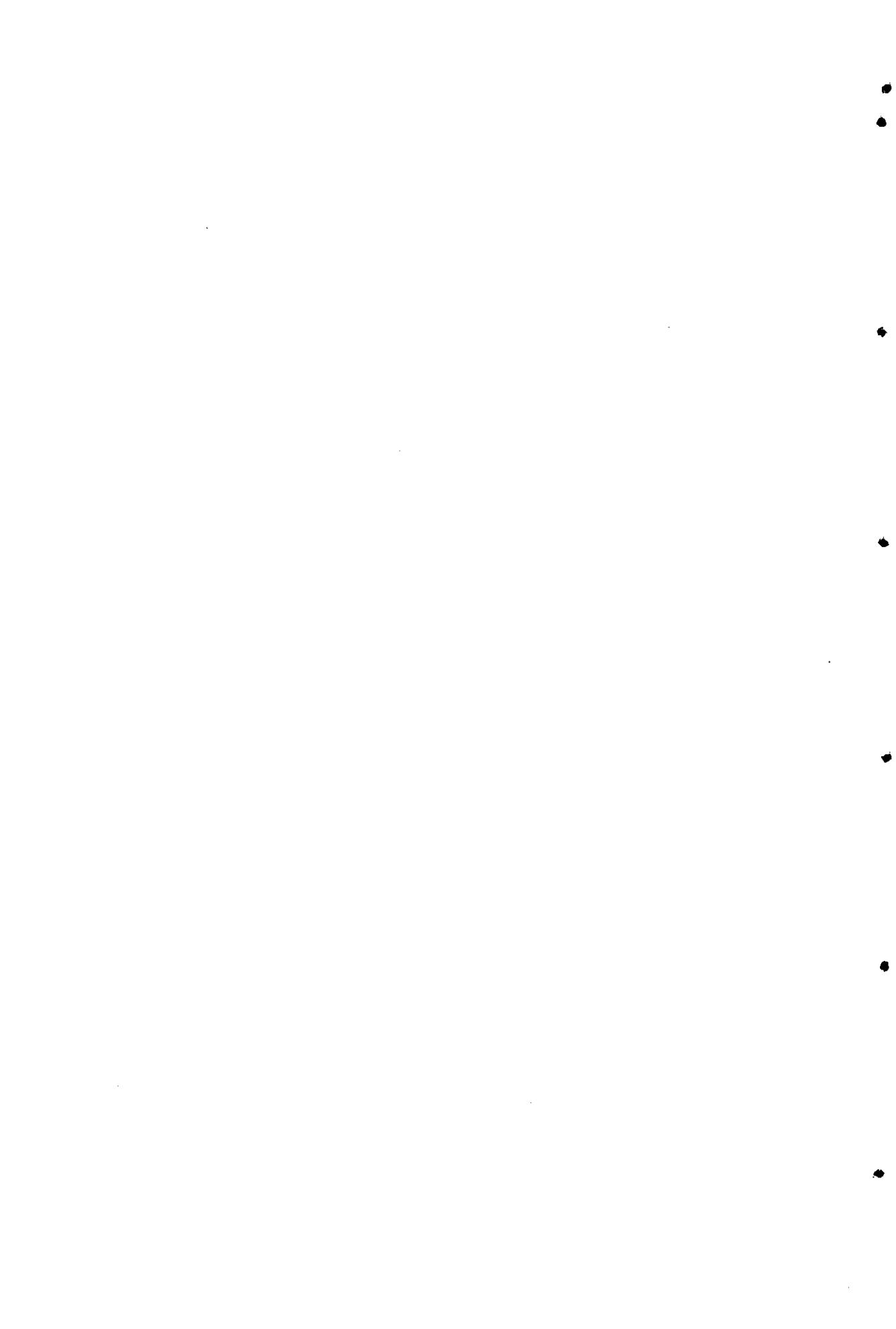
### 4.3. Bibliografía

(1) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 181-185.

(2) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, P.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2265.



## 5. Estudio espectrofotométrico

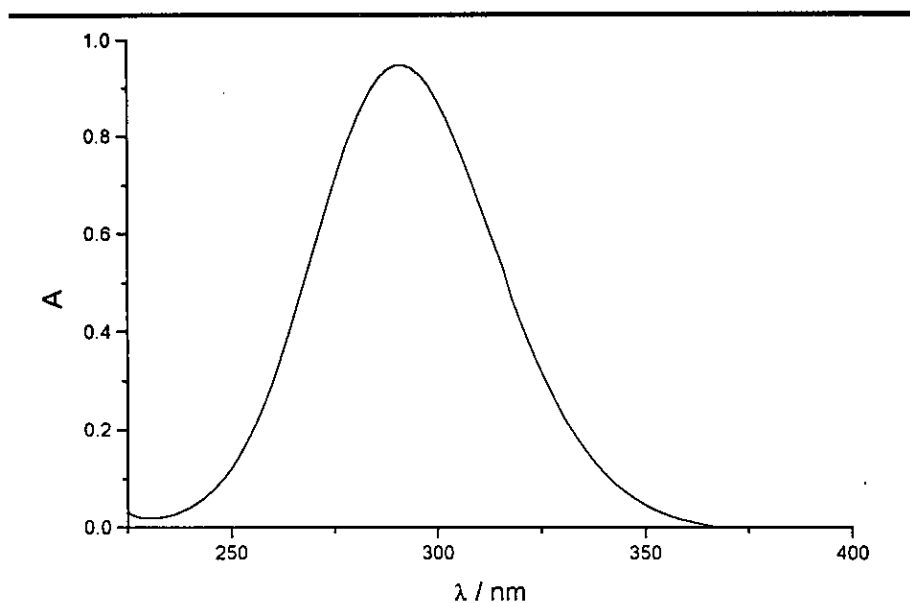


La aplicación del método espectrofotométrico para el seguimiento de una reacción química sólo es posible si la aparición de un intermedio o producto o la desaparición de algún reactivo lleva asociado un cambio apreciable de absorbancia del sistema.

Seguidamente se muestran los espectros correspondientes a los reactivos, y a los productos de cada una de las reacciones estudiadas, así como su variación temporal.

**5.1. Estudio espectrofotométrico de la reacción de descomposición del sulfóxido de (N-Cl)-Met, de la sulfona de (N-Cl)-Met, y del ácido (N-Cl)-cisteico.**

En la figura 5.1 se muestra el espectro del agente halogenante, ion hipoclorito, que tiene su máximo de absorción a 292 nm. Longitud de onda que se utilizó para determinar su concentración<sup>1</sup> ( $\epsilon_{350\text{nm}}=350 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$  a  $\text{pH}>12$ , 298.0 K).



**Figura 5.1** Espectro de absorción UV-Vis de  $\text{ClO}^-$ .  $[\text{ClO}^-]=0.085 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}>12$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

Los espectros de absorción UV-Vis de los (N-Cl)-compuestos muestran un máximo de absorción a una longitud de onda próxima a  $255 \text{ nm}^{2-4}$  (figura 5.2).

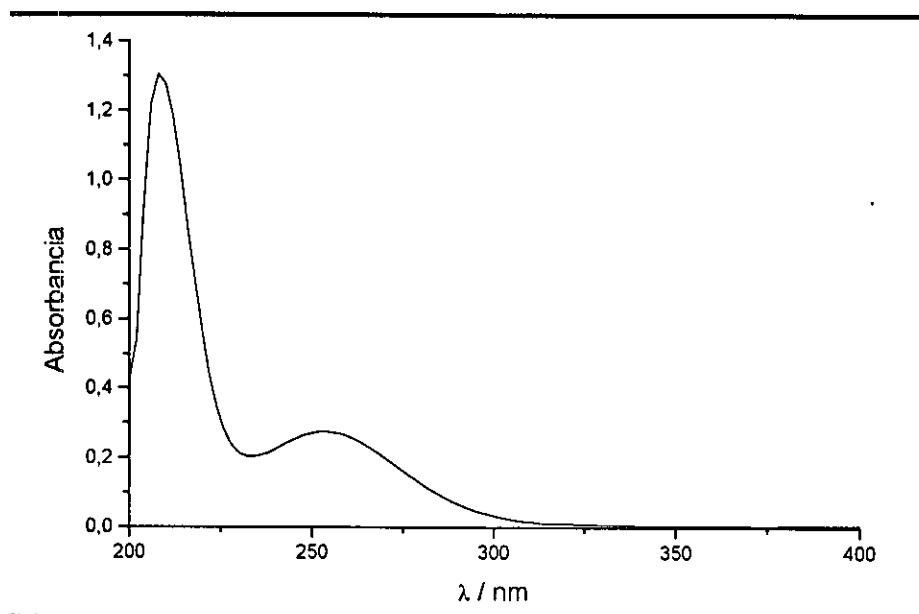


Figura 5.2 Espectro de absorción UV-Vis del sulfóxido de (N-Cl)-Met.  $[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 0.001 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; pH=7, T=298.0 K.

Dicho máximo se encuentra desplazado respecto al máximo de absorción del agente halogenante (figura 5.1), lo cual confirma que el seguimiento de la reacción puede efectuarse midiendo la evolución temporal de la absorbancia.

Como se muestra en las figuras 5.3 y 5.4 el máximo de absorción de los (N-Cl)-compuestos es ~255 nm independientemente del valor de pH de trabajo. A pH mayor de 12 aparece un segundo proceso (figura 5.4) que produce interferencias dificultando, e incluso impidiendo, en algunos casos el estudio cinético de la reacción.

Se utilizó 255 nm como longitud de onda de trabajo para el seguimiento de las reacciones de descomposición de estos (N-Cl)-derivados con todas las bases utilizadas, la excepción fue el (N-Cl)-derivado de  $\text{MetSO}_2$  cuando la base utilizada fue el ion hidróxido, en cuyo caso se empleó como longitud de onda de trabajo la correspondiente a la aparición del producto de descomposición, 215 nm, ya que ésta es comparable con la desaparición del (N-Cl)-compuesto y, además, tal como se puede observar la figura 5.5, el coeficiente de absorción molar del (N-Cl)-compuesto a 255 nm es más pequeño que el del producto de descomposición a 215 nm por lo que la variación de absorbancia es menor y,



por tanto, el error obtenido al ajustar las trazas cinéticas a 255 nm podría ser considerable.

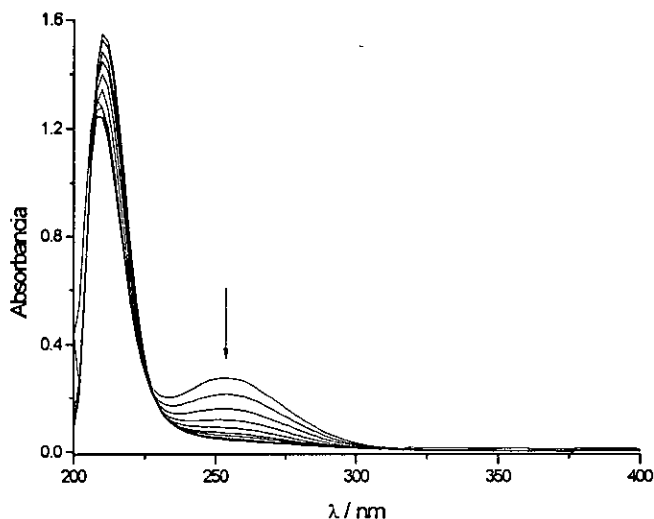


Figura 5.3 Espectro de absorción UV-Vis de reacción correspondiente a la descomposición del sulfóxido de *(N-Cl)*-Met.  $[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 0.001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $l = 0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$ ;  $t = 80 \text{ min}$ .

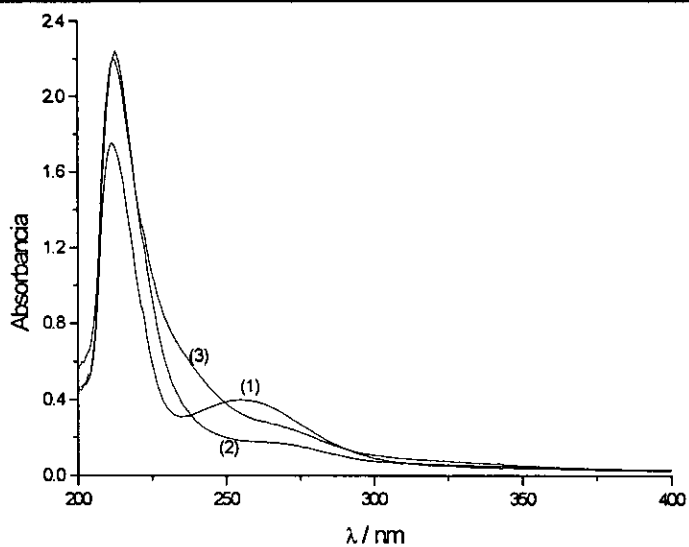


Figura 5.4 Espectro de absorción UV-Vis de reacción correspondiente a la descomposición del sulfóxido de *(N-Cl)*-metionina.  $[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 0.001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $l = 0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $[\text{NaOH}] = 0.01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$ . (1)  $t = 0 \text{ min}$ , (2)  $t = 60 \text{ min}$ , (3)  $t = 900 \text{ min}$ .

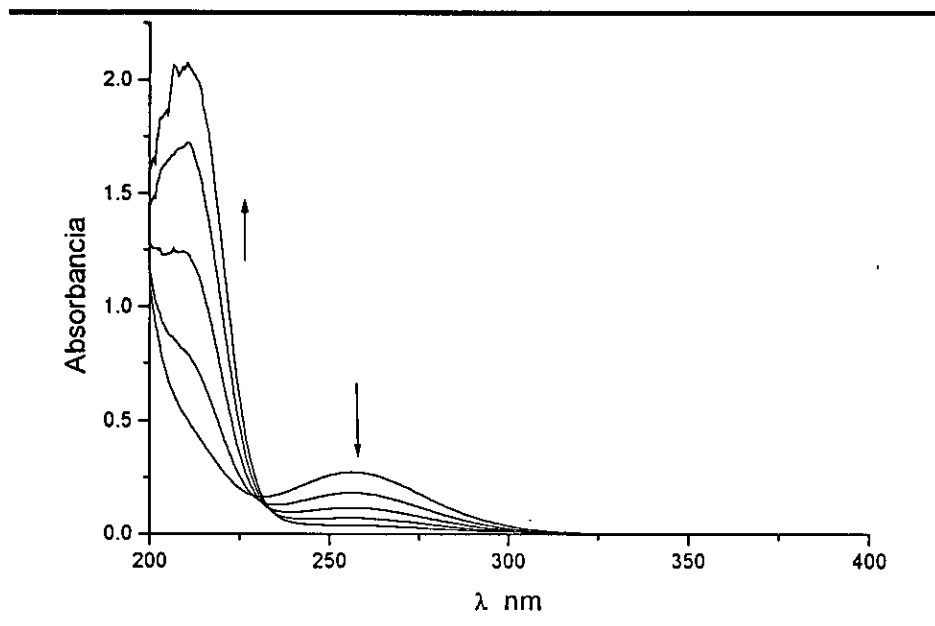


Figura 5.5 Espectro de absorción UV-Vis de reacción correspondiente a la descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Met.  $[\text{MetSO}_2]=[\text{HOCl}]=0.001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $\text{pH}=7$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ ;  $t=120 \text{ min}$ .

## 5.2. Estudio espectrofotométrico de la reacción de descomposición de sulfona (N-Br)-metionina.

Los espectros de absorción de los (N-Br)-compuestos muestran un máximo de absorción a una longitud de onda próxima a 300 nm. Este máximo de absorción es independiente del valor de pH de trabajo, y fue esta longitud de onda la utilizada para el seguimiento de las reacciones estudiadas.

Como se recoge en la bibliografía<sup>5</sup> la reacción de descomposición de (N-Br)-compuestos es más rápida que la descomposición del (N-Cl)-compuesto correspondiente. Así la desaparición de la banda de la sulfona (N-Cl)-metionina a  $\text{pH}=7$  (figura 5.5) tiene lugar en aproximadamente dos horas, mientras que el (N-Br)-compuesto correspondiente (figura 5.6) desaparece en las mismas condiciones de pH en 10 minutos.

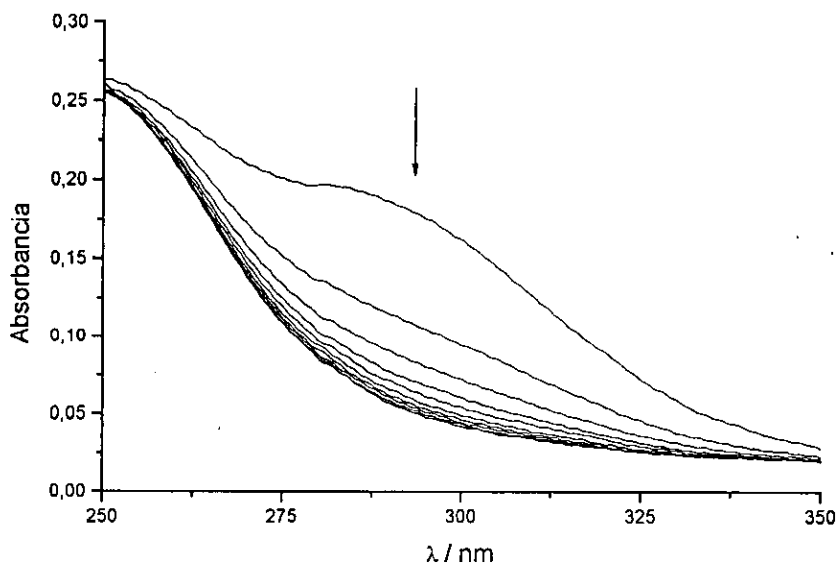


Figura 5.6 Espectro de absorción UV-Vis de reacción correspondiente a la descomposición de la sulfona de (N-Br)-metionina;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $\text{pH}=7$ ,  $t_{\text{total}}=10\text{min}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

### 5.3. Estudio espectrofotométrico de S-compuestos.

#### 5.3.1. Espectros de glutatión (GSH) y metionina (Met).

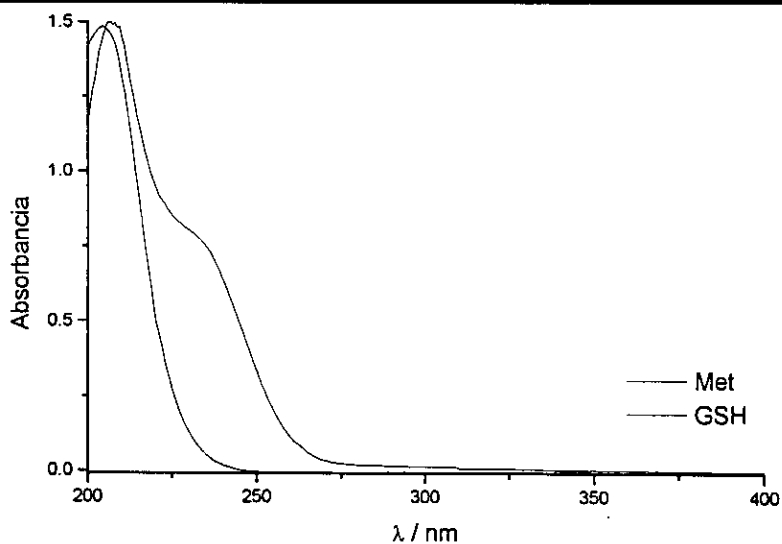


Figura 5.7 Espectro de absorción UV-Vis de Glutacion (GSH) y Metionina (Met) ( $\text{pH}=7$ ).

5.3.2. Determinación del coeficiente de absortividad molar de Cys, Cys<sup>+</sup>Cys y Cya.

Se determinaron los coeficientes de extinción molar de estos compuestos a las diferentes longitudes de onda que caracterizan sus espectros de absorción UV-Vis y a diferentes pH.

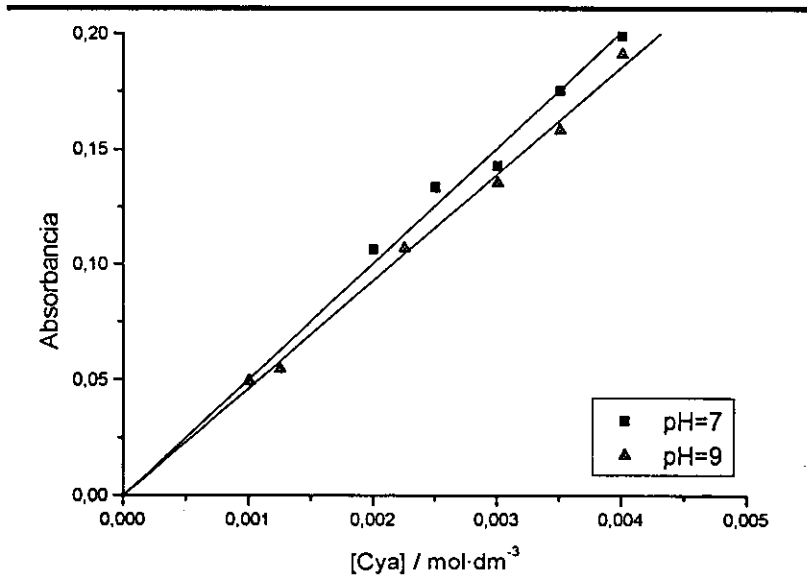


Figura 5.8 Ley de Lambert-Beer para el ácido cisteico (Cya),  $\lambda=215$  nm

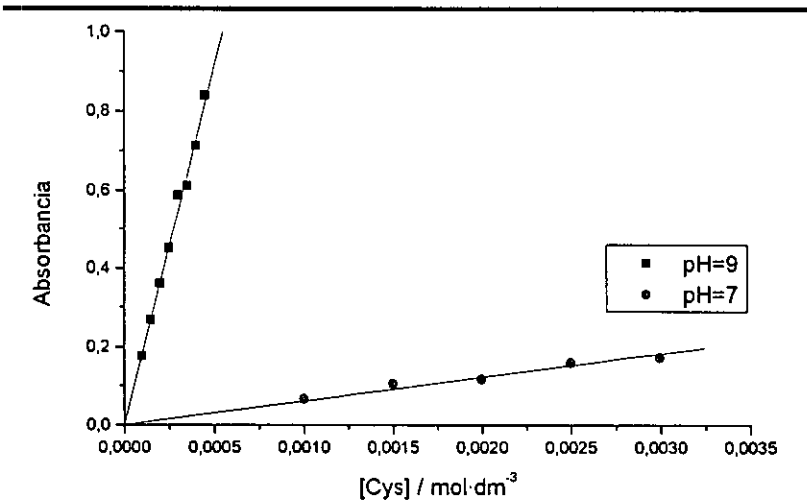


Figura 5.9 Ley de Lambert-Beer para la cisteína (Cys),  $\lambda=244$  nm

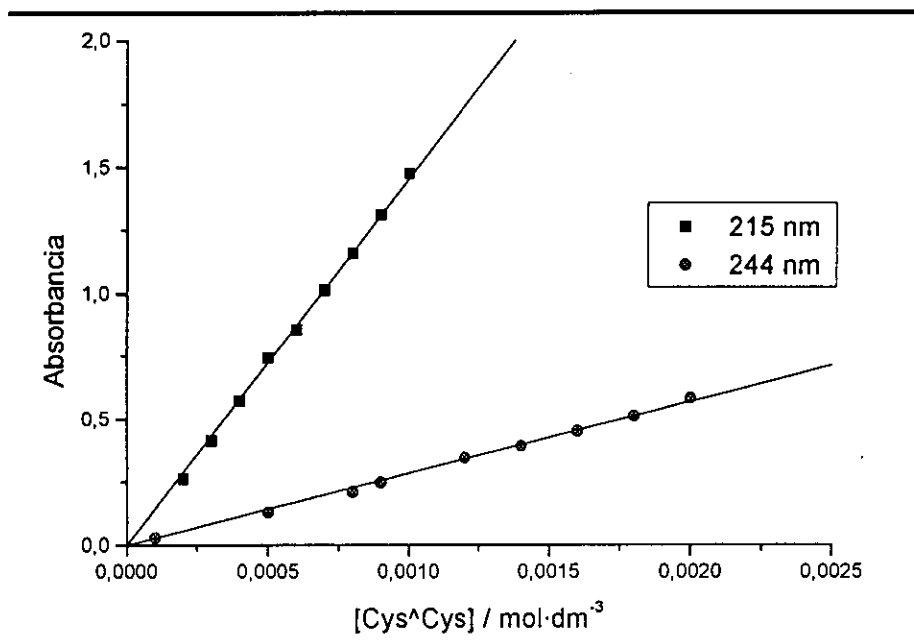


Figura 5.10 Ley de Lambert-Beer para la cistina (Cys<sup>^</sup>Cys), pH=9.5.

En la siguiente tabla se recogen los valores obtenidos para los coeficientes de extinción a diferentes pH y a las longitudes de onda que caracterizan sus espectros de absorción UV-Vis.

Aminoácido	$\epsilon(\lambda)$	$\epsilon(\lambda = 215 \text{ nm})$ mol·dm <sup>-3</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\epsilon(\lambda = 244 \text{ nm})$ mol·dm <sup>-3</sup> ·cm <sup>-1</sup>
	pH		
Cys	7.0	278±4	61±2
	9.0	119±5	1884±41
Cys <sup>^</sup> Cys	9.5	1454±8	285±3
Cya	7.0	51±1	0
	9.0	46±1	0

Para la Cys<sup>^</sup>Cys no se pudo determinar el coeficiente de extinción molar en medio neutro ya que este aminoácido sólo es soluble en medio alcalino.

La Cys<sup>^</sup>Cys y la Cys se caracterizan por dos máximos de absorción uno a 215 nm y otro a 244 nm. Ya que la Cys<sup>^</sup>Cys es producto final de reacción para la cloración de la Cys y ambos absorben a las mismas longitudes de onda, se

siguió la desaparición del agente halogenante con el fin de evitar posibles interferencias a la hora de hacer el estudio cinético.

La Cys presenta una marcada influencia del coeficiente de extinción con el pH del medio, de ahí que sea necesario considerar la posible existencia de más de una especie al plantear los posibles procesos elementales a través de los que tiene lugar la reacción de halogenación.

### 5.3.3. Estudio espectrofotométrico de la reacción de cloración por HOCl de S-compuestos.

A continuación se muestra el espectro de reacción correspondiente a la cloración por HOCl de metionina.

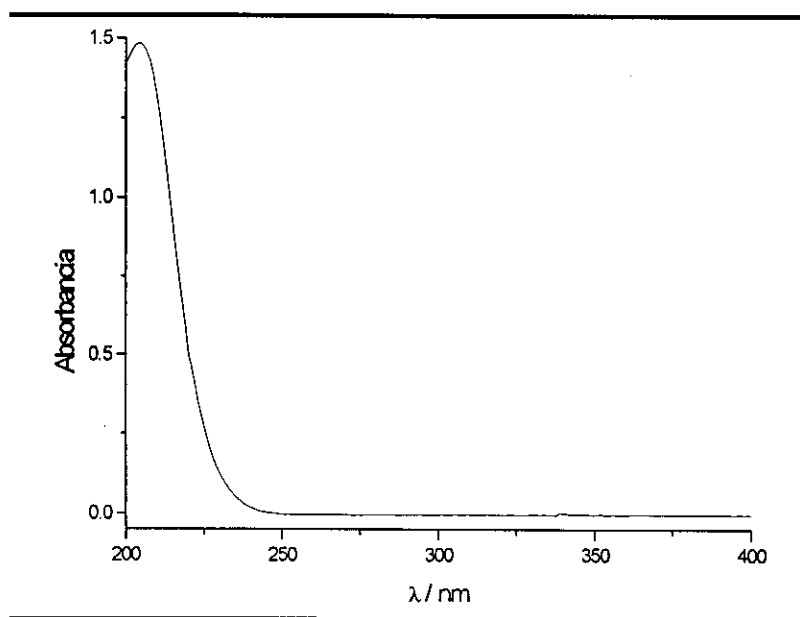


Figura 5.11 Espectro de absorción UV-Vis de la reacción de cloración de metionina por HOCl.  $[Met]=[HOCl]=2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH}=7$ ;  $298.0 \text{ K}$ .

Como se desprende del espectro anterior (figura 5.11) no se observa la aparición de ninguna banda que ayude a caracterizar el S-Cl-compuesto generado. Además como la reacción tiene lugar en tiempos muy cortos, milésimas de segundo, tampoco se observa la disminución de la banda que caracteriza al halogenante, HOCl. Por ello el estudio cinético de estas reacciones se hizo utilizando la técnica de flujo detenido y midiendo la desaparición del máximo de absorción del halogenante.

5.3.4. Estudio espectrofotométrico de la reacción de transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina a cisteína, cistina, glutatión, glutatión oxidado, y metionina.

5.3.4.1. Espectro y estabilidad de la (N-Cl)-Taurina.

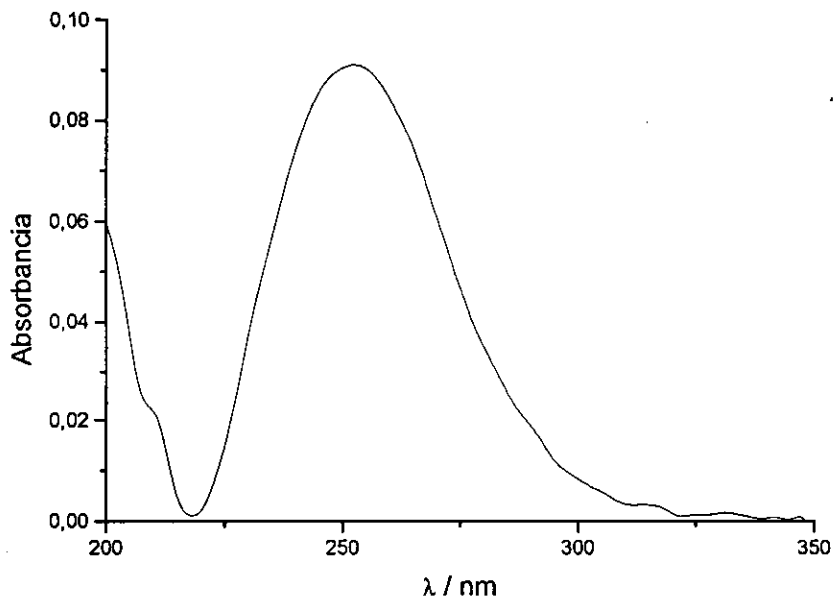


Figura 5.12 Espectro de absorción UV-Vis de la (N-Cl)-Taurina, [(N-Cl)-Taurina]= $2.5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=9, T=298.0 K.

Se comprobó la estabilidad de la (N-Cl)-Taurina a diferentes pH dentro del intervalo de pH de trabajo.

Tal y como se muestra en las figuras siguientes (figuras 5.13 y 5.14) la (N-Cl)-Taurina es estable no sufriendo variación su espectro de absorción con el tiempo.

Estudio espectrofotométrico

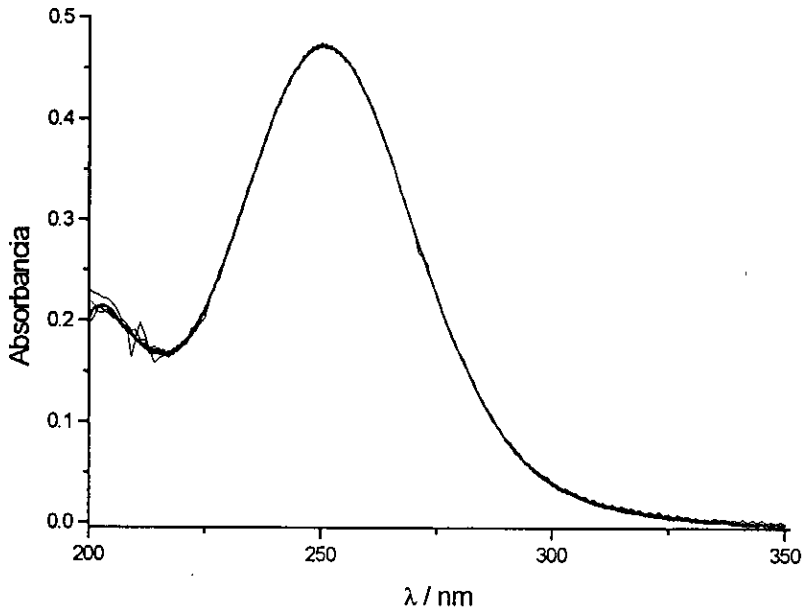


Figura 5.13 Espectro de absorción UV-Vis de la (N-Cl)-Taurina en medio básico.  $[(N-Cl)\text{-Tau}] = 1.5 \cdot 10^{-3}$ ,  $\text{pH} = 11$ ,  $t_{\text{total}} = 30 \text{ min}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$ .

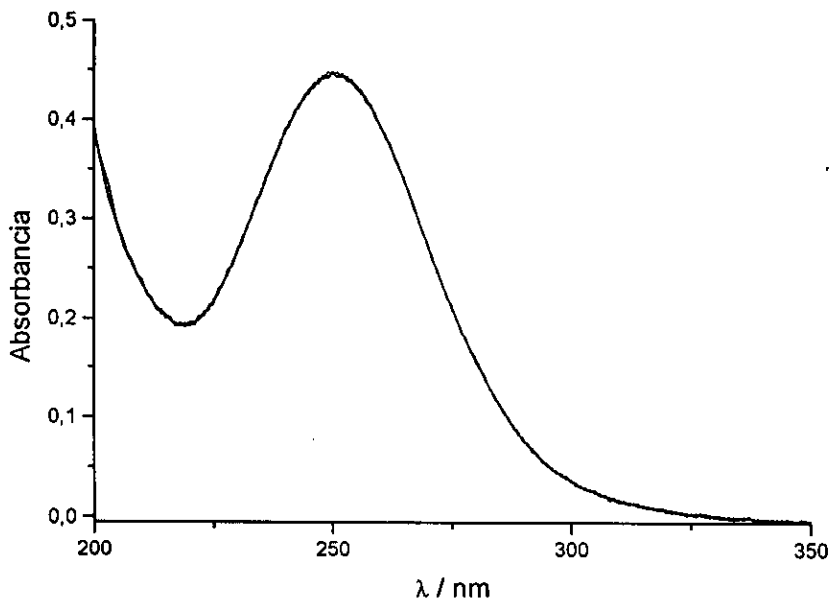


Figura 5.14. Espectro de absorción UV-Vis de la (N-Cl)-Taurina en medio neutro.  $[(N-Cl)\text{-Tau}] = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ,  $t_{\text{total}} = 30 \text{ min}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$ .



5.3.4.2. Reacción de transferencia de Cl desde la (N-Cl)-Taurina a los S-compuestos.

En este caso la cloración es mucho más lenta que con HOCl, siendo posible observar la disminución de la absorbancia de la (N-Cl)-Taurina a 252 nm.

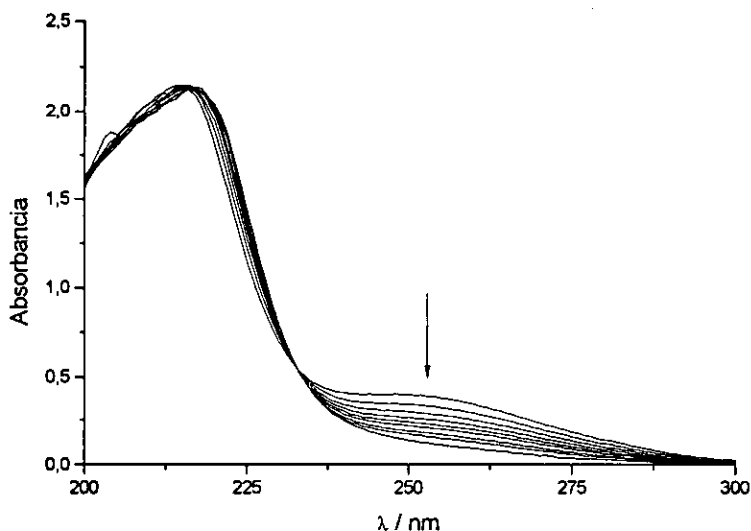


Figura 5.15. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de transferencia de Cl desde la (N-Cl)-Taurina al GSH. [(N-Cl)-Tau]=[GSH]= $1.5 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>; I=0.5 mol·dm<sup>-3</sup>; pH=7; t=20min, 298.0 K

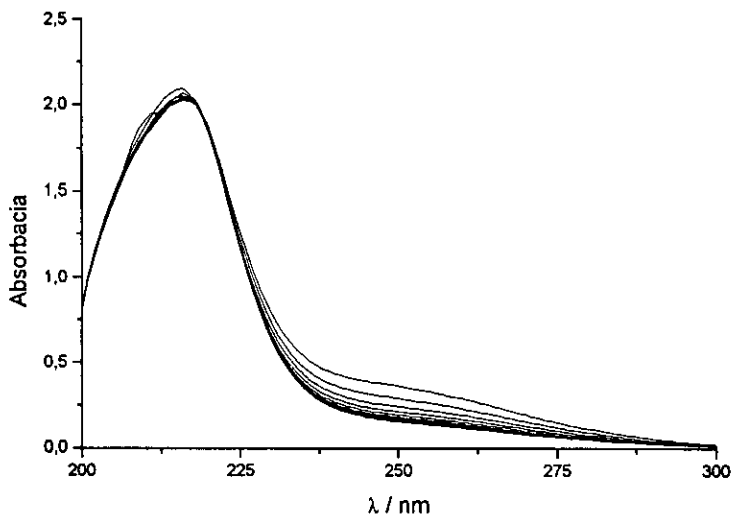


Figura 5.16. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de transferencia de Cl desde la (N-Cl)-Taurina al GSH. [(N-Cl)-Tau]=[GSH]= $1.5 \cdot 10^{-3}$  mol·dm<sup>-3</sup>; I=0.5 mol·dm<sup>-3</sup>; pH=11; t=30min, 298.0 K.

**5.4. Bibliografía.**

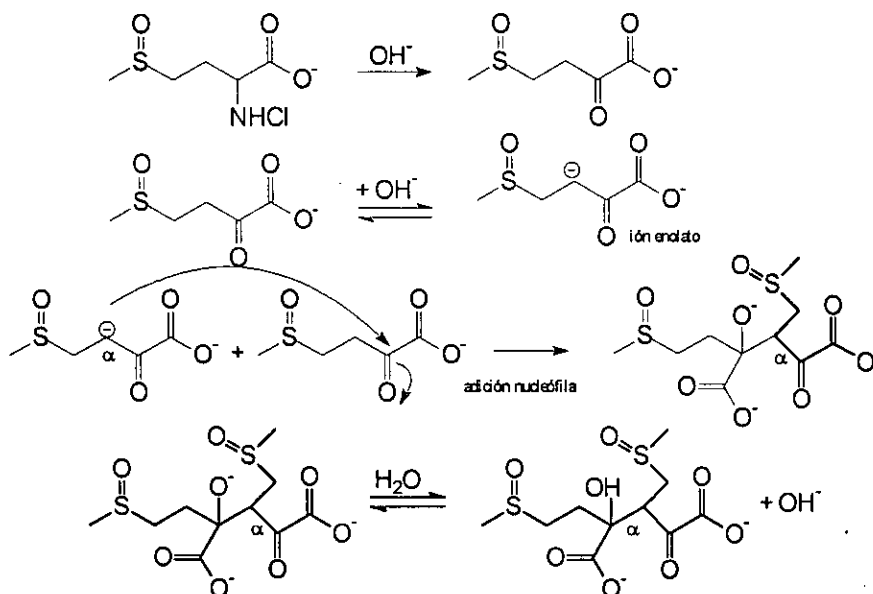
- (1) Morris, J. C. *J. Phys. Chem.* **1966**, *70*, 3798-3805.
- (2) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275-284.
- (3) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1135.
- (4) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Electronic Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1)* **1996**.
- (5) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 453-460.

6. Descomposición de (*N*-halo)-derivados de aminoácidos azufrados: Resultados



Con el fin de determinar el mecanismo a través del que transcurre la descomposición del sulfóxido (*N*-Cl)-Metionina, de la sulfona de (*N*-Cl)-Metionina y del ácido (*N*-Cl)-cisteico, y por analogía con lo observado para otros (*N*-Cl)-aminoácidos, se consideró la posibilidad de la existencia de catálisis general básica.<sup>1,2</sup> Para ello se estudió la influencia de distintas bases en la velocidad de reacción de descomposición de (*N*-Cl)-compuestos. Como se indicó en el capítulo 2 los (*N*-Cl)-compuestos estudiados presentan un máximo de absorción característico sobre 255 nm, siendo ésta la longitud de onda utilizada en este estudio.

Según se mostró en el capítulo anterior, la descomposición de los (*N*-Cl)-compuestos estudiados muestra que a medida que progresa la reacción, la disminución del máximo a 255 nm y la aparición una nueva banda de absorción centrada aproximadamente a 225 nm, la cual va a producir interferencias en el seguimiento de la descomposición de los (*N*-Cl)-derivados del MetSO y MetSO<sub>2</sub>, e impide el estudio de la influencia de la concentración de iones hidróxido en la descomposición del (*N*-Cl)-Cya. La aparición de la citada banda se puede atribuir a un proceso de condensación aldólica<sup>3-5</sup> entre los productos finales de la reacción de descomposición tal y como se indica en el siguiente esquema:



Esquema 6.1

Del análisis cinético de los datos se encontró (capítulo 4, apartado 4.1) para los tres (*N*-Cl)-compuestos estudiados, una dependencia de orden uno respecto a la concentración de (*N*-Cl)-compuesto.

Se estudió también la reacción de descomposición de los (*N*-Br)-compuestos correspondientes, los cuales se caracterizan por presentar un máximo de absorción centrado sobre 300 nm (capítulo 5), siendo ésta la longitud de onda de trabajo.

En adelante se presenta el estudio de la influencia de la concentración de iones hidróxido, alcóxido, fosfato y carbonato.

### 6.1. Descomposición de sulfóxido de (*N*-Cl)-Metionina.

Como se aprecia en la figura 6.1, la constante de velocidad es prácticamente independiente del pH en el intervalo comprendido entre 6 y 9, encontrándose un valor para  $k_{obs} = (5.1 \pm 0.5) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a 298.0 K

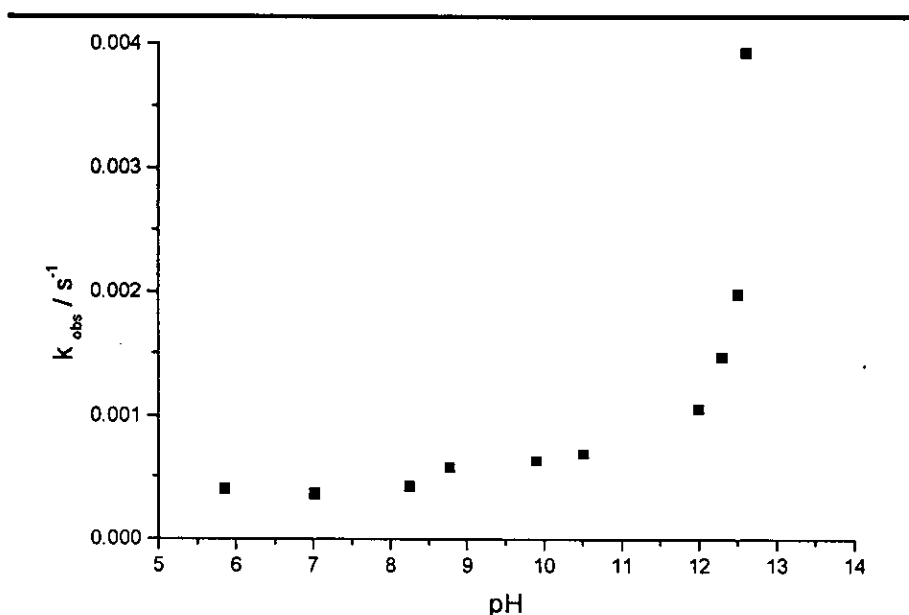


Figura 6.1 Descomposición del sulfóxido de (*N*-Cl)-Metionina. Influencia del pH.  $[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (NaCl);  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ;  $T = 298.0 \text{ K}$

Cuando el  $\text{pH} > 11$ , la velocidad de reacción aumenta rápidamente con la basicidad del medio.

6.1.1. Catálisis por iones hidróxido.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de iones hidróxido sobre la descomposición del sulfóxido de (N-Cl)-Metionina. La concentración de iones hidróxido se obtuvo mediante adición a la mezcla de reacción de la cantidad adecuada de disolución de NaOH previamente valorada. Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , utilizando  $\text{NaClO}_4$  como electrolito inerte.

En la figura 6.2 se muestra la dependencia de la constante de velocidad con la concentración de iones  $\text{OH}^-$

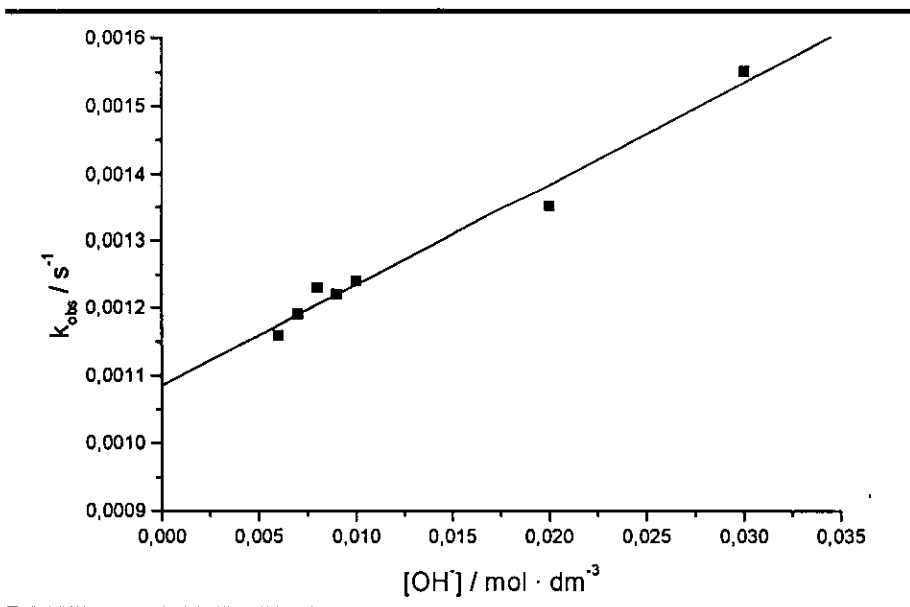


Figura 6.2 Influencia de la concentración de  $\text{OH}^-$  en la descomposición de sulfóxido de (N-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}] = [\text{NaClO}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ );  $T = 298.0 \text{ K}$

La representación de la constante cinética de primer orden frente a la concentración de iones hidróxido, se ajusta a una línea recta del tipo  $y = a + b \cdot X$ , por lo que se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = v_0 + v_{\text{OH}^-} k_{\text{obs}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] = k_0 \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] + k_{\text{OH}^-} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] [\text{OH}^-] \quad \text{Ec.6.1}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{\text{OH}^-}$  es la constante de orden dos debida a

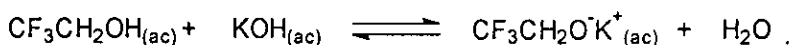
la reacción con iones hidróxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones hidróxido.

A partir de los datos experimentales (véase anexo 3) se obtienen los siguientes valores,

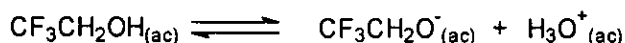
$$k_0 = (1.08 \pm 0.01) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$
$$k_{\text{OH}^-} = (14.9 \pm 0.9) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

### 6.1.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$  sobre la descomposición de sulfóxido (N-Cl)-Metionina. Para este trabajo se utilizó una disolución reguladora  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH} / \text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$



dependiendo la concentración de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$  del pH del medio y del  $\text{pK}_a$  del equilibrio



cuyo valor es 12.43.<sup>6</sup>

Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Se utilizó KCl como electrolito inerte, y no  $\text{NaClO}_4$ , para evitar la precipitación de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ .

En la figura 6.3 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de iones  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$ . La variación de pH, debida a la disolución tampón, fue 0.7 unidades. En el intervalo de acidez en que fue realizado el estudio ( $\text{pH}=11.1 - 11.8$ ) es necesario tener en cuenta la aportación de los iones hidróxido ( $1.2 \cdot 10^{-3} - 6.3 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), y debido a que la concentración de iones hidróxido es suficientemente importante como para contribuir de forma significativa al valor de la constante observada, es necesario corregir el valor de esta constante.

La constante de velocidad de segundo orden fue calculada mediante la representación de la constante corregida  $k$  frente a la concentración de iones  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$ .

$$k = k_{\text{obs}} - k_{\text{OH}^-} \cdot [\text{OH}^-] \quad \text{Ec.6.2}$$



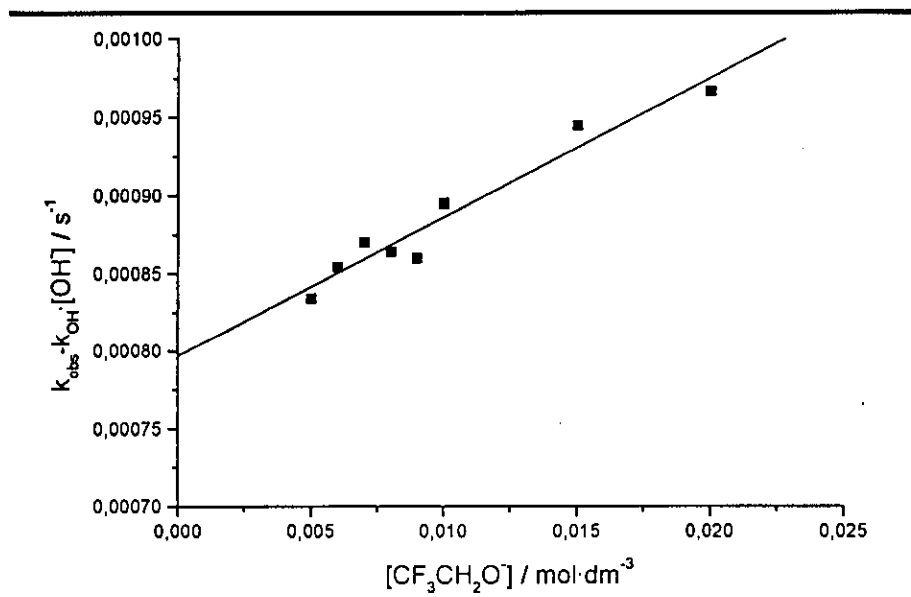


Figura 6.3 Influencia de la concentración de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$  en la descomposición del sulfóxido de (N-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}] = [\text{NaClO}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T = 298.0 \text{ K}$

De los datos obtenidos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma

$$v = v_0 + \Sigma v_B = k_{\text{obs}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] = (k_0 + k_{\text{OH}^-} \cdot [\text{OH}^-] + k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-} \cdot [\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-]) \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] \quad \text{Ec.6.3}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la reacción con iones trifluoroetóxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones alcóxido.

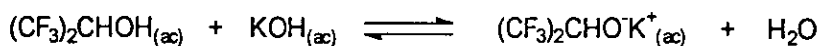
A partir de los datos experimentales (ver anexo 3) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (7.97 \pm 0.09) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

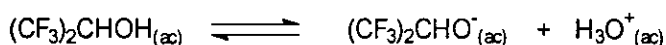
$$k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-} = (8.91 \pm 0.08) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

6.1.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxico.

Igualmente se ha estudiado la influencia de la concentración de  $(CF_3)_2CHO^-$  sobre la descomposición de los *N*-cloroderivados. Para este trabajo se utilizó una disolución reguladora  $(CF_3)_2CHOH / (CF_3)_2CHO^-$



dependiendo la concentración de  $(CF_3)_2CHO^-$  del pH del medio y del  $pK_a$  del equilibrio:



cuyo valor es 9.30.<sup>6</sup>

Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica en la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Se utilizó KCl como electrolito inerte, y no  $NaClO_4$ , para evitar la precipitación de  $(CF_3)_2CHONa$ .

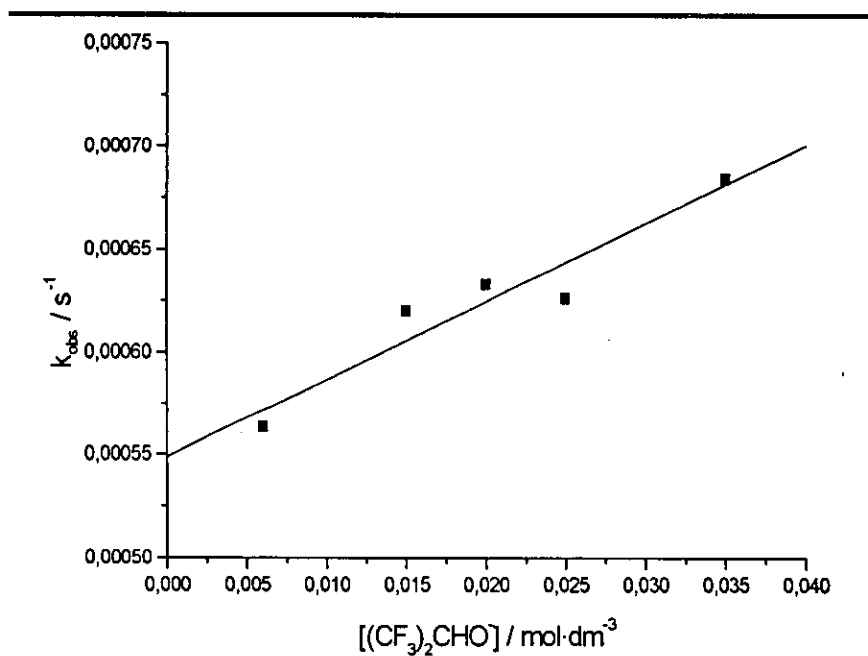


Figura 6.4 Influencia de la concentración de  $(CF_3)_2CHO^-$  en la descomposición de sulfóxido *N*-Cl-Metionina.  $[MetSO]=[NaClO]=5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T=298.0 \text{ K}$

En la figura 6.4 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de iones  $(CF_3)_2CHO^-$ . La variación de pH, debida a la disolución tampón, es de 0.1 unidades. En el intervalo de acidez en que se realizó el estudio, pH=9.2-9.3, puede considerarse que la aportación de iones hidróxido,  $(1.6-2.0) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , es poco significativa por lo que no se aplicó ningún factor de corrección a las constantes cinéticas observadas.

La constante de velocidad de segundo orden fue calculada mediante la representación de la constante de velocidad observada,  $k_{\text{obs}}$ , frente a la concentración de iones  $(CF_3)_2CH_2O^-$ .

De los datos obtenidos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma

$$v = v_0 + v_B = k_{\text{obs}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] = (k_0 + k_{(CF_3)_2CHO^-}) \cdot [(CF_3)_2CHO^-] \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] \quad \text{Ec.6.4}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de  $(N\text{-Cl})$ -compuesto,  $k_{(CF_3)_2CHO^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la reacción con iones hexafluoropropanóxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones alcóxido

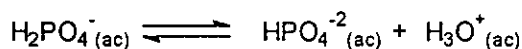
A partir de los datos experimentales (véase anexo 3) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (5.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{(CF_3)_2CHO^-} = (3.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

#### 6.1.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.

También se estudió la influencia de la concentración de  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$  sobre la descomposición del sulfóxido  $(N\text{-Cl})$ -Metionina, para lo que se utilizó una disolución reguladora, dependiendo la concentración de ambos iones del pH del medio y del  $pK_a$  del equilibrio:



cuyo valor es  $(6.47 \pm 0.02)$ .<sup>7</sup>

Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica en la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , se utilizó KCl como electrolito inerte.

En las figura 6.5 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración total de disolución reguladora. Debido a las condiciones de pH, no es necesario restar el efecto debido a la variación en la concentración de iones hidróxido.

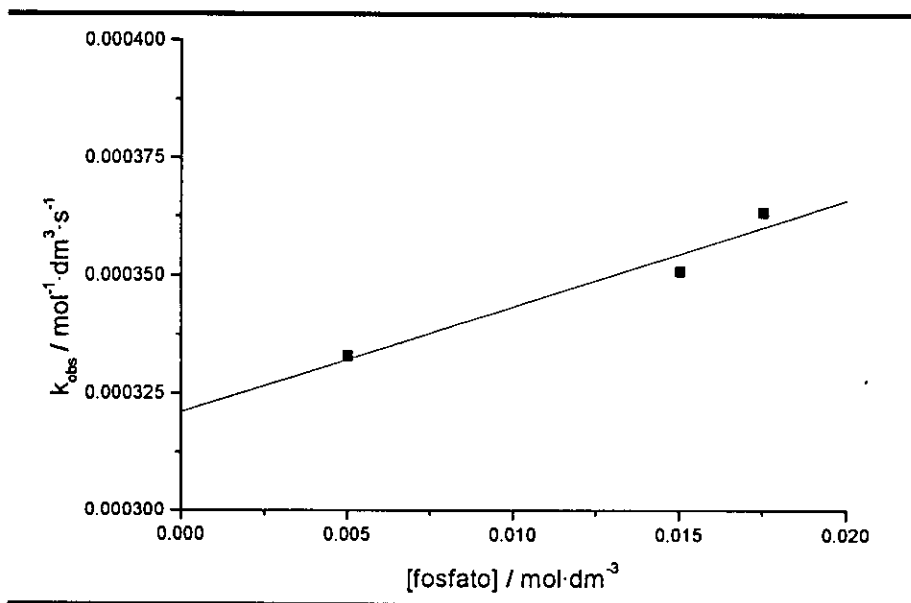


Figura 6.5 Influencia de la concentración total de fosfato en la descomposición del sulfóxido de la (N-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}]=[\text{NaClO}]=5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T=298.0 \text{ K}$

Aceptando la existencia de catálisis por ambas especies, se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma:

$$v = v_0 + v_{\text{fosfato}} = k_{\text{obs}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] = (k_0 + k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-} [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + k_{\text{HPO}_4^{2-}} [\text{HPO}_4^{2-}]) \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] \quad \text{Ec.6.5}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{\text{H}_2\text{PO}_4^-}$  y  $k_{\text{HPO}_4^{2-}}$  son las constantes de orden dos y corresponden a las constantes catalíticas debidas a la presencia de iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  respectivamente, y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones mono- y dihidrógeno fosfato.

Si bien teóricamente es posible determinar la contribución catalítica de cada una de las especies, la calidad de los datos cinéticos desaconseja la

realización de dichas experiencias, sirviendo los datos que aquí se presentan como una indicación clara de la existencia de catálisis por las especies presentes en la disolución reguladora.

Teniendo en cuenta el pH del medio y el correspondiente  $pK_a$ , la ecuación 6.6 permite expresar la ecuación 6.5 en función de la concentración analítica de fosfato (véase la ecuación 6.7), con lo que es esperable una dependencia lineal con la concentración de la disolución reguladora, lo cual quedó patente en la figura 6.5.

$$[B^-]_{\text{equ}} = \frac{[BH]_{\text{total}}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

$$[BH]_{\text{total}} = [BH]_{\text{equ}} + [B^-]_{\text{equ}} \quad \text{Ec.6.6}$$

$$v = v_0 + k_B \cdot [BH]_{\text{total}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}] \quad \text{Ec.6.7}$$

donde

$$k_B = \frac{k_{H_2PO_4^-} \cdot 10^{-pH} + k_{HPO_4^{2-}} \cdot 10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}}$$

A partir de los datos experimentales (véase anexo 3) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (3.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_B = (2.2 \pm 0.5) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

## 6.2. Descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Metionina.

### 6.2.1. Catálisis por iones hidróxido.

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de la concentración de hidróxido sobre la descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Metionina, se utilizó como longitud de onda de trabajo la correspondiente a la aparición del producto de descomposición 215 nm, ya que ésta es comparable con la desaparición del (N-Cl)-compuesto. Además, como se indicó en el capítulo 5, el coeficiente de absorción molar del (N-Cl)-compuesto a 255 nm es más pequeño que el del producto de descomposición a 215 nm por lo que la variación de absorbancia es menor y, por tanto, el error obtenido al ajustar las trazas cinéticas a 255 nm podría ser considerable.

La concentración de iones hidróxido se obtuvo mediante adición a la mezcla de reacción de la cantidad adecuada de disolución de NaOH previamente valorada. Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , utilizando  $\text{NaClO}_4$  como electrolito inerte.

En la figura 6.6 se muestra la dependencia de la constante de velocidad con la concentración de iones  $\text{OH}^-$ .

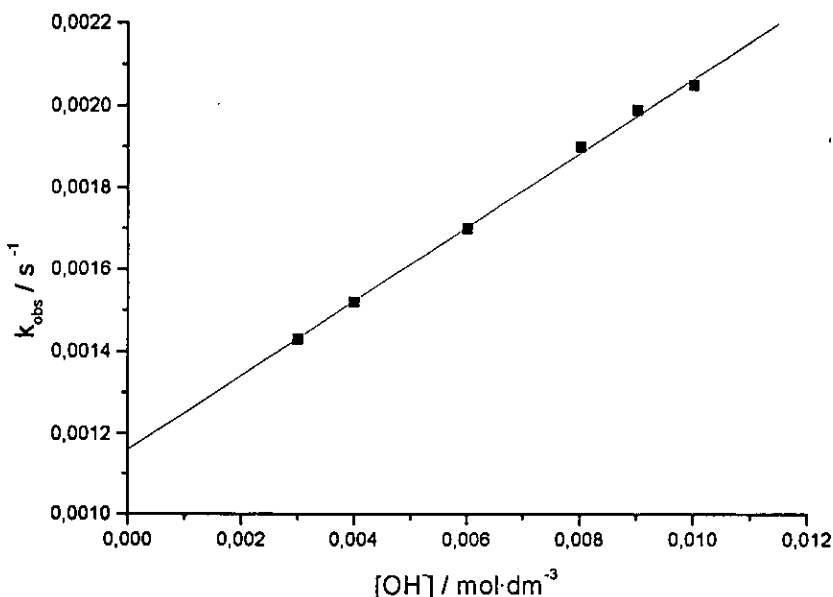


Figura 6.6 Influencia de la concentración de  $\text{OH}^-$  en la descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}_2]=[\text{NaClO}]=2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ );  $T=298.0 \text{ K}$ .

La representación de la constante cinética de primer orden frente a la concentración de iones hidróxido, se ajusta a una línea recta del tipo  $y=a+b\cdot x$ , por lo que se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v=v_0+v_{\text{OH}^-}=k_{\text{obs}}\cdot[(N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2]=(k_0+k_{\text{OH}^-}\cdot[\text{OH}^-])\cdot[(N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2] \quad \text{Ec.6.8}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto y  $k_{\text{OH}^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la reacción con iones hidróxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones hidróxido.

A partir de los datos experimentales (véase anexo 4) se obtienen los siguientes valores,

$$k_0 = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{OH}^-} = (9.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

### 6.2.2. Catálisis por iones trifluoroetóxido.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$  sobre la descomposición de sulfona de (*N*-Cl)-Metionina. Las cinéticas se siguieron a 255 nm. Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , utilizando KCl como electrolito, y no  $\text{NaClO}_4$ , para evitar la precipitación de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{ONa}$ .

La variación de pH, debida a la modificación de la concentración de la disolución tampón, fue de 0.2 unidades. En el intervalo de acidez en que fue realizado el estudio (pH=12.0 –12.2) es necesario tener en cuenta la aportación de los iones hidróxido ( $0.01$ - $0.016 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), y debido a que la concentración de iones hidróxido es suficientemente importante como para contribuir de forma significativa al valor de la constante observada, es necesario corregir el valor de esta constante (véase ecuación 6.2.).

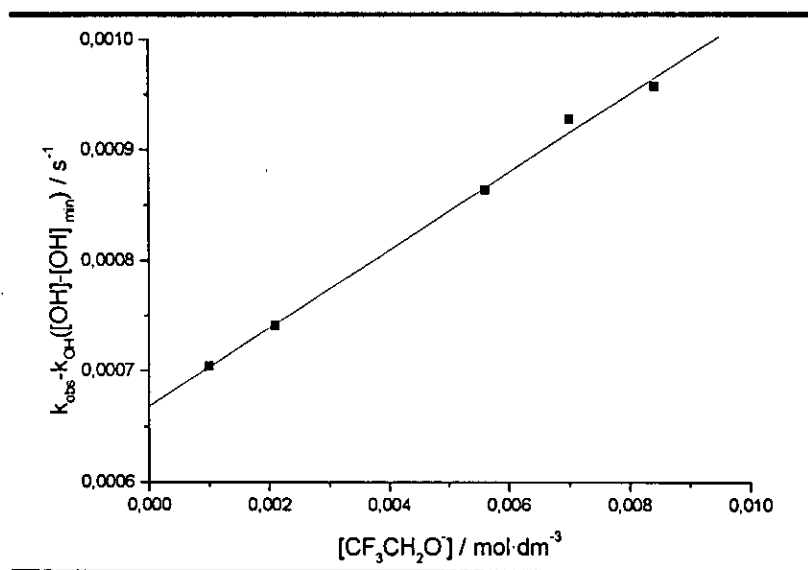


Figura 6.7 Influencia de la concentración de  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$  en la descomposición de la sulfona de (*N*-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}_2] = [\text{NaClO}] = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T = 298.0 \text{ K}$ .

### Descomposición de (N-halo)-derivados de aminoácidos azufrados: resultados

En la figura 6.7 se muestra la dependencia de la constante de velocidad corregida  $k$  frente a la concentración de iones  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-$ . La constante de velocidad de segundo orden fue calculada a partir de la pendiente de esta representación.

De los datos obtenidos se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = v_0 + \sum v_B = k_{\text{obs}} [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2] = (k_0 + k_{\text{OH}^-} + [\text{OH}^-] + k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}^-}) [(N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2] \quad \text{Ec.6.9}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la reacción con iones trifluoroetóxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones alcoholóxido

A partir de los datos experimentales (véase anexo 4) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (6.68 \pm 0.07) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$
$$k_{\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-} = (3.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

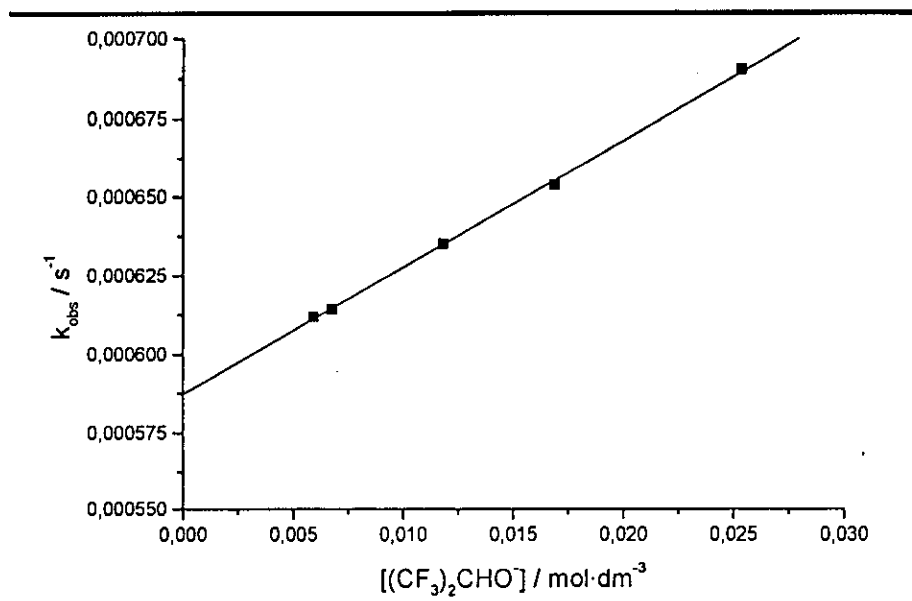
#### 6.2.3. Catálisis por iones hexafluoropropanóxido.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de  $(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-$ , sobre la descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Metionina. Las cinéticas se siguieron a 255 nm. Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Se utilizó KCl como electrolito inerte, y no  $\text{NaClO}_4$ , para evitar la precipitación de  $(\text{CF}_3)_2\text{CHONa}$ .

En la figura 6.8 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de iones  $(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-$ . La variación de pH, debida a la concentración de la disolución tampón, fue de 0.1 unidades. En el intervalo de acidez en que se realizó el estudio,  $\text{pH}=9.9\text{-}10.2$ , puede considerarse que la aportación de iones hidróxido,  $0.79\text{-}1.6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , es poco significativa, por lo que no se aplicó ningún factor de corrección a las constantes cinéticas observadas.



La constante de velocidad de segundo orden se determinó mediante la representación de la constante de velocidad observada,  $k_{obs}$ , frente a la concentración de iones  $(CF_3)_2CHO^-$ .



**Figura 6.8** Influencia de la concentración de  $(CF_3)_2CHO^-$  en la descomposición de la sulfona de (N-Cl)-Metionina.  $[MetSO_2]=[NaClO]=2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T=298.0 \text{ K}$

De los datos obtenidos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma

$$v = v_0 + v_B = k_{obs} \cdot [(N-Cl)-MetSO_2] = (k_0 + k_{(CF_3)_2CHO^-} \cdot [(CF_3)_2CHO^-]) \cdot [(N-Cl)-MetSO_2] \quad \text{Ec.6.10}$$

donde  $k_{obs}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{(CF_3)_2CHO^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la presencia de iones hexafluoropropanóxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones alcóxido

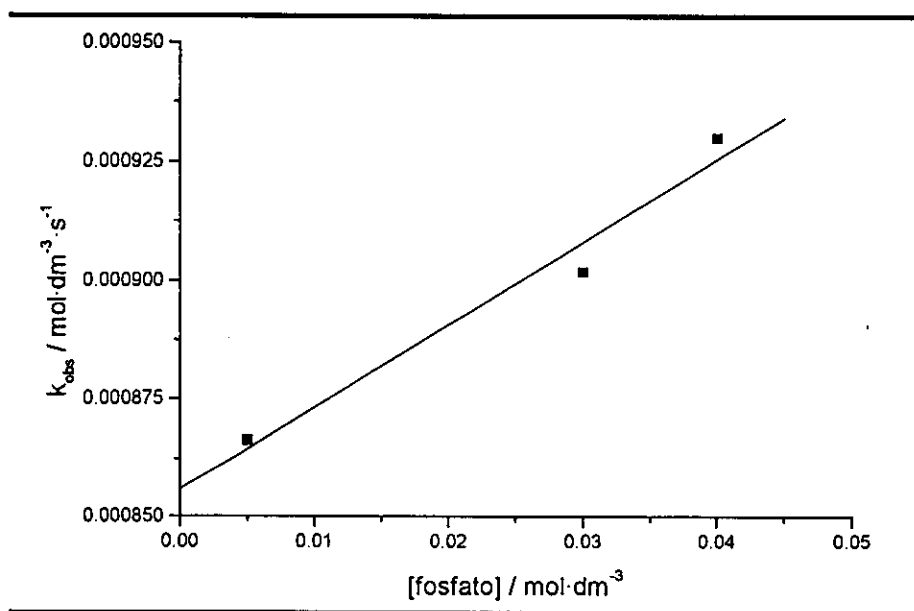
A partir de los datos experimentales (véase anexo 4) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (5.87 \pm 0.01) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{(CF_3)_2CHO^-} = (4.03 \pm 0.07) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

#### 6.2.4. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.

Del mismo modo se ha estudiado la influencia de la concentración los iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  sobre la descomposición de la sulfona de (*N*-Cl)-Metionina. Las trazas cinéticas se siguieron a 255 nm. Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica sobre la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , se utilizó KCl como electrolito inerte.



**Figura 6.9** Influencia de la concentración de fosfato en la descomposición de la sulfona de (*N*-Cl)-Metionina.  $[\text{MetSO}_2]=[\text{NaClO}]=2\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T=298.0 \text{ K}$

Del mismo modo que para el (*N*-Cl)-MetSO, en la figura 6.9 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de tampón fosfato. Debido a las condiciones de pH, no es necesario restar el efecto catalítico debido a la concentración de iones hidróxido.

Las mismas consideraciones efectuadas en el caso del (*N*-Cl)-MetSO son de aplicación aquí.

A partir de los datos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma:

$$v = v_0 + v_{\text{fosfato}} = k_{\text{obs}} \cdot [(\text{N-Cl})\text{-MetSO}_2] = v_0 + k_{\text{B}} \cdot [\text{BH}]_{\text{total}} \cdot [(\text{N-Cl})\text{-MetSO}_2] \quad \text{Ec.6.11}$$

donde  $k_{obs}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (*N*-Cl)-compuesto,  $k_B$  es una constante que contiene a la constante catalítica debida a la presencia de iones  $H_2PO_4^-$  y  $HPO_4^{2-}$  (véase la ecuación 6.7), y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de los iones de la disolución reguladora.

A partir de los datos experimentales (véase anexo 4) se obtienen los siguientes valores:

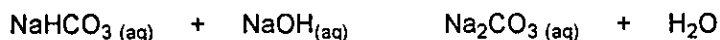
$$k_0 = (8.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_B = (1.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

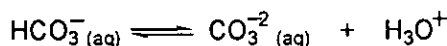
### 6.3. Descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico.

#### 6.3.1. Catálisis por iones carbonato e hidrógeno carbonato.

Se ha estudiado la influencia de los iones carbonato e hidrógeno carbonato en la reacción de descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico. Para ello se utilizó una disolución reguladora  $HCO_3^- / CO_3^{2-}$



dependiendo la concentración de ambos iones del pH del medio y del  $pK_a$  del equilibrio,



cuyo valor es  $9.93 \pm 0.02$ .<sup>7</sup>

Para evitar el posible efecto de la fuerza iónica en la velocidad de reacción, ésta se mantuvo constante,  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , utilizando  $NaClO_4$  como electrolito inerte. Las cinéticas se siguieron a 255 nm.

En la figura 6.10 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de tampón carbonato/bicarbonato:

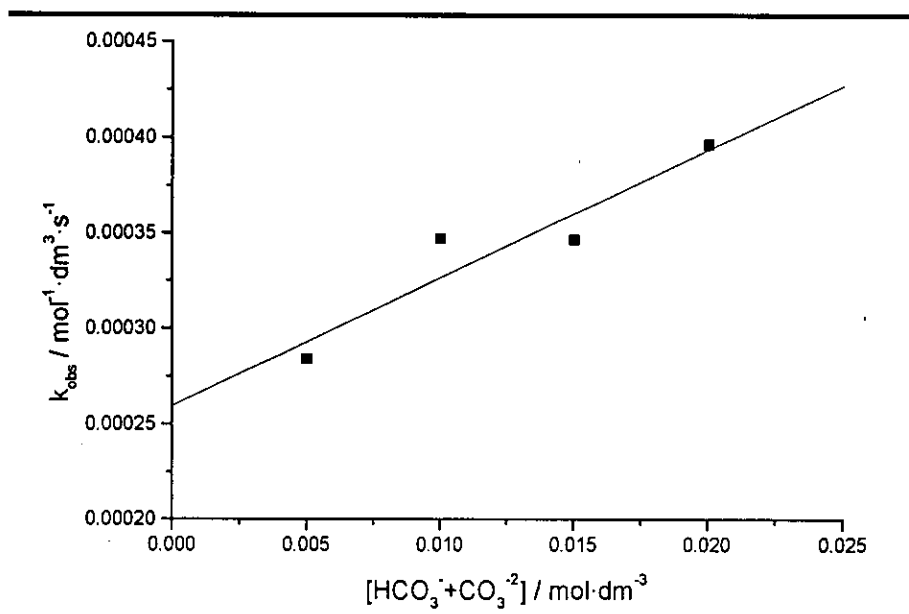


Figura 6.10 Influencia de la concentración de tampón carbonato/bicarbonato en la descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico. [Cya]=[NaClO]= $5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>; I=0.5 mol·dm<sup>-3</sup> (NaClO<sub>4</sub>); T=298.0 K

De los datos obtenidos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma:

$$v = v_0 + v_{\text{OH}^-} + v_{\text{carbonato}} = k_{\text{obs}} \cdot [(N - \text{Cl}) - \text{Cya}] = (k_0^* + k_B \cdot [\text{BH}]_{\text{total}}) \cdot [(N - \text{Cl}) - \text{Cya}]$$

siendo  $k_0^* = k_0 + k_{\text{OH}^-} \cdot [\text{OH}^-]$  donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (*N*-Cl)-compuesto,  $k_B$  es una constante que contiene a la constante catalítica debida a la presencia de iones HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y CO<sub>3</sub><sup>-2</sup> (véase la ecuación 6.7), y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de los iones de la disolución reguladora.

En las condiciones de pH de trabajo podría ser necesario eliminar el efecto que sobre la constante de velocidad tiene la concentración de hidróxido presente, pero tal y como se indicó anteriormente la existencia de un segundo proceso impidió el estudio de la descomposición de (*N*-Cl)-Cya en presencia de iones hidróxido.

Teniendo en cuenta el pH del medio, el pK<sub>a</sub> del equilibrio anterior y la ecuación que relaciona ambos (ecuación 6.6), es posible determinar el

porcentaje de ambas especies en el equilibrio, y por tanto cuánto contribuyen en la constante de velocidad observada.

Sin embargo lo indicado tanto para el (*N*-Cl)-MetSO<sub>2</sub> y como para el (*N*-Cl)-MetSO en el caso de la influencia de tampón fosfato es de aplicación aquí, con lo que se ha querido poner de manifiesto que existe influencia catalítica de dichas especies.

A partir de los datos experimentales (véase anexo 5) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0^* = (2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_{\text{HCO}_3^-} = (7 \pm 1) \cdot 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

### 6.3.2. Catálisis por iones hexafluoropropanóxico.

Se ha estudiado la influencia de la concentración de (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO<sup>-</sup>, sobre la descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico. Las cinéticas se siguieron a 255 nm. Para controlar la fuerza iónica se utilizó KCl como electrolito inerte, y no NaClO<sub>4</sub>, para evitar la precipitación de (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHONa.

En la figura 6.11 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de iones (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO<sup>-</sup>. En el intervalo de acidez en que se realizó el estudio, pH=8.6-9.0, puede considerarse que la aportación de iones hidróxido, es poco significativa por lo que no se aplicó ningún factor de corrección a las constantes cinéticas observadas.

La constante de velocidad de segundo orden fue calculada a partir de la pendiente de esta representación.

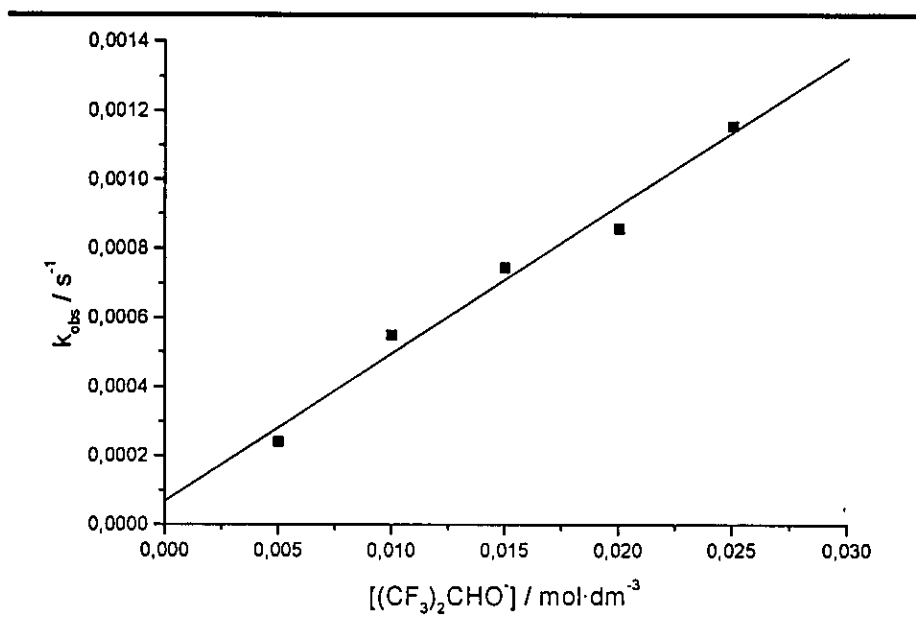


Figura 6.11 Influencia de la concentración de  $(CF_3)_2CHO^-$  en la descomposición del (N-Cl)-ácido cisteico.  $[Cya]=[NaClO]=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl);  $T=298.0 \text{ K}$

De los datos obtenidos se puede establecer la ecuación de velocidad de la siguiente forma:

$$v = v_0 + v_B = k_{obs} \cdot [(N-Cl)-Cya] = (k_0 + k_{(CF_3)_2CHO^-} \cdot [(CF_3)_2CHO^-]) \cdot [(N-Cl)-Cya] \quad \text{Ec.6.13}$$

donde  $k_{obs}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (N-Cl)-compuesto,  $k_{(CF_3)_2CHO^-}$  es la constante de orden dos y corresponde a la constante catalítica debida a la presencia de iones hexafluoropropanóxido y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de iones alcóxido.

A partir de los datos experimentales (véase anexo 5) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (6.7 \pm 6.2) \cdot 10^{-5}$$

$$k_{(CF_3)_2CHO^-} = (4.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-2} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

6.3.3. Catálisis por iones hidrógeno y dihidrógeno fosfato.

También se ha estudiado la influencia de la concentración de los iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  sobre la descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico. Las cinéticas se siguieron a 255 nm. Para controlar la fuerza iónica se utilizó  $\text{NaClO}_4$  como electrolito inerte.

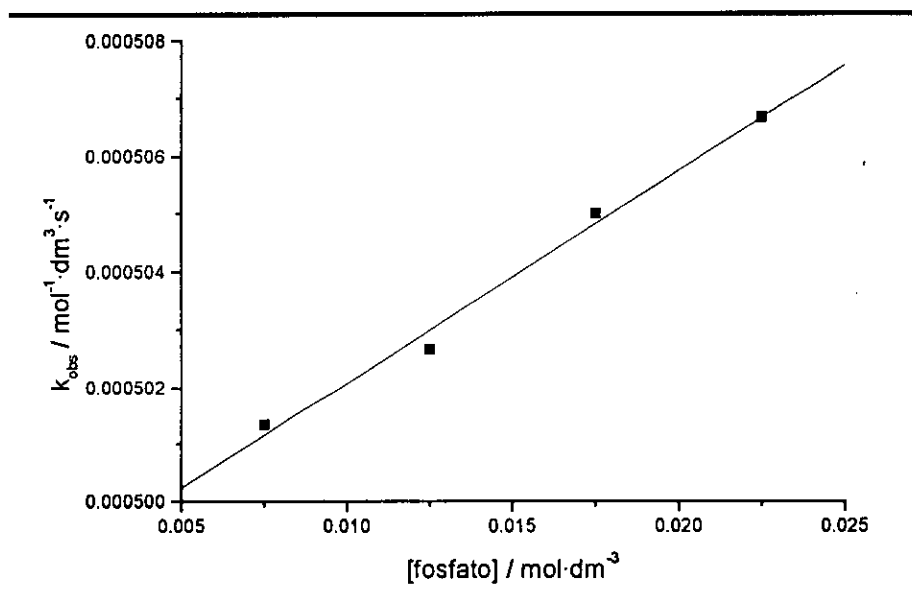


Figura 6.12 Influencia de la concentración de tampón fosfato en la descomposición del ácido (*N*-Cl)-cisteico.  $[\text{Cya}] = [\text{NaClO}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ );  $T = 298.0 \text{ K}$

En la figura 6.13 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de tampón fosfato. Debido a las condiciones de pH, no es necesario restar el efecto con que la concentración de iones hidróxido podría contribuir al valor de la constante observada.

Considerando reactivas a ambas especies del tampón fosfato se puede establecer la ecuación de velocidad como:

$$v = v_0 + v_{\text{fosfato}} = k_{\text{obs}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-Cya}] = v_0 + k_B [\text{BH}]_{\text{total}} \cdot [(N\text{-Cl})\text{-Cya}] \quad \text{Ec.6.15}$$

donde  $k_{\text{obs}}$  representa la pseudoconstante de orden uno respecto a la concentración de (*N*-Cl)-compuesto,  $k_B$  es una constante que contiene a la constante catalítica debida a la presencia de iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$  (véase la

*Descomposición de (N-halo)-derivados de aminoácidos azufrados: resultados*

ecuación 6.7), y  $k_0$  es la contribución debida al proceso de descomposición en ausencia de los iones de la disolución reguladora.

La constante de  $k_B$  se calcula a partir de la pendiente de esa representación e implica la existencia de catálisis por las especies presentes en el tampón fosfato.

De los datos experimentales (véase anexo 5) se obtienen los siguientes valores:

$$k_0 = (4.98 \pm 0.04) \cdot 10^{-4}$$

$$k_B = (3.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$



#### 6.4. Bibliografía.

(1) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, *9*, 552-560.

(2) Losada, M. Tesis doctoral, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1993.

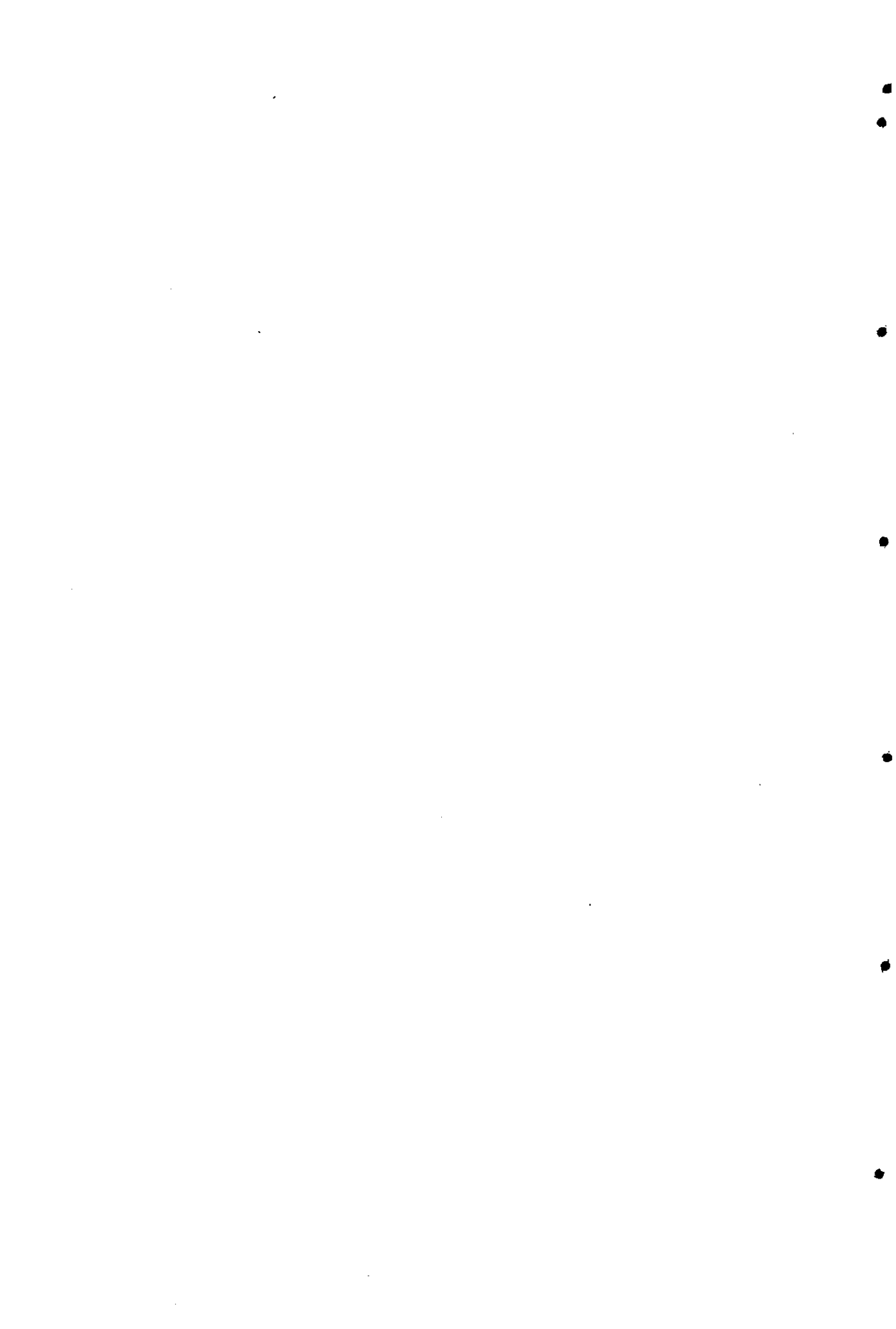
(3) Smith, M. B.; March, J. *March's advanced organic chemistry: reactions mechanisms, and structure.*; 5th ed.; John Wiley & Sons: New York, 2001.

(4) Fernández, I. Tesis de licenciatura, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1996.

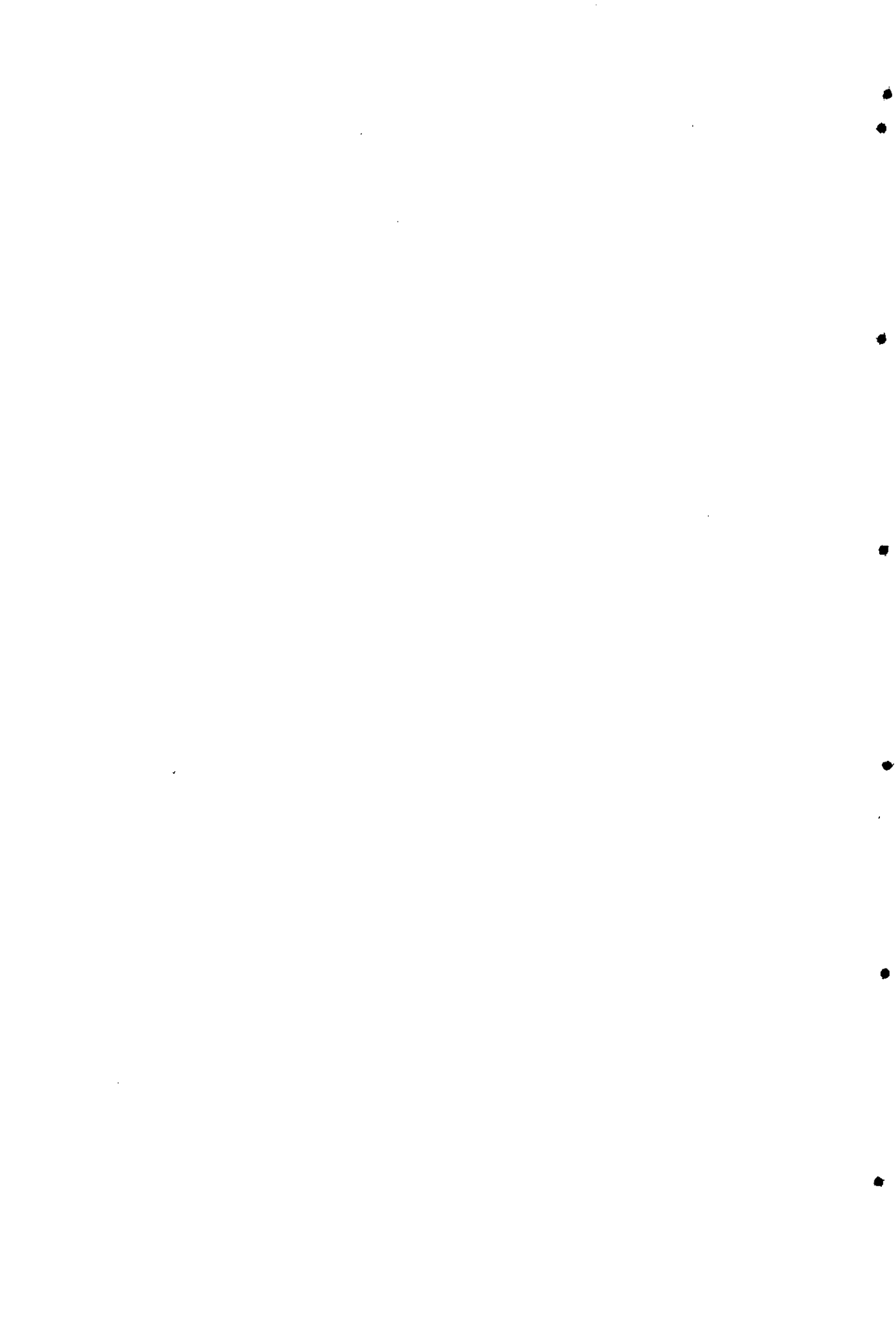
(5) Armesto, X. L.; Caamaño, R.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, S.; Santaballa, J. A., Trabajo sin publicar.

(6) Page, M. I.; Webster, P. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1990**, 813.

(7) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 6 (Second Supplement).

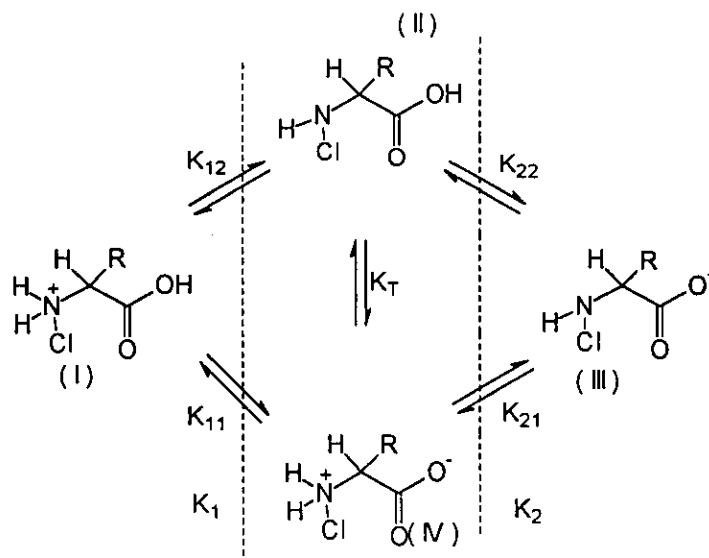


7. Descomposición de (*N*-halo)-derivados de aminoácidos azufrados: Discusión



La interpretación de los datos cinéticos, obliga a conocer en primer lugar, qué especies están presentes en las condiciones de trabajo. Tanto el sulfóxido de (*N*-Cl)-Metionina como la sulfona de (*N*-Cl)-Metionina pueden presentarse en cuatro formas relacionadas mediante dos equilibrios macroscópicos, cuatro microscópicos y un equilibrio de tautomería. Mientras que en el caso del ácido (*N*-Cl)-cisteico el número de posibles especies presentes en el proceso son ocho, relacionadas mediante tres equilibrios macroscópicos, doce microscópicos y cuatro equilibrios de tautomería.

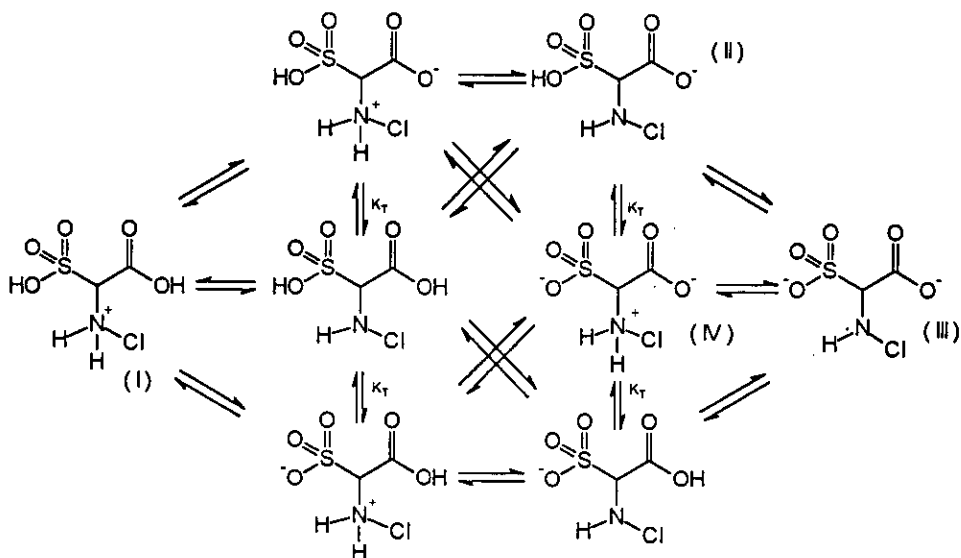
En los siguientes esquemas, se muestran los posibles equilibrios de ionización para los (*N*-Cl)-compuestos estudiados.



Esquema 7.1 Equilibrios ácido-base para el sulfóxido de la (*N*-Cl)-Met ( $\text{R}=\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_3$ ) y la sulfona de (*N*-Cl)-Met ( $\text{R}=\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ )

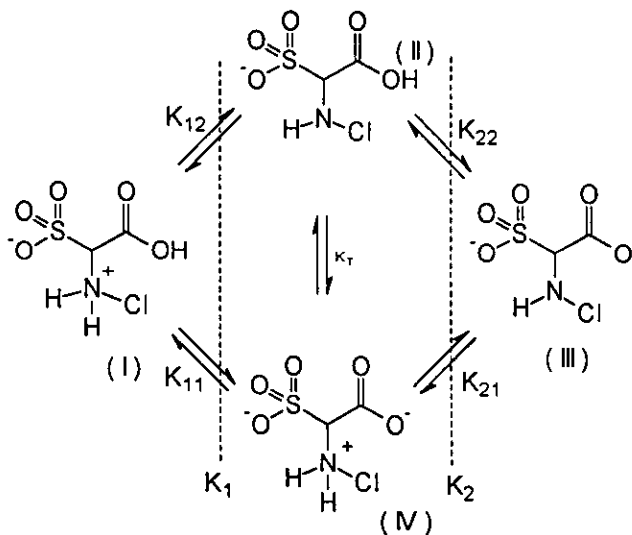
donde  $K_1$  y  $K_2$  son las constantes macroscópicas, y  $K_{12}$ ,  $K_{22}$ ,  $K_{11}$  y  $K_{21}$  corresponden a los equilibrios microscópicos existentes (dos para cada equilibrio macroscópico) y  $K_T$  corresponde al equilibrio de tautomería.

Descomposición de (*N*-halo)-compuestos catalizada por bases: discusión



Esquema 7.2 Equilibrios ácido-base para ácido (*N*-Cl)-Cya.

En las condiciones de pH que se utilizaron en el trabajo se pueden reducir el número de derivados del ácido (*N*-Cl)-Cya a cuatro tal y como se indica en el esquema 7.3



Esquema 7.3 Equilibrios ácido-base reducidos para el ácido (*N*-Cl)-Cya.

donde  $K_1$  y  $K_2$  son las constantes macroscópicas, y  $K_{12}$ ,  $K_{22}$ ,  $K_{11}$  y  $K_{21}$  corresponden a los equilibrios microscópicos existentes (dos para cada equilibrio macroscópico) y  $K_T$  corresponde al equilibrio de tautomería.

Teniendo en cuenta las condiciones de trabajo ( $\text{pH} \geq 7$ ), en el caso de los *N*-cloroderivados de la metionina sulfóxido y sulfona, y tomando como referencia los valores de  $\text{pK}_a$  macroscópicos de la metionina [ $\text{pK}_a(-\text{CO}_2\text{H})=2.20 \pm 0.04$ ,  $\text{pK}_a(-\text{NH}_3^+)=9.05 \pm 0.02$ ]<sup>1</sup>, las especies (I) y (II) no se encuentran en proporciones significativas ya que el grupo carboxílico está protonado y, además, la existencia de un átomo de Cl unido al N, hace que el  $\text{pK}_a$  de este grupo pueda disminuir en casi 10 unidades,<sup>2</sup> por lo que también este grupo debería estar desprotonado en las condiciones experimentales. Basándose en esto último también se puede descartar la presencia en concentraciones significativas la especie (IV).

Para el (*N*-Cl)-derivado del ácido cisteico, teniendo en cuenta los valores de  $\text{pK}_a$  macroscópicos del ácido cisteico, [ $\text{pK}_1=1.88$ ,  $\text{pK}_2=8.69$ ]<sup>3</sup>, las condiciones de acidez del estudio, así como las consideraciones acerca de la disminución de  $\text{pK}_a$  del grupo amino debido a la presencia de un átomo aceptor (Cl) se puede descartar la presencia de las especies (I), (II) y (IV) en concentraciones significativas. Así, la especie implicada en la reacción de descomposición para los tres (*N*-Cl)-derivados debe de ser la especie dianiónica (III).

La concentración de esta especie se puede expresar en función de las constantes macroscópicas, y de la concentración analítica del (*N*-Cl)-compuesto:

$$[\text{III}] = \frac{[(\text{N-Cl})\text{-compuesto}]_0}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2}} \quad \text{Ec.7.1}$$

A partir de las evidencias experimentales acerca del orden respecto a los (*N*-Cl)-compuestos estudiados (capítulo 4), junto a la dependencia de la velocidad de descomposición con la concentración de distintas bases (capítulo 6), se deduce la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = \frac{-d[\text{III}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{III}] = (k_0 + \sum_{i=1}^n k_B [B]_i) [\text{III}] \quad \text{Ec.7.2}$$

ecuación que en función de la concentración analítica del (N-Cl)-compuesto adopta la siguiente forma:

$$v = k_{\text{obs}} [\text{III}] = k_{\text{obs}} \frac{[(N\text{-Cl})\text{-compuesto}]_0}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 K_2}} \quad \text{Ec.7.3}$$

En las condiciones de trabajo,  $K_1 \gg [\text{H}^+]$  y  $K_2 \gg [\text{H}^+]$ , la expresión anterior se simplifica a:

$$v = k_{\text{obs}} [(N\text{-Cl})\text{-compuesto}]_0 = (k_0 + \sum_{i=1}^n k_B [B]_i) [(N\text{-Cl})\text{-compuesto}]_0 \quad \text{Ec.7.4}$$

Estos resultados sugieren la existencia de dos procesos simultáneos que dependen del pH. Así en el caso del sulfóxido de la (N-Cl)-Metionina, (capítulo 6, figura 6.1), se encontró que la constante de velocidad ( $k_0$ ) no depende del pH del medio a valores comprendidos entre 6 y 11, y que a  $\text{pH} > 12$  existe una clara dependencia de la constante de velocidad con la basicidad del medio. El primer proceso puede clasificarse como una fragmentación de Grob unimolecular y el segundo es un proceso catalizado por bases.

En la tabla 7.1 se recogen los valores obtenidos para las constantes  $k_B$  de la ecuación anterior.

Tabla 7.1.

Base	$k_B / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$		
	MetSO	MetSO <sub>2</sub>	Cya
HO <sup>-</sup>	$(14.9 \pm 0.9) \cdot 10^{-3}$	$(9.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$	-
CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O <sup>-</sup>	$(8.91 \pm 0.08) \cdot 10^{-3}$	$(3.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-2}$	-
(CF <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHO <sup>-</sup>	$(3.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-3}$	$(4.03 \pm 0.07) \cdot 10^{-3}$	$(4.3 \pm 0.4) \cdot 10^{-2}$
(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> + HPO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> )*	$(2.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(1.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-3}$	$(3.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-4}$
(HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup> )*	-	-	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-2}$

\* En este caso el resultado es función de ambas constantes (véase la ecuación 6.7)

Además dado que en todos los casos se obtienen ordenadas en el origen distintas de cero, se puede determinar la constante de catálisis debida al



disolvente. Este valor se toma como el promedio de las ordenadas en el origen de las distintas representaciones de la  $k_{obs}$  frente a la concentración de disolución reguladora. Valor que es necesario dividir por la concentración de agua para obtener la constante de orden dos.

$$k_{H_2O} (\text{MetSO}) = (1.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{H_2O} (\text{MetSO}_2) = (1.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{H_2O} (\text{Cya}) = (5 \pm 1) \cdot 10^{-6} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

La ecuación 7.4, presenta la forma característica de aquellos procesos sujetos a catálisis general básica. Un método comúnmente aceptado para verificar la existencia de catálisis general básica es que se cumpla la relación de Brönsted, que relaciona las constantes de catálisis general básica con las constantes de ionización de las bases que participan en la reacción:

$$\log\left(\frac{k_B}{q}\right) = \log G_B + \beta \left( \log\left(\frac{p}{q}\right) + pK_{BH} \right) \quad \text{Ec.7.5}$$

donde,

- $k_B$  es la constante catalítica de orden dos para la reacción catalizada por una base B
- $\beta$  (o  $\beta_H$ ) es el parámetro de Brönsted asociado con la reacción catalizada por bases
- $K_{BH}$  es la constante de acidez del ácido conjugado de la base que cataliza la reacción
- p y q se refieren a una base que posea q posiciones indistinguibles en las que pueda alojarse un protón, y cuya forma ácida conjugada tenga p protones equivalentes

Como  $pK_{BH} = -\log K_{BH}$  la ecuación anterior se puede expresar como:

$$\log k_B = \beta \cdot pK_{BH} + \text{cte} \quad \text{Ec.7.6}$$

Esta relación implica que cuanto más fuerte sea la base que participa en el proceso más efectiva es la catálisis.

El valor de  $\beta$  se interpreta como el grado de transferencia protónica cuando se alcanza el estado de transición de la reacción estudiada. Esta interpretación se basa en las suposiciones de que todos los cambios que se producen en la

base cuando se transforma en su ácido conjugado son función lineal del grado de transferencia protónica y que la transferencia protónica tiene lugar en línea recta. De acuerdo con esto, el valor de  $\beta$  debería variar siempre entre 0 y 1.<sup>4</sup>

En las gráficas 7.1, 7.2 se muestran las representaciones de Brønsted para la catálisis general de las reacciones de descomposición del sulfóxido de (*N*-Cl)-Met y de la sulfona de (*N*-Cl)-Met.

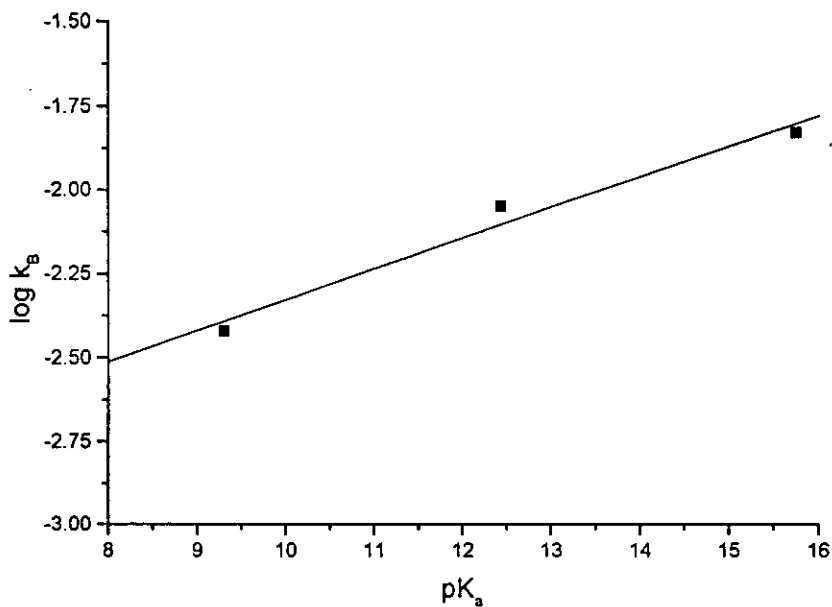


Figura 7.1 Representación de Brønsted para la reacción de descomposición de (*N*-Cl)-MetSO.

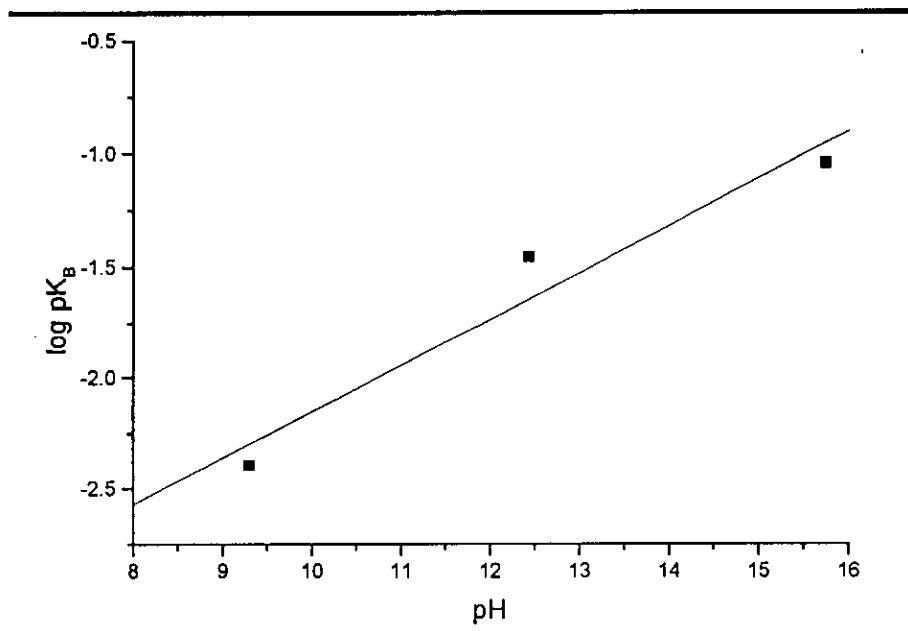


Figura 7.2 Representación de Brønsted para la reacción de descomposición de (N-Cl)-MetSO<sub>2</sub>.

La linealidad obtenida en ambos casos confirma la catálisis general básica. La similitud de las pendientes indica además que el grado de transferencia protónica en el estado de transición de la reacción varía poco con el cambio de base. El ajuste por regresión lineal de las gráficas proporciona los correspondientes valores del parámetro  $\beta_H$ .

Los valores obtenidos son

- $\beta_H ((N-Cl)\text{-MetSO}) = 0.09 \pm 0.01$
- $\beta_H ((N-Cl)\text{-MetSO}_2) = 0.21 \pm 0.05$

Para el sulfóxido de (N-Cl)-Metionina en el estado de transición el enlace C<sub>β</sub>-H está roto en un 9%, mientras que para el (N-Cl)-derivado de la metionina sulfona este enlace se ha roto en un 21%. Esta diferencia entre los  $\beta_H$  así calculados se puede explicar sobre la base de los diferentes sustituyentes en el C<sub>β</sub>, que afectarán estabilizando el posible carbanión en grado diverso. Para el caso del sulfóxido de (N-Cl)-Metionina se obtiene un  $\beta_H = 0.09$ , lo que indica que el posible carbanión es menos estable que el de la metionina sulfona debido a que el sustituyente en C<sub>β</sub> (-CH<sub>2</sub>SOCH<sub>3</sub>) lo estabiliza por inducción en menor medida. Sin embargo debido al mayor efecto inductivo del grupo (-

CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), el posible carbanión en este caso es más estable que en el caso de la metionina sulfóxido y de ahí que el grado de ruptura del enlace C-H sea mayor.

En el mismo sentido se comparan los valores de las constantes de velocidad  $k_B$  para la misma base. De la tabla 7.1  $k_B^{(N-Cl)-MetSO} < k_B^{(N-Cl)-MetSO_2}$ , es decir, se produce un aumento en la velocidad de reacción por sustituyentes aceptores de carga, que ayudan a disipar la carga parcial negativa ( $\delta^-$ ) que se generaría en el estado de transición, y que estaría de acuerdo con la estabilidad de los posibles carbaniones.

Para el caso del (*N*-Cl)-Cya, dado que no se dispone de las constantes catalíticas necesarias, no ha sido posible obtener directamente un valor  $\beta_H$ . A la vista del comportamiento de los otros dos compuestos, y dado que en este caso el sustituyente en C <sub>$\beta$</sub> , un grupo ácido sulfónico, está más cerca de uno de los centros de reacción, se podría predecir que el grado de transferencia del protón es todavía mayor, y por ende la  $\beta_H$ . Esta predicción está de acuerdo con los valores de la constante catalítica correspondiente al ion (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO<sup>-</sup> se observa que  $k_B^{(N-Cl)-MetSO} < k_B^{(N-Cl)-MetSO_2} < k_B^{(N-Cl)-Cya}$  (tabla 7.1).

A partir de las constantes de velocidad obtenidas podría obtenerse información acerca del proceso mediante el empleo de la representación de Taft, la cual se muestra en la figura 7.3.

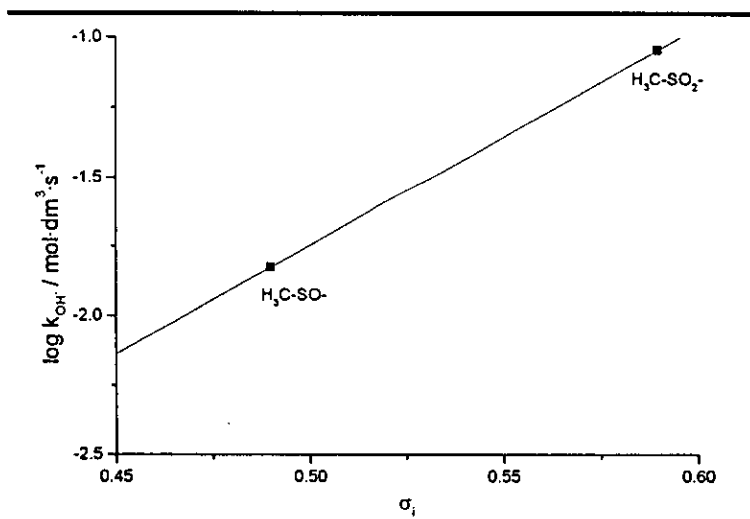


Figura 7.3 Representación de Taft para la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO y de (*N*-Cl)-MetSO<sub>2</sub>.

Lo que debe de resaltarse de esta gráfica es el signo de la pendiente ( $\rho > 0$ ), lo que indica que en el estado de transición se está generando una carga negativa sobre el centro de reacción próximo a los sustituyentes, esto es sobre el C, de acuerdo con lo discutido hasta el momento. No se discute aquí el valor numérico de  $\rho$  puesto que se han empleado valores para sigma para grupos similares pero con un  $\text{CH}_2$  menos; dado que no existen valores bibliográficos se ha tomado esta opción como una medida de la tendencia.

Si bien la representación de Taft de la figura 7.3 está en consonancia con lo concluido hasta el momento, la situación podría revertirse si por ejemplo se considerasen los valores de  $k_{(\text{H}_2\text{PO}_4(-) + \text{HPO}_4(-2))}$  y  $k_{(\text{HCO}_3(-) + \text{CO}_3(-2))}$  de la tabla 7.1. Dichos valores se corresponden a la expresión indicada en la ecuación 6.7, puesto que las distintas experiencias con tampón fosfato se han realizado en las mismas condiciones de pH, dichos valores pueden ser comparados. Por tanto, puesto que se cumple la relación de Brönsted se puede predecir que quien presente el mayor valor de la función de constantes de la ec. 6.7 será quien tenga las constantes catalíticas más altas, resultando que el orden de reactividad es ahora para  $k_{\text{HPO}_4(-2)}$ , por ejemplo,  $(N\text{-Cl})\text{-MetSO} > (N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2 > (N\text{-Cl})\text{-Cya}$ , inverso al obtenido para el  $k_{(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-}$  (Tabla 7.1). Utilizando un razonamiento similar se concluye que, como era de esperar, las constantes catalíticas de las especies del tampón carbonato son mayores que las del tampón fosfato.

Resulta, pues, que con las bases más fuertes la representación de Taft (figura 7.3) apunta al desarrollo de carga negativa en el carbono, mientras que con bases bastante más débiles presenta pendiente negativa, lo cual implica desarrollo de carga positiva. Este cambio en el signo de la densidad de carga sobre el carbono podría haberse predicho al observar la representación de Brönsted conjunta para el  $(N\text{-Cl})\text{-MetSO}$  y el  $(N\text{-Cl})\text{-MetSO}_2$ , que se muestra en la figura 7.4.

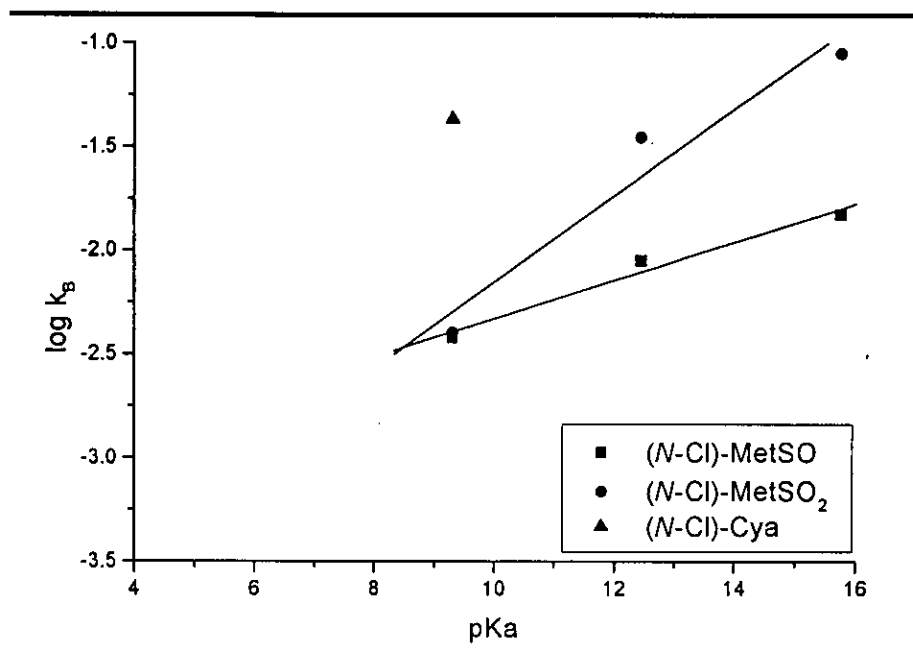


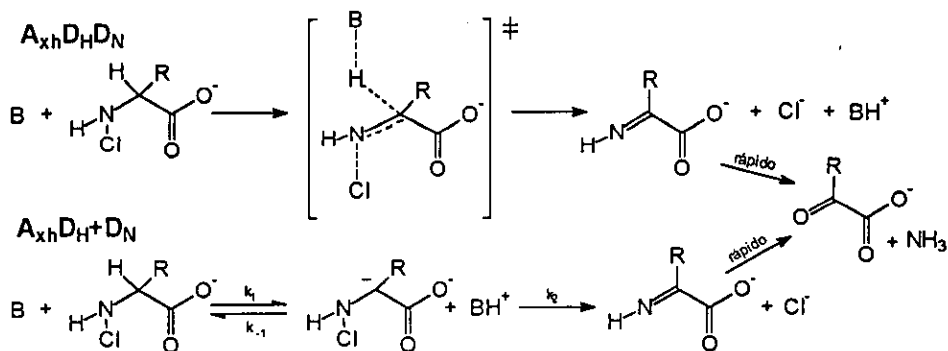
Figura 7.4 Representación de Brønsted para la reacción de descomposición de (*N*-Cl)-MetSO<sub>2</sub> y (*N*-Cl)-MetSO.

A la vista de dicha figura queda patente que ambas líneas se cruzan y que para bases con un pKa menor de 8 el orden de reactividad se va a invertir, lo cual se ha comprobado, y también la pendiente de la representación de Taft; resulta, entonces, que el carbono, del que es abstraído el protón, en el estado de transición pasa de tener carga negativa para bases fuertes, a mostrar carga positiva para bases débiles, lo cual puede interpretarse como que el evento molecular que ocurre en el citado carbono está acoplado con otro proceso en el que también hay cambios en la distribución electrónica.

De lo anterior se puede incidir en dos aspectos, uno general y otro particular. De modo específico, y a la vista de los valores de la tabla 7.1., se corrobora que el grado de transferencia protónica ha de ser mayor en el (*N*-Cl)-Cya que en los otros dos compuestos, de otra manera no presentaría constantes catalíticas menores para las especies del tampón fosfato. El aspecto general es relativo al cuidado con el que se han de manejar los resultados de relaciones como las de Taft, siendo más apropiado analizar las tendencias que aferrarse a valores numéricos concretos.

En la bibliografía<sup>5</sup> se ha propuesto para la reacción de descomposición de (*N*-Cl)-compuestos catalizada por bases, un proceso de eliminación 1,2

(eliminación en  $\beta$ ) como mecanismo de reacción. Como se indica en el capítulo 2 los procesos de eliminación se pueden clasificar en: ( $D_N^\ddagger + A_{xh}D_H$ ), ( $A_{xh}D_H D_N^\ddagger$ ) y ( $A_{xh}D_H + D_H$ ) y dependiendo de las constantes de velocidad  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  se pueden distinguir varios mecanismos.

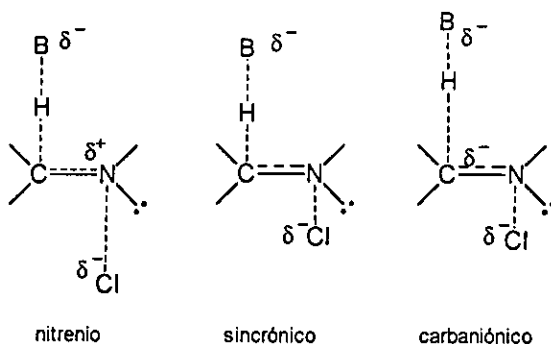


**Esquema 7.4** Mecanismos de descomposición de (*N*-Cl)-compuestos en medio básico.

Entre éstos últimos hay dos posibilidades límite: ( $A_{xh}D_H^\ddagger + D_N$ ), la formación del carbanión es la etapa limitante ( $k_1$ ); ( $A_{xh}D_H + D_N^\ddagger$ ), la etapa limitante corresponde a la ruptura del enlace N-Cl ( $k_2$ ).

El mecanismo ( $D_N^\ddagger + A_{xh}D_H$ ) se caracteriza por seguir una ley cinética de orden uno. En este proceso la etapa limitante corresponde a la formación del ion nitrenio.

Un proceso que siga un mecanismo ( $A_{xh}D_H D_N^\ddagger$ ) se caracteriza por ser un proceso concertado, con una ley cinética de orden dos y que además presenta catálisis general básica. En este caso no existe intermedio de reacción, y el estado de transición refleja la modificación de todos los parámetros estructurales (distancias de enlace, ángulos de enlace, ángulos diedros) a lo largo de la reacción. Los principales parámetros estructurales implicados en el proceso son cuatro distancias de enlace: formación de los enlaces B-H y N=C y la ruptura de los enlaces N-Cl y C-H. Dichos eventos moleculares no han de ser necesariamente sincrónicos, por lo que el estado de transición puede hallarse dentro de un amplio abanico de estructuras (esquema 7.5).



**Esquema 7.5** Estructuras posibles para el estado de transición de un mecanismo concertado  $A_{xh}D_HD_N$

Un mecanismo ( $A_{xh}D_H + D_N$ ) transcurre a través de la formación de un carbanión como intermedio de reacción, sigue una ley cinética de orden dos para ( $A_{xh}D_H^\ddagger + D_N$ ), y ( $A_{xh}D_H + D_N^\ddagger$ ), y puede presentar catálisis general básica o específica.

De entre estas posibilidades es difícil discernir entre un mecanismo concertado, ( $A_{xh}D_HD_N^\ddagger$ ), con un estado de transición próximo a un carbanión y un mecanismo vía carbanión ( $A_{xh}D_H^\ddagger + D_N$ ).

A partir de las evidencias experimentales obtenidas para la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO, (*N*-Cl)-MetSO<sub>2</sub> y (*N*-Cl)-Cya que conducen a la ecuación de velocidad antes propuesta (ecuación 7.4) se pueden realizar las siguientes consideraciones:

1. Teniendo en cuenta las características de un mecanismo ( $D_N^\ddagger + A_{xh}D_H$ ) (capítulo 2), y como los datos experimentales conducen a una ecuación de velocidad característica de procesos sujetos a catálisis general básica y además de orden cinético dos, por lo que es posible rechazar este mecanismo como la vía por la que transcurre la reacción de descomposición de los (*N*-Cl)-compuestos estudiados.

2. El mecanismo ( $A_{xh}D_H + D_N^\ddagger$ ) se caracteriza porque tiene lugar un rápido equilibrio de protonación siendo la etapa limitante la correspondiente al proceso de eliminación a partir del carbanión libre, no existiendo en esta situación catálisis general básica, que no es lo que sucede en las reacciones estudiadas; por ello se puede descartar el mecanismo ( $A_{xh}D_H + D_N^\ddagger$ ).

3. Un cambio en la etapa limitante en la velocidad de reacción al aumentar la concentración de disolución reguladora del pH es una evidencia



determinante de la existencia de un carbanión como intermedio. Para los tres (N-Cl)-compuestos estudiados, se observa este incremento con todas las disoluciones reguladoras empleadas (capítulo 5). Debido a que se trabaja a fuerza iónica constante se puede descartar el efecto salino como responsable de esta variación, y por tanto se podría atribuir a un cambio de la etapa limitante que pasaría de ser la formación del carbanión, cuando la concentración de regulador es baja, a la expulsión del grupo saliente cuando es alta. A la vista de los resultados experimentales obtenidos podría concluirse que el proceso sigue un mecanismo tipo ( $A_{\text{N}}D_{\text{H}}^{\ddagger} + D_{\text{N}}$ ).

Mediante parámetros que relacionen estructura y reactividad, como es  $\beta_{\text{H}}$ , es posible conocer el grado de ruptura del enlace  $C_{\beta}-\text{H}$  en el estado de transición. Así cabría esperar un valor próximo a uno para las reacciones estudiadas si el mecanismo a través del que tiene lugar fuese tipo ( $A_{\text{N}}D_{\text{H}}^{\ddagger} + D_{\text{N}}$ ); sin embargo para los (N-Cl)-compuestos estudiados se obtienen valores de  $\beta_{\text{H}}$  bajos [ $\beta_{\text{H}}$  ((N-Cl)-MetSO) =  $0.09 \pm 0.01$ ;  $\beta_{\text{H}}$  ((N-Cl)-MetSO<sub>2</sub>) =  $0.21 \pm 0.05$ ]; es decir, que en el estado de transición todavía no se ha producido la abstracción protónica completamente, y por tanto la reacción no transcurre a través de un carbanión.

Otro parámetro estructura-reatividad que informa acerca del estado de transición es  $\beta_{\text{lg}}$ , el cual indica el grado de ruptura del enlace con el grupo saliente.

$$\partial(\log k_{\text{lg}}) = -\beta_{\text{lg}} \partial(\text{p}K_{\text{a}}) + \text{cte} \quad \text{Ec7.8}$$

donde

- $k_{\text{lg}}$  es la constante de velocidad
- $K_{\text{a}}$  es la constante de acidez de la ácido conjugado del nucleófilo
- $\beta_{\text{lg}}$  es el coeficiente tipo Brønsted para este tipo de correlación

El efecto del grupo saliente se comprueba comparando los resultados obtenidos para las constantes de velocidad con distintos nucleófilos, en este caso las de las reacciones para el (N-Cl)-compuesto y el (N-Br)-compuesto correspondiente, por lo que la ecuación 7.8 se puede escribir de la siguiente forma:

$$\beta_{lg} = \frac{\log \frac{k_{HOBr}}{k_{HOCl}}}{pK_{HOBr} - pK_{HOCl}} \quad \text{Ec.7.9}$$

Debe de indicarse que este parámetro ofrece mayor fiabilidad en la medida en que los distintos nucleófilos son estructuralmente similares, por lo que en este caso los valores resultantes de la comparación entre los *N*-Cl y los *N*-Br-compuestos deben de tomarse con cierta cautela.

En estudios preliminares<sup>5,6</sup> realizados para este tipo de compuestos se encontró que la descomposición de los (*N*-Br)-compuestos era hasta un orden de magnitud más rápida que la del (*N*-Cl)-compuesto correspondiente. Sin embargo, no fue posible determinar valores cuantitativos dado que como se indicó anteriormente la existencia de un segundo proceso interfiere significativamente en la calidad de los datos cinéticos.

Dado que en un mecanismo ( $A_{xH}D_H^\ddagger + D_N$ ) el enlace con el grupo saliente permanece intacto en la etapa limitante, un cambio en la velocidad de reacción al modificar el grupo saliente, lo que ocurre en el presente caso, que supondría que la reacción transcurre no transcurre a través de un mecanismo ( $A_{xH}D_H^\ddagger + D_N$ ).

Tanto por las evidencias positivas como por aquellas que permiten descartar otros mecanismos alternativos, la conclusión que se puede extraer es que las reacciones de descomposición de estos (*N*-X)-compuestos tienen lugar a través de un mecanismo ( $A_{xH}D_H D_N^\ddagger$ ).

Una vez establecido el mecanismo de reacción, el siguiente paso es la caracterización del estado de transición. Para ello es posible utilizar el diagrama de More O'Ferrall-Jencks (figura 7.5), en donde se representa en el eje X, la ruptura del enlace N-X y en el eje Y la ruptura del enlace C-H, y en la localización del estado de transición se utilizan parámetros obtenidos de las relaciones estructura-reactividad como pueden ser  $\beta_H$  y  $\beta_{lg}$ .

Aunque en este caso no ha sido posible obtener valores para el parámetro  $\beta_{lg}$ , por analogía con el comportamiento de los procesos estudiados se utiliza el valor de  $\beta_{lg}=0.51$  obtenido para la (*N*-Cl)-Thr.<sup>7</sup>

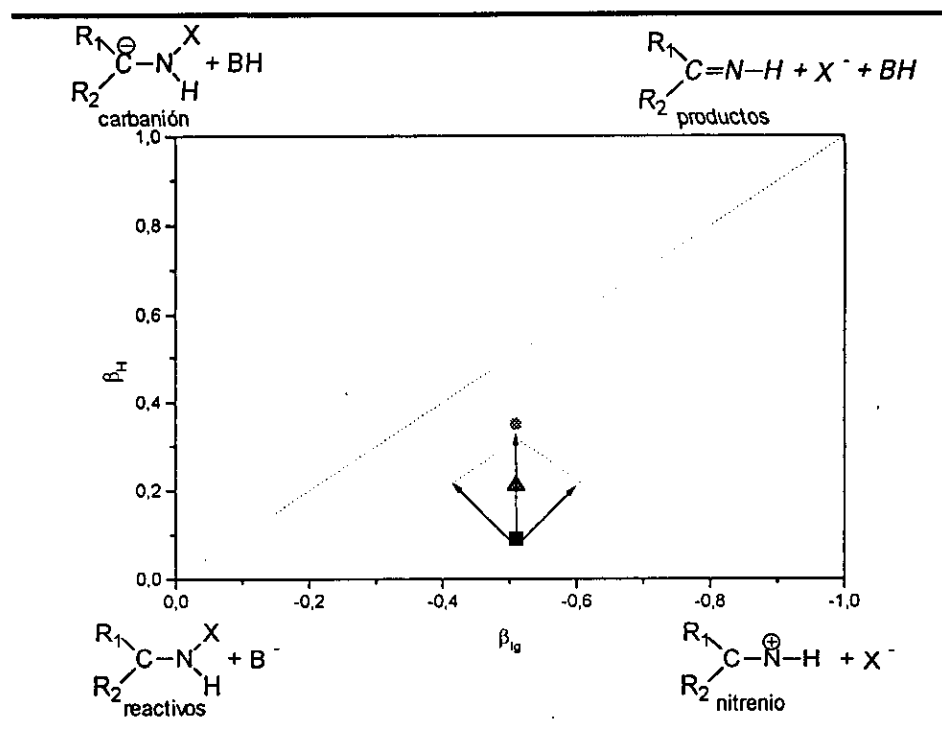


Figura 7.5 Diagrama de More O'Ferrall-Jencks para la reacción de eliminación de (N-Cl)-MetSO (■), (N-Cl)-MetSO<sub>2</sub> (▲) y (N-Cl)-Cya (●).

Como se ilustra en la figura 7.5, el estado de transición de estos compuestos se encuentra fuera de la diagonal, lo que indica que en el estado de transición la ruptura de ambos enlaces no es idéntica, y por tanto, no se trata de una eliminación sincrónica. Ello implica que la evolución de los enlaces correspondientes a los dos centros de reacción a lo largo de la coordenada de reacción es simultánea pero no en el mismo grado. De hecho en función del compuesto y de la base presente, la ruptura del enlace N-X podría estar adelantada, igualada o retrasada respecto a la ruptura del enlace C-H.

La ventaja de este diagrama respecto al diagrama de More O'Ferrall<sup>8</sup> es que permite predecir el efecto sobre el estado de transición debido a un cambio del sustituyente, y este efecto se representa en el diagrama como la resultante de la componente perpendicular (efecto Thornton) y la componente paralela (efecto Hammond). Un punto débil de este diagrama es que no aporta información acerca del grado de desarrollo del doble enlace.

Considérese la predicción del efecto al cambiar de compuesto, pasando del (N-Cl)-MetSO al (N-Cl)-Cya existe una estabilización de la especie

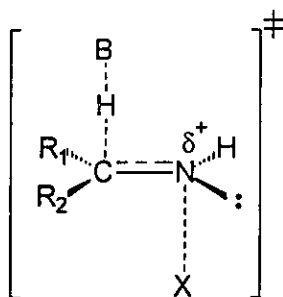
carbaniónica (componente perpendicular) debido a un aumento de la capacidad de estabilización de los sustituyentes en el  $C_\beta$  ((-SO-)< (-SO<sub>2</sub>-)<(HO<sub>3</sub>S-)) y una desestabilización de los productos (componente paralela); aceptando que ambos efectos sean similares ello implica que la ruptura del enlace N-X será la misma mientras que aumentará el grado de transferencia protónica, lo cual se muestra en la figura 7.5. y se observa al determinar las  $\beta_H$ .

Del mismo modo, al disminuir la fuerza de la base se estabilizan los reactivos y las especies inferior derecho, lo que implica una mayor rotura del enlace N-X, produciéndose mayor carga parcial positiva sobre el átomo de nitrógeno, debiendo haber un mayor flujo de carga desde el carbono, con lo que en dicho carbono queda menor cantidad de carga negativa que cuando se trata de una base fuerte, lo cual es consistente con la, en principio, sorprendente variación en la pendiente de la representación de Taft, que a la vista de ello lo que está indicando es cuál de ambos procesos de rotura (C-H y N-X) está más adelantado en cada caso.

Según este diagrama la reacción puede ser descrita de la siguiente forma: los reactivos tras encontrarse y orientarse adecuadamente reaccionan alcanzando el estado de transición, que evoluciona mediante las rupturas concertadas pero asincrónicas de los enlaces  $C_\beta$ -H y N-X siendo el grado de ruptura de estos enlaces una función de los distintos sustituyentes y de la fuerza de la base empleada.

La geometría del estado de transición presentará los cuatro enlaces implicados formando un mismo plano con el átomo de hidrógeno y el grupo saliente formando un ángulo de 180°, posición antiperiplanar. Una vez alcanzada la geometría adecuada se produce la eliminación concertada. Para la reacción de descomposición de los (N-Cl)-compuestos aquí estudiados el estado de transición, dependiendo del compuesto y de la fuerza de la base, será más próximo al ion nitrenio, es decir, en el estado de transición está más adelantada la ruptura del enlace N-X.

Parte I - Halogenación

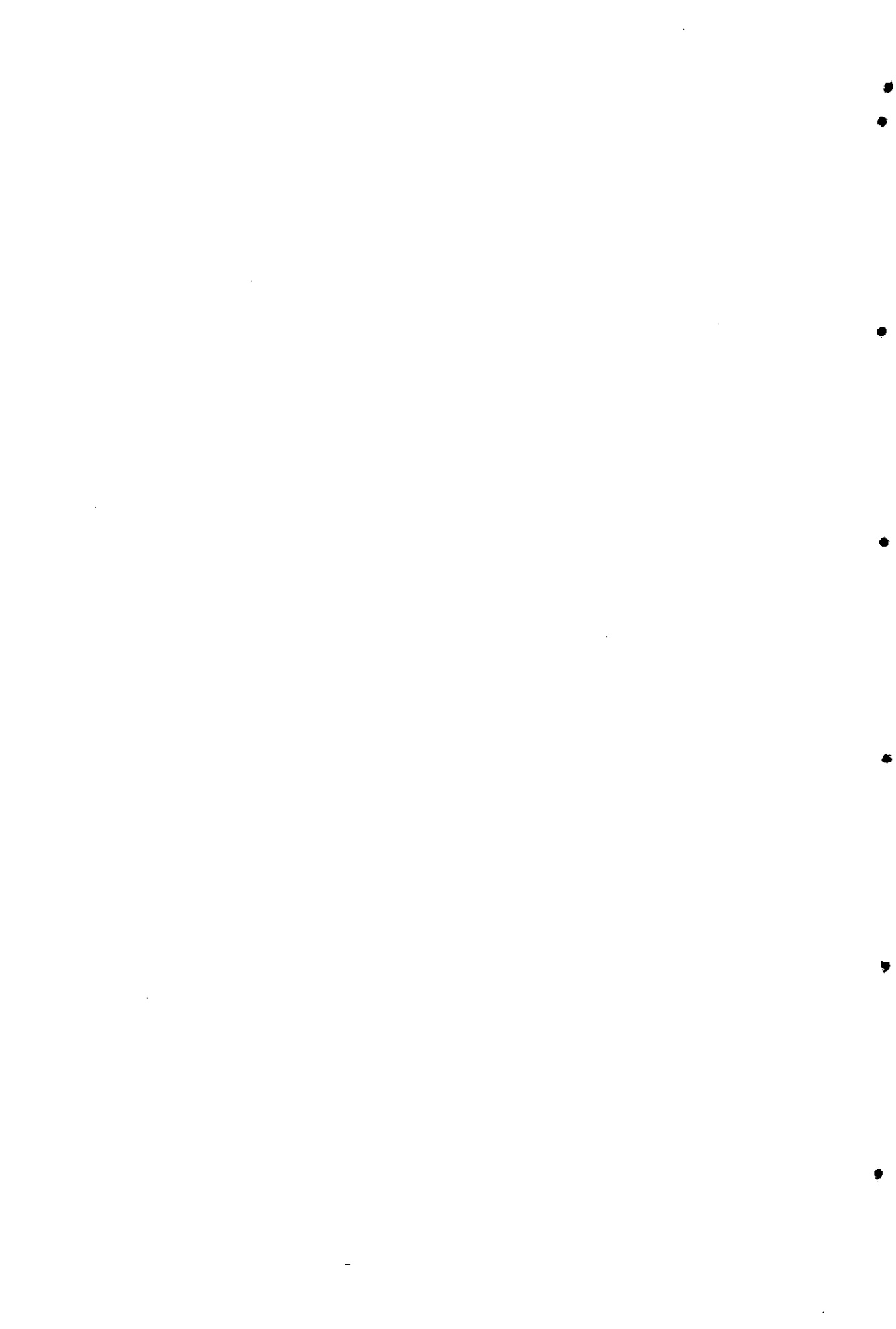


Esquema 7.6 Estado de transición para la reacción de descomposición de (N-X)MetSO, (N-X)MetSO<sub>2</sub> y (N-X)Cya.

### 7.1. Bibliografía.

- (1) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Amino Acids. Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 1.
- (2) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Gamper, A. M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10509-10520.
- (3) *The Merck Index*; 11<sup>a</sup> edición ed.; Budavari, S., Ed.; Merck & Co., Inc: Rahway, New Jersey, U.S.A., 1989.
- (4) Maskill, H. *The Physical Basis of Organic Chemistry*; Oxford University Press: Oxford, 1993.
- (5) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 453-460.
- (6) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1041-1053.
- (7) Losada, M. Tesis doctoral, Universidade da Coruña. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Fundamental e Industrial, 1993.
- (8) Jencks, W. P. *Chemical Reviews* **1985**, *85*, 511.

8. Cloración de aminoácidos que contienen  
azufre: Resultados





### 8.1. Cloración por HOCl.

Dada su elevada velocidad las reacciones de formación de S-Cl-compuestos se estudiaron utilizando la técnica de flujo detenido. Según se indicó en el capítulo 5, estos compuestos a diferencia de lo que ocurre con los (N-Cl)-derivados no presentan una banda de absorción característica a 255 nm, de ahí que en el estudio del proceso de su formación se siga la desaparición de la banda correspondiente al ion hipoclorito a 292 nm. Debido a que en medio neutro o ligeramente básico, las reacciones eran demasiado rápidas para ser monitorizadas, no se pudo trabajar en un intervalo amplio de pH, por lo que se ha operado principalmente en medio básico. Se trabajó a fuerza iónica constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , utilizando  $\text{NaClO}_4$  como electrolito inerte y a  $298.0 \text{ K}$ .

Las reacción de cloración se representa adecuadamente por una ecuación de velocidad de orden dos, orden uno respecto a cada uno los reactivos:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{S - compuesto}] \cdot [\text{halogenante}] \quad \text{Ec.8.1}$$

Para todos los compuestos estudiados, se obtuvo una dependencia de la constante de velocidad con el pH del medio, tal y como se muestra en las siguientes figuras:

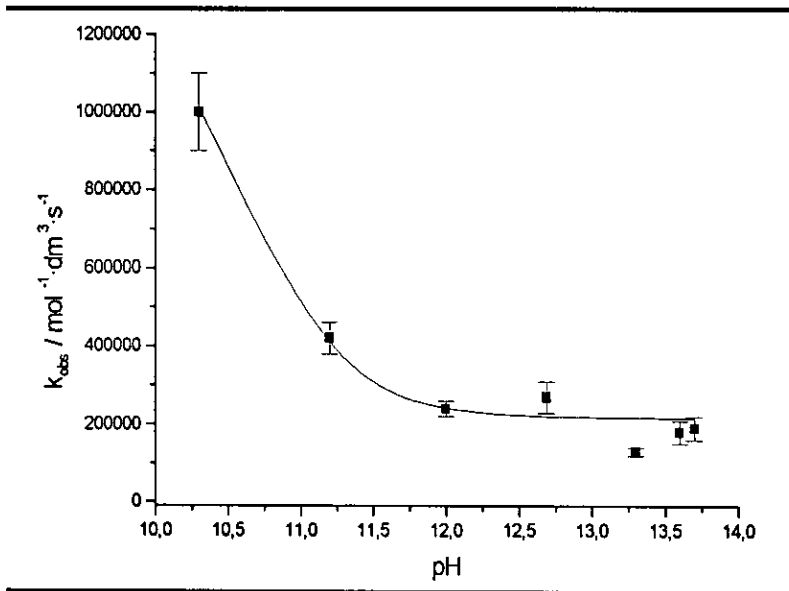


Figura 8.1. Dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  para la reacción de Cys y HOCl/ClO<sup>-</sup> con el pH del medio.  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

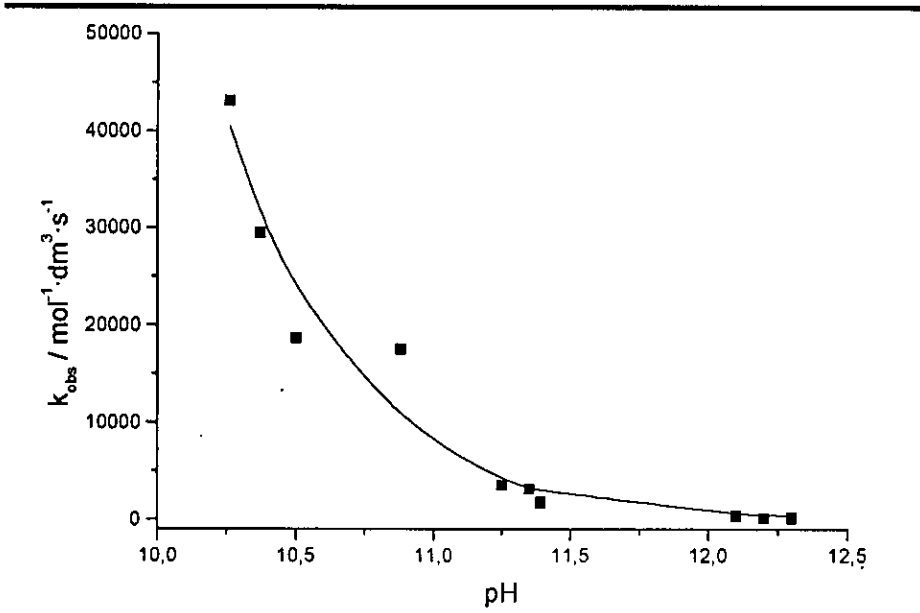


Figura 8.2. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de Cys<sup>A</sup>Cys y HOCl/CIO<sup>-</sup> con el pH del medio.  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}(\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

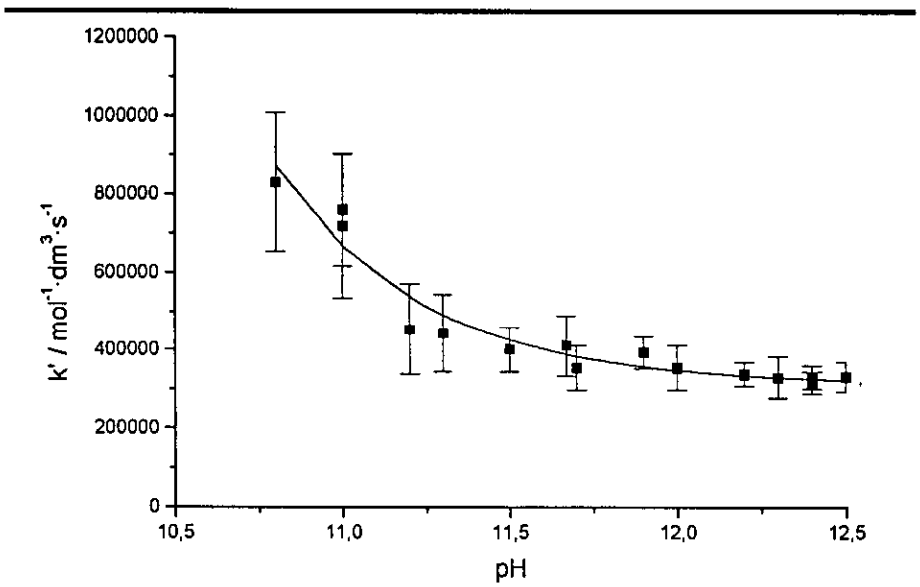


Figura 8.3. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de GSH y HOCl/CIO<sup>-</sup> con el pH del medio.  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}(\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

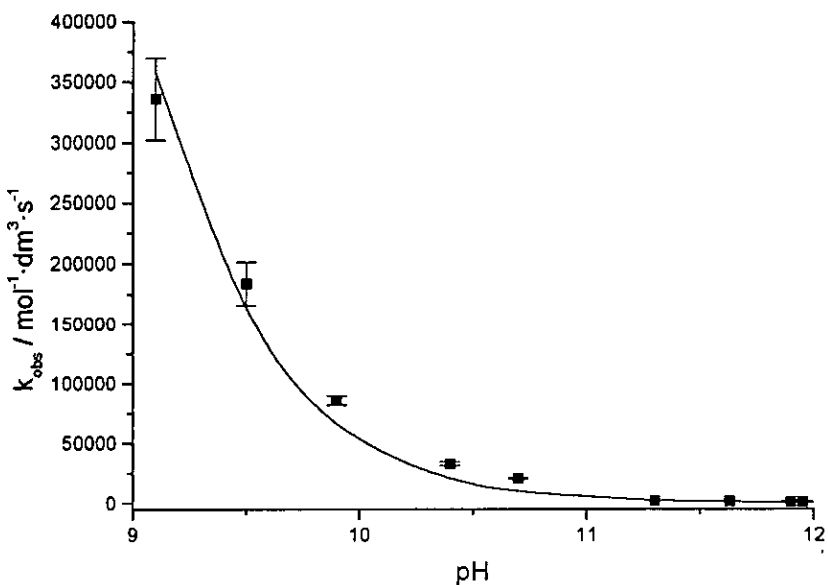


Figura 8.4. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de GSSG y HOCl/CIO<sup>-</sup> con el pH del medio.  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

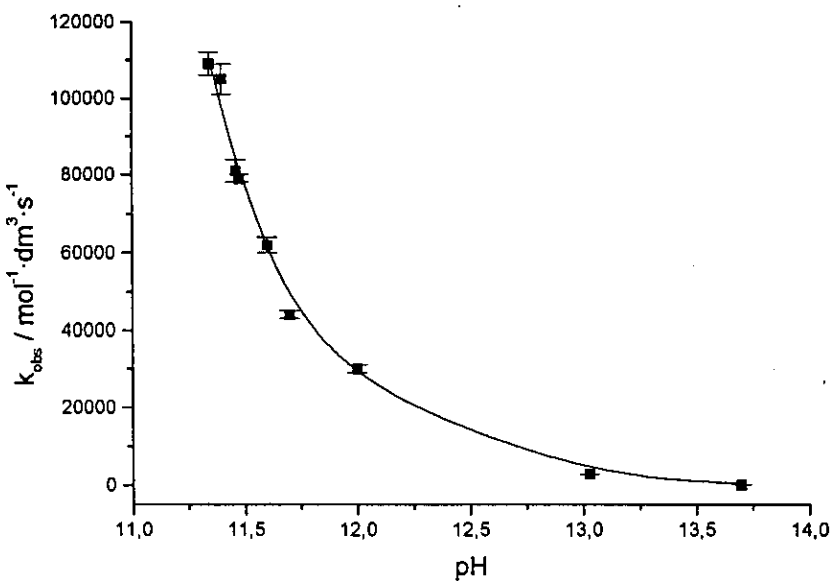


Figura 8.5. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de Met y HOCl/CIO<sup>-</sup> con el pH del medio.  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

En el intervalo de pH estudiado se ha encontrado que la dependencia experimental que se muestra en las figuras anteriores puede ajustarse adecuadamente empleando las siguientes funciones:

- Cys, GSH

$$k_{\text{obs}} = \left( a \cdot \frac{[\text{H}^+]}{C + [\text{H}^+]} + b \cdot \frac{C}{C + [\text{H}^+]} \right) \cdot \frac{S}{S + [\text{H}^+]} \quad \text{Ec.8.2}$$

- Cys^Cys, GSSG, Metionina

$$k_{\text{obs}} = a \cdot \frac{[\text{H}^+]}{C + [\text{H}^+]} \quad \text{Ec.8.3}$$

donde a, b, S y C son parámetros empíricos.

Se midió también la variación de la concentración de ión cloruro, Cl<sup>-</sup>, a lo largo de la reacción de halogenación comprobando que ésta aumenta después de la oxidación, produciéndose una concentración de Cl<sup>-</sup> aproximadamente igual a la concentración inicial de halogenante, HOCl.

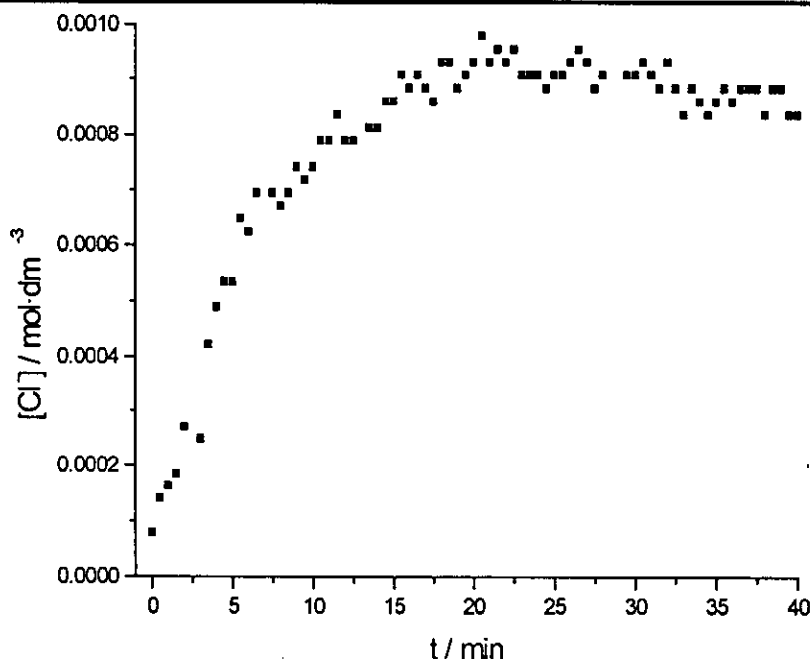


Figura 8.6. Variación de la concentración de Cl<sup>-</sup> en la reacción de halogenación de Cys por HOCl. [Cys]=[HOCl]=1mM, I=0.1 mol·dm<sup>-3</sup> (NaNO<sub>3</sub>), T=298.0 K.

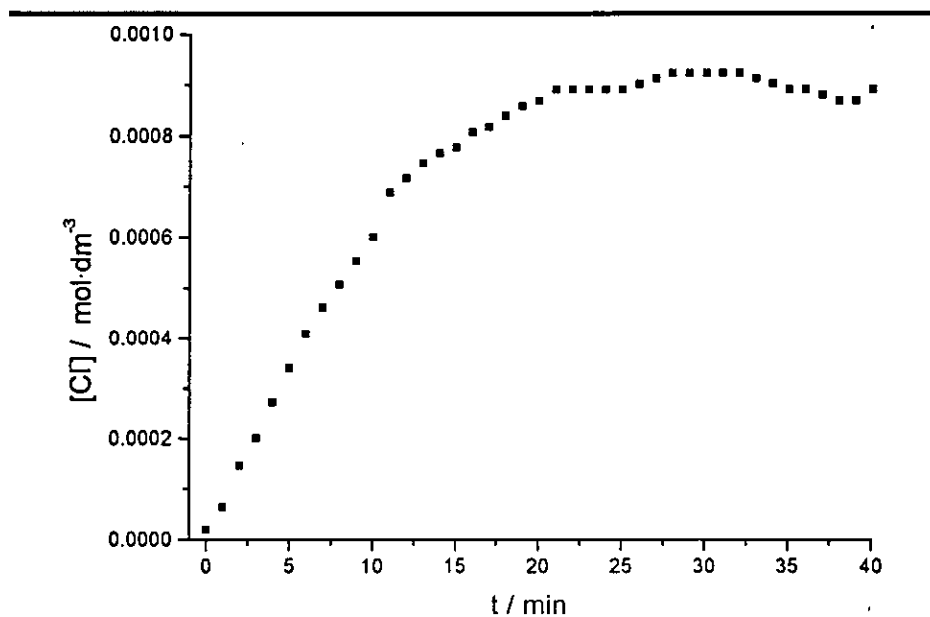


Figura 8.7. Variación de la concentración de  $Cl^-$  en la reacción de halogenación de Met por HOCl.  $[Met]=[HOCl]=1\text{ mM}$ ,  $I=0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaNO}_3$ ),  $T=298.0\text{ K}$ .

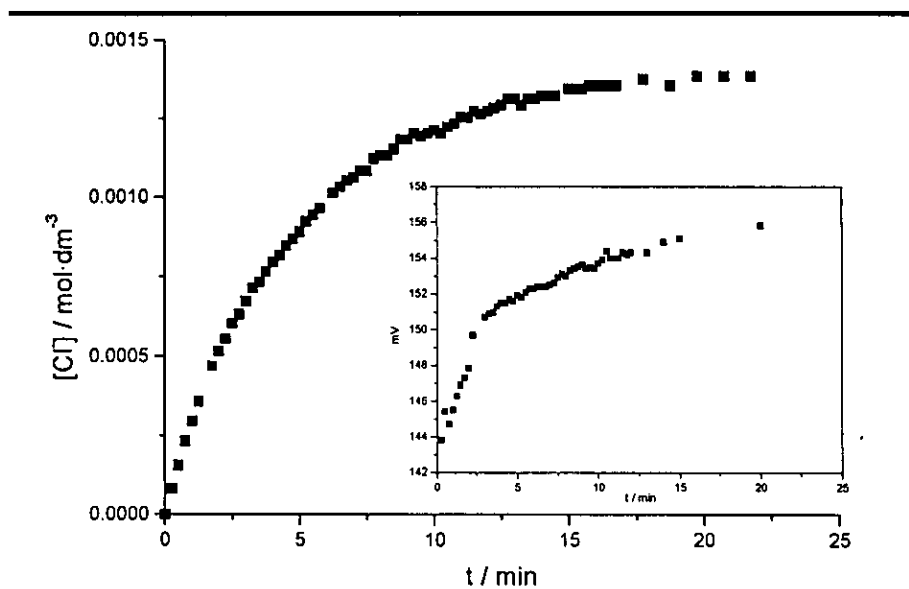


Figura 8.8. Variación de la concentración de  $Cl^-$  en la reacción de halogenación de Cys<sup>A</sup>Cys por HOCl.  $[Cys^A Cys]=[HOCl]=0.5\text{ mM}$ ,  $I=0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaNO}_3$ ),  $T=298.0\text{ K}$ . Sobrepuesto la respuesta del electrodo de cloruros en presencia de Cys<sup>A</sup>Cys 0.5 mM.

## 8.2. Transferencia del Cl desde (N-Cl)-taurina.

Se ha estudiado también la cloración utilizando como halogenante un (N-Cl)-compuesto, siendo este proceso más lento que el observado para la cloración por HOCl (apartado 8.1).

Los S-Cl-compuestos, como se dijo anteriormente, no presentan ningún máximo de absorción característico, es por ello que se realizó el estudio cinético utilizando la longitud de onda que caracteriza a (N-Cl)-Taurina, 252 nm ( $\epsilon=429 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$ ).<sup>1</sup>

Se trabajó en un amplio intervalo de pH, pH=4-12, ya que por un lado las velocidades de reacción no eran demasiado rápidas para ser monitorizadas, y además el coeficiente de absorción molar del (N-Cl)-compuesto utilizado es independiente del pH del medio en el intervalo de pH de trabajo, lo que nos permite obtener una variación apreciable de su máximo de absorción durante la reacción de transferencia.

Se trabajó a fuerza iónica constante,  $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , utilizando  $\text{NaClO}_4$  como electrolito inerte y a 298.0 K.

Los datos absorbancia-tiempo fueron ajustados a ecuaciones de segundo orden, orden uno respecto a cada uno de los reactivos, pudiendo establecerse la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{S} - \text{compuesto}] \cdot [(\text{N} - \text{Cl}) - \text{Taurina}] \quad \text{Ec.8.4}$$

Para la cisteína y el glutatión se obtuvo una dependencia compleja de la constante de velocidad con el pH del medio, tal y como se muestra en las figuras 8.9 y 8.10.

Por su parte el comportamiento correspondiente a la metionina se presenta en la figura 8.12.

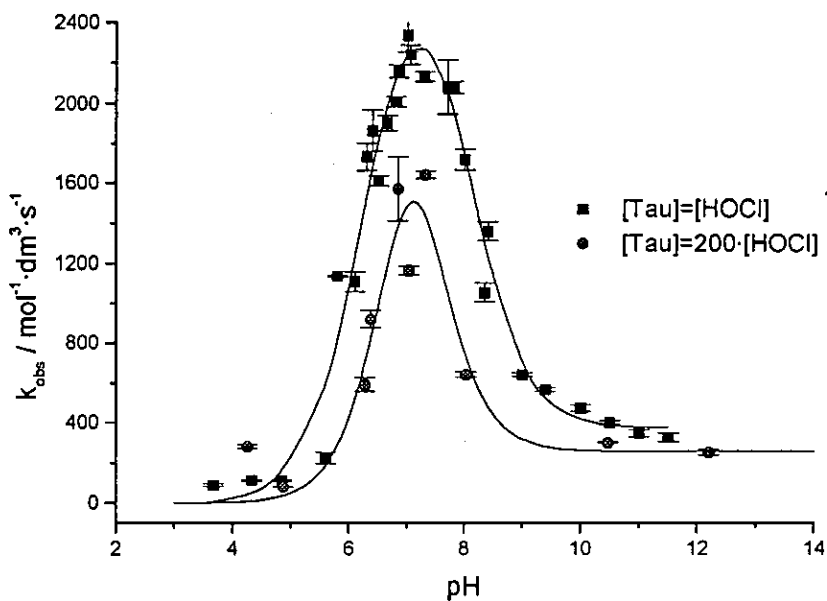


Figura 8.9. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de Cys y (N-Cl)-Taurina con el pH del medio.  $I(\text{NaClO}_4) = 0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda = 252 \text{ nm}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$

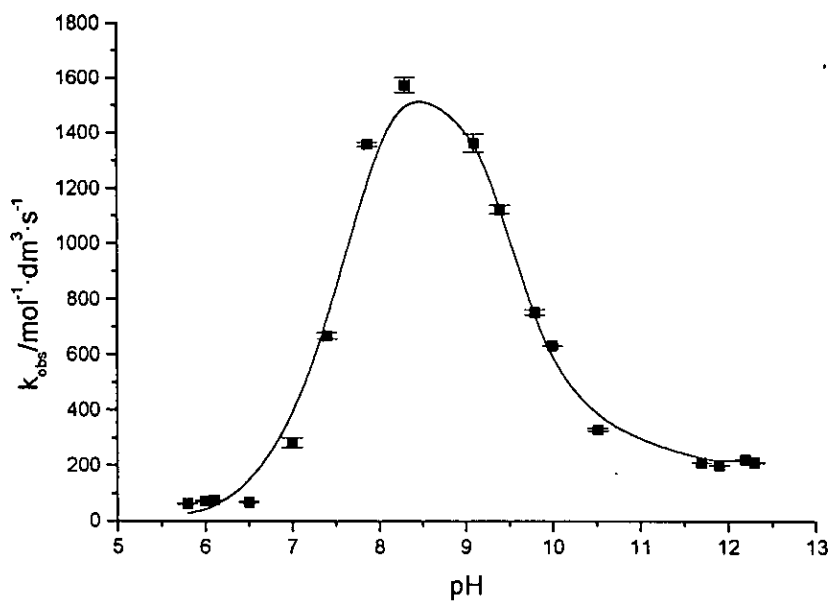


Figura 8.10. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de GSH y (N-Cl)-Taurina con el pH del medio.  $I(\text{NaClO}_4) = 0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda = 252 \text{ nm}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$

A la vista de la influencia de la concentración de taurina en la cloración de la Cys, se realizaron varios experimentos manteniendo el pH constante y con

exceso de taurina; obteniéndose una dependencia lineal entre la constante de velocidad observada y el inverso de la concentración de taurina (figura 8.11).

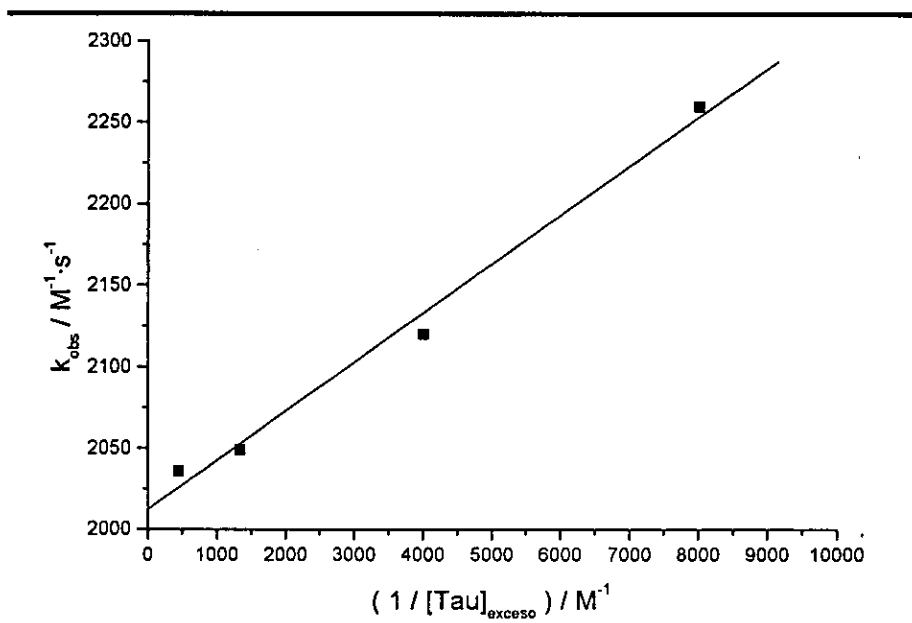


Figura 8.11. Dependencia de la velocidad de cloración de Cys por (N-Cl)-Tau con la concentración de taurina a pH constante (pH=7.4),  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=252 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ ,

Con lo que a pH constante este comportamiento puede ser descrito según la ecuación:

$$k_{\text{obs}} = \left[ A \cdot \frac{1}{[\text{Tau}]} \right] + B \quad \text{Ec.8.5}$$

En el intervalo de pH estudiado se ha encontrado que la dependencia experimental de la constante de velocidad de cloración de Cys y GSH por (N-Cl)-Tau con la acidez que se muestra en las figuras anteriores puede ajustarse adecuadamente empleando las siguiente ecuación:

$$k_{\text{obs}} = \left[ \left( \frac{a \cdot H \cdot S \cdot [H^+] + b \cdot C \cdot S \cdot H}{(C + [H^+]) \cdot (S + [H^+])} \right) \cdot \frac{1}{[\text{Tau}]} \right] + d \cdot \frac{S}{(S + [H^+])} \quad \text{Ec.8.6}$$

La dependencia de la velocidad de cloración de metionina con la acidez del medio se muestra en la siguiente figura:



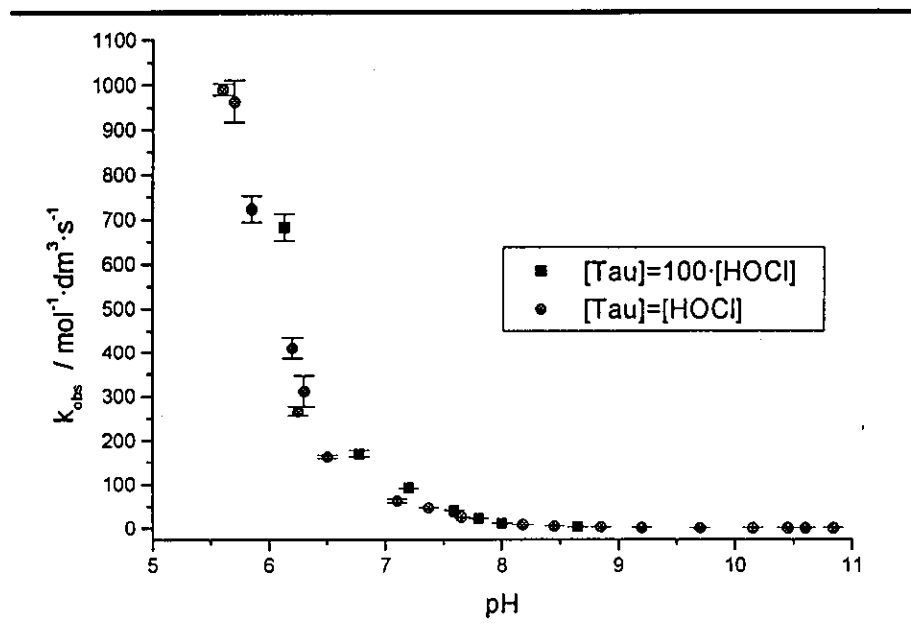


Figura 8.12. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de Met y (N-Cl)-Taurina ([Met]=2.5 mM) con el pH del medio.  $I=05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=252 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

En este caso hay dos aspectos diferenciadores respecto al comportamiento de la Cys y del GSH, por una parte en el mismo intervalo de pH no se observa la existencia de un máximo de velocidad, y por otra, no parece que el efecto del exceso de concentración de taurina sea disminuir la velocidad de la reacción.

Es por ello que se realizaron una serie de experimentos a pH constante y variando la concentración de taurina, el comportamiento observado se presenta en la figura 8.13.

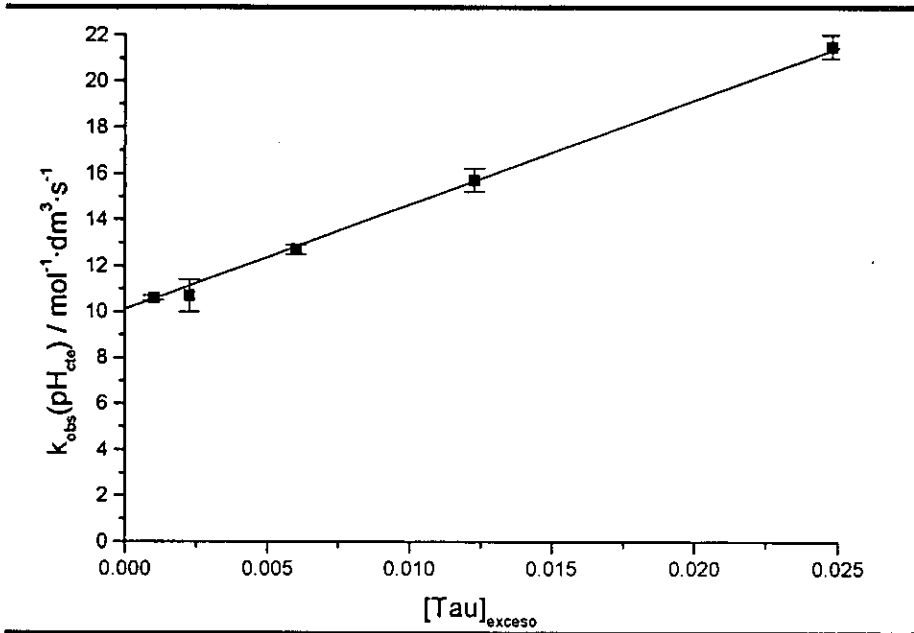


Figura 8.13. Dependencia de la  $k_{obs}$  para la reacción de Met y (N-Cl)-Taurina ( $[Met]=2.5 \text{ mM}$ ) con la concentración de taurina a pH constante ( $pH=7.8$ ).  $I=0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $\lambda=252 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

Esta dependencia lineal (ec. 8.7) contrasta con la dependencia inversa (ec. 8.5) hallada para la cisteína y el glutatión.

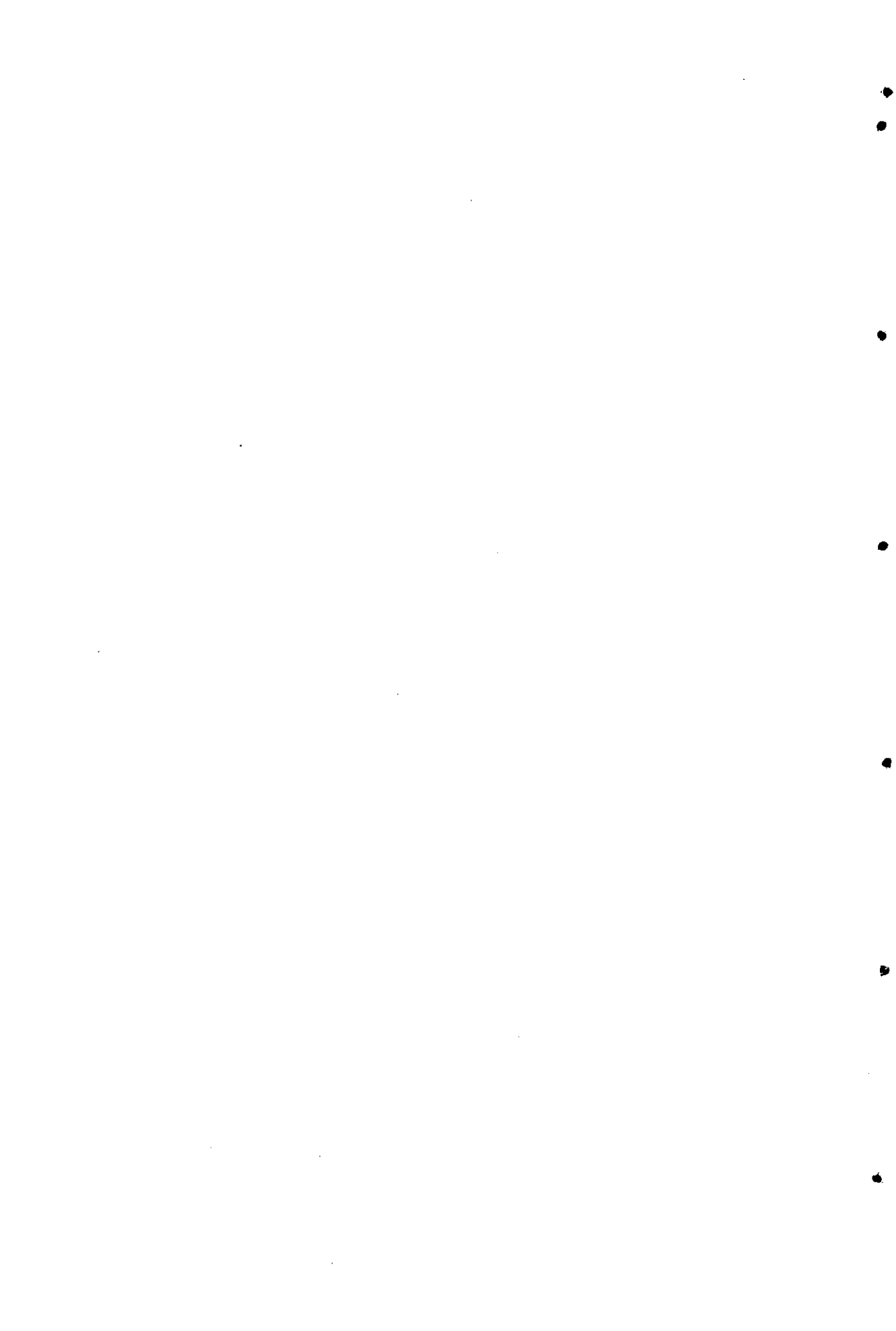
$$k_{obs} = a \cdot [Tau] + b \quad \text{Ec.8.7}$$

Es pues evidente que en lo que respecta a la cloración por (N-Cl)-Tau el comportamiento de los tioles es diferente del de los sulfuros, diferencia que deberá quedar adecuadamente justificada desde un punto de vista mecanicista.

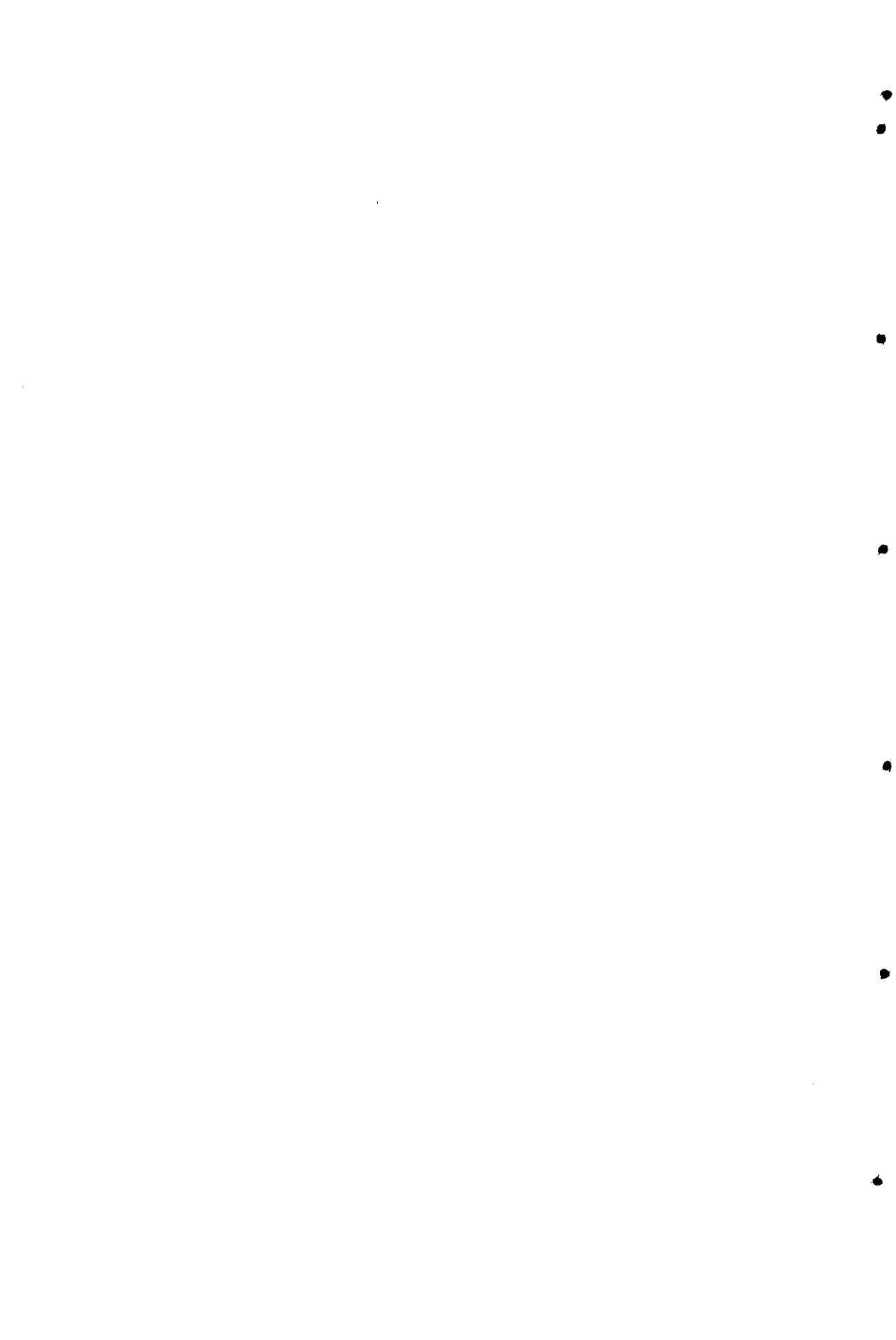
**8.3. Bibliografía.**

(1) Thomas, E. L.; Grisham, M. B.; Jefferson, M. M. *Methods in Enzymology*. 1986, 132, 569-585.

(2) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* 1998, 27, 453-460.



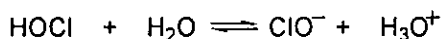
9. Descomposición de (*N*-halo)-derivados de aminoácidos azufrados: Resultados



### 9.1. Cloración por HOCl.

Para poder interpretar los datos cinéticos obtenidos, es necesario conocer en primer lugar qué especies están presentes en las condiciones de trabajo, y una vez determinadas podemos establecer los posibles procesos elementales a través de los que tienen lugar las reacciones estudiadas.

Como agente halogenante se utilizó ácido hipocloroso. En las condiciones de acidez que se han empleado, las especies del agente clorante presentes son el ion hipoclorito y el ácido hipocloroso, entre las que se establece el siguiente equilibrio

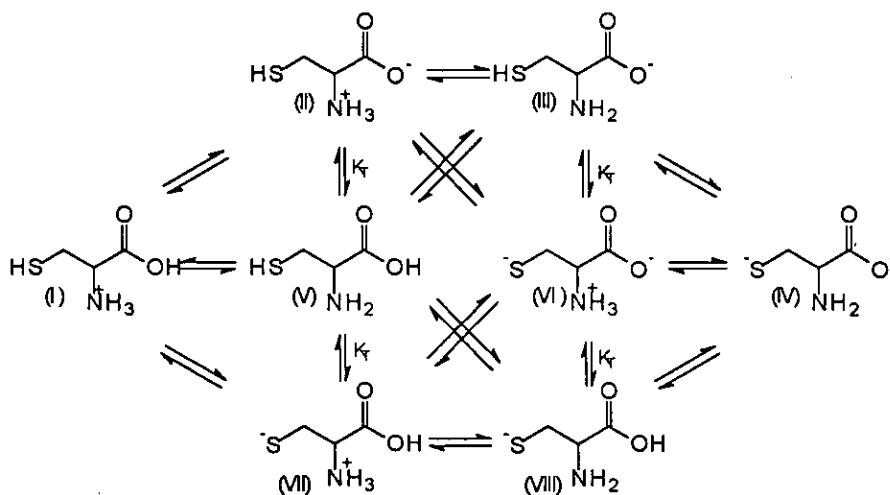


Esquema 9.1 Equilibrio ácido-base para el HOCl.

Siendo, a 298.0 K, el valor de  $\text{pK}_a = 7.26 \pm 0.04$ .<sup>1</sup>

#### 9.1.1. Halogenación de cisteína (Cys).

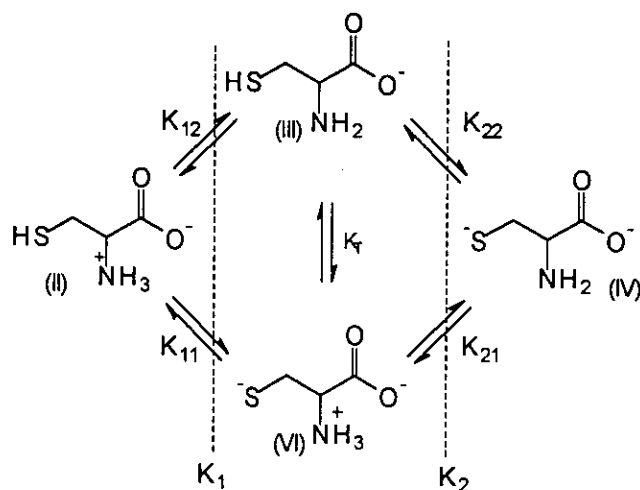
Para este aminoácido podrían estar presentes ocho especies relacionadas mediante tres constantes macroscópicas, doce microscópicas y cuatro equilibrios de tautomería, tal y como se muestra en el esquema 9.2.<sup>2</sup>



Esquema 9.2 Equilibrios ácido-base para la cisteína (Cys).

Sin embargo, teniendo en cuenta las condiciones de basicidad empleadas, así como los valores de  $\text{pK}_a$  macroscópicos para la Cys

[ $pK_a(-CO_2H)=1.88\pm 0.02$ ;  $pK_a(-NH_3^+)=8.15\pm 0.06$ ;  $pK_a(-SH)=10.29\pm 0.08$ ],<sup>3</sup> el esquema anterior se puede reducir, siendo cuatro las posibles especies presentes relacionadas mediante dos constantes macroscópicas, cuatro microscópicas y una constante de tautomería (esquema 9.3).



Esquema 9.3 Equilibrios ácido-base reducido para la cisteína (Cys).

Estas constantes macroscópicas y microscópicas se relacionan de acuerdo con las siguientes expresiones:<sup>4</sup>

$$\begin{aligned}
 (1) \quad K_{11} &= K_1 - K_{12} & (2) \quad K_{21} &= \frac{K_{12} \cdot K_{22}}{K_{11}} \\
 (3) \quad K_{22} &= \left( 1 + \frac{K_{11}}{K_{12}} \right) & (4) \quad K_T &= \frac{K_{11}}{K_{12}} = \frac{K_{22}}{K_{21}}
 \end{aligned}$$

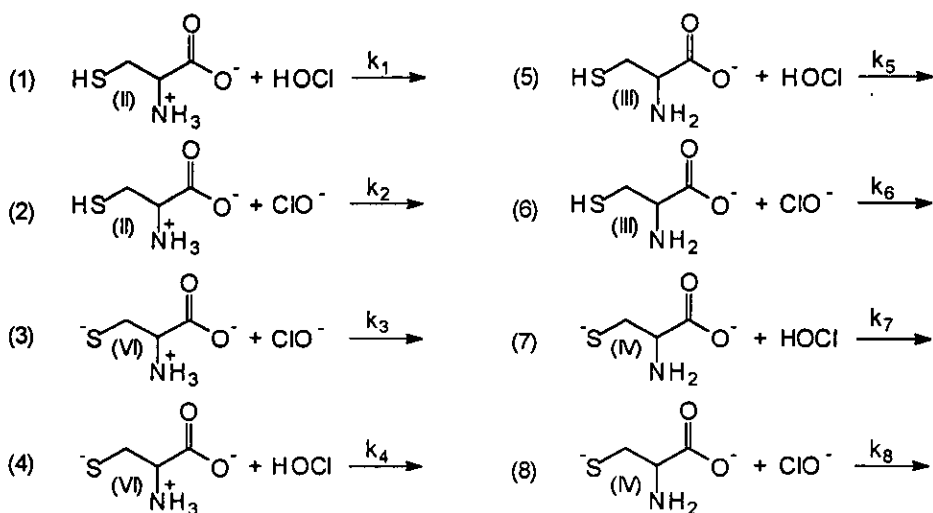
Ec.9.1

A partir de los valores de  $pK_a$  macroscópicos y microscópicos,<sup>5</sup> y mediante las ecuaciones anteriores (ecuación 9.1) se puede estimar el valor  $K_T \sim 0.8$ , lo que indica que el equilibrio está desplazado hacia la especie con el grupo tiol protonado.

Una vez que se conocen las especies que están presentes en las condiciones experimentales, se pueden establecer los posibles procesos elementales a través de los que podría tener lugar la reacción estudiada. Para el caso de Cys, son en total cuatro especies y ocho posibles procesos, los cuales se muestran en el esquema 9.4



Parte I - Halogenación



Esquema 9.4 Posibles procesos elementales para la cloración de la Cys.

Las ecuaciones de velocidad correspondientes a estos procesos elementales son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad v &= k_1 \cdot [\text{II}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (2) \quad v &= k_2 \cdot [\text{II}] \cdot [\text{ClO}^-] \\
 (3) \quad v &= k_3 \cdot [\text{VI}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (4) \quad v &= k_4 \cdot [\text{VI}] \cdot [\text{ClO}^-] \\
 (5) \quad v &= k_5 \cdot [\text{III}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (6) \quad v &= k_6 \cdot [\text{III}] \cdot [\text{ClO}^-] \\
 (7) \quad v &= k_7 \cdot [\text{VI}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (8) \quad v &= k_8 \cdot [\text{VI}] \cdot [\text{ClO}^-]
 \end{aligned}$$

Ec. 9.2

La cloración podría tener lugar tanto sobre el átomo de azufre como sobre el grupo amino. Sin embargo la posibilidad de que la cloración tenga lugar sobre el grupo amino se puede descartar basándose en las siguientes evidencias experimentales:

1. Los (N-Cl)-compuestos se caracterizan por una banda de absorción UV centrada hacia 250 - 260 nm<sup>1,6-12</sup> (capítulo 5), cuya aparición no se observa.
2. Los (N-Cl)-compuestos sufren diferentes procesos, dando lugar a aldehídos, cetonas,  $\alpha$ -ceto ácidos, amoníaco y aminas como productos

finales.<sup>8,10,12-15</sup> Sin embargo se encontraron el disulfuro (cistina, Cys<sup>2</sup>) y el correspondiente ácido sulfónico (ácido cisteico, Cya) como productos finales de la reacción (capítulo 10).

3. Bajo las mismas condiciones de acidez, la cloración de estos compuestos es como mínimo un orden de magnitud más rápido que para un amino ácido que no contenga azufre con un valor de pK<sub>a</sub> semejante.

4. A partir de las constantes de velocidad conocidas para compuestos nitrogenados con un pK<sub>a</sub> similar, se predicen velocidades de reacción menores, por lo que los valores de k<sub>obs</sub> no se podrían explicar sobre la base de un mecanismo vía cloración en el grupo amino.<sup>1,6,9,11,16</sup>

Por todo ello se puede descartar la cloración sobre el grupo amino, por lo que todos los procesos propuestos (esquema 9.4) implican la cloración sobre el átomo de S.

Considerando los diversos equilibrios de ionización en los que están involucradas las distintas especies (esquema 9.3), y teniendo en cuenta que la reacción tiene lugar sobre el átomo de S, se muestran en la ecuación 9.3 algunas de las dependencias de k<sub>obs</sub> con la acidez del medio encontradas para las ecuaciones de velocidad (ecuación 9.2) de los procesos elementales anteriormente propuestos (esquema 9.4)

$$\begin{aligned}
 (1) \quad k_{obs} &= k_5 \cdot \frac{[H^+]^2}{(K_c + [H^+]) \cdot ([K_s + [H^+])} \\
 (2) \quad k_{obs} &= k_6 \cdot K_c \cdot \frac{[H^+]}{(K_c + [H^+]) \cdot ([K_s + [H^+])} && \text{Ec.9.3} \\
 (3) \quad k_{obs} &= k_7 \cdot K_s \cdot \frac{[H^+]}{(K_c + [H^+]) \cdot ([K_s + [H^+])} \\
 (4) \quad k_{obs} &= k_8 \cdot \frac{K_s \cdot K_c}{(K_c + [H^+]) \cdot ([K_s + [H^+])}
 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta la dependencia experimental observada de la k<sub>obs</sub> con el pH del medio (figura 8.1), se pueden descartar los procesos (1) a (5) del esquema 9.4, debido a que las ecuaciones correspondientes a los mismos no dan cuenta de los resultados experimentales. Así, por ejemplo, para el proceso (5), esquema 9.4, se obtiene una dependencia de segundo orden respecto a la

concentración de protones, tal y como se indica en la ecuación 9.3 (1), lo que no corresponde con lo obtenido experimentalmente.

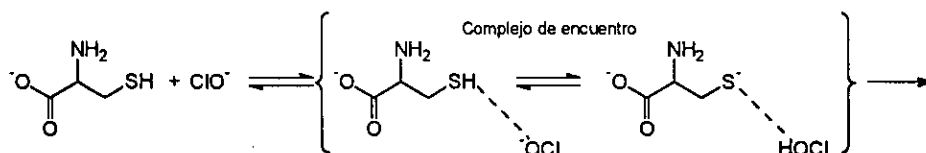
Los procesos (6) y (7) (esquema 9.4) son cinéticamente indistinguibles como se puede ver en la ecuación 9.3 (2) y (3), así que es necesario tener en cuenta la reactividad de las especies que intervienen en estos procesos para poder decidirse por uno de ellos.

El poder oxidante de HOCl es mayor que el de hipoclorito,  $\text{ClO}^-$ <sup>1,6,9,11,16</sup> mientras que el grupo tiolato,  $\text{RS}^-$ , es  $10^4$  más reactivo como nucleófilo que el grupo protonado correspondiente  $\text{RSH}$ <sup>17,18</sup>, como se deduce a partir de los valores del parámetro de nucleofilia,  $n$ , de la ecuación de Swain-Scott para la reacción de IMe con los siguientes nucleófilos.<sup>17</sup>

Tabla 9.1.

nucleófilo	$n^{17}$
Ph-CH <sub>2</sub> SCH <sub>2</sub> -Ph	4.84
MeSMe	5.54
PhSH	5.70
HS <sup>-</sup>	8
PhS <sup>-</sup>	9.95

Teniendo en cuenta esto se podría descartar el proceso (6) del esquema 9.4. Cabría la posibilidad de que en el complejo de encuentro (esquema 9.5) tuviese lugar una transferencia protónica desde el grupo -SH hasta el ión hipoclorito,  $\text{ClO}^-$ , y que, a continuación, tenga lugar el proceso entre el ácido hipocloroso, HOCl, y el grupo  $\text{S}^-$  del aminoácido, lo que equivaldría al proceso (7). Sin embargo esta transferencia protónica es termodinámicamente desfavorable, ya que  $\text{pK}(\text{HOCl}) < \text{pK}(-\text{SH})$ , por lo que es posible desechar el proceso (6)

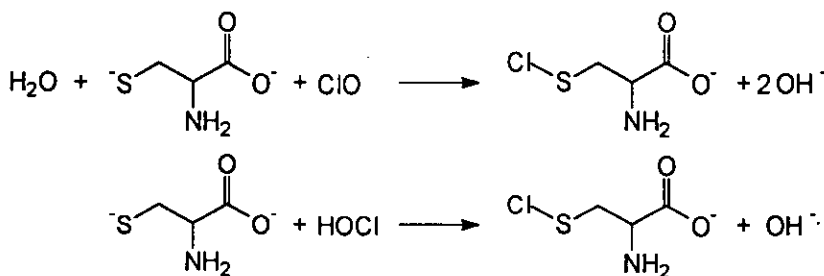


Esquema 9.5

Teniendo en cuenta que el poder oxidante de HOCl es mayor que el de  $\text{ClO}^-$ , se podría pensar en descartar también el proceso (8); sin embargo, se

encuentra que para valores de pH altos, la  $k_{obs}$  es diferente de cero, alcanzando un valor constante (figura 8.1) próximo a  $2 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Esto representa la existencia de un camino de reacción independiente del pH, lo cual sólo puede ser explicado aceptando que tiene lugar reacción entre  $\text{ClO}^-$  y el grupo  $-\text{S}^-$  del aminoácido. Esta reacción corresponde al proceso (8) del esquema 9.4. Esta posible vía de reacción podría ser explicada sobre la base de la elevadísima nucleofilia de las especies  $\text{RS}^-$ <sup>17,18</sup>

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, puede concluirse que el mecanismo de cloración tiene lugar a través de los procesos (7) y (8), mediante la transferencia de Cl desde el oxígeno de HOCl y  $\text{ClO}^-$  hasta el grupo tiolato,  $-\text{S}^-$ , del aminoácido, para dar lugar al correspondiente cloruro de sulfenilo, (S-Cl)-Cys, tal como se indica en el esquema 9.6



Esquema 9.6 Mecanismo propuesto para la cloración de la Cys.

La ecuación de velocidad que se puede derivar del proceso propuesto para la cloración de Cys es la siguiente:

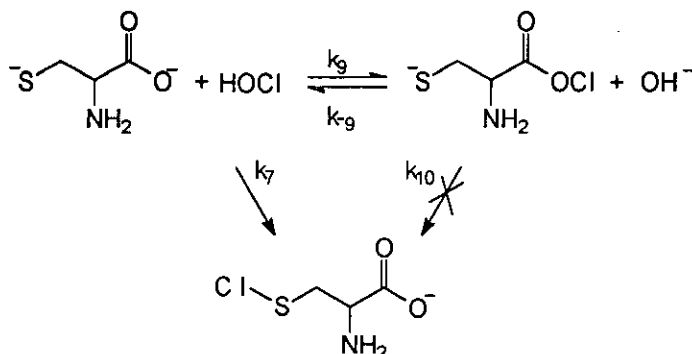
$$v = \left[ k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{(K_c + [\text{H}^+])} + k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)} \cdot \frac{K_c}{(K_c + [\text{H}^+])} \right] \cdot \left[ \frac{K_s}{K_s + [\text{H}^+]} \right] \cdot [\text{HOCl}]_0 \cdot [\text{Cys}]_0$$

Ec.9.4

donde  $\text{RS}^-$  representa la forma tiolato de la Cys,  $k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})}$  y  $k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)}$  son las constantes de orden dos para cada uno de los procesos elementales,  $K_c$  es la constante de ionización para el HOCl y  $K_s$  la constante de ionización para el grupo tiol de la Cys.  $[\text{HOCl}]_0$  y  $[\text{Cys}]_0$  son las concentraciones analíticas de los

reactivos. Las trazas cinéticas obtenidas se ajustan adecuadamente a esta ecuación de velocidad, tal y como se muestra en la figura 8.1.

Se podría plantear un mecanismo alternativo en el que la cloración tuviese lugar inicialmente en el oxígeno del grupo carboxilato con posterior transferencia intramolecular del Cl desde el oxígeno del grupo carbonilo al azufre del grupo tiol como se propone en el esquema 9.7



Esquema 9.7 Mecanismo alternativo para la cloración de Cys.

Si la cloración tuviese lugar sobre el átomo de oxígeno, el término correspondiente a la cloración por HOCl de la expresión de velocidad teórica sería

$$k_{\text{obs}} = k \cdot \frac{K_s \cdot [\text{H}^+]}{(K_c + [\text{H}^+]) \cdot (K_s + [\text{H}^+])} \quad \text{Ec.9.5}$$

donde

$$k = \frac{k_9}{1 + \frac{k_{-9}}{k_{10}} \cdot [\text{HO}^-]} \quad \text{Ec.9.6}$$

siendo  $k_9$  y  $k_{-9}$  las constantes bimoleculares directa e inversa para la transferencia de cloro entre el átomo de oxígeno del ácido hipocloroso y el del carboxilato, y  $k_{10}$  la constante de velocidad unimolecular para el reordenamiento del  $\alpha$ -aminoácido-OCl al (*N*-Cl)- $\alpha$ -aminoácido. Sólo en el caso de que  $k_9 \cdot [\text{OH}^-] \ll k_{10}$  la ecuación de velocidad teórica estaría de acuerdo con

la dependencia con el pH encontrada experimentalmente, lo que sería equivalente al mecanismo propuesto anteriormente.

Por otra parte, si la cloración tiene lugar en el azufre, entonces  $k=k_7$ , y por tanto la ecuación teórica estaría también de acuerdo con la dependencia obtenida experimentalmente con el pH.

Sobre la base de trabajos realizados sobre otros aminoácidos, péptidos, y aminas se podría descartar esta vía alternativa basándose en los siguientes razonamientos:

1. Para aminoácidos que no contienen azufre<sup>6</sup> las constantes de velocidad observadas son del mismo orden de magnitud que para aminas<sup>15</sup>, y éstas últimas no contienen oxígeno. También en la cloración de péptidos se obtienen constantes de velocidad del mismo orden que para cloración del correspondiente éster<sup>19</sup>

2. En compuestos con nitrógeno amínico totalmente sustituido como es la betaína<sup>9</sup>, no se observa reacción de cloración, lo que permitiría excluir la reacción de cloración sobre en el oxígeno como mecanismo alternativo.

3. Teniendo en cuenta la distancia entre el azufre del grupo tiolato y el oxígeno del grupo carboxilato cabría esperar que si la reacción tuviese lugar primero sobre el oxígeno con posterior transferencia del cloro al azufre, al aumentar la distancia entre ambos grupos dentro de la molécula debería disminuir la constante bimolecular, y tal como se verá más adelante (apartado 9.13) esto no sucede, obteniendo una constante de velocidad del mismo orden de magnitud para la cloración del péptido glutatión, en donde ambos grupos están más separados que en el aminoácido cisteína.

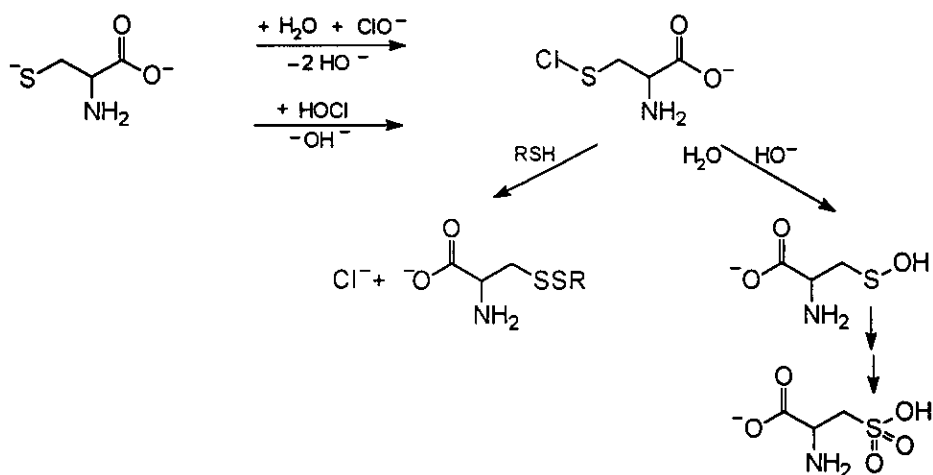
Se puede establecer un paralelismo entre la transferencia protónica y las reacciones de transferencia de cloro. Así teniendo en cuenta los  $pK_a(-SH)$  y  $pK_a(-COO^-)$  (no se considera el grupo amino ya que anteriormente este grupo ha sido descartado como centro de reacción frente al grupo  $-SH$ ) y el  $pK_c$  del ácido hipocloroso, se puede concluir que del mismo modo que a una transferencia protónica desde el ácido hipocloroso a un ácido carboxílico es desfavorable, ya que  $pK_c > pK_a(-COO^-)$ , la transferencia de cloro entre el oxígeno de ácido hipocloroso y el oxígeno de del  $\alpha$ -aminoácido es termodinámicamente desfavorable; mientras que al igual que en la

transferencia de un protón desde el ácido hipocloroso a un tiolato es favorable, ya que  $pK_c < pK_a(-SH)$ , la transferencia de cloro desde el oxígeno del ácido hipocloroso al azufre del  $\alpha$ -aminoácido es termodinámicamente favorable.

Ello implica que el hipotético complejo encuentro entre el azufre del  $\alpha$ -aminoácido y el agente clorante da lugar más rápidamente al S-Cl-compuesto que lo hace el hipotético complejo de encuentro entre el anión carboxilato del  $\alpha$ -aminoácido y el agente clorante para dar lugar al  $\alpha$ -aminoácido-OCI.

Para la oxidación de la Cys con HOCl, se encontraron como productos finales (capítulo 10) Cys<sup>+</sup>Cys y Cya, lo que está de acuerdo con el mecanismo de reacción planteado, en donde el proceso de cloración tiene lugar sobre el átomo de S y no sobre el átomo de N. Inicialmente se forma el cloruro de sulfenilo correspondiente, (S-Cl)-Cys que evoluciona para dar lugar a los productos encontrados. Esto está de acuerdo con bibliografía donde se informa que la oxidación de tioles da lugar a la formación del disulfuro correspondiente que puede a su vez dar lugar al correspondiente ácido sulfónico.<sup>20-22</sup>

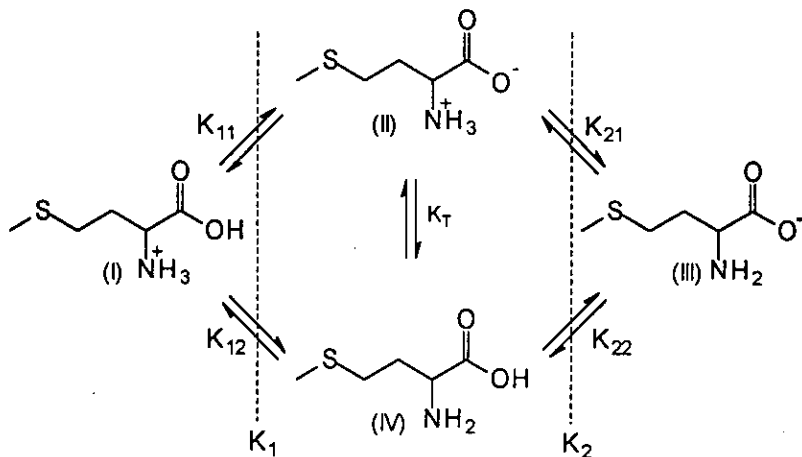
Como se muestra en el capítulo anterior (figuras 8.6 y 8.7), se observó un incremento de la concentración de ión cloruro después de la oxidación, recuperando una concentración de Cl<sup>-</sup> correspondiente, dentro del error experimental, a la concentración inicial de halogenante, [HOCl]<sub>0</sub>.



Esquema 9.8

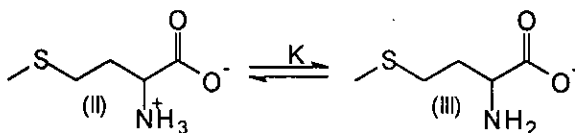
9.1.2. Halogenación de Metionina (Met).

Para este aminoácido podrían estar presentes en el medio cuatro especies, relacionadas mediante dos constantes macroscópicas, cuatro microscópicas y una constante de tautomería (esquema 9.9)



Esquema 9.9 Equilibrio ácido-base para la Metionina (Met).

Teniendo en cuenta las condiciones de pH en que se ha llevado a cabo el trabajo y los valores de los  $pK_a$  macroscópicos<sup>3</sup> [ $pK_a(-CO_2H)=2.20\pm 0.04$ ;  $pK_a(-NH_3^+)=9.05\pm 0.02$ ] el número de especies se reduce a dos:

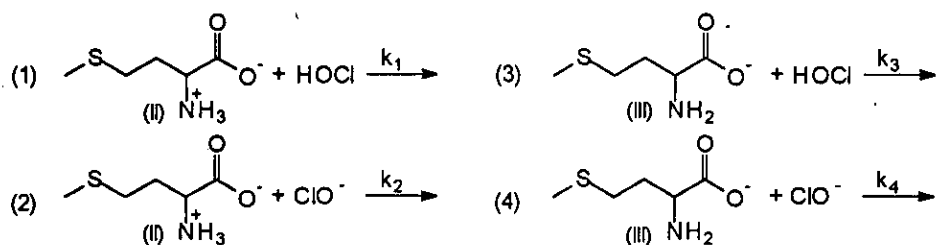


Esquema 9.10 Equilibrio ácido-base reducido para la Metionina (Met).

Una vez que se conocen las especies que están presentes en las condiciones experimentales, podemos establecer los posibles procesos elementales a través de los que podría tener lugar la reacción estudiada. Para el caso de la metionina son en total dos especies, y los cuatro posibles procesos se muestran en el esquema siguiente:



Parte I - Halogenación



Esquema 9.11 Posibles procesos para la cloración de la Met.

Las ecuaciones de velocidad correspondientes a estos procesos elementales son:

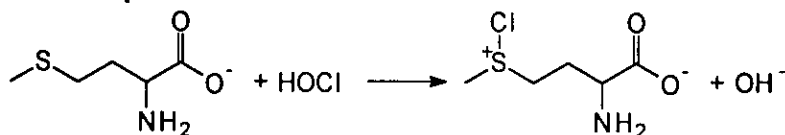
$$\begin{aligned}
 (1) \quad v &= k_1 \cdot [\text{II}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (2) \quad v &= k_2 \cdot [\text{II}] \cdot [\text{ClO}^-] \\
 (3) \quad v &= k_3 \cdot [\text{III}] \cdot [\text{HOCl}] \\
 (4) \quad v &= k_4 \cdot [\text{III}] \cdot [\text{ClO}^-]
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 9.7}$$

Básicamente las mismas consideraciones que para el caso de la Cys son aplicables aquí, por tanto la cloración tiene lugar sobre el átomo de azufre del tiol habida cuenta de la ausencia de una banda de absorción centrada sobre 250 nm, obtención del MetSO como producto final de oxidación (capítulo 10)<sup>20</sup>, y velocidades de reacción mucho más altas que las esperadas para compuestos similares que no contengan azufre. Así todos los procesos propuestos (esquema 9.11) asumen que la cloración tiene lugar sobre el átomo de S.

Teniendo en cuenta que la reacción tiene lugar sobre el átomo de azufre y el equilibrio de ionización para el halogenante (esquema 9.1) se pueden descartar los procesos (1), (2) y (4) del esquema 9.10, ya que la dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  con la acidez del medio para estos procesos no se corresponde con la obtenida experimentalmente (figura 8.5).

Por lo tanto la cloración de Met tiene lugar a través de la transferencia del Cl desde el oxígeno del HOCl hasta el S del la metionina para dar lugar al correspondiente catión clorosulfonio (esquema 9.12).

Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión



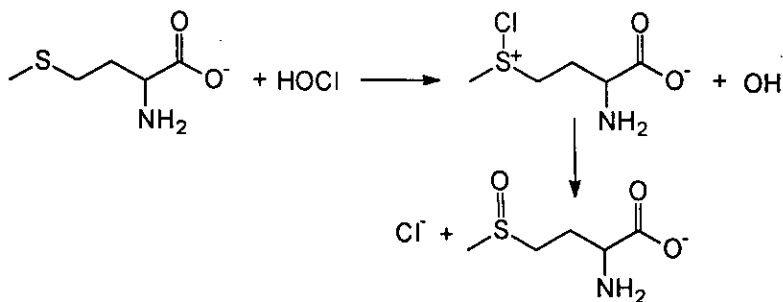
Esquema 9.12 Mecanismo propuesto para la cloración de la Met.

La ecuación de velocidad que se deriva del proceso propuesto para la cloración de Met es la siguiente:

$$v = k_{(\text{Met} + \text{HOCl})} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{(K_c + [\text{H}^+])} \cdot [\text{HOCl}]_0 \cdot [\text{Met}]_0 \quad \text{Ec.9.8}$$

donde  $k_{(\text{Met} + \text{HOCl})}$  es la constante bimolecular para dicho proceso,  $K_c$  es la constante de ionización para el HOCl y  $[\text{HOCl}]_0$  y  $[\text{Met}]_0$  es la concentración total de los reactivos. Las trazas cinéticas obtenidas se ajustan adecuadamente a esta ecuación de velocidad como se muestra en la figura 8.5.

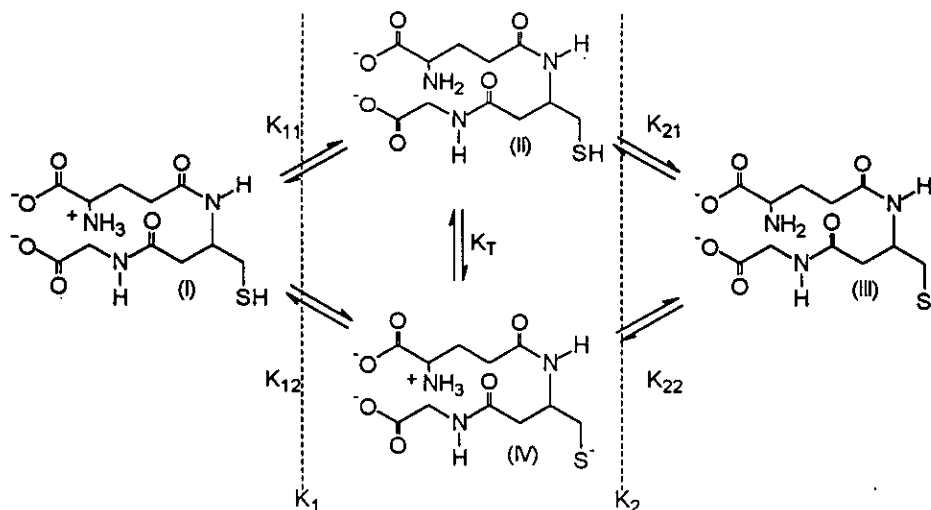
Para la oxidación de la Met con HOCl, se encontró como producto final MetSO (capítulo 10), lo que está de acuerdo con la bibliografía para la oxidación de sulfuros,<sup>7,22-36</sup> y con el mecanismo de reacción planteado, en donde el proceso de cloración tiene lugar sobre el átomo de S y no sobre el átomo de N. Inicialmente se forma el catión clorosulfonio correspondiente, y la hidrólisis de éste intermedio da lugar al producto encontrado (MetSO). Como se muestra en el capítulo anterior (figuras 8.7), se observó un incremento de la concentración de ión cloruro después de la oxidación, determinando una concentración final de  $\text{Cl}^-$  aproximadamente igual a la concentración inicial de halogenante,  $[\text{HOCl}]_0$ .



Esquema 9.13

9.1.3. Halogenación de glutation (GSH).

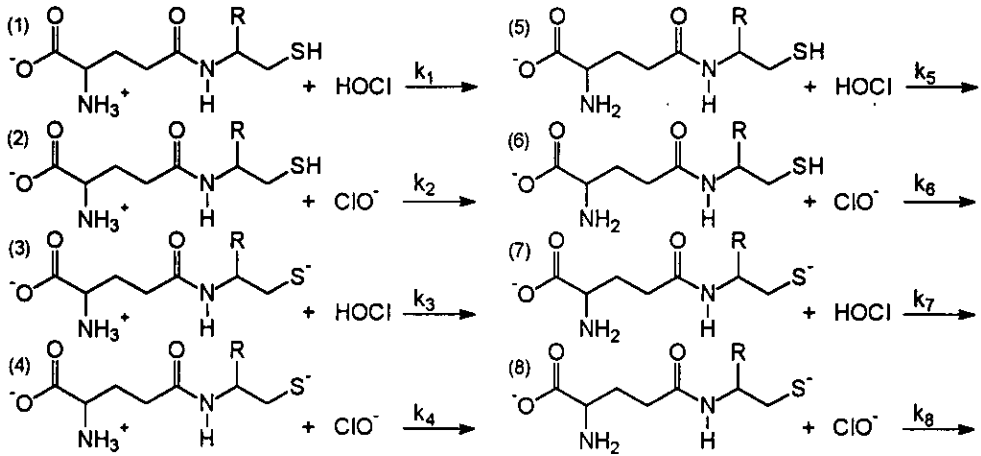
Al considerar todos los posibles átomos sobre los que pueden tener lugar equilibrios ácido-base: un grupo amino terminal, dos grupos carboxilo terminales, dos nitrógenos amídicos y un grupo tiol, resulta el número de posibles especies sería elevado. Teniendo en cuenta las condiciones de basicidad empleadas y los valores de los  $pK_a$  macroscópico de este compuesto ( $pK_a(-CO_2H)=2.34$ ;  $pK_a(-CO_2H)=3.48$ ;  $pK_a(-NH_3^+)=8.58$ ;  $pK_a(-SH)=9.37\pm 0.07$ )<sup>37</sup>, el número de posibles especies se reduce. Además, dado que los nitrógenos amídicos tienen constantes de acidez elevadas,<sup>4</sup> el número de posibles especies se limita a cuatro, las cuales se hallan relacionadas mediante dos constantes macroscópicas y una constante de tautomería (esquema 9.14)



Esquema 9.14 Equilibrio ácido-base reducido para el Glutation (GSH).

Una vez que se conocen las especies que están presentes en las condiciones experimentales, se pueden establecer los posibles procesos elementales a través de los que tiene lugar la reacción estudiada.

Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión



Esquema 9.15 Posibles procesos para la cloración del GSH.

Las ecuaciones de velocidad correspondientes a estos procesos elementales son:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad v &= k_1 [I] [HOCl] \\
 (2) \quad v &= k_2 [I] [ClO^-] \\
 (3) \quad v &= k_3 [IV] [HOCl] \\
 (4) \quad v &= k_4 [IV] [ClO^-] \\
 (5) \quad v &= k_5 [II] [HOCl] \\
 (6) \quad v &= k_6 [II] [ClO^-] \\
 (7) \quad v &= k_7 [II] [HOCl] \\
 (8) \quad v &= k_8 [II] [ClO^-]
 \end{aligned}$$

Ec. 9.8

Para cada una de estas especies hay seis posibles centros de reacción, que son los nitrógenos amídicos, los oxígenos de los grupos carboxilato, el grupo amino terminal y el grupo tiol. Nuevamente la discusión efectuada en la cloración de la Cys sobre las distintas etapas elementales es de aplicación íntegra aquí.

Por todo esto se puede descartar la cloración sobre el nitrógeno, y así todos los procesos propuestos (esquema 9.15) suponen que la cloración tiene lugar sobre el átomo de S.

Considerando los diversos equilibrios de ionización en los que están implicadas las distintas especies (esquema 9.14), y teniendo en cuenta que la reacción tiene lugar sobre el átomo de S, se muestran algunas de las dependencias de  $k_{obs}$  con la acidez del medio (ecuación 9.9) encontradas para las ecuaciones de velocidad (ecuación 9.8) de los procesos elementales anteriormente propuestos (esquema 9.15)

$$\begin{aligned}
 (1) \quad k_{obs} &= k_5 \cdot \frac{[H^+]^2}{(K_C + [H^+]) \cdot (K_S + [H^+])} \\
 (2) \quad k_{obs} &= k_6 \cdot K_C \cdot \frac{[H^+]}{(K_C + [H^+]) \cdot (K_S + [H^+])} \\
 (3) \quad k_{obs} &= k_7 \cdot K_S \cdot \frac{[H^+]}{(K_C + [H^+]) \cdot (K_S + [H^+])} \quad \text{Ec.9.9} \\
 (4) \quad k_{obs} &= k_8 \cdot \frac{K_C \cdot K_S}{(K_C + [H^+]) \cdot (K_S + [H^+])}
 \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta la dependencia experimental observada para la  $k_{obs}$  con el pH del medio (figura 8.3), se pueden descartar los procesos (1) a (5) del esquema 9.15, debido a que las ecuaciones correspondientes a estos procesos no se ajustan a los resultados experimentales. Así, por ejemplo, para el proceso (5), esquema 9.15, se obtiene una dependencia de segundo orden respecto a la concentración de protones, tal y como se indica en la ecuación 9.9 (1), lo que no corresponde con lo obtenido experimentalmente.

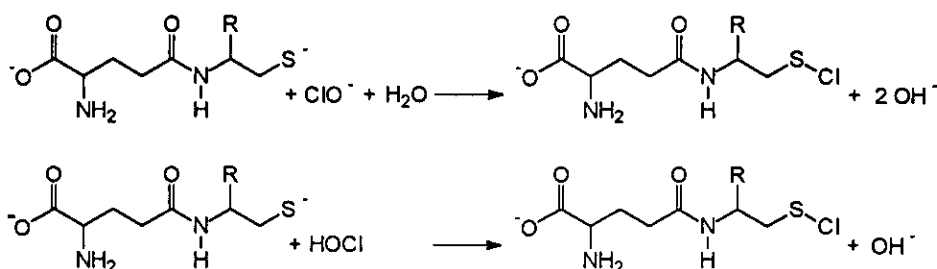
Los procesos (6) y (7) (esquema 9.15) son cinéticamente indistinguibles, tal y como se desprende de la ecuación 9.9 (2) y (3), así que es necesario tener en cuenta la reactividad de las especies que intervienen en estos procesos para poder distinguir entre ellos.

Según se indicó en el apartado correspondiente a la cloración de la Cys, el poder oxidante de HOCl es mayor que ClO<sup>-</sup> y el grupo RS<sup>-</sup> es más nucleófilo que el RSH, por lo que el proceso (6) del esquema 9.15 se puede descartar.

Al igual que se observó para el caso de la cloración de la Cys, se obtiene que para pH altos, figura 8.3, la  $k_{obs}$  es diferente de cero, alcanzando un valor próximo a  $3 \cdot 10^5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ . Lo cual representa la existencia de un camino de reacción independiente del pH, que puede ser explicado aceptando que tiene

lugar reacción entre  $\text{ClO}^-$  y el grupo  $-\text{S}^-$  del péptido; reacción que corresponde al proceso (8) del esquema 9.15.

Por todo esto el mecanismo tendría lugar a través de los procesos (7) y (8), mediante la transferencia de Cl desde el oxígeno de HOCl y  $\text{ClO}^-$  hasta el grupo tiolato,  $-\text{S}^-$ , del aminoácido, para dar lugar al correspondiente cloruro de sulfenilo (S-Cl)-GSH tal y como se indica a continuación en el esquema 9.16



Esquema 9.16 Mecanismo propuesto para la cloración del GSH

La ecuación de velocidad que se deriva del proceso propuesto para la cloración de GSH es la siguiente:

$$v = \left( k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})} \cdot \frac{[\text{H}^+]}{(K_c + [\text{H}^+])} + k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)} \cdot \frac{K_c}{(K_c + [\text{H}^+])} \right) \cdot \left( \frac{K_s}{(K_s + [\text{H}^+])} \right) \cdot [\text{HOCl}]_0 \cdot [\text{GSH}]_0$$

Ec.9.11

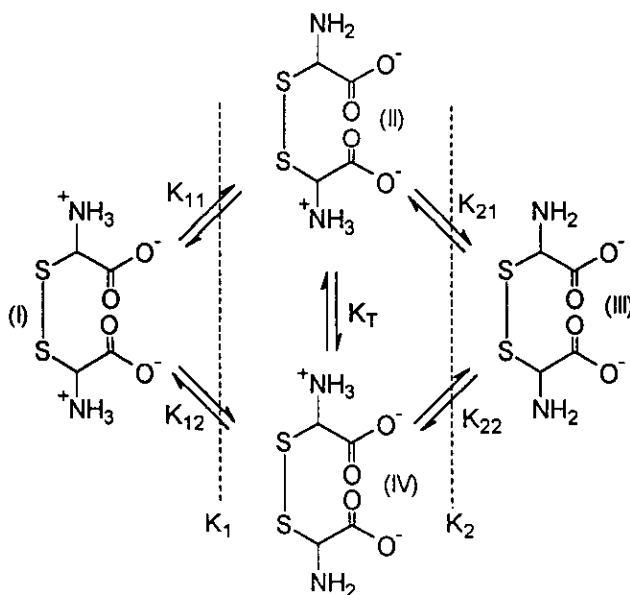
donde  $\text{RS}^-$  representa la forma tiolato del GSH,  $k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})}$  y  $k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)}$  son las constantes bimoleculares para cada uno de los procesos elementales,  $K_c$  es la constante de ionización para el HOCl y  $K_s$  la constante de ionización para el grupo tiol del GSH y  $[\text{HOCl}]_0$  y  $[\text{GSH}]_0$  representan las concentraciones totales de los reactivos. Las trazas cinéticas obtenidas se ajustan adecuadamente a esta ecuación de velocidad como se muestra en la figura 8.3.

Para la oxidación de GSH con HOCl se encontró como productos finales GSSG (capítulo 10), lo que está de acuerdo con el mecanismo de reacción planteado en donde el proceso de cloración tiene lugar sobre el átomo de S y no sobre el átomo de N. Inicialmente se forma el cloruro de sulfenilo correspondiente, (S-Cl)-GSH, que evoluciona rápidamente para dar lugar a los

productos encontrados. En la bibliografía también se ha informado que la oxidación de tioles da lugar a la formación del correspondiente disulfuro.<sup>20-22</sup>

9.1.4. Halogenación de la cistina (Cys<sup>+</sup>Cys).

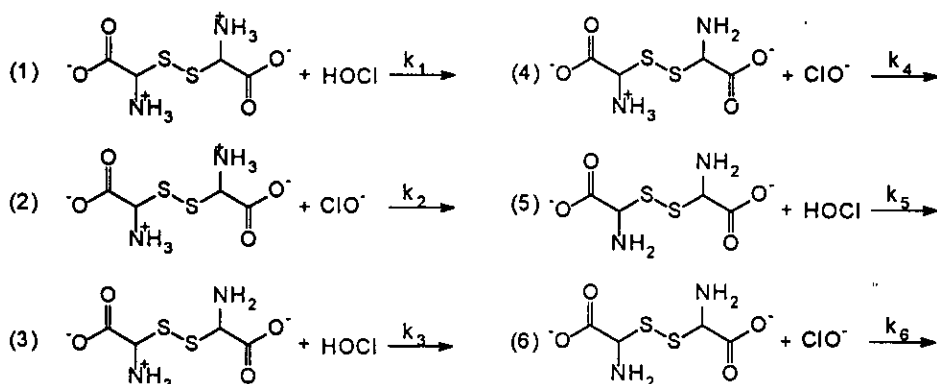
En este caso son catorce las posibles especies, que se relacionan mediante cuatro constantes de ionización macroscópicas. Pero teniendo en cuenta las condiciones de basicidad empleadas junto con los valores de  $pK_a$  macroscópicas para Cys<sup>+</sup>Cys<sup>37</sup> { $pK_a(-CO_2H)=1.88\pm 0.02$ ;  $pK_a(-NH_3^+)=8.80$ ;  $pK_a'(-NH_3^+)=8.03$ }, el número de posibles especies se puede reducir a cuatro, esquema 9.16, relacionadas mediante dos constantes macroscópicas, cuatro microscópicas y una constante de tautomería.



Esquema 9.17 Equilibrio ácido-base reducido para la cistina (Cys<sup>+</sup>Cys).

Se pueden por tanto establecer los posibles procesos elementales a través de los cuales puede tener lugar la reacción estudiada. Para la Cys<sup>+</sup>Cys, hay en total tres especies, y el número de posibles procesos es seis (esquema 9.17).

Cloración de aminoácidos que contienen azufre: discusión



Esquema 9.18 Posibles procesos para la cloración de la Cys<sup>A</sup>Cys

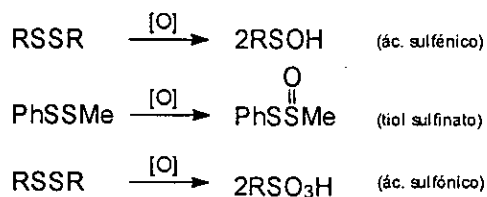
Las ecuaciones de velocidad correspondientes a estos procesos elementales son:

$$\begin{aligned}
 (1) \quad v &= k_1 [I]; [\text{HOCl}] \\
 (2) \quad v &= k_2 [I]; [\text{ClO}^-] \\
 (3) \quad v &= k_3 [II]; [\text{HOCl}] \\
 (4) \quad v &= k_4 [II]; [\text{ClO}^-] \\
 (5) \quad v &= k_5 [III]; [\text{HOCl}] \\
 (6) \quad v &= k_6 [III]; [\text{ClO}^-]
 \end{aligned}$$

Ec. 9.12

Lo indicado para la cloración de la metionina se aplica aquí, existiendo a mayores la posibilidad de cloración en uno o en los dos átomos de azufre.

En la bibliografía<sup>20</sup> se ha sugerido que los disulfuros son oxidados al ácido sulfénico, al tiol sulfinato o al ácido sulfónico correspondiente (esquema 9.19)

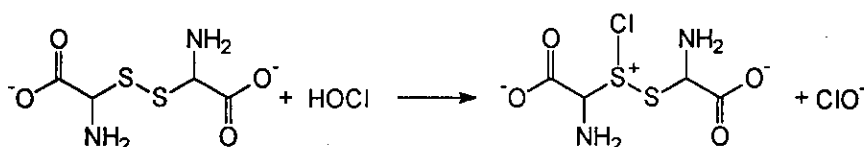


Esquema 9.19 Oxidación de disulfuros

Los ácidos sulfénicos son generalmente inestables y dimerizan para formar, mediante eliminación de agua, el tiol sulfinato.<sup>20,38</sup> Aunque la presencia de grupos carbonilo y amino pueden estabilizarlo mediante enlaces de hidrógeno.



Por similitud con los casos anteriores se supone (esquema 9.18) que la cloración tiene lugar sobre uno de los dos átomos de azufre. Considerando los diversos equilibrios de ionización en los que están implicadas las distintas especies (esquemas 9.1 y 6.15), y teniendo en cuenta que la reacción tiene lugar sobre el átomo de azufre, se pueden descartar los procesos (1) a (4) y (6) del esquema 9.16, ya que las dependencias de  $k_{obs}$  con la acidez del medio no coinciden con las obtenidas experimentalmente (figura 8.2) La reacción tiene lugar mediante la transferencia de Cl desde HOCl hasta uno de los S de la cistina generando el catión clorosulfonio:



Esquema 9.20 Mecanismo propuesto para la cloración de la Cys<sup>+</sup>Cys.

La ecuación de velocidad que deriva del proceso propuesto para la cloración de Cys<sup>+</sup>Cys es la siguiente

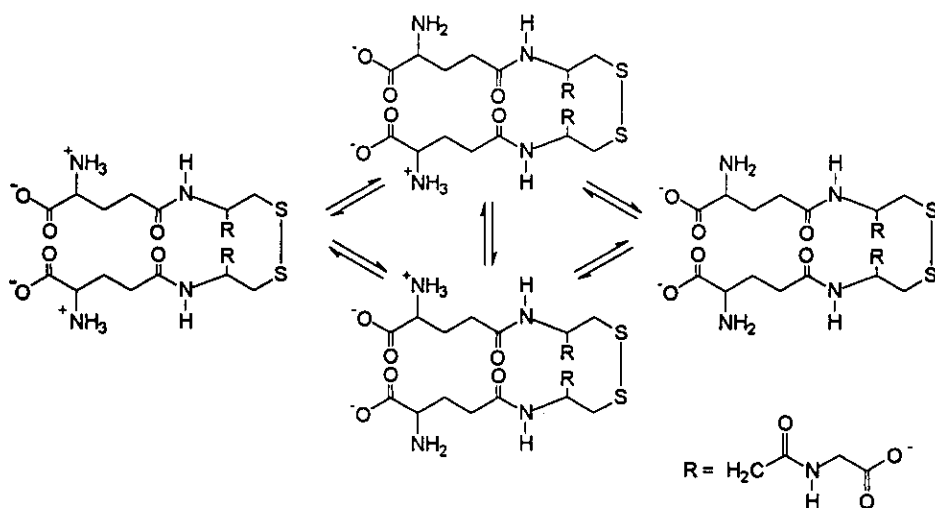
$$v = k_{(\text{Cys}^+\text{Cys} + \text{HOCl})} \frac{[\text{H}^+]}{(K_c + [\text{H}^+])} \cdot [\text{HOCl}]_0 \cdot [\text{Cys}^+\text{Cys}]_0 \quad \text{Ec.9.13}$$

donde  $k_{(\text{Cys}^+\text{Cys} + \text{HOCl})}$  es la constante de orden dos para el proceso elemental,  $K_c$  es la constante de ionización para el HOCl y  $[\text{HOCl}]_0$  y  $[\text{Cys}^+\text{Cys}]_0$  es la concentración total de los reactivos. Las trazas cinéticas obtenidas se ajustan adecuadamente a esta ecuación de velocidad, tal y como se muestra en la figura 8.2.

Se observó un incremento de la concentración de ion cloruro después de la oxidación, recuperando una concentración de  $\text{Cl}^-$  superior a la concentración inicial de halogenante,  $[\text{HOCl}]_0$ . Se comprobó la respuesta del electrodo en presencia del disulfuro, y se observó que con el tiempo se producía una variación importante de la señal (ver figura 8.8). Del incremento total en concentración de cloruro, se restó la variación debida a la interferencia del disulfuro y se obtuvo así un valor para la concentración de  $\text{Cl}^-$  recuperada del orden de la concentración inicial de halogenante.

9.1.5. Halogenación de glutation oxidado (GSSG).

Para este polipéptido el número de posibles especies sería treinta y dos especies, que se relacionan mediante seis constantes macroscópicas. Pero teniendo en cuenta las condiciones de basicidad empleadas y los valores de los  $pK_a$  macroscópico de este compuesto<sup>37</sup> [ $pK_a(-CO_2H)=2.3, 1.3, 3.04, 3.88$  (correspondiente a cada uno de los grupos carbonilo);  $pK_a(-NH_3^+)=8.7\pm 0.2, 9.5\pm 0.2$  (correspondiente a cada uno de los grupos amino)], el número de posibles especies se reduce a cuatro relacionadas mediante dos constantes macroscópicas y una constante de tautomería (esquema 9.21)

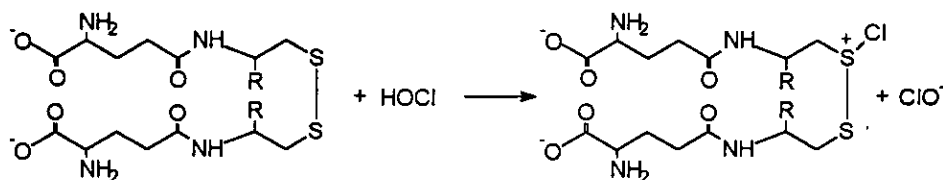


Esquema 9.21 Equilibrio ácido-base reducido para el glutation oxidado (GSSG).

Análogamente a lo que sucede para el disulfuro Cys^Cys, esquema 9.17, el número de posibles procesos elementales a través de los que intervienen las especies que aparecen en el esquema 9.21 es seis, considerando la posibilidad de que la reacción de halogenación sea con las dos especies en las que se puede encontrar el halogenante, esquema 9.1. Sobre la base de su similitud con la Cys^Cys, las ecuaciones de velocidad resultarían análogas a las presentadas para dicho compuesto:

Por analogía con la Cys^Cys, al analizar la dependencia de  $k_{obs}$  con la acidez del medio obtenida se pueden descartar aquellos procesos en los que están implicadas las especies (1) - (3) del esquema 9.20, ya que no coinciden con las obtenidas experimentalmente (figura 9.4). Por tanto, la reacción tiene

lugar mediante la transferencia de Cl desde HOCl hasta uno de los S de glutation oxidado para producir el correspondiente catión clorosulfonio, según se refleja en el siguiente esquema.



Esquema 9.22 Mecanismo propuesto para la cloración del GSSG.

Como podría haberse anticipado, se obtiene el mismo tipo de ecuación de velocidad que para la cloración de Cys^Cys

$$v = k_{(GSSG+HOCl)} \cdot \frac{[H^+]}{(K_C + [H^+])} \cdot [HOCl]_0 \cdot [GSSG]_0 \quad \text{Ec.9.14}$$

donde  $k_{(GSSG + HOCl)}$  es la constante de orden dos para el proceso elemental,  $K_C$  es la constante de ionización para el HOCl y  $[HOCl]_0$  y  $[GSSG]_0$  es la concentración total de los reactivos. Las trazas cinéticas obtenidas se ajustan adecuadamente a esta ecuación de velocidad, tal y como se muestra en la figura 8.5.

A modo de resumen se presenta la siguiente tabla donde se recogen los valores de las constantes bimoleculares, a 298.0 K, para la cloración de los S-compuestos estudiados en este trabajo:

**Tabla 9.2.**

S-compuesto	$k_{HOCl} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	$k_{ClO^-} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
Cys	$(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^9$	$(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^5$
Cys^Cys	$(3.8 \pm 0.1) \cdot 10^7$	N.R.
GSH	$(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^9$	$(3.1 \pm 0.1) \cdot 10^5$
GSSG	$(2.3 \pm 0.1) \cdot 10^7$	N.R.
Met	$(8.7 \pm 0.2) \cdot 10^8$	N.R.

N.R.= no reacciona

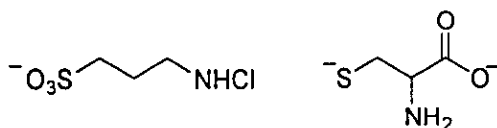


Ello contribuirá en este último caso a una pérdida entrópica por solvatación de las especies cargadas que desfavorecerá la reacción.

## 9.2. Transferencia de Cl desde (N-Cl)-Taurina.

La velocidad de la reacción de cloración de aminoácidos azufrados por (N-Cl)-Taurina presenta, a primera vista, un comportamiento inesperado al variar el pH. En la figura 9.1 se compara la tendencia que con el pH presentan las constantes de velocidad de cloración de orden dos por (N-Cl)-Taurina y HOCl.

Del mismo modo que se efectuó en el caso de la cloración por el sistema HOCl/CIO<sup>-</sup>, puede realizarse aquí un análisis relativo a la existencia de las distintas especies potencialmente participantes en la reacción. La (N-Cl)-Taurina hasta valores de pH < 4 estará esencialmente como el anión sulfonato correspondiente, mientras que en la Cys o en el GSH la especie reactiva será la que contiene al grupo tiol desprotonado.



En la figura 9.1 se muestra la dependencia con el pH encontrada de las constantes de orden dos por cloración por (N-Cl)-Taurina y HOCl.

Aceptando, para la Cys y el GSH, que las especies reactivas sean el RS<sup>-</sup> y el anión de la (N-Cl)-Taurina, no puede explicarse el comportamiento observado al variar el pH, pudiendo esperarse que la reacción fuese más rápida al aumentar el mismo.

Realizando el mismo análisis que en el apartado anterior, en la cloración de metionina por (N-Cl)-Taurina las especies reactivas debieran ser la metionina, sin importar el estado de protonación del grupo amino, y el anión de la (N-Cl)-Taurina. En este caso cabría esperar que la velocidad de cloración fuera independiente del pH.

Como se desprende de la figura 9.1 el comportamiento de la Cys y del GSH son distintos del de la Met. La cloración de aminoácidos azufrados portadores del grupo tiol presenta notables similitudes con la cloración debida al sistema HOCl/CIO<sup>-</sup>, lo cual puede constatarse en la propia figura 9.1 o bien al comparar, las figuras 8.1 y 8.9, o la 8.3 y la 8.10.

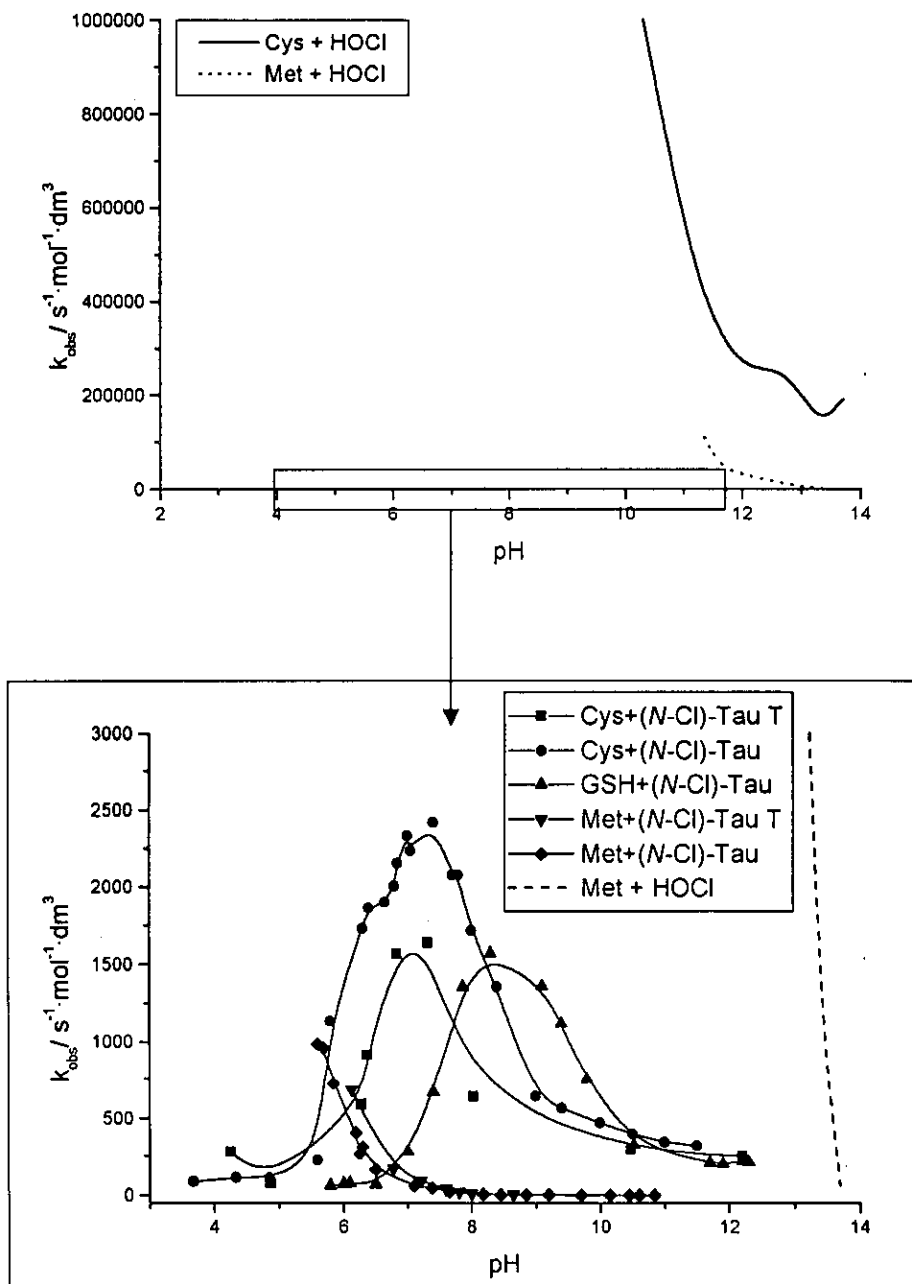
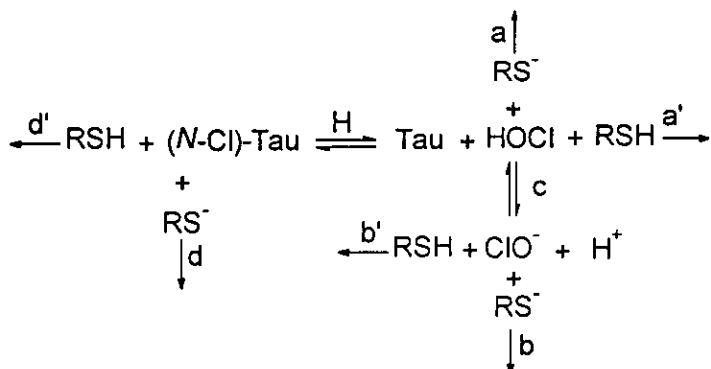


Figura 9.1. Dependencia con el pH de las constantes experimentales de orden dos de cloración por (N-Cl)-Taurina y HOCl. En el recuadro se indican las especies reaccionantes, la presencia de una T adicional señala la presencia de Taurina en exceso.

En el caso de la Cys la dependencia con el pH es análoga a la hallada al estudiar la cloración de aminoácidos no azufrados.<sup>1,6,9,11,16</sup> El comportamiento observado sugiere que se está produciendo HOCl en el medio de reacción, lo cual sólo se puede explicar aceptando que ocurra la hidrólisis de la (N-Cl)-Taurina. En el siguiente esquema se muestra el mecanismo propuesto para la cloración de Cys y GSH:



**Esquema 9.23** Mecanismo propuesto para la cloración del Cys o GSH por (N-Cl)-Taurina. *H* representa la constante de hidrólisis de la (N-Cl)-Taurina; *c* representa la constante de ionización de HOCl; *a, b* y *c* son las constantes cinéticas para la halogenación de RS<sup>-</sup> y *a', b'* y *c'* son las constantes cinéticas para la cloración de RSH

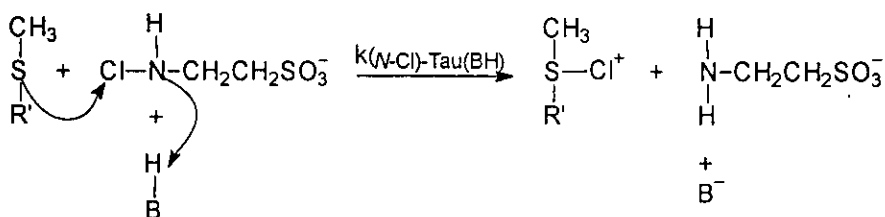
Para el que se puede derivar la siguiente ecuación de velocidad:

$$k_{\text{obs}} = \left( \left[ \frac{(a \cdot H \cdot [\text{H}^+] + b \cdot C \cdot H)}{(C + [\text{H}^+])} \cdot \frac{1}{[\text{Tau}]} \right] + d \right) \frac{S}{(S + [\text{H}^+])} \quad \text{Ec.9.15}$$

donde se ha hecho la consideración de que la especie RSH no reacciona significativamente, ya que el grupo tiolato, RS<sup>-</sup>, es 10<sup>4</sup> más reactivo como nucleófilo que el grupo protonado RSH.<sup>17,18</sup> Esta ecuación es formalmente similar a la hallada experimentalmente, prediciendo una dependencia inversa con la concentración de taurina, lo cual se ha verificado experimentalmente tal como ha quedado patente tanto en la figura 8.11 como en la 9.1.

Puesto que la mayoría de los parámetros de dicha ecuación se conocen del estudio de cloración por  $\text{HOCl}/\text{ClO}^-$ , es posible determinar tanto la constante cinética bimolecular correspondiente a la reacción entre la especie  $\text{RS}^-$  y la (N-Cl)-Taurina como la constante del equilibrio de hidrólisis; resulta en este caso  $6.6 \cdot 10^{-8}$  M, en buen acuerdo con el hecho de que por medidas espectrofotométricas directas no se observe hidrólisis de la (N-Cl)-Taurina en escalas de tiempo largas.

Para la cloración de la Met, se propone como etapa determinante de la velocidad de reacción la mostrada en el esquema 9.24.



Esquema 9.24 Mecanismo propuesto para la cloración de la Met .

Aceptando esta hipótesis, y considerando la presencia en el medio de reacción de varias especies capaces de ceder protones (BH), se deduce la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{Met}] \cdot [(\text{N}-\text{Cl})-\text{Tau}] \quad \text{Ec.9.16}$$

consistente con el orden dos global hallado experimentalmente; los términos contenidos en  $k_{\text{obs}}$  se muestran seguidamente en la ecuación 9.17:

$$k_{\text{obs}} = \sum_i k_{(N-Cl)\text{-Tau}(B_iH)} \cdot [B_i]_0 \cdot \frac{[H^+]}{[H^+] + [K_{a,B_iH}]} \quad \text{Ec.9.17}$$

Con objeto de controlar el pH del medio fue necesario emplear disoluciones reguladoras del pH en la mayoría de las condiciones de trabajo, ello implica que no pueden ajustarse de forma rigurosa todos los datos experimentales a una ecuación. Sin embargo, si se fija el pH, en condiciones de exceso de taurina se llega a la expresión:

$$k_{\text{obs}} = k'_{(N-Cl)\text{-Tau}(\text{Tau})} \cdot [\text{Tau}]_0 + a \quad \text{Ec.9.18}$$



donde se predice una dependencia lineal entre la constante observada y la concentración de (N-Cl)-Taurina, de acuerdo con lo hallado experimentalmente. El término "a" contiene los términos similares al especificado para la taurina, pero en este caso corresponden al tampón utilizado y a la contribución debida al disolvente. Teniendo en cuenta el equilibrio ácido-base de la taurina es posible obtener el valor de  $k_{(N-Cl)-Tau(Tau)}$ .

$$k'_{(N-Cl)-Tau(Tau)} = k_{(N-Cl)-Tau(Tau)} \cdot \frac{[H^+]}{[H^+] + [k_{a,TauH}]} \quad \text{Ec.9.19}$$

A la vista de lo discutido para la metionina se hace preciso reanalizar parcialmente lo hallado para la cisteína. El parámetro "d" de la ecuación 9.15 realmente será una expresión compleja análoga a la ecuación 9.17, que en caso de que el pH se mantenga constante adoptará la forma de la ecuación 9.18. Todo ello trasladado a la ecuación 9.15 resulta:

$$k_{obs} = \frac{A}{[Tau]} + B + C \cdot [Tau] \quad \text{Ec.9.20}$$

donde A contiene todos los términos debidos a la cloración por el sistema HOCl/CIO<sup>o</sup>, B engloba a la cloración de Cys por (N-Cl)-Taurina con la asistencia del tampón y del disolvente, y C puede asociarse con la cloración de Cys por (N-Cl)-Taurina asistida por la taurina protonada en el grupo amino. Dicha ecuación puede transformarse en la de una parábola, mostrando la figura 9.2 que dicha función se ajusta adecuadamente a los datos experimentales.

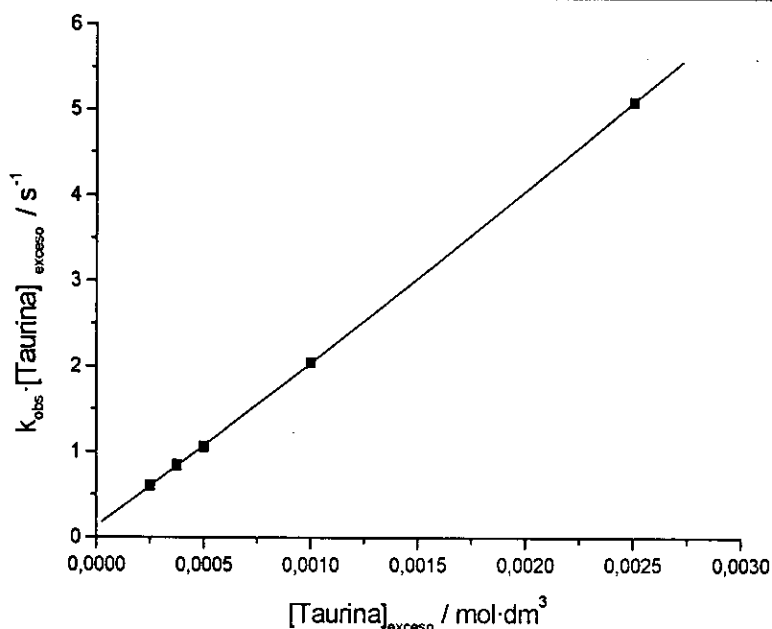


Figura 9.2. Dependencia del término  $k_{obs}[Tau]$  con el exceso de la concentración de taurina. [Cys]=2.5 mM; pH=7.4, I=0.5 mol·dm<sup>-3</sup> (NaClO<sub>4</sub>), λ=252 nm, T=298.0 K.

El resultado del ajuste permite recalcular el valor de la constante de hidrólisis ( $K_H=4.4 \cdot 10^{-9}$  M) y obtener una estimación de la  $k_{(N-Cl)-Tau(Tau)}$ , valor que se recoge en la tabla 9.3.

Tabla 9.3.

Compuesto	$k_{(N-Cl)-Tau(Tau)} / \text{mol}^{-2} \cdot \text{dm}^6 \cdot \text{s}^{-1}$
Cys	$(4.7 \pm 1.5) \cdot 10^4$
Met	$473 \pm 9$

Al comparar los valores de la tabla 9.2 con los de la 9.3 queda patente la gran diferencia de reactividad entre el HOCl y la (N-Cl)-Taurina. Del mismo modo que es aplicable aquí la discusión realizada en el apartado anterior sobre la notable diferencia de reactividad entre el grupo tiolato y el grupo sulfuro.

Todo lo anterior resulta consistente con el papel modulador de los procesos oxidativos que se atribuye a la (N-Cl)-Taurina *in vivo*: la elevada concentración de la taurina en el medio celular controla los efectos oxidativos que origina el sistema mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl, siendo la (N-Cl)-Taurina quien sigue ejerciendo como oxidante pero con una actividad mucho menor.

### 9.3. Bibliografía.

- (1) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Gazz. Chim. Ital.* **1994**, *124*, 519.
- (2) Kallen, R. G. *J. Am.Ch.S.* **1971**, *93*, 6227-6235.
- (3) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Amino Acids. Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 1.
- (4) Stewart, R. *The Proton: Applications to Organic Chemistry*, Academic Press: Orlando (Florida, U.S.A.), 1985.
- (5) Friedman, M. *The Chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group amino acids, peptides and proteins*, 1973.
- (6) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275-284.
- (7) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1993**, *25*, 331.
- (8) Armesto, X. L.; Canle, M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 181.
- (9) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1135.
- (10) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Bull. Soc. Chim. Belg* **1996**, *105*, 349-353.
- (11) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Electronic Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1)* **1996**.
- (12) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, *9*, 552-560.
- (13) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, P.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2265.
- (14) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4659.
- (15) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 521-530.
- (16) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 453-460.

- (17) Pearson, R. G.; Sobel, H.; Songstad, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 319.
- (18) Scudder, P. H. *Electron Flow in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons, Inc.: New York (U.S.A.), 1992.
- (19) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Rodríguez, S.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 608-612.
- (20) Cremllyn, R. J. *An Introduction to Organosulfur Chemistry*; John Wiley & Sons: Chichester (England), 1996.
- (21) Zincke, T.; Frohneberg, W. *Berichte* **1910**, *43*, 837.
- (22) Oae, S. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chapter 8.
- (23) Schank, K. In *The syntheses of sulphones, sulfoxides and cyclic sulphides*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York (U.S.A.), 1994, p Chap. 1.
- (24) Weber, J. V.; Schneider, M.; Salami, B.; Paquer, D. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. **1986**, *105/3*, 99-102.
- (25) Young, P. R.; Till, M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, No. 8., 1416-1418.
- (26) Grossert, J. S.; Hardstaff, W. R.; Langler, R. F. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 421-426.
- (27) Harville, R.; Samuel F. Reed, J. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, No. 10., 3976-3977.
- (28) Truce, W. E.; Klingler, T. C.; Brand, W. W. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chap. 10.
- (29) Marino, J. P. In *Topics in Sulfur Chemistry*; Senning, A., Ed.; Georg Thieme Publishers Stuttgart.: 1976; Vol. 1, p 48-107.
- (30) Grossert, J. S.; Hardstaff, W. R.; Langler, R. F. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1973**, 50.
- (31) Montanari, F.; Cinquini, M. **1968**, *3*, 121.
- (32) Skattebøl, L.; Boulette, B.; Solomon, S. *J. O. C.* **1967**, *32*, 3111-3114.
- (33) Higuchi, T.; Gensch, K. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3874.
- (34) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; McGregor, W. S. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2485.
- (35) Benes, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1171.

- (36) Kwart, H.; Miller, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5008-5011.
- (37) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 6 (Second Supplement).
- (38) Capozzi, G.; Modena, G., p 785-839.
- (1) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Gazz. Chim. Ital.* **1994**, *124*, 519.
- (2) Kallen, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 6227-6235.
- (3) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Amino Acids. Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 1.
- (4) Stewart, R. *The Proton: Applications to Organic Chemistry*, Academic Press: Orlando (Florida, U.S.A.), 1985.
- (5) Friedman, M. *The Chemistry and biochemistry of the sulfhydryl group amino acids, peptides and proteins*, 1973.
- (6) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 275-284.
- (7) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1993**, *25*, 331.
- (8) Armesto, X. L.; Canle, M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 181.
- (9) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* **1994**, *26*, 1135.
- (10) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Bull. Soc. Chim. Belg* **1996**, *105*, 349-353.
- (11) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Electronic Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1)* **1996**.
- (12) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* **1996**, *9*, 552-560.
- (13) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, P.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2265.
- (14) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4659.
- (15) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 521-530.

- (16) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chemical Society Reviews* **1998**, *27*, 453-460.
- (17) Pearson, R. G.; Sobel, H.; Songstad, J. *J. Am. Chem. Soc* **1968**, *90*, 319.
- (18) Scudder, P. H. *Electron Flow in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.: New York (U.S.A.), 1992.
- (19) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Rodríguez, S.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 608-612.
- (20) Cremlyn, R. J. *An Introduction to Organosulfur Chemistry*, John Wiley & Sons: Chichester (England), 1996.
- (21) Zincke, T.; Frohneberg, W. *Berichte* **1910**, *43*, 837.
- (22) Oae, S. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chapter 8.
- (23) Schank, K. In *The syntheses of sulphones, sulphoxides and cyclic sulphides*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York (U.S.A.), 1994, p Chap. 1.
- (24) Weber, J. V.; Schneider, M.; Salami, B.; Paquer, D. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. **1986**, *105/3*, 99-102.
- (25) Young, P. R.; Till, M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, No. 8., 1416-1418.
- (26) Grossert, J. S.; Hardstaff, W. R.; Langler, R. F. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 421-426.
- (27) Harville, R.; Samuel F. Reed, J. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3976-3977.
- (28) Truce, W. E.; Klingler, T. C.; Brand, W. W. In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1977, p Chap. 10.
- (29) Marino, J. P. In *Topics in Sulfur Chemistry*; Senning, A., Ed.; Georg Thieme Publishers Stuttgart.: 1976; Vol. 1, p 48-107.
- (30) Grossert, J. S.; Hardstaff, W. R.; Langler, R. F. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1973**, 50.
- (31) Montanari, F.; Cinquini, M. **1968**, *3*, 121.
- (32) Skattebøl, L.; Boulette, B.; Solomon, S. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3111-3114.
- (33) Higuchi, T.; Gensch, K. H. *J. Am. Chem. Soc* **1966**, *88*, 3874.

- (34) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; McGregor, W. S. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2485.
- (35) Benes, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1171.
- (36) Kwart, H.; Miller, R. K. *Journal of American Chemical Society.* **1956**, *78*, 5008-5011.
- (37) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 6 (Second Supplement).
- (38) Capozzi, G.; Modena, G., p 785-839.
- (39) Andrés, J.; Canle L., M.; García, M. V.; Rodríguez Vázquez, L. F.; Santaballa, J. A. *Chemical Physics Letters* **2001**, 342.

- (34) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; McGregor, W. S. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2485.
- (35) Benes, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1171.
- (36) Kwart, H.; Miller, R. K. *Journal of American Chemical Society.* **1956**, *78*, 5008-5011.
- (37) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants*; Plenum Press: New York (U.S.A.), 1989; Vol. 6 (Second Supplement).
- (38) Capozzi, G.; Modena, G., p 785-839.
- (39) Andrés, J.; Canle L., M.; García, M. V.; Rodríguez Vázquez, L. F.; Santaballa, J. A. *Chemical Physics Letters* **2001**, 342.



## 10. Análisis de productos: halogenación



## 10.1. Cromatografía en capa fina (TLC).

### 10.1.1. Cloración de Cys.

Para el análisis de TLC se usaron placas de gel de sílice de 10 cm, y para desarrollar las placas se empleó para eluir la mezcla *n*-PrOH/H<sub>2</sub>O (70:30 cm<sup>3</sup>). Como agente revelante se utilizó ninhidrina. En estas condiciones se detectó Cys ( $R_F=0.45$ ) y Cys<sup>^</sup>Cys( $R_F=0.18$ ).

### 10.1.2. Cloración de GSH.

Se usaron placas de gel de sílice de 10 cm, empleándose para desarrollarlas la mezcla *n*-PrOH/H<sub>2</sub>O (70:30 cm<sup>3</sup>) como eluyente. También en este caso el agente revelante fue ninhidrina. Se detectó GSH ( $R_F=0.48$ ) y GSSG( $R_F=0.27$ ).

### 10.1.3. Cloración de Met.

Para el análisis de TLC se usaron placas de gel de sílice de 10 cm, siendo desarrolladas con la mezcla *n*-PrOH/AcOH/H<sub>2</sub>O (80:20:20 cm<sup>3</sup>). Nuevamente se reveló con ninhidrina. De este modo se detectó Met( $R_F=0.58$ ) y MetSO( $R_F=0.23$ ). También se empleó (*N*-Cl)-taurina, y como fase móvil *n*-PrOH/H<sub>2</sub>O (70:30 cm<sup>3</sup>), y se detectó Met( $R_F=0.64$ ) y MetSO( $R_F=0.30$ ) y Tau( $R_F=0.58$ ).

## 10.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los análisis de HPLC fueron realizados en un sistema equipado con: una unidad de flujo, desgasificador en línea de cuatro canales, inyección automática, horno para columnas y módulo para el control de temperatura, y como detector se empleó un sistema de "array" de fotodiodos.

### 10.2.1. Determinación de cisteína y cistina.

#### 10.2.1.1. Cloración por HOCl.

Para el análisis de los productos de oxidación de Cys con HOCl, se han seguido dos procedimientos:

a.1) Se utilizó una columna de fase normal Waters rellena con Porasil 125 Å 10 mm, de 300×3.9 mm. La fase móvil empleada fue *n*-PrOH:H<sub>2</sub>O (70:30 cm<sup>3</sup>).

Se trabajó en modo isocrático, a 298 K, con un flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de 10  $\mu$ L. La detección se hizo a 210 nm. Se comprobó la linealidad de la respuesta del detector con los compuestos analizados (ver Anexo). Se obtuvieron los correspondientes calibrados que fueron usados para determinar el porcentaje de reacción. Como producto mayoritario de oxidación del tiol, Cys, se obtuvo su disulfuro, Cys<sup>2</sup>S, con evidencia de la presencia de ácido cisteico, Cya.

Los tiempos de retención para estos compuestos son los que aparecen en la siguiente tabla:

$t_R(\text{Cys})/\text{min}$	$t_R(\text{Cys}^2\text{S})/\text{min}$	$t_R(\text{Cya})/\text{min}$
4.4	7.6	~3.0

En estas condiciones se obtiene de la oxidación de Cys un 22% de Cys<sup>2</sup>S.

a.2) Mediante un procedimiento de derivatización usando o-ftaldehído/2-mercaptoetanol (OPA/MCE), para generar derivados fluorescentes, siguiendo un procedimiento que permite de forma rápida y directa la detección fluorimétrica de aminoácidos por debajo del intervalo de nanomoles.<sup>1-3</sup> La reacción de OPA-MCE con Cys da lugar a un derivado con poca fluorescencia. Para solucionar este problema se realiza un pretratamiento con ácido iodoacético que bloquea el grupo sulfidrilo, formándose un derivado que fluoresce con mayor intensidad.<sup>3</sup>

Se utilizó una columna Alltech fase reversa de 250 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, rellena con Partisil ODS3 5mm (tamaño de partícula). Se utilizó también precolumna Alltech, con el mismo tipo de relleno, de 7.5 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. La fase móvil utilizada fue 72:20:8 mezcla de H<sub>2</sub>O/0.25 mol dm<sup>-3</sup> propionato sódico (pH~6.5)/CH<sub>3</sub>CN. Se trabajó en modo isocrático, a 298 K, con un flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de 10  $\mu$ L. Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando como  $\lambda_{\text{excitación}}=360$  nm y  $\lambda_{\text{emisión}}=455$  nm. Los rendimientos de fluorescencia de los derivados OPA/MCE de los aminoácidos se cuantificaron por comparación con la señal producida por homoserina, que se utilizó como patrón interno. Mediante esta técnica de derivatización sólo es posible identificar el tiol, ya que

en el proceso de derivatización tiene lugar la reducción del disulfuro Cys<sup>2</sup>Cys a su correspondiente tiol, Cys. Además debido a la baja estabilidad de los derivados<sup>2-5</sup> es posible que los rendimientos así obtenidos sean más bajos que los esperados.

Los tiempos de retención para estos compuestos son los que aparecen en la siguiente tabla:

$t_R(\text{Cys})/\text{min}$	$t_R(\text{Cys}^2\text{Cys})/\text{min}$	$t_R(\text{Cya})/\text{min}$
12.0	12.0	5.0

En estas condiciones y para diferentes pH, se obtiene un 33% de Cya y un 11% de Cys<sup>2</sup>Cys como productos de la oxidación de Cys por HOCl.

#### 10.2.1.2. Cloración por (N-Cl)-taurina.

En este caso se utilizó una columna de Alltech fase normal de 250 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, rellena con Kromasil Sílice 5 mm (tamaño de partícula). La fase móvil utilizada fue *n*-PrOH/H<sub>2</sub>O (70:30 cm<sup>3</sup>). Se trabajó en modo isocrático, a 298 K, con flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección de 10 µL. La detección se hizo a 210 nm. Se comprobó la linealidad de la respuesta del detector con los compuestos analizados (ver Anexo). Se obtuvieron los correspondientes calibrados que fueron usados para determinar el porcentaje de reacción. Como producto mayoritario de la oxidación de tiol, Cys, se obtuvo su disulfuro, Cys<sup>2</sup>Cys, con evidencia de la presencia de ácido cistéico, Cya. También existen evidencias de la recuperación de Tau, pero debido a que aparece a tiempos de retención próximos al volumen muerto de la columna, se concluye que el compuesto está poco retenido por la fase estacionaria, por lo que es difícil su identificación y cuantificación.

Análisis de productos

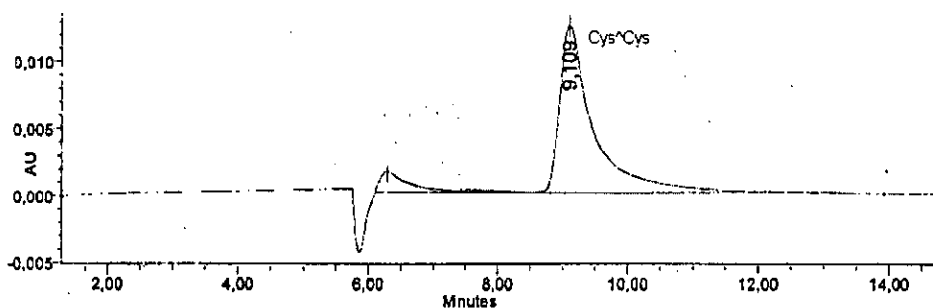


Figura 10.1 Cromatograma de la reacción de oxidación de Cys por (N-Cl)-Tau. [Cys]=[(N-Cl)-Tau]; pH=7; T=298.0 K.

Los tiempos de retención determinados para ambos compuestos son:

(N-Cl)-taurina	
$t_R(\text{Cys})$ /min	$t_R(\text{Cys}^{\wedge}\text{Cys})$ /min
7.1	9.1

El análisis de productos se llevó a cabo a diferentes pH (5, 7 y 10).

*pH=5*

En estas condiciones sólo aparecen Cys y Cys<sup>^</sup>Cys como productos mayoritarios de reacción. La reacción no es cuantitativa, reaccionado un ~50% de Cys y sólo un ~35% de éste se transforma en Cys<sup>^</sup>Cys, siendo la relación (N-Cl)-taurina:Cys 1:1. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.

*pH=7*

En estas condiciones sólo aparecen Cys y Cys<sup>^</sup>Cys como productos mayoritarios de reacción. La reacción es casi cuantitativa, reaccionado ~100% de Cys y un ~80% de éste se transforma en Cys<sup>^</sup>Cys, siendo la relación (N-Cl)-taurina:Cys 1:1. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.

*pH=10*

En estas condiciones sólo aparecen Cys y Cys<sup>^</sup>Cys como productos mayoritarios de reacción. La reacción es casi cuantitativa, reaccionado ~100% de Cys y un ~66% de éste se transforma en Cys<sup>^</sup>Cys, siendo la relación (N-Cl)-taurina:Cys 1:1. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.

10.2.2. Determinación de glutatión oxidado y reducido. <sup>6-10</sup>

La separación de estos polipéptidos se realizó utilizando una columna de fase reversa Inertsil ODS2 5 mm (tamaño de partícula) 250x4.6 mm La fase móvil utilizada fue, H<sub>2</sub>O(0.1%TFA, V/V):ACN (98:2 cm<sup>3</sup>). Se tampona con ácido trifluoroacético para minimizar las interacciones del péptido con la fase estacionaria, mejorando así la forma de las señales y, por tanto, la separación de ambos compuestos. Se trabajó en modo isocrático, a 298 K, con un flujo de 1 mL/min y volumen de inyección de 10 µL. La detección se hizo a 210 nm.

Los patrones se prepararon utilizando agua en las mismas condiciones de pH que la fase móvil. Se comprobó la linealidad de respuesta del detector con la concentración de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Debido a que las diferentes muestras analizadas presentaban condiciones de pH distintas a la de la fase móvil, se comprobó también que los patrones preparados inicialmente al pH de trabajo, y a continuación llevados al pH de la fase móvil seguían manteniendo la linealidad dentro del intervalo de concentraciones estudiadas. A partir de los calibrados se determinaron los rendimientos de reacción. Se comprobó también la estabilidad del tiol GSH en medio básico, no observando variación en el área de la señal del tiol en un intervalo de tiempo de una hora. Las muestras de reacción se prepararon a distintos valores de pH, una vez finalizada la reacción se modificó el pH hasta conseguir el pH de la fase móvil.

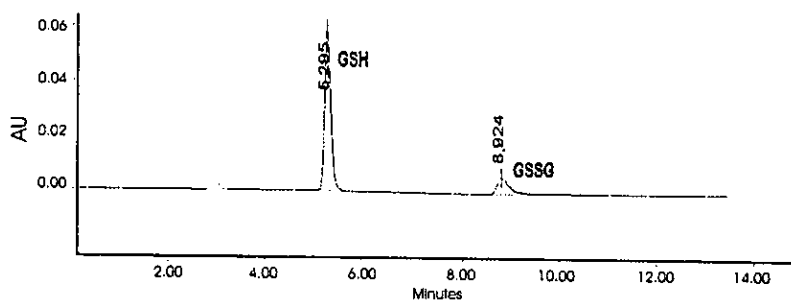


Figura 10.2 Cromatograma de la reacción de oxidación de GSH por HOCl.  
[GSH]=[HOCl]; pH=7; T=298.0 K.

Los tiempos de retención hallados para ambos compuestos fueron:

HOCl		(N-Cl)-taurina	
t <sub>R</sub> GSH/min	t <sub>R</sub> GSSG/min	t <sub>R</sub> GSH / min	t <sub>R</sub> GSSG/min
5.4	8.9	5.5	8.4

10.2.2.1. Cloración por HOCl.

El análisis de productos se llevó a cabo a pH 5, 7 y 10.

*pH=5*

En estas condiciones sólo aparecen GSH y GSSG como productos de reacción. La reacción no es cuantitativa, reaccionando un 31% de GSH y sólo un 14% de éste se transforma en GSSG, siendo la relación GSH:HOCl 1:1. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.

*pH=7*

Se encontró de nuevo como producto mayoritario GSSG. Al igual que antes la reacción no es cuantitativa, reaccionando un 49% de GSH y sólo un 44% de éste se transforma en GSSG, siendo la relación GSH:HOCl 1:1. Tampoco se observa variación en los rendimientos con el tiempo.

*pH=10*

En estas condiciones aparecen otros productos además del GSSG y GSH. La reacción no es cuantitativa, reaccionando un 77% de GSH y sólo un 38% de éste se transforma en GSSG, siendo la relación GSH:HOCl 1:1. En estas condiciones, si que hay variación en los rendimientos con el tiempo (ver Anexo).

Por analogía con Cys se podría asumir que el GSH que reacciona pero que no se transforma en GSSG lo hace en el correspondiente ácido sulfónico (GSa)

10.2.2.2. Cloración por (N-Cl)-taurina.

La reacción se llevó a cabo a pH 5, 7 y 10.

*pH=5*

En estas condiciones sólo aparecen GSH y GSSG como productos de reacción. La reacción no es cuantitativa, reaccionando un 30% de GSH y sólo un 20% de éste se transforma en GSSG, siendo la relación (N-Cl)-taurina:GSH 1:1. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.



*pH=7*

Como producto de oxidación mayoritario resulta GSSG. La reacción no es cuantitativa pero el GSH reacciona en mayor medida (82%), convirtiéndose un 81% en GSSG. No existe variación en los rendimientos de reacción con el tiempo.

*pH=10*

En estas condiciones aparecen otros productos además del GSSG y GSH, el GSH reacciona en un 70% y se transforma en GSSG, condiciones 1:1, un 30%.

*10.2.3. Determinación de metionina y metionina sulfóxido.*

Para separar estos compuestos, se utilizó una columna Alltech fase reversa de 250 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno, rellena con Partisil ODS3 5mm(tamaño de partícula). Se empleó también precolumna Alltech, con el mismo tipo de relleno, de 7.5 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno. La fase móvil utilizada fue MeOH:H<sub>2</sub>O 5:95. Se trabajó en modo isocrático, a 298.0 K, con un flujo de 1 mL/min(HOCl)-0.8 mL\*/min(N-Cl-aurina) y volumen de inyección de 10 µL. La detección se hizo a 210 nm. Se efectuaron la linealidad de la respuesta del detector con los compuestos analizados. Se obtuvieron los correspondientes calibrados que fueron usados para determinar el porcentaje de reacción.

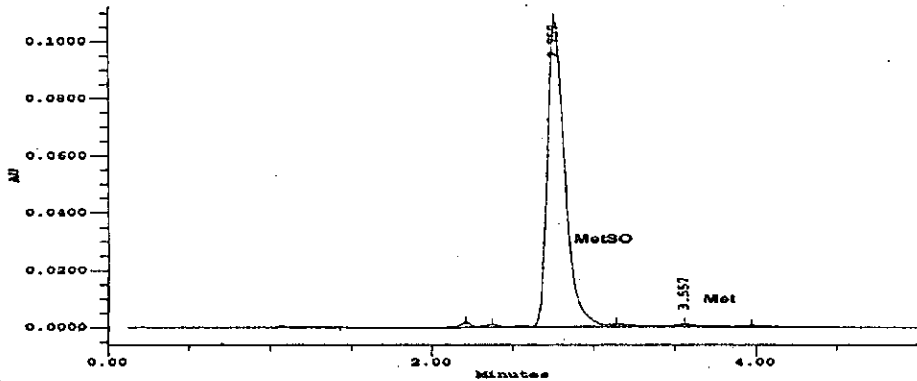


Figura 10.3 Cromatograma de la reacción de oxidación de Met por HOCl.  
[Met]=[HOCl]; pH=7; T=298.0 K

Los tiempos de retención determinados para ambos compuestos son\*:

HOCl		(N-Cl)-taurina	
$t_R(\text{Met})/\text{min}$	$t_R(\text{MetSO})/\text{min}$	$t_R(\text{Met})/\text{min}$	$t_R(\text{MetSO})/\text{min}$
3.5	2.8	4.3	3.6

10.2.3.1. Cloración por HOCl.

La determinación se realizó llevando a cabo la reacción a distintos pH (6, 7, 8 y 12). En todos los casos la reacción es cuantitativa, desapareciendo la Met en su totalidad. En todos los casos aproximadamente un 75% se transforma en metionina sulfóxido, siendo éste el producto mayoritario de la reacción de oxidación.

10.2.3.2. Cloración por (N-Cl)-taurina.

La determinación se realizó llevando a cabo la reacción a distintos pH, 7, 9, 10 y 11. En ninguno de los casos la metionina desaparece totalmente.

pH	%Met que reacciona	%MetSO formado
7	75	100
9	75	78
10	67	61
11	73	61

A pH=7 la metionina se transforma en un 100% en metionina sulfóxido. A medida que aumenta el pH de reacción, el porcentaje disminuye, así a pH=9 se transforma un 78% y a pH=10 y 11 sólo se genera un 61% de metionina sulfóxido.

---

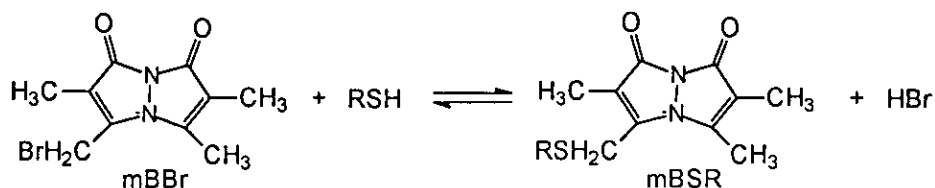
\* La columna que se utilizó para la determinación de los productos de transferencia desde la (N-Cl)-taurina era nueva, de ahí esas variaciones en los tiempos de retención.

### 10.3. Medida de fluorescencia de derivados de monobromobimano.<sup>11-13</sup>

El monobromobimano (mBBr) es un compuesto especialmente útil para el análisis de tioles de bajo peso molecular. Este producto por si mismo es poco fluorescente pero reacciona selectivamente con tioles para dar lugar a tioéteres (mBSR) estables y de mayor fluorescencia, los cuales pueden ser fácilmente detectados a niveles de picomoles.

Las disoluciones estándar del tiol se preparan a concentraciones altas y a bajo pH para minimizar las pérdidas debidas a oxidación. La derivatización se realizó a concentración elevada para maximizar la reacción con mBBr y minimizar reacciones laterales. Se trabajó en exceso de mBBr para asegurar una reacción rápida y completa con el tiol. Las disoluciones de mBBr se prepararon utilizando acetonitrilo como disolvente y se almacenan en la oscuridad y en la nevera. Los derivados de bimano son fotosensibles, por lo que es necesario protegerlos de la luz durante su preparación y almacenaje.

La reacción de derivatización es la siguiente:



La determinación se realiza mediante medidas de fluorescencia, en este caso y se realizó a  $\lambda_{\text{exc}}=394\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{emi}}=480\text{nm}$ .

La reacción de derivatización se realiza a pH=8. La utilización de esta técnica sólo permite comprobar la desaparición del tiol de partida, pero no suministra información acerca del producto generado como consecuencia de la cloración.

Se comprobó la linealidad de la respuesta del detector con todos los tioles analizados, y se obtuvieron los correspondientes calibrados, que fueron usados para determinar el porcentaje de reacción del tiol estudiado.

A continuación se muestra el espectro de emisión para el derivado monobromobimano de GSH, a diferentes concentraciones.

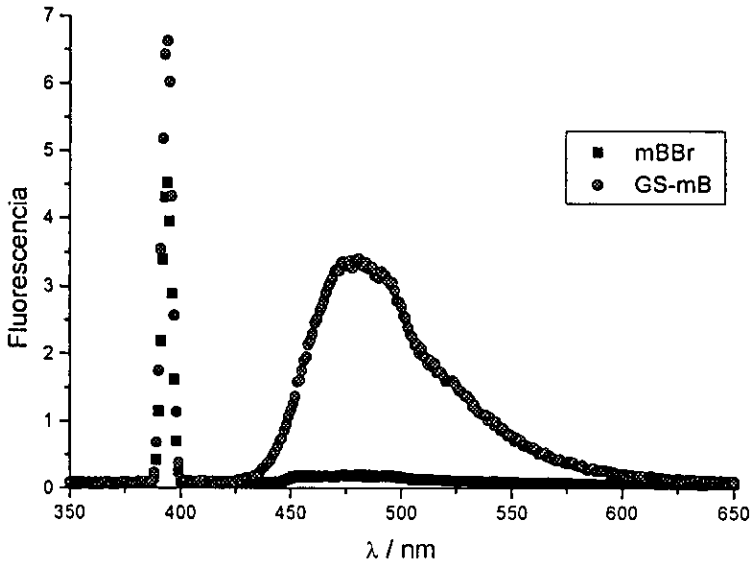


Figura 10.4 Espectro de fluorescencia de emisión ( $\lambda_{exc} = 394 \text{ nm}$ ) de mBBR y del mBBR derivado de GSH.

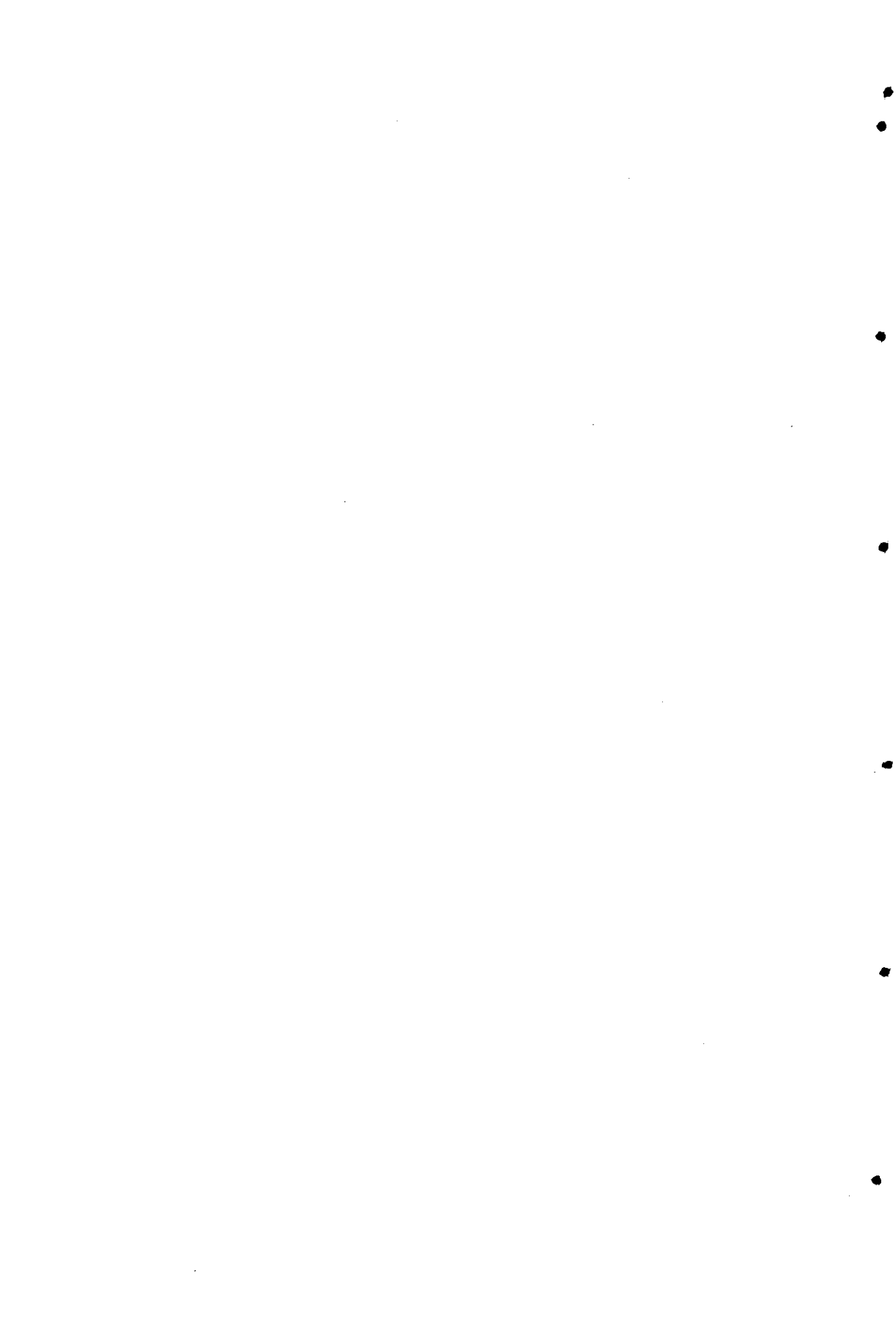
El porcentaje de desaparición de GSH y HOCl por cloración con HOCl calculado es :

GSH	
pH	% reacción
7	85%
8	78%
≈12	88%

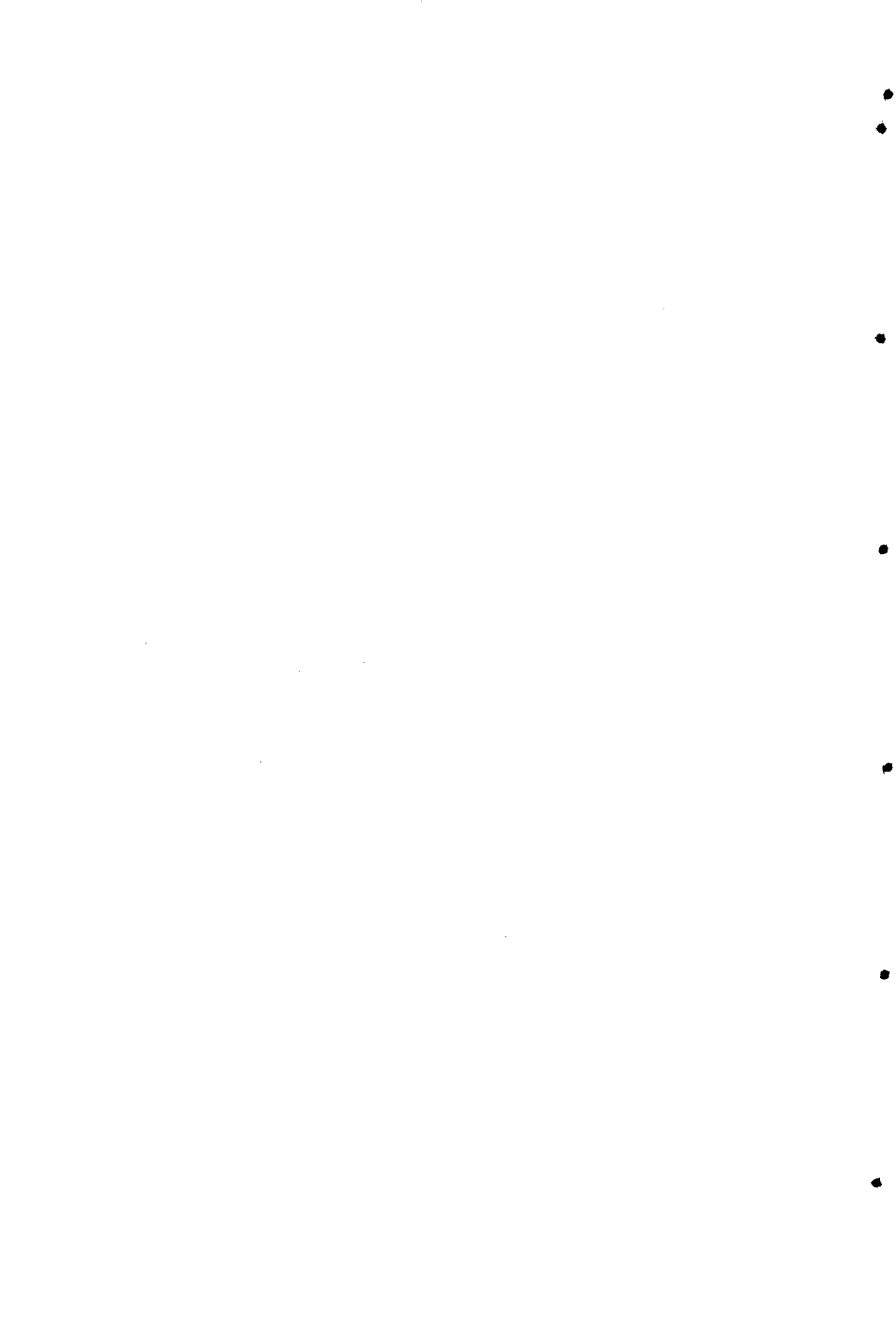
Para Cys el porcentaje de desaparición por HOCl es de un 99 % a pH=8

#### 10.4. Bibliografía.

- (1) Roth, M. *Anal. Chem.* **1971**, *43*, 880.
- (2) Turnell, D. C.; Cooper, J. D. H. *Clinical Chemistry* **1982**, *28*, 527-531.
- (3) Cooper, J. D. H.; Turnell, D. C. *Journal of Chromatography.* **1982**, *227*, 158-161.
- (4) Cooper, J. D. H.; Ogden, G.; McIntosh, J.; Turnell, D. C. *Analytical Biochemistry.* **1984**, *142*, 98-102.
- (5) Soto-Otero, R.; Méndez-Álvarez, E.; Galán-Valiente, J.; Aguilar-Veiga, E.; Sierra-Marcuño, G. *Biomedical Chromatography* **1994**, *8*, 114-118.
- (6) Manna, L.; Valvo, L.; Betto, P. *Journal of Chromatography A* **1999**, *846*, 59-64.
- (7) Havel, K.; Pritts, K.; Wielgos, T. *Journal of Chromatography A* **1999**, *853*, 215-223.
- (8) Lewis, S. D.; Misra, D. C.; Shafer, J. A. *Am. Ch. S. Biochemistry* **1980**, *19*, 6129-6137.
- (9) Melnyk, S.; Pogribna, M.; Pogribny, I.; Hine, R. J.; James, S. J. *J. Nutr. Biochem.* **1999**, *10*, 490-497.
- (10) Reed, D. J.; Babson, J. R.; Beatty, P. W.; Brodie, A. E.; Ellis, W. W.; Potter, D. W. *Analytical Biochemistry* **1980**, *106*, 55-62.
- (11) Fahey, R. C.; Newton, G. L. *Methods in Enzymology* **1987**, *143*, 85-96.
- (12) Hulbert, P. B.; Yabuku, S. I. *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, *35*, 384-386.
- (13) Cotgreave, I. A.; Moldéus, P. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1986**, *13*, 231-249.



## 11. Anexos halogenación





**ANEXO 1. MÉTODOS CINÉTICOS.**

**Tabla 1 Comprobación del orden de reacción para la descomposición del ácido (N-Cl) cisteico catalizado por  $H_2PO_4/HPO_4^{-2}$ .**

[MetSO]=[NaClO]=0.001 mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7, I=0.5 mol·dm<sup>-3</sup> (NaCl); T=298.0 K

t / min	Abs	t / min	Abs	t / min	Abs
0	0.2399	50	0.1056	100	0.0713
5	0.2116	55	0.0996	105	0.0696
10	0.1924	60	0.0947	110	0.0684
15	0.1759	65	0.0901	115	0.0673
20	0.1614	70	0.0863	120	0.0664
25	0.1490	75	0.0827	125	0.0654
30	0.1377	80	0.0797	130	0.0647
35	0.1280	85	0.0773	140	0.0633
40	0.1196	90	0.0749	145	0.0630
45	0.1120	95	0.0731	150	0.0626

**Tabla 2 Comprobación del orden de reacción para la reacción de cloración de metionina.**

[Met]>>>[HOCl], I=0.5M(NaCl), pH=12, λ=292nm, T=298.0 K.

[Met] / M	k <sub>obs</sub> / mol <sup>-1</sup> ·dm <sup>3</sup> ·s <sup>-1</sup>
0.0075	5.45
0.0070	5.25
0.0065	4.77
0.0060	4.25
0.0055	3.82
0.0050	3.6

**ANEXO 2. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE Cys, Cys<sup>+</sup>Cys Y Cya.**

**Tabla 1 Cys,  $\lambda=215$  nm, pH=9**

$[\text{Cys}] \cdot 10^4 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
2	0.1493
4	0.1790
6	0.2027
8	0.2346
10	0.2515
12	0.2718
14	0.2942

**Tabla 2 Cys,  $\lambda=215$ nm, pH=7**

$[\text{Cys}] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1.50	0.4345
1.75	0.4725
2.00	0.5556
2.25	0.6215
2.50	0.6689

**Tabla 3 Cys,  $\lambda=244$  nm, pH=9**

$[\text{Cys}] \cdot 10^4 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1.0	0.1756
1.5	0.2672
2.0	0.3601
2.5	0.4497
3.0	0.5867
3.5	0.6114
4.0	0.7121
4.5	0.8396

Tabla 4 Cys,  $\lambda=244$  nm, pH=7

$[\text{Cys}] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1.0	0.0657
1.5	0.104
2.0	0.1158
2.5	0.1581
3.0	0.1716

Tabla 5 Cys<sup>2</sup>,  $\lambda=215$  nm, pH=9.5

$[\text{Cys}^2] \cdot 10^4 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
2	0.2625
3	0.4143
4	0.5737
5	0.7433
6	0.8569
7	1.0141
8	1.1596
9	1.3098
10	1.4746

Tabla 6 Cys<sup>2</sup>,  $\lambda=244$  nm, pH=9.5

$[\text{Cys}^2] \cdot 10^4 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1	0.0293
5	0.1307
8	0.2109
9	0.2473
12	0.3481
14	0.3941
16	0.4538
18	0.5141
20	0.5842

Tabla 7 Cya,  $\lambda=215$  nm, pH=7.0

$[\text{Cya}] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1.5	0.0877
2.0	0.1065
2.5	0.1336
3.0	0.1429
3.5	0.1755
4.0	0.1991

Tabla 8 Cya,  $\lambda=215$  nm, pH=9.0

$[\text{Cya}] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	Abs
1.00	0.0497
1.25	0.0548
2.25	0.1071
3.00	0.1355
3.50	0.1584
4.00	0.1912

ANEXO 3. DESCOMPOSICIÓN DE SULFÓXIDO (*N*-Cl)-METIONINA.

Tabla 1 Influencia de la  $[H^+]$  en la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO.

$[MetSO]=[HOCl]=0.001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}(\text{NaCl})$ ,  $\lambda=255 \text{ nm}$ ,  
 $T=298.0 \text{ K}$ .

pH	$k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$
12.00	0.00106
12.70	0.01612
12.60	0.00393
12.50	0.00198
12.30	0.00147
10.51	6.926E-4
9.90	6.367E-4
8.78	5.946E-4
8.25	4.212E-4
7.02	3.646E-4
5.85	4.01E-4

Tabla 2 Influencia de la  $[OH^-]$  en la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO.

$[MetSO]=[HOCl]=5\cdot 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} (\text{NaClO}_4)$ ,  $\lambda=255 \text{ nm}$ ,  
 $T=298.0 \text{ K}$

$[OH^-] / \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}}\cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
0.030	16±2
0.020	13±2
0.010	12±2
0.009	12.2±0.1
0.008	12.3±0.1
0.007	11.9±0.1
0.006	11.6±0.1

**Tabla 3** Influencia de la  $[\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-]$  en la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO.

$[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  
 $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$[\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
11.10	0.005	8.4±0.3
11.30	0.006	8.6±0.2
11.45	0.007	9.0±0.3
11.52	0.008	9.0±0.3
11.60	0.009	9.1±0.3
11.63	0.010	9.4±0.2
11.78	0.015	10.0±0.3
11.85	0.020	10.4±0.2

**Tabla 4** Influencia de la  $[(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-]$  en la descomposición de (*N*-Cl)-MetSO.

$[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  
 $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$[(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-] / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
9.30	0.006	5.63±0.03
9.30	0.007	5.26±0.05
9.20	0.015	6.2±0.1
9.20	0.020	6.33±0.2
9.30	0.025	6.26±0.2
9.30	0.030	7.0±0.1
9.30	0.035	6.9±0.2
9.30	0.040	7.6±0.2

**Tabla 5** Influencia de la concentración de disolución reguladora  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  en la descomposición de (N-Cl)-MetSO.

$[\text{MetSO}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  
 $T = 298.0 \text{ K}$

pH	[fosfato] / $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
7.02	0.005	3.33
7.00	0.015	3.51
7.01	0.0175	3.63

## ANEXO 4. DESCOMPOSICIÓN DE LA SULFONA DE (N-Cl)-METIONINA.

Tabla 1 Influencia de la  $[\text{OH}^-]$  en la descomposición de (N-Cl)-MetSO<sub>2</sub>.

$[\text{MetSO}_2]=[\text{HOCl}]=2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (NaClO<sub>4</sub>),  $\lambda=215 \text{ nm}$ ,  
 T=298.0 K

$[\text{OH}^-] / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
0.0030	14.3
0.0040	15.2
0.0060	17.0
0.0080	19.0
0.0090	19.9
0.0100	20.5

Tabla 2 Influencia de la  $[\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-]$  en la descomposición de (N-Cl)-MetSO<sub>2</sub>.

$[\text{MetSO}_2]=[\text{HOCl}]=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (KCl),  $\lambda=255 \text{ nm}$ ,  
 T=298.0 K

pH	$[\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O}^-] / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
12.00	0.0010	7.0
12.00	0.0020	7.4
12.05	0.0056	9.7
12.10	0.0070	11.6
12.10	0.0084	11.9



**Tabla 3** Influencia de la  $[(CF_3)_2CHO]$  en la descomposición de  $(N-Cl)-MetSO_2$ .

$[MetSO_2]=[HOCl]=5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>,  $I=0.5$  mol·dm<sup>-3</sup> (KCl),  $\lambda=255$  nm,  $T=298.0$  K

pH	$[(CF_3)_2CHO] / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
9.80	0.0067	6.10
10.01	0.0118	6.30
10.13	0.0169	6.50
10.15	0.0253	6.90
10.16	0.0059	6.12

**Tabla 4** Influencia de la concentración de disolución reguladora  $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$  en la descomposición de  $(N-Cl)-MetSO_2$ .

$[MetSO_2]=[HOCl]=5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>,  $I=0.5$  mol·dm<sup>-3</sup> (KCl),  $\lambda=255$  nm,  $T=298.0$  K

pH	[fosfato] / mol·dm <sup>-3</sup>	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
6.91	0.0037	8.66
7.01	0.0151	9.02
7.04	0.0233	9.3

## ANEXO 5. DESCOMPOSICIÓN DEL ÁCIDO (N-Cl)-CISTÉICO.

Tabla 1 Influencia de la concentración de los iones  $\text{HCO}_3^-$  y  $\text{CO}_3^{2-}$  en la descomposición de (N-Cl)-Cya.

$[\text{Cya}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$[\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
9.31	5	2.84
9.55	10	3.47
9.63	15	3.46
9.67	20	3.96

Tabla 2 Influencia de la concentración de los iones  $(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-$  en la descomposición de (N-Cl)-Cya.

$[\text{Cya}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{KCl}$ ),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$[(\text{CF}_3)_2\text{CHO}^-] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
8.6	5	2.41
8.9	10	5.49
9.0	15	7.45
9.0	20	8.58
9.1	25	11.6

Tabla 3 Influencia de la concentración de iones  $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$  en la descomposición de (N-Cl)-Cya.

$[\text{Cya}] = [\text{HOCl}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  $T = 298.0 \text{ K}$

pH	[fosfato] / $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} \cdot 10^4 / \text{s}^{-1}$
6.81	0.0075	5.01
6.82	0.0125	5.03
6.82	0.0175	5.05
6.85	0.0225	5.07

**ANEXO 6. TRANSFERENCIA DE Cl/ DESDE HOCl a Cys, Cys<sup>+</sup>Cys, GSH, GSSG y Met.**

**Tabla 1 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl/ hasta Cys.**

$$[Cys]=[HOCl]=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, \lambda=292 \text{ nm}, T=298.0 \text{ K}$$

pH	$k_{obs} \cdot 10^{-5} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
10.30	10±1
11.20	4.2±0.4
12.00	2.4±0.2
12.69	2.7±0.4
13.30	1.3±0.1
13.60	1.8±0.3
13.70	1.9±0.3

**Tabla 2 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl/ hasta Cys<sup>+</sup>Cys.**

$$[Cys^+Cys]=[HOCl]=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}, \lambda=292 \text{ nm}, T=298.0 \text{ K}$$

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
11.39	1820±47
11.39	1708±58
12.10	379±2
12.20	165±1
12.30	81.7±0.3
12.30	237±0.2

**Tabla 3** Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl hasta GSH.

$[GSH]=[HOCl]=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

pH	$k_{obs} \cdot 10^{-5} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	pH	$k_{obs} \cdot 10^{-5} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
10.80	8.3±1	11.90	3.94±0.4
11.00	7.18±1	12.00	3.5±0.5
11.00	7.6±1	12.20	3.4±0.3
11.20	4.54±1	12.30	3.3±0.5
11.30	4.44±1	12.40	3.3±0.3
11.50	4.0±0.5	12.40	3.2±0.2
11.67	4.1±0.7	12.50	3.3±0.3
11.70	3.5±0.5		

**Tabla 4** Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia hasta GSSG.

$[GSSG]=[HOCl]=2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
9.10	335900±33714
9.50	183700±17776
9.90	85655±3943
10.40	32957±1564
10.70	20467±584
11.30	2228±96
11.63	1428±51
11.90	1200±33
11.95	1236±76
12.05	1432±112

**Tabla 5 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia hasta Met.**

$[Met]=[HOCl]=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda=292 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
11.34	109000±3000
11.39	105000±4000
11.46	81000±3000
11.47	79000±1000
11.60	62000±2000
11.69	44000±1000
12.00	30000±1000
13.03	2780±40
13.69	60±10

**Tabla 6 Calibrado típico de un electrodo selectivo de ion cloruro.**

$\text{NaCl}$ ;  $I=0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaNO}_3$ );  $T=298.0 \text{ K}$

$[\text{Cl}^-] \cdot 10^3 / \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	mV
0.20	231
0.42	212
0.52	207.7
0.62	203.6
0.72	200.1
0.83	197
1.05	191.1
2.1	172.9
3.1	162.8
4.2	155.4
5.2	149.9
8.4	138.4
10.5	133.1

Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación del tipo

$$mV = A + B \cdot \log [Cl^-]$$

obteniéndose los siguientes valores:

$$A = (19.4 \pm 0.8); B = (-57.4 \pm 0.3); R = -0.99987$$

**Tabla 7 Variación de la concentración de Cl<sup>-</sup> en la reacción de halogenación de Cys por HOCl.**

$$[Cys]=[HOCl]=1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; I=0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaNO}_3); T=298.0 \text{ K}$$

t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^4$ /mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^4$ /mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^4$ /mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^4$ /mol $\cdot \text{dm}^{-3}$
0.0	0.79	8.5	7.0	16.5	9.1	24.5	8.8
0.5	1.4	9.0	7.4	17.0	8.8	25.0	9.1
1.0	1.6	9.5	7.2	17.5	8.6	26.0	9.3
1.5	1.8	10.0	7.4	18.0	9.3	27.0	9.3
2.0	2.7	10.5	7.9	18.5	9.3	28.0	9.1
3.0	2.5	11.0	7.9	19.0	8.8	30.0	9.1
3.5	4.2	11.5	8.4	19.5	9.1	31.0	9.1
4.0	4.9	12.0	7.9	20.0	9.3	32.0	9.3
4.5	5.3	12.5	7.9	20.5	9.8	33.0	8.4
5.0	5.3	13.5	8.1	21.0	9.3	34.0	8.6
5.5	6.5	14.0	8.1	21.5	9.6	35.0	8.6
6.0	6.3	14.5	8.6	22.0	9.3	36.0	8.6
6.5	7.0	15.0	8.6	22.5	9.6	37.0	8.4
7.5	7.0	15.5	9.1	23.0	9.1	38.0	8.8
8.0	6.7	16.0	8.8	23.5	9.1	39.0	8.4

**Tabla 8 Variación de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en la reacción de halogenación de Met por HOCl**

$[\text{Met}] = [\text{HOCl}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $I = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NaNO}_3)$ ;  $T = 298.0 \text{ K}$

$t/\text{min}$	$[\text{Cl}^-] \cdot 10^4$ $/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$t/\text{min}$	$[\text{Cl}^-] \cdot 10^4$ $/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$t/\text{min}$	$[\text{Cl}^-] \cdot 10^4$ $/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$t/\text{min}$	$[\text{Cl}^-] \cdot 10^4$ $/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
1	0.44	11	6.7	21	8.7	31	9
2	1.3	12	7	22	8.7	32	9
3	1.8	13	7.3	23	8.7	33	8.9
4	2.5	14	7.5	24	8.7	34	8.8
5	3.2	15	7.6	25	8.7	35	8.7
6	3.9	16	7.9	26	8.8	36	8.7
7	4.4	17	8	27	8.9	37	8.6
8	4.9	18	8.2	28	9	38	8.5
9	5.3	19	8.4	29	9	39	8.5
10	5.8	20	8.5	30	9	40	8.7

Tabla 9 Variación de la concentración de Cl<sup>-</sup> en la reacción de halogenación de Cys<sup>^</sup>Cys<sup>^</sup> por HOCl.

$$[\text{Cys}^{\wedge}\text{Cys}] = [\text{HOCl}] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}; I(\text{NaNO}_3) = 0.1; T = 298.0 \text{ K}$$

t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^3$ mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^3$ mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^3$ mol $\cdot \text{dm}^{-3}$	t/min	[Cl <sup>-</sup> ] $\cdot 10^3$ mol $\cdot \text{dm}^{-3}$
0.5	0.83	7.5	7.64	14.5	8.53	21.0	8.81
1.0	1.61	8.0	7.72	15.0	8.72	21.5	8.91
2.0	3.35	8.5	7.81	15.5	8.62	22.0	8.86
2.5	4.17	9.0	7.99	16.0	8.72	22.5	8.91
3.0	4.67	9.5	7.99	16.5	8.67	23.0	8.91
3.5	5.15	10.0	8.12	17.0	8.81	24.0	8.86
4.0	5.7	10.5	8.25	17.5	8.81	25.0	8.81
4.5	6.06	1.01	8.21	18.0	8.76	26.0	8.76
5.0	6.54	11.5	8.44	18.5	8.81	27.0	8.67
5.5	6.74	12.0	8.39	19.0	8.86	28.0	8.67
6.0	6.7	12.5	8.44	19.5	8.91	29.0	8.53
6.5	7.22	13.5	8.48	20.0	8.86	30.0	8.58
7.0	7.34	14.0	8.53	20.5	8.86	31.0	8.53



**ANEXO 7. TRANSFERENCIA DE Cl DESDE (N-Cl)-TAURINA.**

**Tabla 1 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl hasta Cys.**

[Cys]=[N-Cl]-Tau]=  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I(\text{NaClO}_4)=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda=252 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
11.50	324±23	7.00	2335±81
11.00	346±17	6.85	2157±32
10.50	399±9	6.80	2007±24
10.00	472±16	6.65	1901±38
9.40	566±10	6.50	1611±25
9.00	639±9	6.40	1863±102
8.40	1358±47	6.30	1731±69
8.35	1053±45	6.10	1108±49
8.00	1717±53	5.80	1135±4
7.80	2078±30	5.60	223±29
7.70	2080±134	4.85	109±4
7.40	2424±23	4.33	111±4
7.30	2130±24	3.67	88±6
7.05	2239±49		

**Tabla 2 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl hasta Cys en presencia de exceso de Tau.**

[Cys]=[N-Cl]-Tau]=  $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I(\text{NaClO}_4)=0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda=252 \text{ nm}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
4.25	279±8	7.03	1164±22
4.87	78±1	7.32	1640±18
6.28	590±34	8.03	640±13
6.37	920±45	10.47	299±3
6.84	1570±159	12.2	252±12

**Tabla 3** Dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl hasta GSH.

$[\text{GSH}] = [(N\text{-Cl})\text{-Tau}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I(\text{NaCl}) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda = 252 \text{ nm}$ ,  
 $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$k_{\text{obs}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
5.80	62±1	9.40	1121±15
6.00	72±2	9.80	751±10
6.10	75±2	10.00	631±3
6.50	68±3	10.52	329±5
7.00	282±17	11.70	209±1
7.40	667±12	11.90	200±1
7.87	1357±8	12.20	220±2
8.30	1572±27	12.30	210±2
9.10	1361±34		

**Tabla 4** Dependencia de la  $k_{\text{obs}}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia hasta Met.

$[\text{Met}] = [(N\text{-Cl})\text{-Tau}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $I(\text{NaCl}) = 0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $\lambda = 252 \text{ nm}$ ,  
 $T = 298.0 \text{ K}$

pH	$k_{\text{obs}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	pH	$k_{\text{obs}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
5.60	990±12	8.18	8.1±0.1
5.70	964±47	8.45	4.7±0.2
5.85	723±29	8.85	2.69±0.01
6.20	410±25	9.20	1.193±0.004
6.25	266±10	9.70	0.628±0.002
6.30	312±35	10.15	0.2500±0.0004
6.50	162±4	10.45	0.2350±0.0004
7.10	62±4	10.60	0.0800±0.0004
7.37	46.5±0.1	10.84	0.06600±0.0004
7.65	25.52		

**Tabla 5 Dependencia de la  $k_{obs}$  con el pH del medio para la reacción de transferencia de Cl hasta Met en presencia de exceso de Tau.**

[Met]=[(N-Cl)-Tau]=  $2.5 \cdot 10^{-4}$  mol·dm<sup>-3</sup>, I(NaClO<sub>4</sub>)=0.5 mol·dm<sup>-3</sup>,  $\lambda$ =252 nm, T=298.0 K

pH	$k_{obs} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
6.13	682±30
6.77	169±7
7.2	91±1
7.59	40±1
7.8	22.4±0.2
8	11.4±1
8.65	3.2±0.2

ANEXO 8. ANÁLISIS DE PRODUCTOS.

1. Calibrados de Cys y Cys<sup>+</sup>Cys a distintos valores de pH.

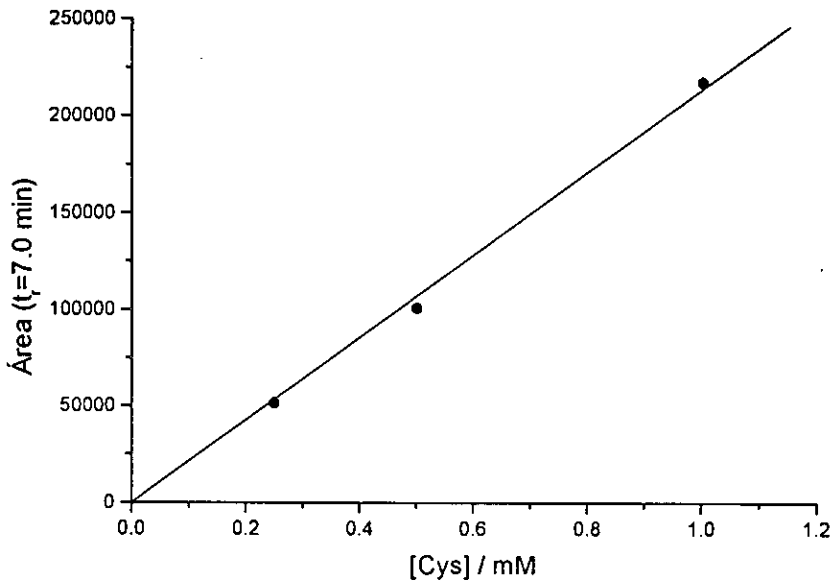


Figura 1 Cys a pH=5

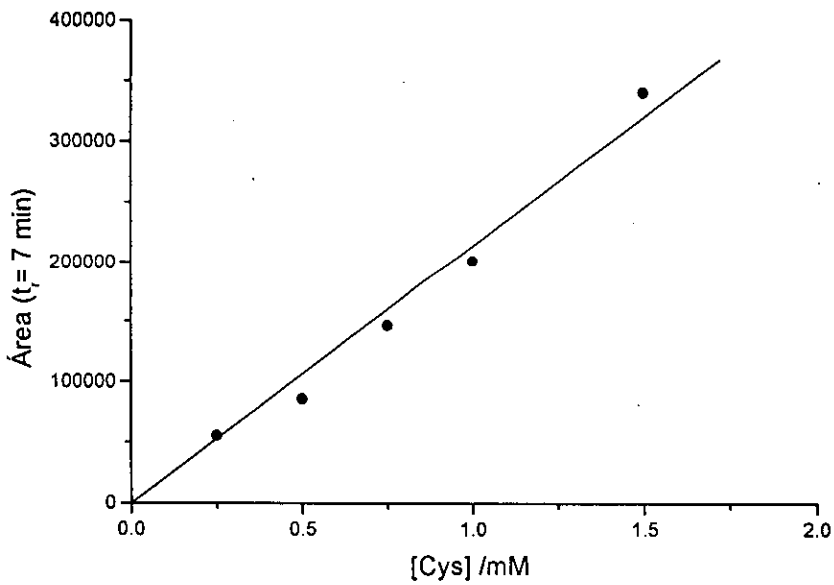


Figura 2 Cys a pH=7

Parte I - Halogenación

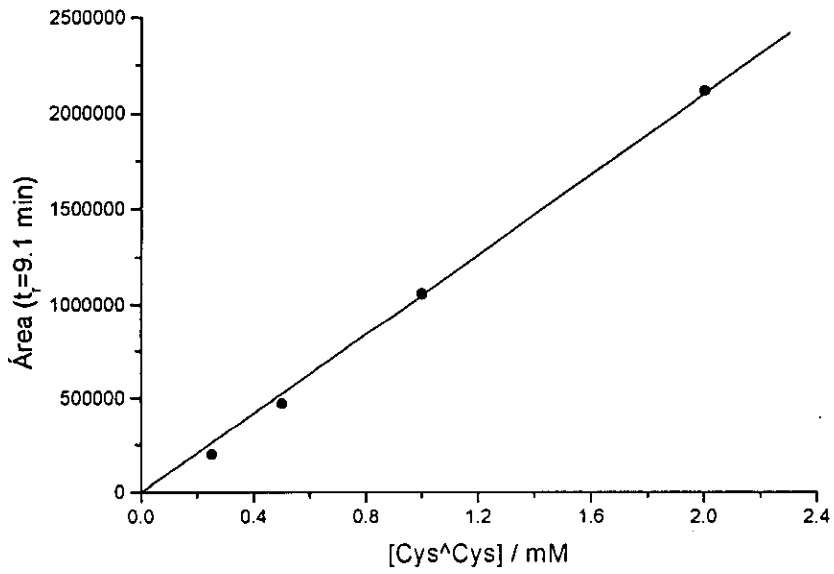


Figura 3 Cys^Cys a pH=7

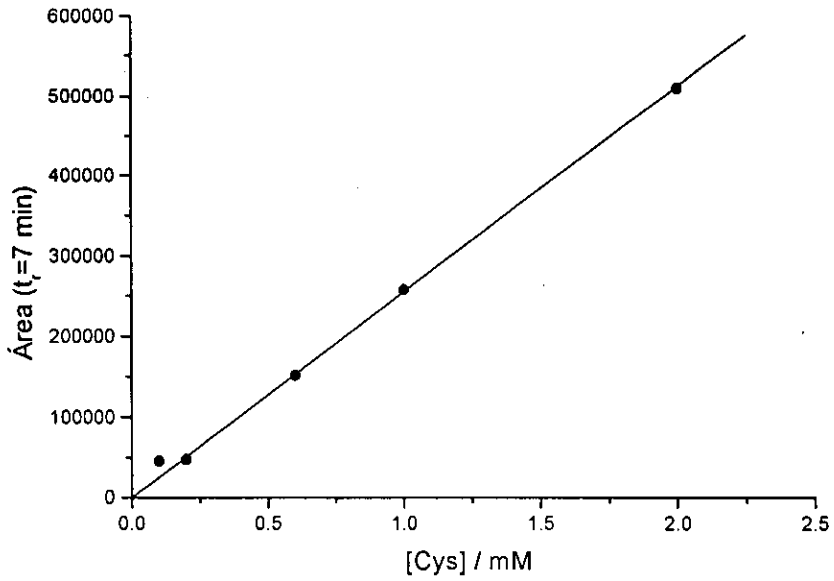


Figura 4 Cys a pH=10

Anexos

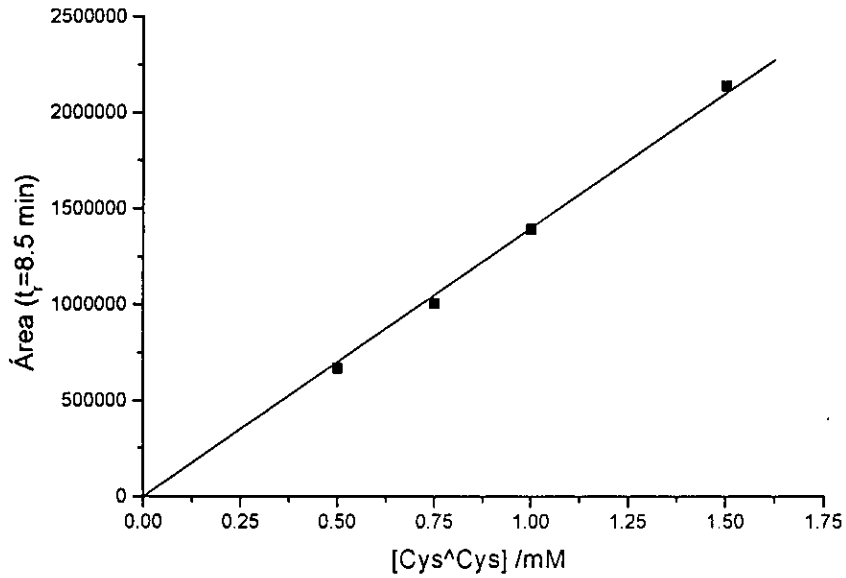


Figura 5 Cys^Cys a pH=10

Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación del tipo  $y=A \cdot X$ , obteniéndose los siguientes valores:

Figura 1:  $A=(2.14 \pm 0.04) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9992$

Figura 2:  $A=(2.13 \pm 0.07) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9926$

Figura 3  $A=(2.67 \pm 0.03) \cdot 10^6$ ;  $R=0.9986$

Figura 4  $A=(2.55 \pm 0.04) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9989$

Figura 5:  $A=(1.40 \pm 0.02) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9998$

2. Calibrados de GSH y GSSG a distintos valores de pH.

Parte I - Halogenación

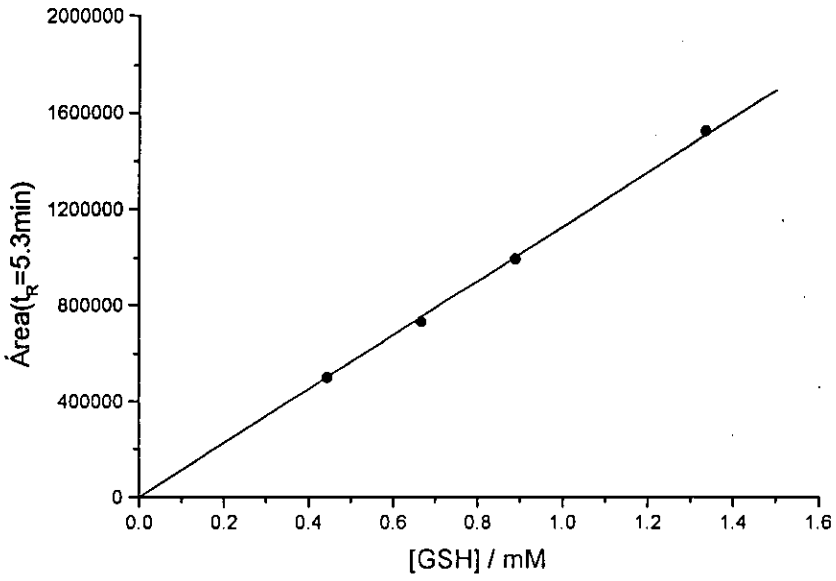


Figura 1 GSH a pH=7

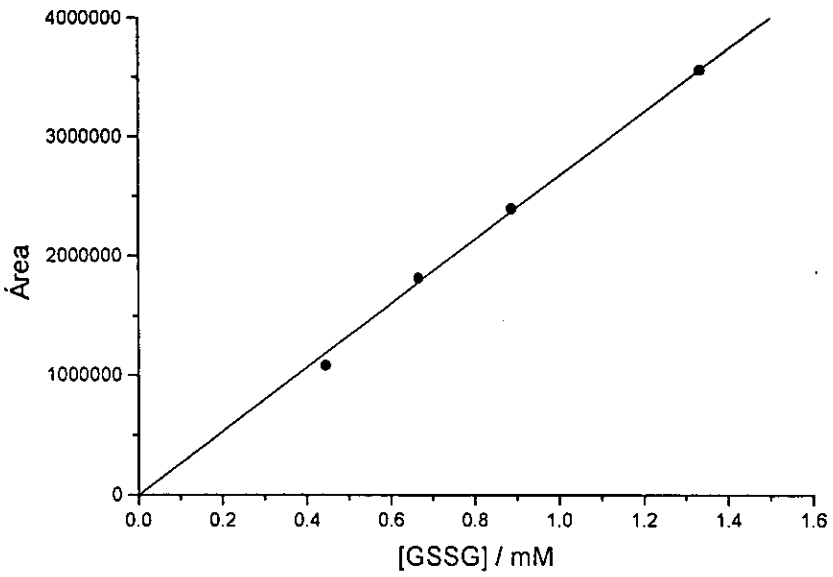


Figura 2 GSSG a pH=7

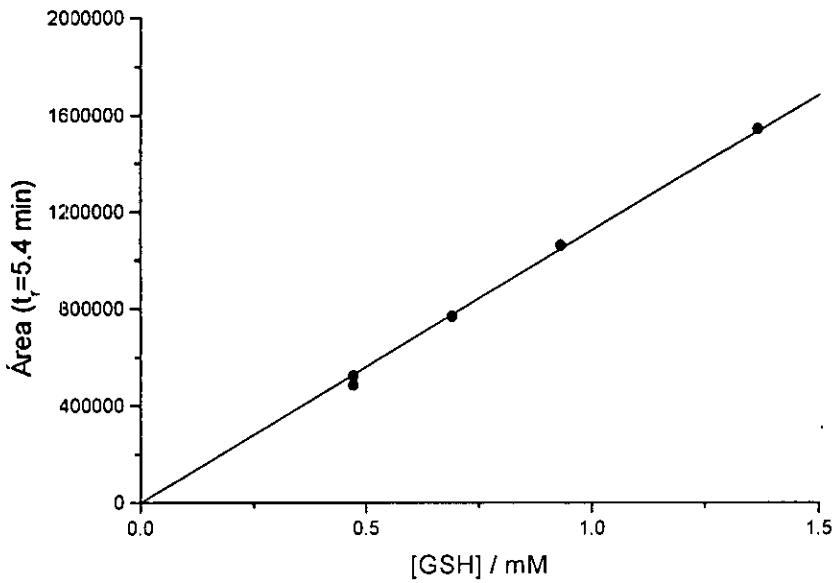


Figura 3 GSH a pH=10

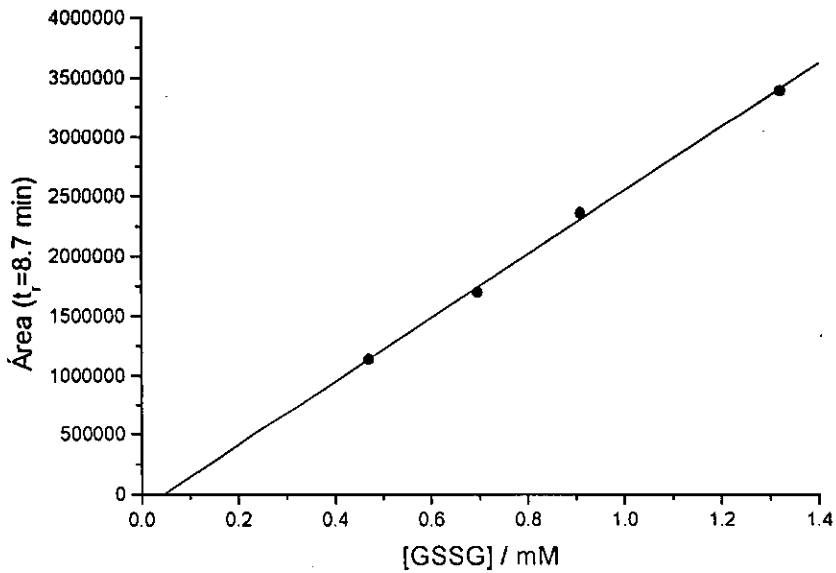


Figura 4 GSSG a pH=10

Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación del tipo  $y=A \cdot X$ , obteniéndose los siguientes valores:



Figura 1:  $A=(1.12\pm 0.01)\cdot 10^6$ ;  $R=0.9997$

Figura 2  $A=(2.67\pm 0.03)\cdot 10^6$ ;  $R=0.9986$

Figura 3  $A=(1.12\pm 0.01)\cdot 10^6$ ;  $R=0.9994$

Figura 4  $A=(2.69\pm 0.03)\cdot 10^6$ ;  $R=0.9991$

### 3. Calibrados de Met y MetSO a distintos valores de pH.

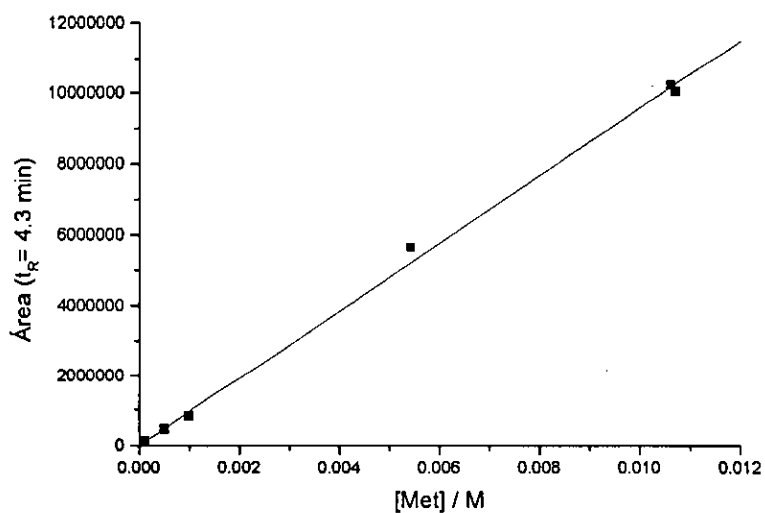


Figura 1 Met a pH=7

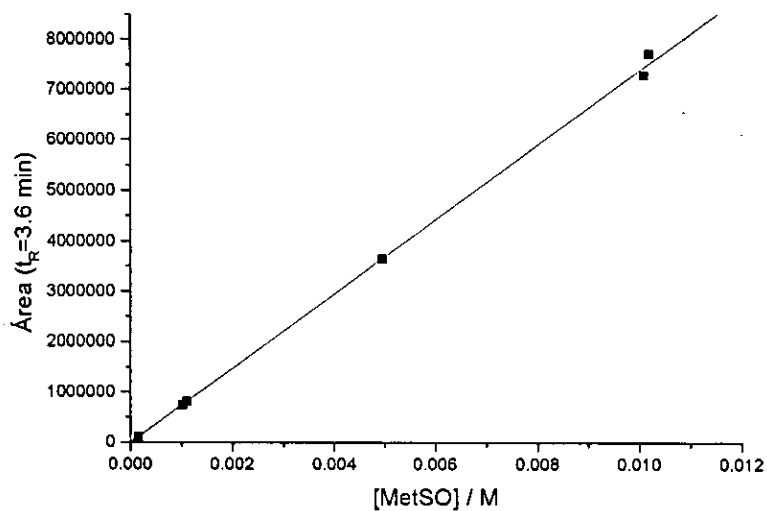


Figura 2 MetSO a pH=7

*Anexos*

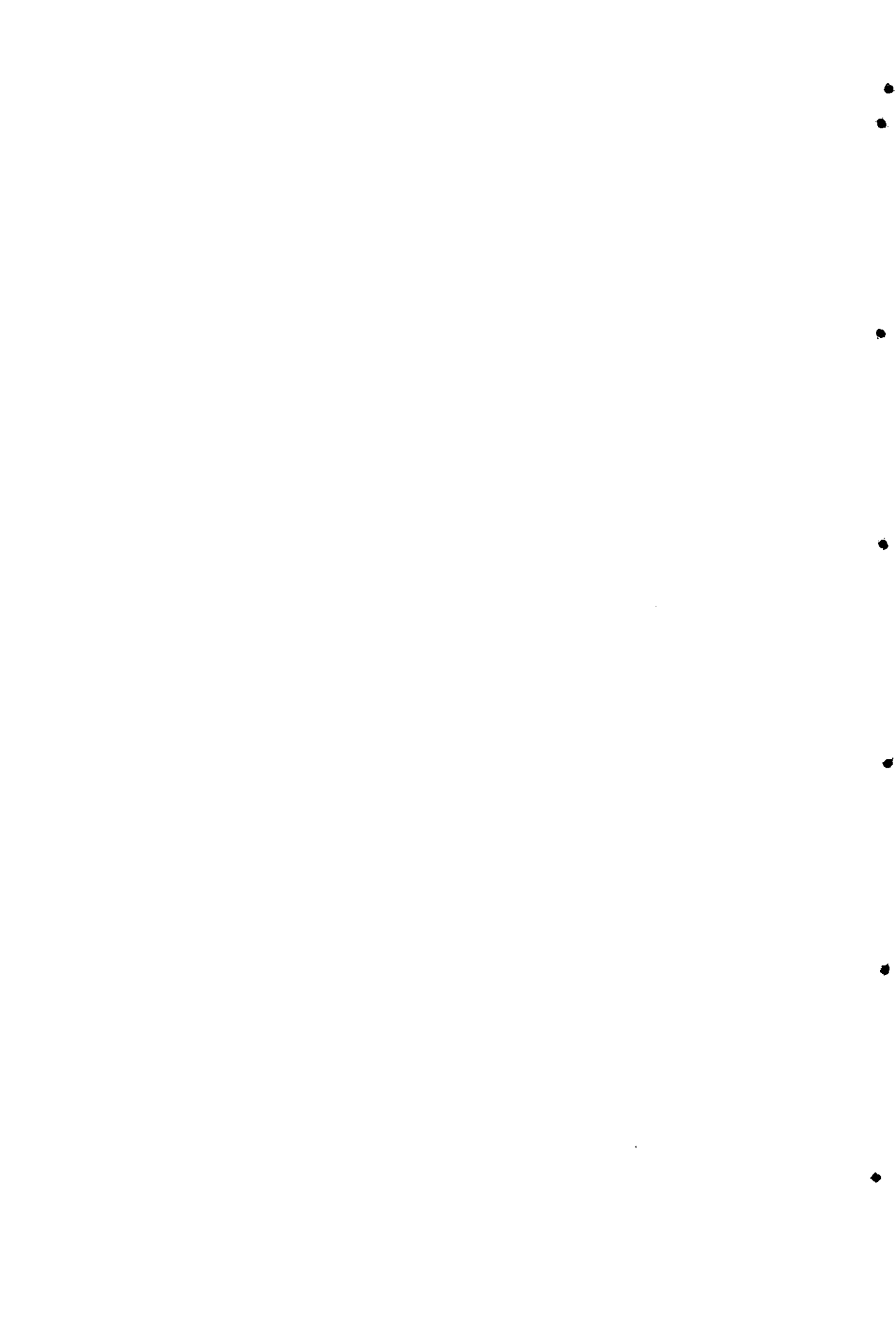
Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación del tipo  $y=A \cdot X$ , obteniéndose los siguientes valores:

**Figura 1:**  $A=(5.84 \pm 0.01) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9955$

**Figura 2:**  $A=(5.42 \pm 0.02) \cdot 10^5$ ;  $R=0.9997$

***MECANISMOS DE OXIDACIÓN Y FOTOOXIDACIÓN DE  
COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOQUÍMICA Y  
MEDIOAMBIENTAL:***

***2. FOTODEGRADACIÓN DE BIOCIDAS TIPO S-TRIAZINA***



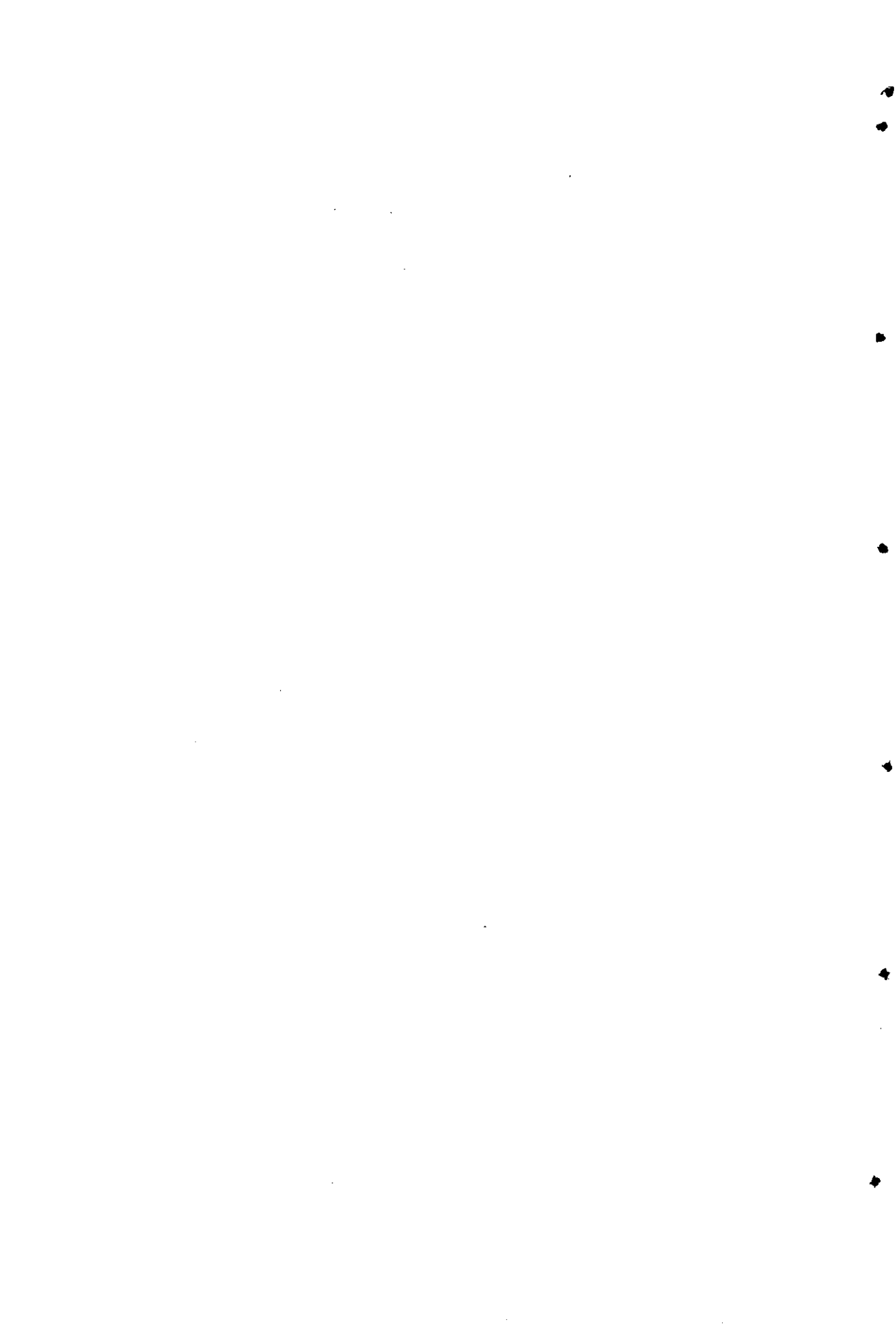
## *Índice*

<b>12. Química de la radiación</b>	<b>225</b>
12.1. Introducción.....	227
12.2. Tipos de radiación ionizante.....	229
12.3. Interacción de la radiación con la materia.....	231
12.4. Rendimiento, dosimetría y unidades.....	236
12.5. Técnicas de irradiación.....	240
12.6. Comparación de los efectos de la radiación UV frente a la radiación ionizante.....	243
12.7. Bibliografía.....	244
<b>13. Fotoquímica.</b>	<b>245</b>
13.1. Introducción.....	247
13.2. Transiciones electrónicas permitidas.....	248
13.3. Leyes de la fotoquímica.....	251
13.4. Diferencia entre estado electrónico excitado y fundamental.....	252
13.5. Vías de relajación de moléculas en estado electrónico excitado....	253
13.6. Fenómenos multifotónicos.....	256
13.7. Bibliografía.	259
<b>14. Fotodegradación de herbicidas tipo s-triazina: antecedentes.</b>	<b>261</b>
14.1. Introducción.....	263
14.2. Clasificación de los pesticidas.....	264
14.3. Herbicidas tipo s-triazina.....	266
14.4. Transformación de los pesticidas en el medioambiente.....	269
14.4.1. Degradación química.....	269
14.4.2. Degradación biológica.....	271
14.4.3. Degradación fisicoquímica.....	272
14.5. Mecanismos de fotodegradación de pesticidas.....	272
14.5.1. Fotodegradación directa.....	275
14.5.2. Degradación mediante fotosensibilizadores.....	283
14.5.3. Degradación fotocatalítica.....	284
14.5.4. Degradación por reacción con el radical hidroxilo.....	286
14.6. Bibliografía.....	291

## Índice

<b>15. Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: experimental.</b>	<b>299</b>
15.1. Radiólisis de pulso.....	301
15.2. Fotólisis de destello.....	310
15.3. Fotólisis en estado estacionario a 254 nm.....	313
15.4. Bibliografía.....	315
<b>16. Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: resultados.</b>	<b>317</b>
16.1. Radiólisis de pulso.....	319
16.1.1. Reacción de mono-reducción electrónica. Reacción con el electrón.....	319
16.1.2. Reacción de mono-oxidación electrónica. Reacción con el radical $SO_4^{\bullet-}$ .....	324
16.1.3. Reacción de adición del radical $OH^{\bullet}$ .....	329
16.2. Fotólisis de destello.....	335
16.2.1. Reacción con el radical $OH^{\bullet}$ .....	335
16.2.2. Determinación del rendimiento cuántico de fotoionización a 193nm.....	335
16.3. Fotólisis en estado estacionario a 254 nm.....	339
16.4. Bibliografía.....	346
<b>17. Análisis de productos: fotodegradación.</b>	<b>347</b>
<b>18. Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: discusión.</b>	<b>355</b>
17.1. Reacción de mono-reducción monoelectrónica.....	357
17.2. Reacción de mono-oxidación electrónica.....	362
17.3. Fotólisis a 193 nm y en estado estacionario a 254 nm.....	369
17.4. Bibliografía.....	373
<b>19. Anexos fotodegradación.</b>	<b>375</b>
<b>20. Papers produced out of this thesis, so far.</b>	<b>399</b>

## 12. Química de la radiación





### 12.1. Introducción.

Por química de la radiación se entienden los procesos químicos inducidos por radiación ionizante. Esta radiación incluye, partículas  $\alpha$  y  $\beta$ , rayos X y  $\gamma$ , protones y neutrones. Las primeras observaciones fueron hechas a principio de este siglo y se interesaban principalmente por el efecto que las partículas  $\alpha$ , emitidas por el radio y el radon, tenían sobre los sustratos.

El desarrollo de sistemas de rayos X para aplicación en la industria y en la medicina en los años 30, dio lugar a nuevas fuentes de radiación que se ajustaban mejor a las necesidades de la investigación en el campo de la química que las fuentes de radio que se usaban previamente. Junto con el creciente interés sobre los efectos que la radiación de alta energía ejercía sobre los sistemas biológicos, se intensificaron los trabajos realizados en el campo de la química de la radiación del agua y disoluciones acuosas.

Estos trabajos mostraron que mientras en sistemas gaseosos la radiación de alta energía y la radiación ultravioleta producían efectos similares, en disolución había una clara diferencia entre química de la radiación y fotoquímica.

Las diferencias surgen debido a que la radiación ultravioleta y visible son absorbidas ante todo por las moléculas de soluto, el cual es elegido teniendo en cuenta sus características de absorción, mientras que el disolvente es esencialmente transparente a la longitud de onda usada.

La radiación de alta energía, sin embargo, deposita energía en cualquiera de las moléculas que encuentra en su camino, ya sean moléculas de soluto o de disolvente. Como normalmente hay más moléculas de disolvente que de soluto, a menudo el comportamiento del sistema a fines prácticos es como si sólo el disolvente interaccionase con la radiación.

El interés por los efectos químicos y físicos de la radiación se desarrolló rápidamente con la creación de programas de energía nuclear a gran escala en los años 40, a lo que se sumó la mayor disponibilidad de más y mejores fuentes de radiación, tanto aceleradores como radioisótopos.

En el área de la química el interés inicial se encontraba en la identificación y medida de los productos de un amplio rango de diferentes sustancias irradiadas con distintos tipos y energías de radiación y bajo diversas condiciones físicas. El agua y los sistemas acuosos fueron ampliamente

estudiados debido a su asociación con sistemas biológicos, al uso de agua como principal disolvente, y al empleo de agua como moderador en los reactores nucleares. En poco tiempo los radicales hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fueron identificados como agentes oxidantes, y los átomos de hidrógeno ( $\text{H}^\bullet$ ) como reductores en el agua irradiada, en vez de moléculas de agua "activadas" tal como se había propuesto anteriormente.

Durante los años 60 y 70 se examinaron en mayor detalle los procesos físicos de absorción de energía y se desarrollaron mecanismos de radiólisis más completos. Se trató de establecer patrones de reactividad y, en menor medida, las posibles aplicaciones de las reacciones inducidas por radiación en la industria.

Las constantes de velocidad para reacciones de radicales en disolución pudieron ser medidas, inicialmente mediante cinéticas competitivas y posteriormente mediante radiólisis de pulso. Esta última técnica, similar a la fotólisis de destello, supuso una de las mayores contribuciones a la química de la radiación, haciendo posible la determinación de las constantes de velocidad de muchas reacciones de radicales, iones y estados excitados.

Un paso importante fue el descubrimiento de un nuevo agente reductor, el electrón hidratado ( $\text{e}^-_{\text{ac}}$ ), en sistemas acuosos irradiados. El electrón hidratado es el principal agente reductor cuando se irradia agua o disoluciones acuosas en condiciones de pH neutras o básicas, mientras que el átomo de hidrógeno es el principal agente reductor en condiciones ácidas.

La figura 2.1 muestra una escala de tiempo aproximada de los eventos siguientes a la interacción de la radiación ionizante con la materia.

## Parte II - Fotodegradación

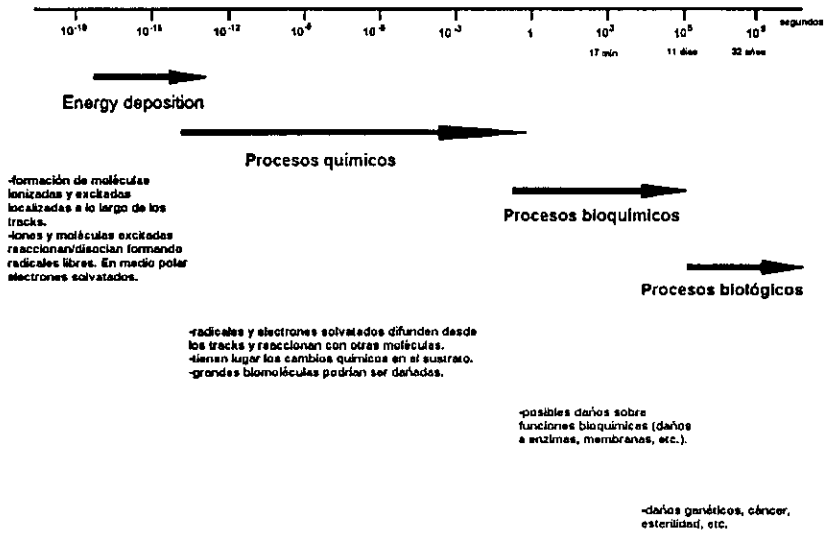


Figura 12.1. Eventos que tienen lugar tras la interacción de la radiación ionizante con la materia.<sup>1</sup> (figura tomada de la referencia)

### 12.2. Tipos de radiación ionizante.

Cuando la energía de una partícula o un fotón excede el potencial de ionización de una molécula, una colisión con la molécula podría dar lugar a su ionización. Los potenciales de ionización de las moléculas están, en general, dentro del intervalo 8-13 eV. La longitud de onda de fotones de esta energía está por debajo de 200 nm, el límite de la región ultravioleta. La radiación UV no es considerada como radiación ionizante, aunque en disolución, donde el potencial de ionización puede ser inferior a 3 eV y dependiendo de la polaridad del disolvente, pueden tener lugar procesos de ionización.

La radiación ionizante de alta energía usada en las reacciones radioquímicas incluye radiación de radioisótopos naturales y artificiales (radiación  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), rayos X, haces de neutrones, y haces de partículas cargadas, estas últimas abarcan tanto haces de electrones como de partículas cargadas positivamente.

Las fuentes de radiación de alta energía se pueden dividir en tres grupos: aquellas que emplean isótopos radiactivos naturales o artificiales, aquellas que emplean aceleradores de partículas, y los reactores nucleares. El primer grupo consiste en las fuentes clásicas de radiación, radio y radón y radioisótopos artificiales como cobalto-60, cesio-137, y estroncio-90/ytrio-90. El segundo grupo incluye generadores de rayos-X, aceleradores de electrones de varios

tipos y aceleradores como el acelerador de Van de Graaff y el ciclotrón usado para generar haces de iones positivos. Los reactores nucleares también han sido usados como fuentes de radiación, generalmente de haces de electrones. Las fuentes de radiación más utilizadas con fines comerciales son cobalto-60, rayos  $\gamma$  y aceleradores de electrones.

### 12.2.1. Radioisótopos.

Ciertos procesos de decaimiento radiactivo son utilizados como fuentes de radiación gamma para radiólisis. Dos radioisótopos artificiales cobalto-60 y cesio-137 son ampliamente empleados como fuentes de radiación gamma. El cobalto-60 se produce por irradiación del isótopo estable del cobalto ( $^{59}\text{Co}$ ) en un reactor nuclear.  $^{60}\text{Co}$  tiene una vida media de 5.27 años y emite radiación gamma de 1.2 MeV de energía. El  $^{137}\text{Cs}$  tiene un tiempo de vida media de 30.17 años y 0.66 MeV de energía.

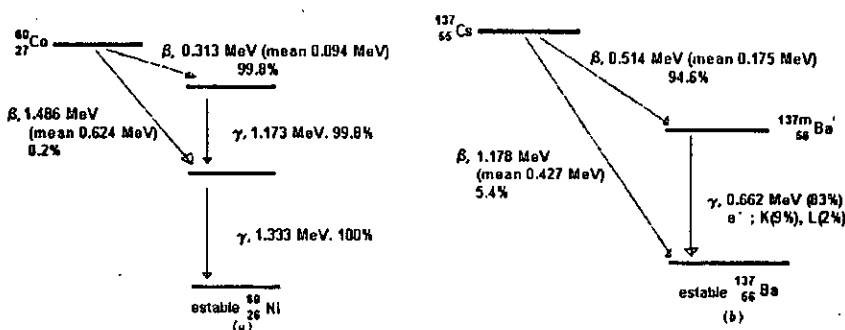


Figura 12.2. Decaimiento radiactivo de isótopos emitiendo radiación  $\gamma$ : (a)  $^{60}\text{Co}$ ; (b)  $^{137}\text{Cs}$ .<sup>1</sup> (figura tomada de la referencia)

Ambos radioisótopos artificiales son relativamente económicos; el cobalto-60 genera radiación con más poder penetrante y más energía, mientras que el cesio-137 tiene como ventaja su elevado tiempo de vida media, necesitando con menor frecuencia la sustitución de la fuente.

### 12.2.2. Aceleradores lineales de partículas.

Son usados para generar haces de electrones acelerados, iones positivos y rayos X *bremstrahlung* (radiación retardada). El amplio uso de los aceleradores de electrones es debido en gran parte a la disponibilidad de radiación de elevada energía con los haces de electrones, la extremada baja

probabilidad de inducir radiactividad en los productos irradiados y, a diferencia de la irradiación gamma, el hecho de que los haces de electrones pueden ser conectados y desconectados. La duración de los pulsos suele ser de unos pocos nano- o microsegundo de duración. Estos aceleradores son capaces de generar haces de electrones de varios cientos de MeV.

#### *12.2.3. Aceleradores de Van der Graaff.*

La mayoría de los aceleradores de electrones usados en radiólisis son aceleradores de Van der Graaff. Dependiendo del tipo de cátodo, pueden trabajar mediante emisión continua o pulsada. Suelen generar haces de 2-5 MeV. La duración de los pulsos va desde los 10 ns a los 5  $\mu$ s.

#### *12.2.4. Ferbetron.*

Este es un acelerador comercial de electrones, el cual es capaz de generar pulsos entre 1 y 2 MeV (360J en un pulso de 30 ns) pudiendo alcanzar energías inferiores como 600 keV (12J en un pulso de 3 ns).

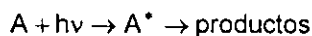
#### *12.2.5. Ciclotrones.*

Los ciclotrones se usan como fuentes de iones pesados. La energía de los deuterones y protones acelerados es generalmente sobre 20 MeV; y los iones de helio, en torno a 40 MeV.

### **12.3. Interacción de la radiación con la materia.**

#### *12.3.1. Interacción radiación-materia en fotoquímica.*

En fotoquímica se estudian los cambios químicos generados por la absorción de radiación electromagnética por las moléculas. Normalmente la fotoquímica se limita a aquellos casos en los que la energía de los fotones no es suficiente para dar lugar a la fotoionización de las moléculas. Excepto en casos especiales de fotólisis láser, una molécula puede absorber un solo fotón según la secuencia:



donde  $h$  es la constante de Planck y  $\nu$  la frecuencia de la radiación. La absorción de radiación de una determinada longitud de onda  $\lambda_i$  de un componente de la muestra se puede predecir mediante la ecuación de Lambert-Beer:

$$\text{Absorbancia}(\lambda_i) = \log(I_0 / I_{tr}) = \epsilon_i \cdot c \cdot l$$

La distribución de los fotones absorbidos entre los componentes de la muestra depende de la naturaleza de los enlaces moleculares de los mismos, como se refleja en la dependencia de los valores de la absorptividad molar,  $\epsilon_i$ , con la longitud de onda para cada molécula. Como consecuencia de esto, un compuesto minoritario de la muestra podría ser el compuesto que absorba la radiación.

### 12.3.2. Interacción entre radiación ionizante y materia.

La radiación ioniza y excita los componentes de la muestra, lo mismo que cuando se irradia la muestra con fotones que tengan energía suficiente para inducir la ionización de los componentes de la muestra irradiada.

#### 12.3.2.1. Irradiación con fotones de alta energía.

Los procesos físicos de transferencia de energía desde fotones de alta energía y partículas cargadas difieren. De la misma manera, la absorción de energía por una muestra de radiación electromagnética de alta y baja energía esta gobernada por diferentes procesos físicos. Cuando fotones de alta energía interaccionan con la materia, la mayoría de la energía absorbida da por resultado la expulsión de un electrón de los átomos que forman el material absorbente. La interacción depende principalmente de la configuración atómica y, en menor medida, de la estructura molecular, que es el factor que va a controlar la irradiación con fotones de baja energía. La absorción de energía de radiación electromagnética de baja energía, incluyendo infrarrojo, visible, UV e incluso rayos X, depende totalmente de la estructura molecular del medio. Esto constituye la principal diferencia entre los efectos de la radiación ionizante y no ionizante. La energía transferida por la radiación electromagnética de alta energía se describe mediante una ecuación equivalente a la ley de Lambert-Beer:

$$\text{Absorbancia} = \log(I_0/I_{tr}) = \mu l$$

donde la constante de proporcionalidad  $\mu$  es el coeficiente de absorción del material, y  $l$  es espesor de la muestra. A la absorción de energía contribuyen tres procesos de transferencia de energía: el efecto fotoeléctrico, el efecto Compton, y la formación del par electrón-positrón.

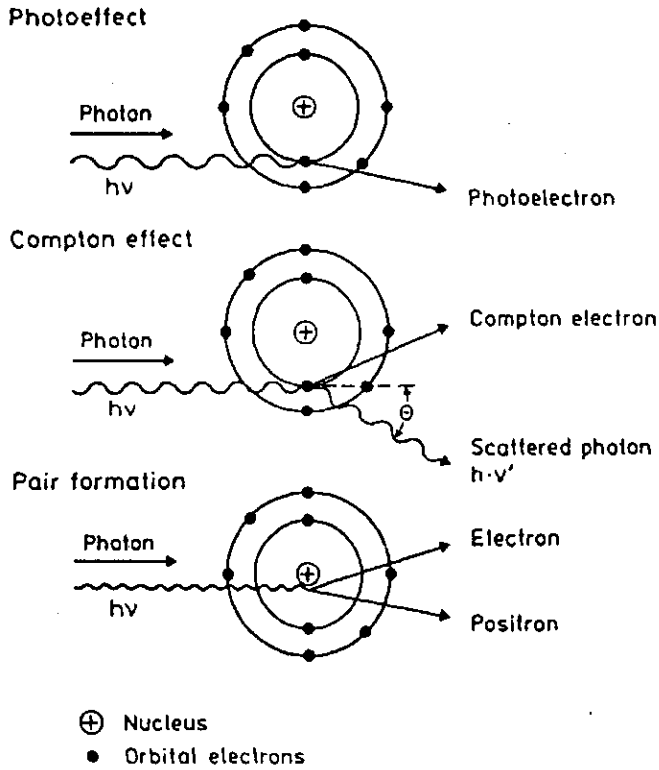
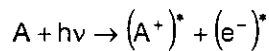


Figura 12.3. Representación esquemática del efecto Compton, fotoeléctrico y formación del par electrón-positrón.<sup>2</sup> (figura tomada de la referencia)

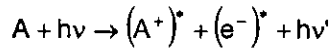
- En el efecto fotoeléctrico el fotón es absorbido generando un electrón.



La energía de este electrón ( $E_{e^-}$ ) es la diferencia entre la energía del fotón ( $h\nu$ ) y la energía que retiene al electrón en el átomo ( $E_b$ ). Para conservar el momento del fotón, se transfiere cierta energía cinética al núcleo que es muy pequeña comparada con la del electrón resultante, de modo que se puede escribir:

$$E_{e^-} = h\nu - E_b$$

- En el efecto Compton una fracción de energía es convertida en energía cinética del electrón liberado ( $E_{e^-}$ ) y resulta un fotón de menor energía ( $h\nu'$ ).



La energía del electrón es inferior a la diferencia de energía entre el fotón incidente y del fotón resultante, lo que manifiesta la energía que retiene al  $e^-$  unido al átomo ( $E_b$ )

$$E_{e^-} = h\nu - h\nu' - E_b$$

La energía del fotón resultante es función del ángulo de dispersión (scattering):

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + h\nu(1 - \cos\theta)/m_0c^2}$$

donde  $m_0$  es la masa del electrón en reposo y  $c$  la velocidad de la luz.

El efecto Compton no implica interacción con el núcleo.

- Formación de un par electrón-positrón. En este caso se absorbe completamente el fotón en las cercanías del núcleo atómico, con la formación de dos partículas, un electrón y un positrón.

$$E_{e^-+e^+} = h\nu - 2 \cdot m_0c^2$$

La contribución de estos tres procesos depende de la energía del fotón y del número atómico del material absorbente.

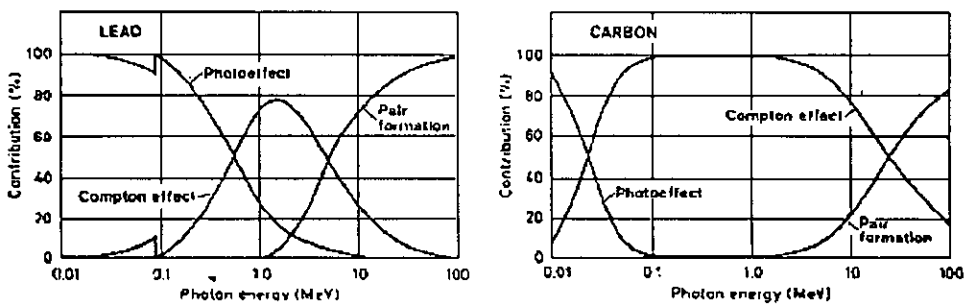


Figura 12.4. Contribución del efecto Compton, efecto fotoeléctrico y formación del par positrón-electrón en función de la energía de fotón y del material que absorbe la radiación.<sup>2</sup> (figura tomada de la referencia)



12.3.2.2. *Interacción con partículas cargadas.*

Cuando una partícula cargada tal como un electrón interacciona con la materia, los procesos más importantes a través de los que tiene lugar la interacción con la materia son: procesos de dispersión elástica, inelástico y de emisión de radiación electromagnética. La importancia de estos procesos depende principalmente de la energía de los electrones y en menor medida del número atómico de la materia. La emisión de radiación predomina con electrones de elevada energía y los procesos de dispersión elástica e inelástica con electrones de baja energía. De estos tres mecanismos, el proceso de dispersión inelástica es el único que genera ionización y excitación del material irradiado y, por lo tanto, es el único proceso que puede dar lugar a importantes cambios químicos o biológicos.

Los electrones secundarios producidos interaccionan de la misma manera que los hacen los otros electrones con la materia.

- **Procesos de emisión de radiación.** Los electrones con elevada velocidad pasan cerca del núcleo de un átomo pueden ser desacelerados, la energía así perdida podría ser emitida en forma de radiación electromagnética retardada (rayos X retardados).

- **Dispersión elástica.** Este proceso tiene lugar cuando los electrones son repelidos por el campo electrostático de los núcleos atómicos.

- **Dispersión inelástica.** Este proceso tiene lugar cuando los electrones interaccionan con los campos electrostáticos de los electrones de los átomos, de forma que estos pasan a un nivel energético superior o son expulsados del átomo (ionización). El proceso supone la transferencia de energía desde los electrones incidentes hasta los electrones atómicos, y causa la desaceleración de los electrones incidentes. La energía perdida por unidad de longitud debido a colisiones inelásticas  $(-dE/dl)_{col}$  es función de la velocidad del electrón y cambia cuando el electrón es desacelerado.

Los cambios químicos producidos por una partícula cargada y de alta energía dependen de la cantidad total de energía transferida a la muestra y de la velocidad de transferencia. Ambos factores son determinantes, una alta velocidad de transferencia de energía genera una elevada concentración de

especies reactivas, lo que facilita su recombinación. La transferencia de energía en los experimentos de química de la radiación no es homogénea como en los procesos de fotoquímica. Las inhomogeneidades locales a lo largo del camino de la partícula producen grandes diferencias en los rendimientos de las especies reactivas en la escala de tiempo de las reacciones químicas. La transferencia lineal de energía (LET), que es la cantidad de energía transferida al medio por unidad de distancia recorrida, se utiliza para cuantificar estos procesos. La energía perdida por electrón (LET) se describe mediante la ecuación de Bethe <sup>3</sup>

$$-\left(\frac{dE}{dl}\right)_{col} = \frac{2\pi N e^4 Z}{m_e v^2} \left[ \ln \frac{m_e v^2 E}{2I^2(1-\beta^2)} - \left(2\sqrt{1-\beta^2} - 1 + \beta^2\right) \ln 2 + 1 - \beta^2 + \frac{1}{8} \left(1 - \sqrt{1-\beta^2}\right)^2 \right] \text{ J m}^{-1}$$

donde  $v$  es la constante de velocidad de los electrones,  $c$  la velocidad de la luz,  $\beta$  es  $v/c$ ,  $I$  representa el potencial de ionización de los átomos del material sobre el que incide los electrones,  $N$  el número de átomos por unidad de volumen, " $e$ " es la carga de un electrón,  $m_e$  es la masa en reposo del electrón, y  $Z$  el número atómico del material sobre el que incide la radiación.

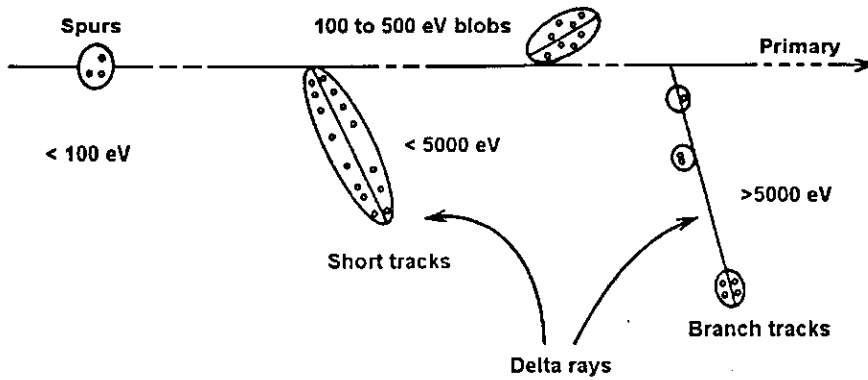
La transferencia lineal de energía es esencialmente proporcional a la densidad de electrones en el medio. Esta propiedad tiene un efecto importante en la producción de radicales y especies iónicas en disolución, y es el motivo por el que se diferencian los procesos fotoquímicos y radioquímicos.

Cuando las muestras son irradiadas con fotones de alta energía o partículas cargadas, la energía transferida podría no ser diferente. Sin embargo, las concentraciones locales podrían variar enormemente. La distribución no homogénea de especies excitadas y iones en "*tracks*" y "*spurs*" (véase más abajo) creados por el recorrido de los electrones a través de la muestra, electrones producidos por radiación electromagnética de alta energía o por excitación de partículas cargadas, produce un ambiente no homogéneo inmediatamente después de la irradiación.

- *Spurs*: cuando pasa radiación ionizante a través de una muestra, la energía no es transferida uniformemente a lo largo del camino de la radiación, si no que se deposita en pequeños volúmenes denominados *spurs*. Estos

pueden tener diferentes tamaños. Pueden estar formados por una sola molécula excitada, pero también por varios radicales catiónicos y electrones o incluso por varias moléculas excitadas

- Tracks: la energía perdida por la radiación ionizante es transferida a la materia generando en su camino moléculas e iones excitados o ionizados. Este camino es lo que se denomina track.



**Figura 12.5.** Distribución de las moléculas e iones excitados. Los círculos abiertos representan iones positivos, cada uno está asociado con un electrón o una o más moléculas excitadas. (figura tomada de la referencia)

Hay dos complicaciones relevantes en la irradiación de disoluciones concentradas. Si el soluto está presente en concentración elevada, puede ser directamente absorbida una cantidad importante de la energía transferida y contribuir a la formación de radicales. El soluto puede afectar a la formación de las especies primarias, actuando como scavenger de estas especies en los spurs y tracks, especies que deberían haber sido recombinadas en disoluciones diluidas. Si la concentración del soluto es la adecuada, evitando la absorción significativa de energía, las no homogeneidades debidas a los spurs y tracks rápidamente desaparecen por difusión a través del medio.

Este tipo de inhomogeneidades no se dan con los métodos fotolíticos, salvo cuando la absorbancia de la especie fotolizada es tan grande que la fracción de fotones absorbidos es mayor que la fracción transmitida.

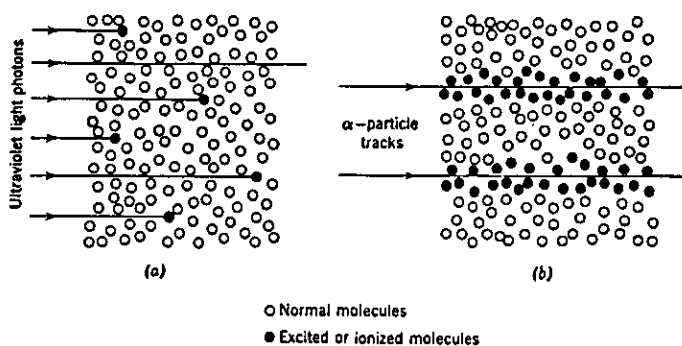


Figura 12.6. Absorción de fotones (a) y partículas  $\alpha$  (b) por la materia.<sup>3</sup>

Bajo condiciones experimentales normales en la química de la radiación, la transferencia de energía entre los componentes de la muestra es controlada por la contribución de cada componente a la densidad de electrones de la muestra. Esto es así tanto para irradiación con fotones de alta energía como para partículas cargadas, por lo que, tal como se indicó anteriormente, en el estudio de disoluciones diluidas es el disolvente el que absorbe casi la totalidad de la energía, siendo ésta la mayor diferencia que existe entre los métodos de química de la radiación y fotoquímica.

Además de los procesos de ionización pueden tener lugar procesos de excitación electrónica por absorción de radiación ionizante. Los procesos de transferencia de energía, transiciones electrónicas, procesos de relajación, etc se relatarán en el siguiente capítulo.

#### 12.4. Rendimiento, dosimetría, y unidades.

En fotoquímica el rendimiento de las especies generadas se expresa mediante el rendimiento cuántico  $\Phi$ , que se define como el número de especies formadas por fotón absorbido por la muestra.

$$\Phi = \frac{\text{número de especies formadas}}{\text{números de fotones absorbidos}}$$

En química de la radiación el rendimiento se expresa mediante el parámetro G, que se define como el número de especies formada por cada 100 eV de energía absorbida por la muestra.

$$G = \frac{\text{número de especies formadas}}{100 \text{ eV}}$$

En el sistema internacional (SI), el valor de G se expresa como el número de micromoles de especies producidas por julio de energía absorbida por la muestra.

La expresión del rendimiento de los productos o del consumo de reactivo en términos de transferencia de energía requiere un método que determine la dosis recibida por la muestra.

En química de la radiación se utilizan los dosímetros químicos, que miden la dosis absorbida mediante la determinación cuantitativa de un cambio químico, es decir el valor de G para un producto, en un conocido sistema químico. Las características de un dosímetro adecuado para su uso en química de la radiación son:

- La respuesta del dosímetro debe ser lineal con la dosis, es decir el valor de G del producto es independiente de la dosis.
- El rendimiento del producto debe ser independiente de la temperatura e insensible a la variación de cambios en las condiciones experimentales durante la irradiación, tales como la acumulación de productos radiolíticos o cambios en el pH.
- Los reactivos usados en la dosimetría deberían ser estándar y fácilmente disponibles sin necesidad de purificación.

Uno de los dosímetros más utilizados es el dosímetro de Fricke, que consiste en la oxidación de ion ferroso en una disolución diluida ácida saturada con aire. Siendo  $G[\text{Fe}^{+3}] = 1.62 \pm 0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}$  (para electrones de 1-30 MeV) y un coeficiente de absorción molar a 304 nm de  $2205 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ .<sup>1</sup>

Otro dosímetro empleado habitualmente es el anión tiocianato, siendo la especie activa generada el radical aniónico  $(\text{SCN})_2^{\bullet -}$  con un valor de  $G[(\text{SCN})_2^{\bullet -}] = 6.0 \mu\text{mol} \cdot \text{J}^{-1}$  y un coeficiente de absorción molar a 480 nm de  $7600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ .<sup>4</sup>

En contraste, en fotoquímica los actinómetros químicos son usados para determinar la intensidad de la radiación, es decir, el número de fotones absorbidos por la radiación. Se han utilizado como actinómetros,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{I}^-$ , ferrioxalato, etc.<sup>5</sup>

Sólo la energía absorbida en una masa definida del medio puede producir cambios químicos. Por lo tanto, "dosis" normalmente se refiere en este campo

a dosis absorbida, definida esta como la cantidad de energía absorbida por unidad de masa de material irradiado. En el sistema internacional la unidad para "dosis" es  $\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}$  que se denomina gray (Gy).

### 12.5. Técnicas de irradiación.

La mayor parte del trabajo realizado en química de la radiación y biología usa  $^{60}\text{Co}$  como fuente de radiación  $\gamma$ , sistemas de rayos X y aceleradores. Estas técnicas de radiación tienen su equivalente en flash fotólisis y técnicas láser usadas en fotoquímica y fotobiología. La energía de un cuanto emitido por los láseres es generalmente inferior a la energía de ionización, pero con los láseres de excímeros ( $\text{ArF}^*$ ,  $\lambda_{\text{emisión}}=193\text{ nm}$ ), y aprovechando la existencia de los procesos bifotónicos, los procesos de ionización pueden ser estudiados mediante el uso del láser.

#### 12.5.1. Radiólisis de pulso y fotólisis de destello.

La fotólisis mediante fuentes que emiten radiación pulsada son muy usadas debido a la elevada intensidad de radiación que es generada por estas fuentes.

Para poder estudiar procesos inducidos por radiación, los tiempos de resolución los equipos deben ser muy cortos porque la mayoría de las reacciones son de naturaleza química radicalaria y, por lo tanto, generalmente muy rápida. La técnica más comúnmente utilizada es la radiólisis de pulso, con electrones de alta energía como radiación ionizante, generados por generadores de Van der Graaff, Ferbetron o Linac. Lo estándar son los pulsos de electrones entorn a los  $\mu\text{s}$ , aunque hoy hay disponibles equipos de ns e incluso ps.

La técnica de fotólisis de destello (*flash photolysis*), introducida en 1949, es un potente medio para el estudio de los efectos fisicoquímicos de la luz sobre la materia. La técnica consiste en la irradiación de la muestra con un pulso pequeño de radiación de alta intensidad, los cambios resultantes en la radiación absorbida son seguidos principalmente fotoeléctricamente como una función del tiempo a una longitud de onda determinada, usando una fuente de radiación continua para monitorizar la muestra. Una década más tarde, estos mismos principios fueron aplicados al estudio de los efectos de la radiación

ionizante como iniciadora de reacciones químicas, sustituyendo la fuente de excitación por una fuente de electrones de alta energía (radiólisis de pulso).

Si bien la técnica de radiólisis de pulso puede ser considerada como el equivalente a la fotólisis láser, debe de tenerse en cuenta que los requisitos de excitación requeridos por ambas técnicas son distintos: en la radiólisis de pulso el proceso de excitación es independiente de las características de absorción del sustrato a diferencia de lo que pasa en la fotólisis láser.

El principio de ambas técnicas con detección fotoeléctrica es el siguiente.

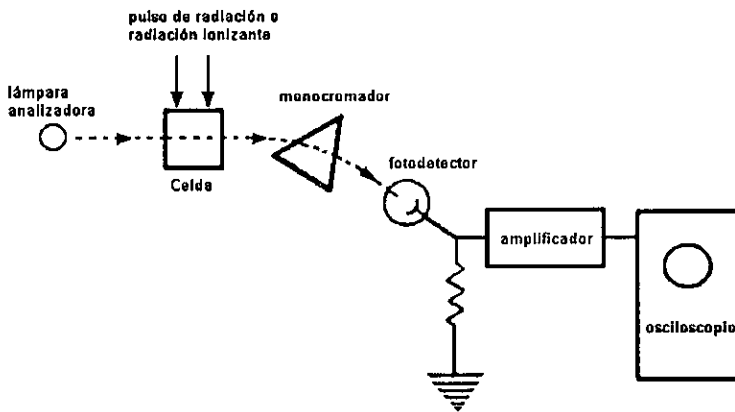


Figura 12.7. Esquema general de los sistemas de radiólisis de pulso y flash fotólisis.

La lámpara analizadora genera un haz de luz continuo que pasa a través de la muestra, normalmente en ángulo respecto al camino del pulso de la radiación de excitación. El pulso de radiación de excitación genera las especies transitorias. El monocromador se usa para seleccionar la longitud de onda a la que absorbe la especie transitoria. Los cambios de transmisión de la muestra antes, durante y después del pulso de radiación de excitación son transformados por el fotodetector de variaciones de la intensidad de radiación en señales eléctricas que son mostradas en el osciloscopio.

Otros posibles métodos de detección son: medidas de conductividad AC o DC, dependiendo del tiempo de detección, resonancia de espín electrónico, etc.

Los primeros tipos de fuentes de radiación utilizados en flash fotólisis fueron lámparas con las que se obtenían pulsos de 1  $\mu$ s. Actualmente el uso del láser como fuente de excitación (láser flash fotólisis) permite generar pulsos de

nanosegundos, picosegundos y femtosegundos. Los aceleradores lineales o los generadores de Van der Graaf y Febertron son las principales fuentes de radiación ionizante utilizadas en la técnica de radiólisis de pulso (con energías normalmente entre 1 y 15 MeV) generan pulsos de pico a microsegundos.

La técnica de radiólisis de pulso es particularmente útil para el estudio de los radicales formados en la irradiación del agua. Estos radicales primarios provienen de la descomposición radiolítica del agua reaccionan rápidamente con sustratos orgánicos e inorgánicos generando como productos secundarios compuestos más o menos estables. De los productos primarios el  $e^-_{ac}$  es la especie importante por su reactividad y por sus características ópticas ( $\epsilon_{700}=19000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>6</sup> que hacen que sea una especie fácil de detectar, permitiendo estudiar las reacciones en que interviene.

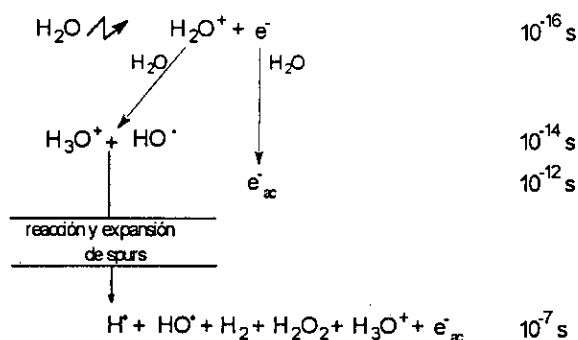


Figura 12.8. Productos primarios generados en la descomposición radiolítica del agua.

La fotólisis genera la excitación de moléculas específicas por absorción de radiación. En algunos casos la excitación genera directamente las especies de interés, mientras que en otras, es necesario la reacción con un precursor.

A veces la importante absorción de fondo, los bajos rendimientos cuánticos, o la falta de un fotosensibilizador apropiado excluye la aplicación de técnicas de fotólisis para el estudio de ciertos sistemas químicos. Muchos de estos sistemas se pueden estudiar mediante radiólisis.



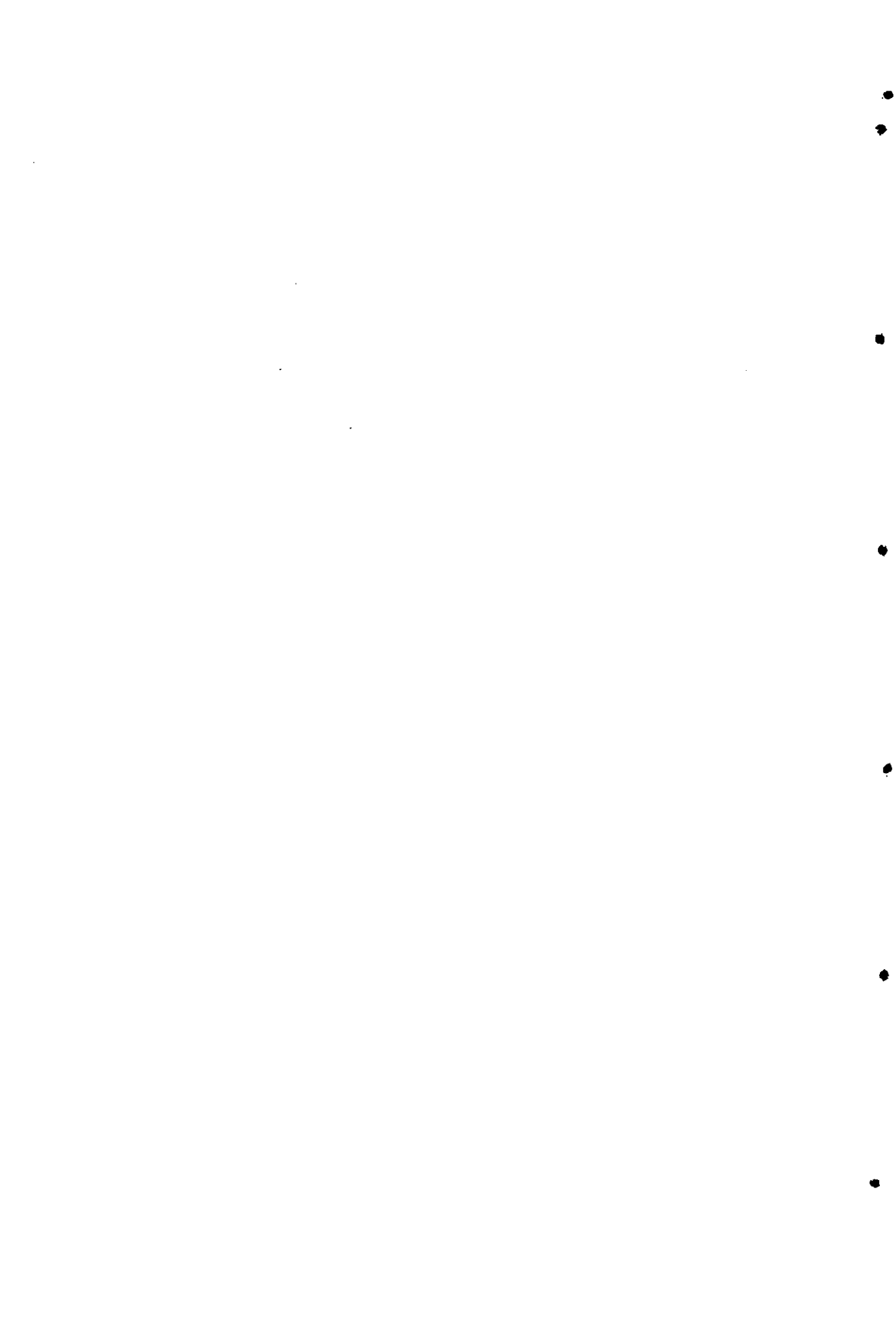
**12.6. Comparación de los efectos de la radiación UV frente a la radiación ionizante.**

	UV	Radiación ionizante
1. Tipo de radiación	Monocromática	Debido a la pérdida de energía, no es posible obtener radiación monoenergética dentro de una muestra.
2. Absorción de radiación.	Depende del coeficiente de absorción, toda la radiación puede ocurrir que sea absorbida por el soluto.	Depende de la fracción electrónica del sustrato. La mayoría de la energía es transferida al disolvente
3. Especies presentes.	Sólo radicales libres y estados excitados. Con radiación UV de alta energía, en algunos casos se puede producir iones.	Radicales libres, moléculas de disolvente excitadas y especies iónicas.
4. Interacción.	Específica.	Inespecífica.
5. Distribución de las especies reactivas.	Homogénea.	No homogénea.

### 12.7. Bibliografía.

- (1) Woods, R. J.; Pikaev, A. K. *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing*, 1994.
- (2) von Sonntag, C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor and Francis: London, 1987.
- (3) Spinks; Woods, R. J. *An Introduction to Radiation Chemistry*, 1990.
- (4) Schuler, R. H.; Hartzell, A. L.; Behar, B. J. *Phys. Chem.* **1981**, *85*, 192.
- (5) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed.; Marcell Dekker, Inc.: New York, 1993.
- (6) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Rosss, A. B. J. *Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513-886.

## 13. Fotoquímica



### 13.1. Introducción.

Una definición general de fotoquímica es "un proceso en el que se producen cambios químicos producido por la absorción de luz". Normalmente por luz se entiende la radiación electromagnética en la zona del visible y ultravioleta (700-100 nm), y por cambio químico se interpreta de forma general a lo que sucede a nivel molecular después de la absorción de un fotón incluso si no se produce un cambio químico. Se puede hacer una distinción entre proceso fotofísico, cuando se produce un cambio en la energía y estructura electrónica de la molécula dando lugar a la misma molécula que antes de absorber el fotón, y procesos fotoquímicos cuando después de la absorción del fotón se generan nuevas moléculas.

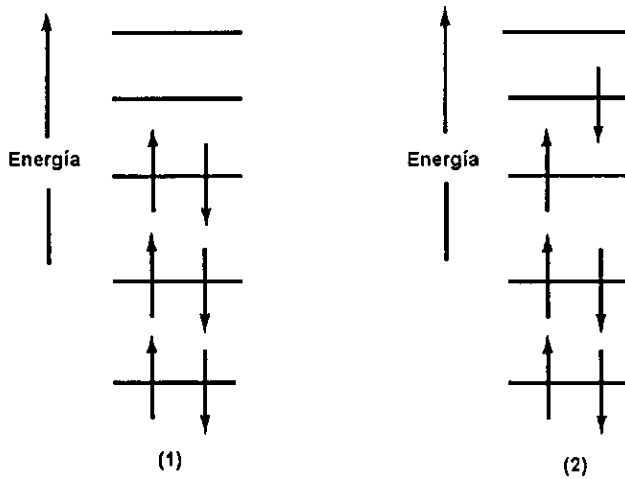


Figura 13.1 Diagrama (simplificado) de orbitales moleculares para una molécula orgánica.

La absorción de un fotón por una molécula orgánica puede dar lugar a un estado electrónico excitado singlete (S) o a un triplete (T), que son el comienzo de las siguientes etapas de la reacción. Estas son especies moleculares cuya configuración electrónica no se corresponde con la configuración de mínima energía (figura 13.1). En el estado fundamental(1) los electrones disponibles ocupan, en pares, los orbitales de menor energía, y la energía total de la molécula es la mínima posible. En el estado electrónico excitado(2) un electrón

ocupa un orbital de energía superior que el del orbital que le corresponde, y la energía total de la molécula es mayor que la del estado fundamental.

Los dos orbitales de mayor importancia en el análisis de las transformaciones fotoquímicas se designan como HOMO y LUMO. Los electrones en el orbital HOMO son los que están a mayor distancia, y por lo tanto menos atraídos, por los núcleos. Por lo tanto serán estos los que sean promocionados cuando se absorba energía, al siguiente orbital de energía mayor, que es el LUMO.

En un estado electrónico singlete el electrón que es promocionado tiene su spin antiparalelo con el del electrón del estado de inferior E. También existe la posibilidad de que el electrón promocionado tenga su spin paralelo al del estado de inferior E en cuyo caso se tendría un estado electrónico triplete.

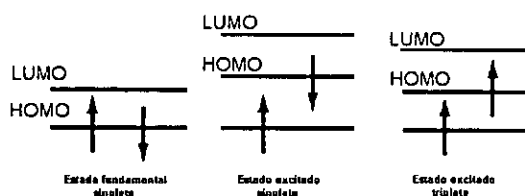


Figura 13.2

Los estados electrónicos singlete y triplete tienen diferente multiplicidad, y son especies diferentes con propiedades y reacciones químicas distintas. El estado electrónico triplete es de menor energía debido a las repulsiones entre electrones del mismo spin. En general no se genera de forma directa por absorción de un fotón, porque para la mayoría de las moléculas la probabilidad de que ocurra una inversión de spin al mismo tiempo que la absorción es extremadamente baja por lo que se genera de forma indirecta.

### 13.2. Transiciones electrónicas permitidas.

Cuando un átomo o molécula absorbe o emite cuantos de radiación electromagnética y pasa de un estado de energía  $E_1$  a otro  $E_2$  se deben cumplir varios requisitos:

- La frecuencia de la radiación debe venir dada por  $\Delta E = h\nu$ .

▪ Es preciso que exista un mecanismo físico adecuado para que pueda tener lugar esta conversión de energía electromagnética en energía de rotación, vibración, etc. La única forma de que esto suceda es por interacción entre el campo electromagnético de la radiación (figura 13.3) y las cargas eléctricas en la molécula, que, normalmente, serán de tipo dipolar.

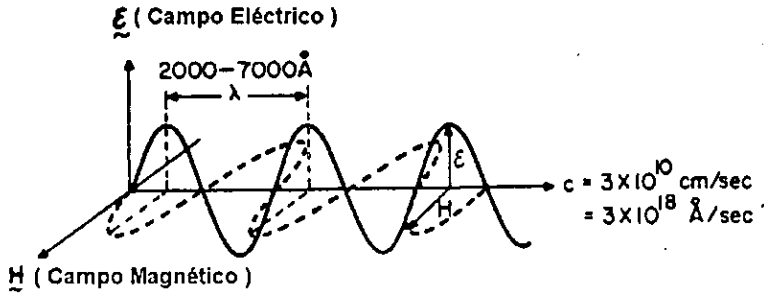


Figura 13.3 Onda electromagnética

La radiación electromagnética causa perturbaciones magnéticas y eléctricas en la región del espacio a través del que pasa (figura 13.4). La fuerza  $F$  ejercida sobre un electrón de la molécula por la onda será

$$F = e \cdot E + e \cdot \frac{[H \cdot v]}{c}$$

donde,  $e$  es la carga del electrón,  $E$  la fuerza del campo eléctrico,  $H$  la fuerza del campo magnético,  $v$  la velocidad del electrón, y  $c$  la velocidad de la luz. Como la velocidad de la luz ( $3 \cdot 10^{10} \text{ cm/s}$ ) es mayor que la posible velocidad del electrón ( $v_{\text{max}} \approx 10^8 \text{ cm/s}$ ), el término  $eE$ , en general, puede ser considerada mayor que el término  $(e/c) \cdot [Hv]$  por lo que  $F$  puede ser aproximada como

$$F \cong e \cdot E$$

es decir, la interacción de la radiación electromagnética con los electrones de la molécula es debida a su componente ondulatoria eléctrica. La interacción con la componente ondulatoria magnética es despreciable.

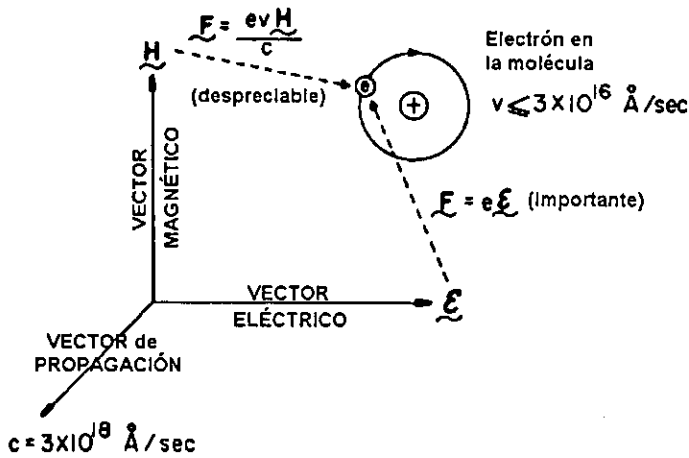


Figura 13.4 Interacción del campo eléctrico y magnético de la onda electromagnética con un electrón en su órbita alrededor del núcleo

Los electrones de la molécula experimentan una perturbación eléctrica producida por las fuerzas atractivas y repulsivas del campo eléctrico de la onda. El efecto neto de esta interacción es la generación de un momento dipolar transitorio en la molécula debido a la interacción de E con los electrones (figura 13.5). Por lo que la energía de interacción vendrá dada por

$$F = E \cdot \mu = E \cdot \mu_E$$

donde E es el campo eléctrico de la radiación,  $\mu$  el momento dipolar y  $\mu_E$  su componente en la dirección de E.

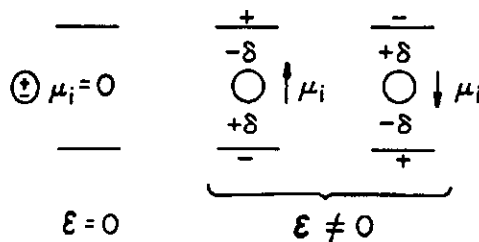


Figura 13.5 Inducción del momento dipolar por un campo eléctrico.

Como los tránsitos espectroscópicos son muy rápidos, habrá que considerar los valores instantáneos de  $\mu$ , que no son constantes si no función de las coordenadas de rotación, vibración, etc. Para que tenga lugar la transición es necesario que al menos durante un instante un dipolo oscile en la frecuencia del fotón absorbido o emitido. De modo general, debe existir, al menos de



modo transitorio, un momento dipolar de transición eléctrico  $\mu_{fi}$  distinto de cero para que se dé una transición entre un estado inicial  $i$  caracterizado por una función de onda  $\Psi_i$  a otro  $f$ , caracterizado por  $\Psi_f$ , ( $|\mu_{fi}| = \int \Psi_f^* \cdot \mu \cdot \Psi_i \cdot d\tau \neq 0$ ; donde  $\mu$  es el operador momento dipolar). Es imprescindible que durante el proceso (rotación, vibración, etc.) varíe la componente del momento dipolar en la dirección del campo eléctrico de la radiación, bien en módulo (como en la vibración) o su orientación (como la rotación).

La magnitud del dipolo transitorio puede interpretarse como una medida de la redistribución de carga que acompaña a una transición entre niveles energéticos. La transición será activa sólo si dicha redistribución de carga genera un dipolo. Entre estas, para complejos centrosimétricos (aquellos que tienen centro de inversión) y átomos, sólo tendrán lugar aquellas transiciones que vayan acompañadas de un cambio de paridad ( $g \rightarrow u$ ,  $u \rightarrow g$ ). (Regla de selección de Laporte).

- Se debe cumplir que  $\Delta S=0$ , no debe haber un cambio global de momento angular spin, dando que el proceso de absorción no afecta directamente al spin. Esta regla impediría tránsitos entre estados singlete y triplete que más adelante se verá que tienen lugar, si bien se tratan de transiciones de baja intensidad. Teniendo en cuenta el acoplamiento de Russell-Saunders si el acoplamiento spin-orbital no es débil (i.e.: si los átomos implicados no son ligeros) no necesariamente todos los momentos orbitales operan de modo cooperativo, y puede ocurrir que  $\Delta S=\pm 1$ . Así, a pesar de que las transiciones  $S_1 \rightarrow T_1$  ó  $T_1 \rightarrow S_0$  están prohibidas, tienen lugar.

### 13.3. Leyes de la fotoquímica.

Se pueden considerar dos leyes fundamentales para el estudio de la fotoquímica:

- Ley de Grotthus-Draper "sólo la luz absorbida por una molécula puede ser efectiva para producir cambios fotoquímicos en ella."

- Ley de Stark-Einstein "cuando una especie absorbe radiación sólo un fotón es absorbido por molécula. Esto se mantiene para la mayoría de los procesos; existen excepciones cuando se utilizan intensas fuentes de radiación, como es el caso del láser en donde la probabilidad de que ocurra la

absorción simultanea o en varias etapas de dos o más fotones no es despreciable.

- Ley de Kasha. Para la mayoría de las reacciones fotoquímicas el estado electrónico excitado más bajo ( $S_1$  o  $T_1$ ), en su estado vibracional más bajo, es el candidato más probable para iniciar la reacción.

La fotoquímica, por tanto, concierne a las reacciones de los estado electrónicos excitados, y hay algunas diferencias entre estos estados y los correspondientes estados fundamentales que afectan de una manera importante en la naturaleza de las reacciones fotoquímicas.

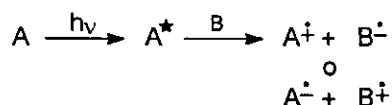
#### 13.4. Diferencias entre estado electrónico excitado y fundamental.

El estado electrónico excitado es una especie distinta, con un tiempo de vida finito y con propiedades físicas y químicas que difieren del estado fundamental.

- Un estado electrónico excitado es considerablemente más energético que el estado fundamental, lo que implica un amplio abanico de posibles reacciones.

- La segunda diferencia importante entre ambos estados electrónicos es su diferente distribución electrónica. Esto tiene una considerable influencia en los cambios químicos observados; después de todo, los mecanismos de las reacciones orgánicas son generalmente racionalizados y propuestos sobre la base de la distribución electrónica.

- Otra diferencia importante es la que corresponde a las diferencias como aceptores o dadores de electrones de ambos estados electrónicos, y como consecuencia de esto sus diferentes propiedades redox. Este efecto es tan importante que muchos procesos fotoquímicos comienzan con la completa transferencia de un electrón desde o a un estado excitado, con la formación de radicales catiónicos o aniónicos, especies poco usuales en el estado fundamental en las reacciones orgánicas.



Además de estas diferencia entre las propiedades del estado electrónico excitado y fundamental que influyen en su comportamiento químico, se pueden

hacer otras consideraciones prácticas. En una reacción térmica, la energía normalmente es suministrada indiferentemente a todas las especies en la mezcla de reacción (reactivos, disolvente, y productos). En una reacción fotoquímica, la radiación puede ser suministrada de una forma selectiva a cada una de las especies de la mezcla. Esto se consigue seleccionando la longitud de onda de excitación adecuada en base a las características de absorción de las especies presentes. Un ejemplo es la excitación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 254nm: el peróxido de hidrógeno absorbe a esta longitud de onda, generando dos radicales  $\text{HO}^\bullet$  por homólisis, que pueden reaccionar con el compuesto que se quiere estudiar.

La energía de un estado excitado es una propiedad usada en el diseño de reacciones químicas fotosensibilizadas, que son aquellas en las cuales el estado electrónico excitado que se necesita se obtiene indirectamente por transferencia de energía desde otras especies y no por absorción directa de la radiación. La mayoría de los procesos en los que intervienen los sensibilizadores, involucran a los estados tripletes del sensibilizador, que transfiere energía desde su estado excitado hasta el compuesto que se quiere estudiar, un ejemplo típico de fotosensibilizadores son las cetonas, debido a que la formación de estados tripletes en compuestos carbonílicos es fácil, y a que los estados tripletes de muchos compuestos aceptores son de menor energía que los estados tripletes de los compuestos carbonílicos, y pueden por lo tanto ser ocupados en procesos exotérmicos de transferencia energética.

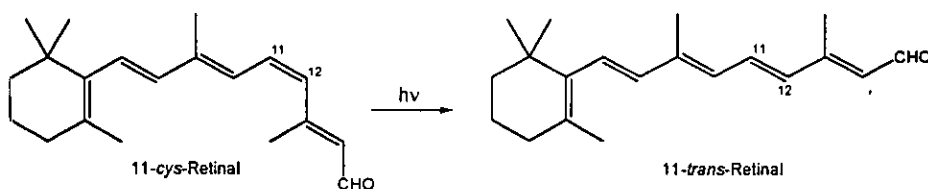
### **13.5. Vías de relajación de moléculas en estado electrónico excitado.**

Cuando una molécula interacciona con un cuanto de radiación electromagnética, de una determinada frecuencia, pasa a un estado excitado. Como los niveles de energía para la excitación vibracional y rotacional están muy próximos, las moléculas en el estado fundamental son realmente un grupo de especies con diferentes niveles rotacionales y vibracionales.

La excitación electrónica, tiene lugar desde cualquiera de esos niveles. Es decir, que las moléculas excitadas (singlete o triplete) pueden ser creadas desde diferentes niveles rotacionales y vibracionales. Dado que los núcleos son más pesados que los electrones, la transición electrónica es mucho más rápida

que la respuesta del núcleo (Principio de Frank-Condon), el paso inicial en la excitación electrónica tendrá lugar sin cambios en la posición de los átomos; se dice que se produce una transición vertical. La transición vertical pasa a través de diferentes niveles vibracionales del estado electrónico excitado siendo el más probable aquel en el que los núcleos puedan mantener la posición inicial. Es decir, la molécula experimenta la transición al nivel vibracional superior cuya función de onda vibracional se solape mejor con la función de onda vibracional del estado fundamental.

Si el tiempo de vida de este estado excitado es suficientemente largo, la relajación puede tener lugar con cambio en la distribución electrónica: esto es una reacción fotoquímica; como ejemplo pueden citarse un reordenamiento tipo Cope, en el que ni siquiera hay cambio en la posición de los átomos, o la reacción de isomerización *cis-trans* de un alqueno. Un ejemplo de este último proceso tiene lugar en las células de la retina. Cuando la luz incide sobre la rodopsina tiene lugar la transformación del 11-*cis*-retinal en 11-*trans*-retinal, lo que constituye el comienzo del proceso visual.



Además de los reordenamientos moleculares o reacciones existen otras vías de relajación que pueden ser: transiciones radiativas y no radiativas, que se describen habitualmente mediante el diagrama de Jablonski (figura 13.6).

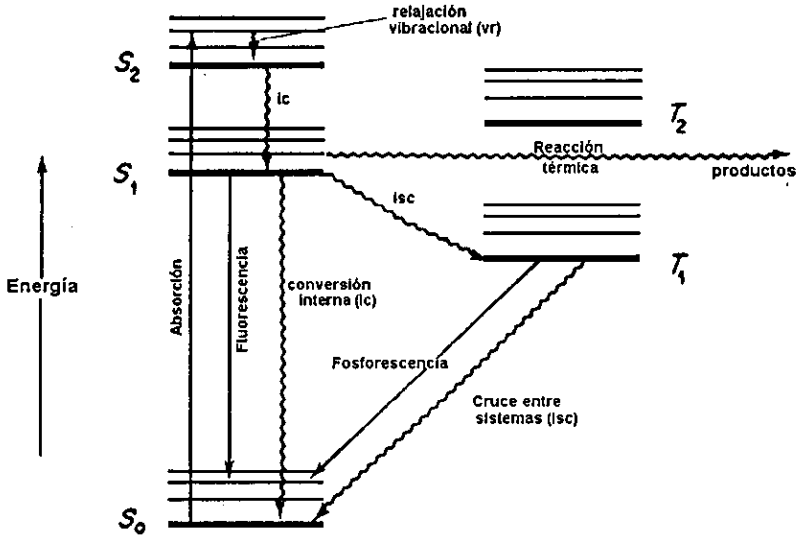


Figura 13.6 Diagrama de Jablonski.

Un proceso de desactivación radiativa es aquel en el que la molécula elimina su energía de excitación en forma de radiación, fluorescencia ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) y fosforescencia ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). Un destino más común es la desactivación no radiativa sin emisión de radiación, relajación vibracional dentro de un mismo nivel electrónico, conversión interna ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) que compite con la fluorescencia, cruce entre sistemas ( $T_1 \rightarrow S_0$ ) que compite con la fosforescencia; ( $S_1 \rightarrow T_1$ ) que compite con la fluorescencia y la conversión interna. Este último mecanismo de cruzamiento entre sistemas es importante porque proporciona el medio por el que se generan muchos estados triplete antes que la fosforescencia o cambios fotoquímicos, mediante la absorción de un fotón para dar lugar a un estado electrónico excitado singlete, seguido de un cruzamiento entre sistemas para generar el triplete. Es decir mediante esta transición se pueden generar, rápida y eficazmente estados triplete excitados para moléculas que tengan una diferencia de energía singlete-triplete pequeña, como es el caso de las cetonas que se utilizan como fotosensibilizadores. Otro proceso no radiativo es la formación de fotoproductos desde  $S_1$  o  $T_1$ .

En principio se pueden conseguir estados electrónicos excitados de más alta energía ( $S_2$ ,  $T_2$ ) por excitación de  $S_1$  o  $T_1$ , pero la probabilidad de absorción de un segundo fotón por la molécula es muy baja cuando se usan fuentes de luz

normales. Este proceso bifotónico es más factible cuando se emplean láseres como fuentes de excitación.

Además de estos procesos de relajación del estado excitado existen otros que son de gran utilidad desde el punto de vista de la fotorreactividad (figura 13.7).

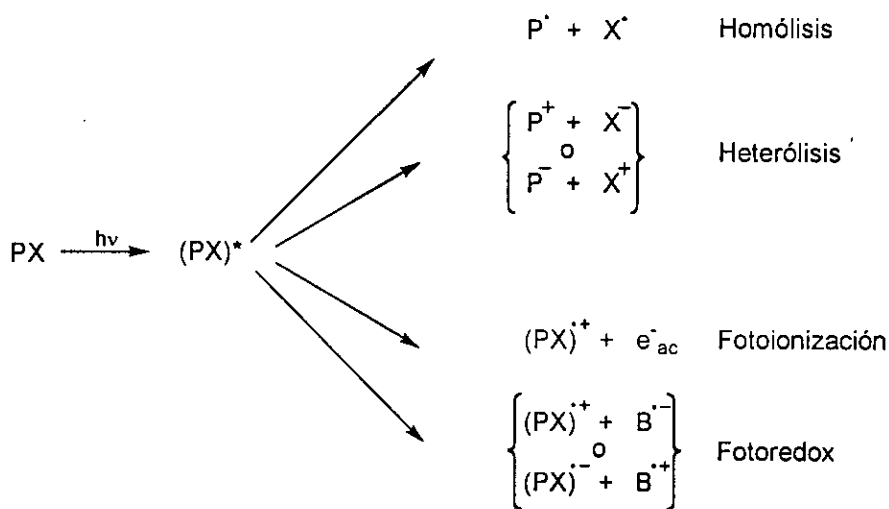


Figura 13.7 Posibles procesos de relajación tras irradiación directa.

### 13.6. Fenómenos multifotónicos.

Hasta ahora se ha supuesto que todos los procesos tienen lugar por absorción de un fotón por molécula (ley de Stark-Einstein), sin embargo cuando se utilizan fuentes de excitación apropiadas como es el láser, la probabilidad de que ocurra la absorción simultánea o en varias etapas de dos o más fotones no es despreciable, pudiéndose conseguir estados electrónicos excitados superiores.

Para que una molécula sea capaz de interactuar con el campo magnético y absorber o emitir un fotón de frecuencia  $\nu$ , debe tener, al menos durante un instante, un dipolo que oscile a esta frecuencia. En mecánica cuántica este dipolo instantáneo se expresa en función del momento dipolar de transición,  $\mu_{fi}$ , entre los estados  $i$  y  $f$  ( $|\mu_{fi}| = \int \psi_f^* \cdot \mu \cdot \psi_i \cdot d\tau \neq 0$ ). Hasta ahora hemos considerado que existe una relación lineal entre el módulo del momento dipolar inducido,  $\mu$ , y la intensidad del campo eléctrico,  $E$ .

$$\mu = \alpha \cdot E$$

donde  $\alpha$  es la polaridad de la molécula. Cuando el campo eléctrico es muy intenso, como en láseres, el momento dipolar inducido no es estrictamente lineal con el campo, obteniéndose

$$\mu = \alpha \cdot E + \frac{1}{2} \cdot \beta \cdot E^2 + \dots$$

donde  $\beta$  es la hiperpolarizabilidad.

Se pueden justificar así la existencia de procesos multifotónicos donde la sustancia responde de forma no lineal a la radiación incidente.

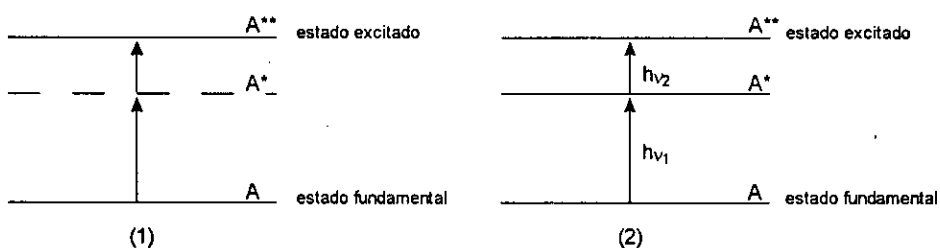
La determinación del número de fotones que intervienen en un proceso fotoquímico se puede establecer sobre la base de rendimiento fotoquímico de una especie transitoria en función de la energía del pulso. En condiciones normales (intensidades por pulso máximas del orden de  $10^{16}$  fotones/cm<sup>2</sup>) los procesos se pueden dividir en monofotónicos o bifotónicos en función de la dependencia observada. Los primeros resultan de la absorción de un único cuanto de luz y se observa una dependencia lineal (1) de la variación de la densidad óptica a una longitud de onda en función de la intensidad del pulso láser. Los procesos bifotónicos resultan de la absorción de dos cuantos de luz y

la variación de densidad óptica medida a una determinada longitud de onda es proporcional a la segunda potencia de la intensidad del pulso láser (2).

$$\Delta A = \alpha \cdot I \quad (1) \quad \Delta A = \beta \cdot I^2 \quad (2)$$

donde  $\Delta A$  es la medida del rendimiento fotoquímico de una especie medido en términos de la variación de su absorbancia,  $\alpha$  y  $\beta$  los coeficientes para la absorción de un cuanto y dos cuantos, respectivamente, e  $I$  la intensidad del pulso láser.

Un proceso de absorción de dos cuantos puede ocurrir simultáneamente por absorción de dos fotones en un único paso o consecutivamente por absorción secuencial de dos fotones en dos pasos (figura 13.8)



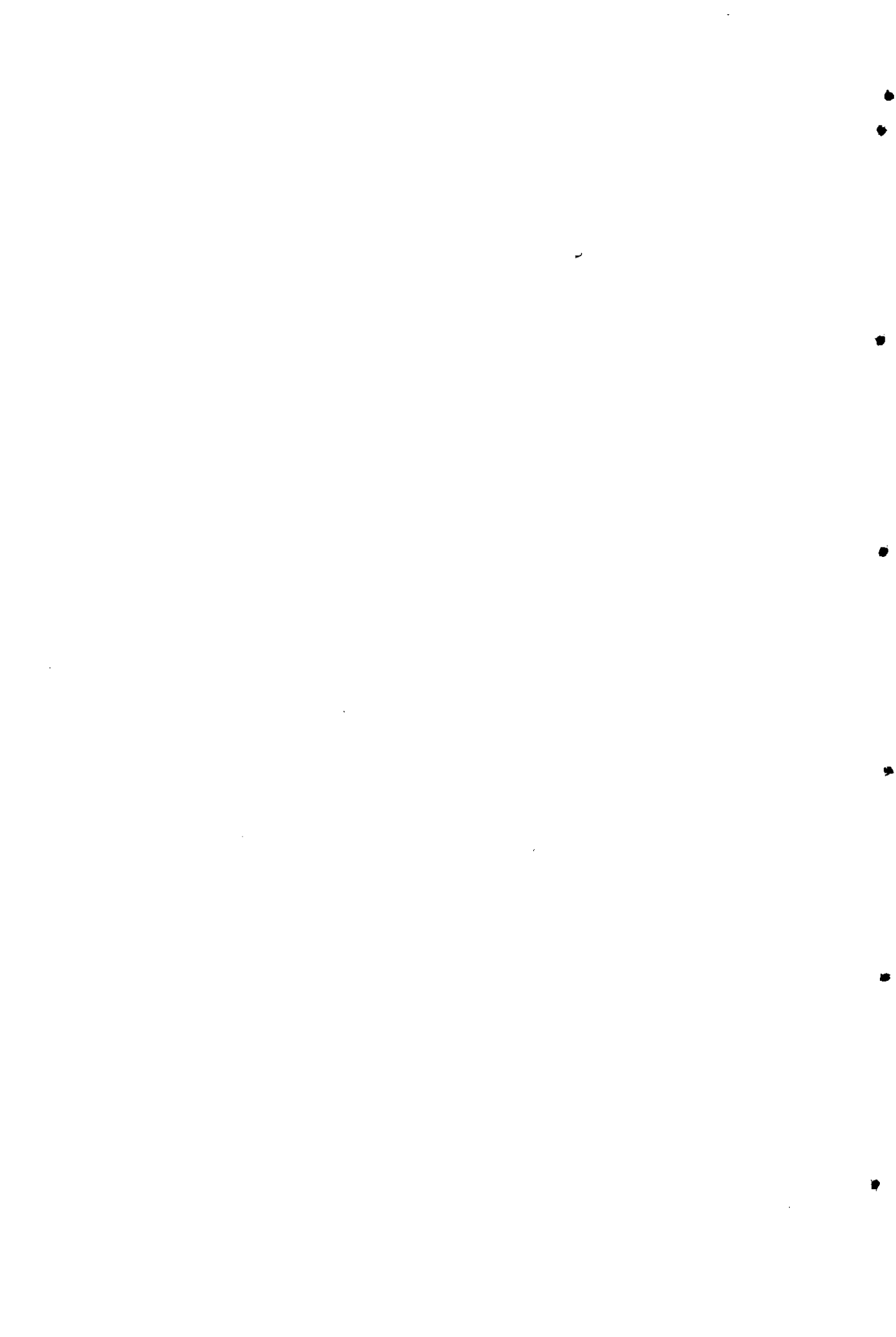
**Figura 13.8** (1) Absorción simultánea de dos fotones en un único paso. (2) Absorción consecutiva de dos fotones en dos pasos.

En el proceso de absorción simultáneo se genera un estado virtual,  $A^{*V}$ , por interacción del primer fotón con  $A$  (figura 13.8 (1)). Sólo si el segundo fotón llega durante la interacción con el primero podrá ser absorbido. La absorción simultánea puede ser visualizada como la absorción de dos fotones actuando como uno solo. La dependencia fotónica es en este caso cuadrática con la energía del pulso, para un amplio intervalo de energía. En el segundo mecanismo de excitación participa un estado intermedio real de la especie absorbente. Este estado es poblado por el primer fotón y actúa como punto de partida para la absorción del segundo (figura 13.8 (2)). En la absorción consecutiva hay que considerar las transiciones para cada uno de los dos estados. Para pulsos de baja intensidad se sigue una relación cuadrática, pero para intensidades altas, si se llega a condiciones de saturación, la dependencia es prácticamente lineal.<sup>10,14</sup>

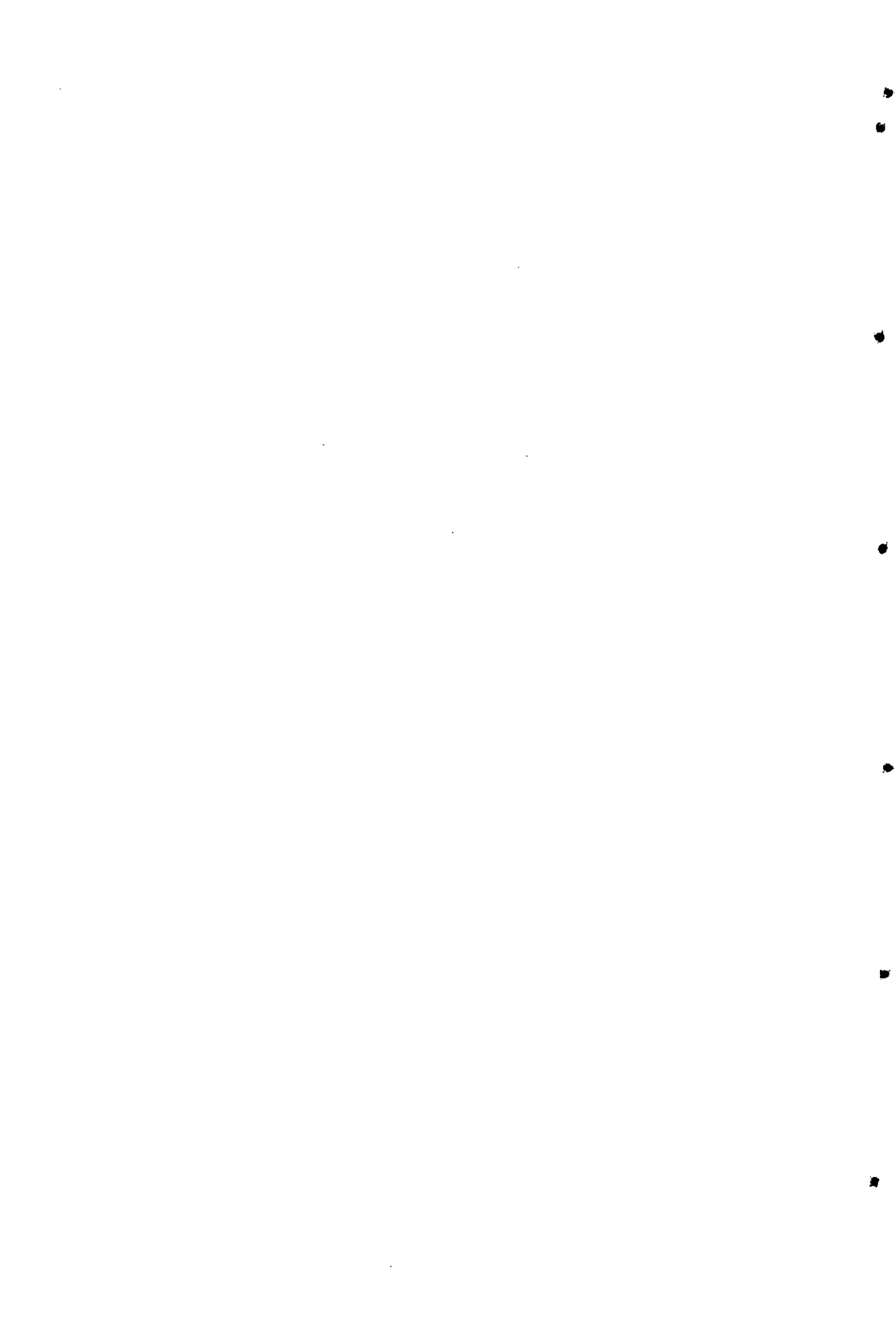


### 13.7. Bibliografía.

- (1) Wishart, J. F.; Nocera, D. G. *Photochemistry and Radiation Chemistry. Complementary Methods for the Study of Electron Transfer*. Washington, 1998.
- (2) Kagan, J. *Organic Photochemistry: Principles and Applications*, 1993.
- (3) Coyle, J. D. *Introduction to Organic Photochemistry*, 1995.
- (4) Woods, R. J.; Pikaev, A. K. *Applied Radiation Chemistry: Radiation Processing*, 1994.
- (5) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, 1991.
- (6) Spinks; Woods, R. J. *An Introduction to Radiation Chemistry*, 1990.
- (7) Mozumder, A. *Fundamentals of Radiation Chemistry*; Academic Press: San Diego, 1999.
- (8) Atkins, P. W. *Physical Chemistry*, 7th ed.; Oxford University Press: Oxford, 2002.
- (9) Levine, I. N. *Físico Química*; 4ª ed.; Mc Graw Hill: Madrid, 1996.
- (10) Faria, J. L. B. M. d., Universidade Técnica de Lisboa, 1992.
- (11) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Rosss, A. B. J. *Phys. Chem. Ref. Data* 1988, 17, 513-886.
- (12) Calvert, J. G.; Pitts, J. N. *Photochemistry*; Wiley: New York, 1996.
- (13) Horspool, W.; Armesto, D. *Organic Photochemistry: a comprehensive treatment*; Ellis Horwood: New York, 1992.
- (14) Wayne, C. E.; Wayne, R. P. *Photochemistry*; Oxford University Press: Oxford, 1996.



14. Fotodegradación de biocidas tipo s-  
triazina: Antecedentes



### 14.1. Introducción.

Los pesticidas son compuestos de vital importancia en la actualidad, facilitando el trabajo y aumentando la productividad agrícola. Debido a su amplia utilización durante las últimas décadas y al enorme desarrollo de la industria agroquímica, la variedad y cantidad de compuestos agroquímicos presentes en las aguas naturales continentales y marinas se ha incrementando preocupantemente. La persistencia y distribución de pesticidas en el medioambiente depende de sus propiedades físico-químicas así como del lugar de aplicación. Después de su aplicación, pueden ocurrir diferentes procesos: volatilización, adsorción en materia orgánica o arcillas, infiltración, degradación química, térmica, microbiológica y fotolítica. A pesar de que la volatilización es un proceso poco probable ya que la mayoría de los pesticidas utilizados en la actualidad tienen presiones de vapor bajas, en USA se ha detectado atrazina, cyanazina y simazina en agua de lluvia en concentraciones  $0.1-1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La mayoría de los pesticidas son resistentes a la degradación química y/o fotoquímica bajo las condiciones típicas medioambientales.<sup>1</sup>

En los últimos años, la comunidad científica ha mostrado un gran interés sobre los posibles efectos adversos que la presencia de esos pesticidas en agua y en los alimentos<sup>2</sup> podría tener sobre la salud humana y sobre el equilibrio de los ecosistemas.<sup>3-7</sup> Entre los efectos crónicos de estos compuestos destacan la carcinogénesis,<sup>8,9</sup> la neurotoxicidad,<sup>10</sup> efectos en la reproducción<sup>11</sup> y efectos sobre el desarrollo de las células, particularmente en los primeros estadios de la vida.<sup>12</sup> Con el incremento de la demanda de productos agrícolas, no parece probable que la situación mejore.

La presencia de pesticidas en el medio ambiente ha forzado a las instituciones oficiales internacionales a establecer niveles de concentración máximos permitidos tanto en el agua de bebida como en los alimentos. Para proteger la calidad del agua potable y de las aguas superficiales, en Europa se realizó una lista donde se recogían aquellos compuestos con un impacto ecológico negativo. En esta lista, directiva 76/464/EEC, estaban incluidos entre otros pesticidas los herbicidas atrazina y simazina. Esta lista se amplió incluyendo pesticidas que se usaban en cantidades superiores a las 50

toneladas/año. En esta nueva lista junto a la atrazina y simazina están cyanazina, prometryn, terbutilazina y terbutryn. En USA a través de la Agencia de protección ambiental (US-EPA), se estableció un listado similar de compuestos basada en la cantidad de pesticida usada (>7000 T), la solubilidad en el agua (>30 mg·L<sup>-1</sup>) y el tiempo de vida media de hidrólisis (>25 semanas). En esta lista se incluyen pesticidas tipo carbamato, que no aparecen en la lista europea aunque son empleados en Holanda, España, Italia y Reino Unido. También se incluyen los productos de transformación de los pesticidas, ya que éstos podrían tener efectos tóxicos. La Unión Europea a través de la directiva 98/83/CE establece una concentración máxima permitida en agua de bebida de 0.1 µg·L<sup>-1</sup> para cada pesticida y 0.5 µg·L<sup>-1</sup> para la suma total de pesticidas, sin tener en cuenta sus características tóxicas específicas. En otros países, USA y Australia, los límites de concentración han sido establecidos teniendo en cuenta las recomendaciones de la Organización Nacional de la Salud (WHO), así para la atrazina, cyanazina y simazina los límites son 3, 9 y 4 µg·L<sup>-1</sup> respectivamente.

Por todo esto, un pesticida ideal sería aquel que presentase una gran selectividad y elevada eficacia, de forma que una dosis pequeña fuese suficiente para ejercer su acción, y se degradase para dar lugar a productos inocuos para el medio.

La situación crítica de estos problemas medioambientales ha provocado la rapidez en el desarrollo de métodos más adecuados para la caracterización y cuantificación de los pesticidas presentes en el medioambiente, métodos que generalmente han sido satisfactorios. Sin embargo, hasta ahora no se han desarrollado métodos completamente eficaces para solucionar el problema de las aguas contaminadas.<sup>13</sup>

#### **14.2. Clasificación de los pesticidas.**

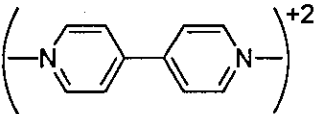
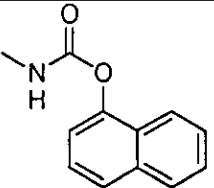
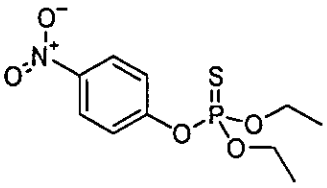
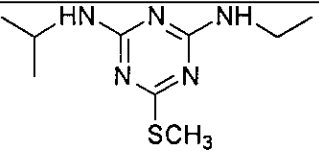
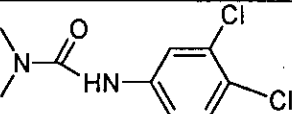
Los pesticidas se pueden clasificar en función de:

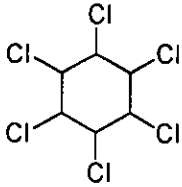
- i) El uso al que esté destinado

Dentro de este grupo podemos distinguir entre: insecticidas, fungicidas, herbicidas y otro grupo que incluye molusquicidas, acaricidas, etc.

ii) El grupo funcional del pesticida

La clasificación según el grupo funcional es bastante extensa pudiendo distinguir hasta 30 tipos de pesticidas en función de la estructura del compuesto. A continuación se muestra un ejemplo de alguno de estos grupos:

Estructura	Ejemplo
Sales de bipyridinio	 <p>Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio cation).</p>
Carbamato	 <p>Carbaryl (1-naftil-metilcarbamato)</p>
Organofosforado	 <p>Parathion (O,O-dietil-O-4-nitrofenil fosforotioato)</p>
s-triazina	 <p>Ametryn (N-etil-N'-isopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina)</p>
Urea	 <p>Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea)</p>

Estructura	Ejemplo
Organoclorado	 <p data-bbox="561 538 1076 572">Lindano (1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano)</p>

iii) Según el modo de acción

Se pueden distinguir dos grandes grupos que son los pesticidas sistémicos y los no sistémicos o de contacto. Un pesticida sistémico es aquel que puede penetrar en la cutícula de un animal o planta y ser transportado por el sistema vascular, de modo que además de un efecto protector, el pesticida presenta un efecto terapéutico, evitando que las plagas ataquen a la planta y exterminando las que se han instalado en ella. Un pesticida de contacto manifiesta una acción protectora que depende en gran medida de las condiciones climáticas. Así por ejemplo, grandes lluvias o prolongada exposición a la radiación solar puede destruirlo, impidiendo que ejerza su acción y acumularlo (o a sus productos) en el medio ambiente. Ello no significa que un pesticida de contacto no pueda ser extraordinariamente eficaz.

**14.3. Herbicidas tipo s-triazina.**

Los herbicidas tipo s-triazina están entre los más conocidos y ampliamente utilizados. Su actividad herbicida fue descubierta en 1952 por J.R. Geygi en Suiza. Actualmente hay 14 herbicidas triazina en uso y algunos antiincrustantes.

La estructura común de estos herbicidas es el anillo 1,3,5-triazina. Las s-triazinas con actividad herbicida son aquellas que tienen grupos cloro, metilío o metóxido. Compuestos en los que se ha sustituido estos grupos por otros átomos de halógeno, o por grupos alquilhalogenados no tienen actividad biológica. Modificaciones en las cadenas laterales N-alquiloamino, además de alteraciones en la actividad biológica, afectan a la velocidad de degradación.<sup>14</sup>



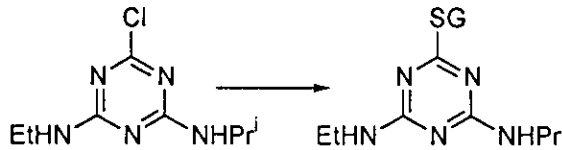
Los herbicidas tipo s-triazina, son compuestos que actúan inhibiendo el transporte electrónico en la fotosíntesis, interviniendo también en otros procesos enzimáticos. Son herbicidas sistémicos selectivos.<sup>14-16</sup>

Estos herbicidas son de uso general (GUP)<sup>1</sup> y no han sido restringidos, excepto la atrazina (6-cloro-*N*-etil-*N'*-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) que ha sido clasificada como un pesticida de uso restringido (RUP)<sup>2</sup> debido a que es un potencial contaminante de las aguas superficiales. Han sido clasificados por la EPA<sup>3</sup> dentro del grupo de Toxicidad III, ligeramente tóxico.<sup>17</sup>

Se usan como herbicidas selectivos en el control de malas hierbas en el cultivo de maíz, caña de azúcar, patatas, y en otros cultivos. También se usan como agente desecante de patatas, etc.<sup>14,15,17</sup>

En el suelo la principal vía de degradación de estos herbicidas es la hidrólisis a derivados 2-hidroxi.<sup>14,15</sup> También tiene lugar la desalquilación y oxidación de las cadenas laterales.<sup>14</sup> Son degradados por microorganismos.<sup>14,15</sup> La vida media de estos herbicidas en suelos varía de 70 a 250 días, dependiendo del tipo de suelo y de las condiciones meteorológicas.<sup>17</sup> La desaparición en el suelo también puede ser debida a la degradación biológica.<sup>14,15,17</sup>

Los principales procesos metabólicos en las plantas de la atrazina son la hidroxilación, la desalquilación, y la conjugación con glutatión.



Esquema 14.1

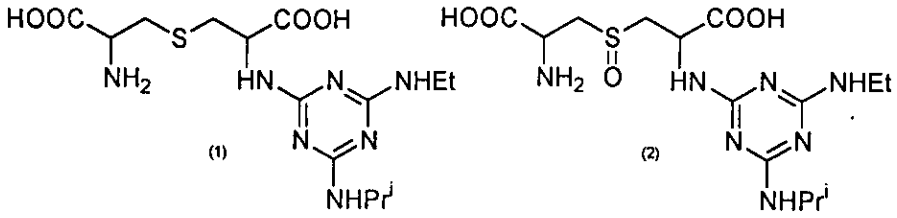
Lamoureux y col. proponen una ruta metabólica compleja que incluye el proceso de conjugación con el glutatión. Entre los metabolitos que identifican están el conjugado lantionine (1), y su derivado S-oxidado (2).<sup>18</sup>

<sup>1</sup> GUP, general use pesticide

<sup>2</sup> RUP, restricted use pesticide

<sup>3</sup> EPA, Environmental Protection Agency

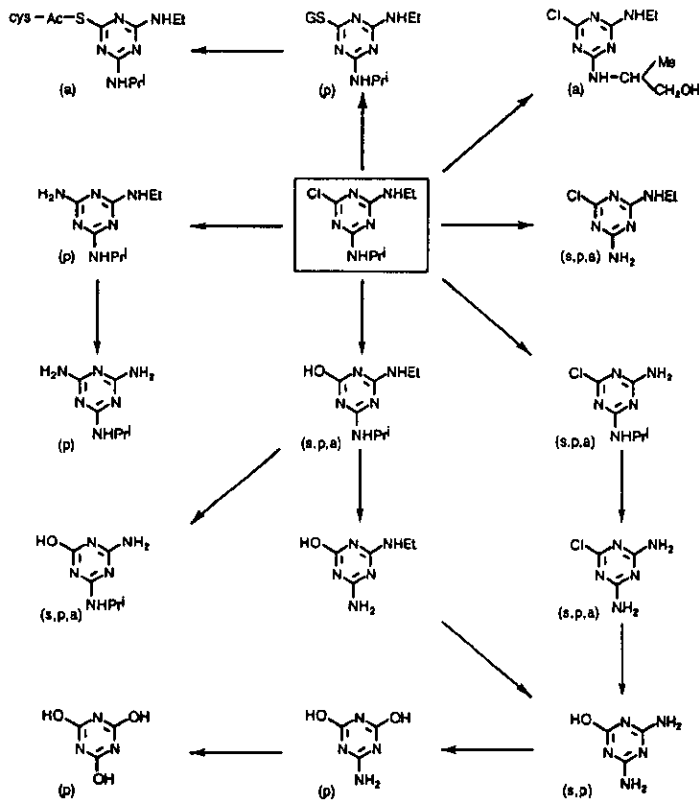
Fotodegradación de herbicidas tipo s-triazina: antecedentes



Esquema 14.2

En mamíferos, la atrazina, es rápida y completamente metabolizada, principalmente mediante desalquilación oxidativa de los grupos amino, y por reacción del átomo de Cl con tioles endógenos.<sup>15</sup> El principal metabolito es la diaminoclorotriazina, que fácilmente se conjuga con glutacion dando lugar a conjugados de cisteína, tioles, sulfuros y disulfuros.<sup>14</sup>

En el siguiente esquema se muestra parcialmente la ruta metabólica de la atrazina en suelos (s), plantas (p) y animales(a).<sup>14</sup>



Esquema 14.3

#### 14.4. Transformación de los pesticidas en el medio ambiente.

Los pesticidas pueden transformarse a través de procesos biológicos y no biológicos, ocurriendo esto tanto durante su aplicación como durante el almacenaje. La mayoría de estos compuestos son relativamente biodegradables y se degradan total o parcialmente para dar lugar normalmente a compuestos inocuos. Sin embargo, en el proceso de degradación, se forman diferentes intermedios que, en las condiciones adecuadas, pueden generar productos tóxicos,<sup>19</sup> Contribuyendo así a la bioactivación y contaminación ambiental. Será importante conocer los procesos de degradación, cómo ocurren, qué productos se forman y cuáles son los factores o agentes que influyen en dicha degradación. Dependiendo del proceso que tenga lugar, los productos de dicha reacción reciben distintos nombres; si los productos son el resultado de una degradación biológica se denominan metabolitos, mientras que si tiene lugar como resultado de la acción de la luz, se conocen como fotoproductos.<sup>19</sup>

Los principales procesos químicos de degradación son reacciones de: oxidación, hidrólisis, reducción, hidratación, conjugación, isomerización y ciclación. Los productos resultantes son, normalmente menos bioactivos que las moléculas de partida, aunque existen muchos casos en los cuales las sustancias resultantes presentan gran bioactividad.<sup>19</sup>

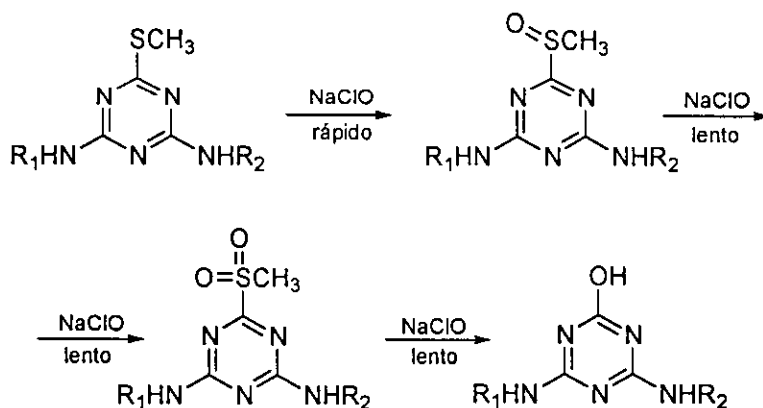
##### 14.4.1. Degradación química.

En la degradación química influye la presencia de distintos compuestos en la matriz ambiental, que reaccionan con los pesticidas dando lugar a su degradación. El ejemplo más habitual es el del agua, que da lugar a muchos casos a la hidrólisis. La atrazina se hidroliza generando la 2-hidroxiatrazina, en medio ácido y alcalino, pero la hidrólisis es muy lenta a pH neutro.<sup>20</sup> Otro ejemplo muy conocido es el caso del cloro acuoso, que da lugar a reacciones de oxidación de los compuestos, esta reacción es empleada en las plantas potabilizadoras de agua.<sup>21,22</sup>

14.4.1.1. Transformación causada por los procesos de potabilización de aguas.

La potabilización de las aguas por cloro acuoso es uno de los procesos más extendidos, ya que a pesar de sus riesgos, es un proceso simple y económico.<sup>13,23-26</sup> Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos orgánicos presentes en el agua, el uso de este tratamiento a través de distintos procesos puede conducir a una gran variedad de productos, constituidos principalmente por derivados clorados; compuestos cuya posible carcinogénesis y/o mutagénesis ha sido suficientemente estudiada.<sup>27-35</sup>

Se estudió la degradación por hipoclorito sódico para las s-triazinas que contienen azufre, prometryn (*N,N'*-diisopropilamino-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina), terbutryn (*N*-(*tert*-butil)-*N'*-etil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina), ametryn (*N*-etil-*N'*-isopropil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) y desmetryn (*N*-isopropil-*N'*-metil-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina).<sup>21,22,36</sup> En las condiciones experimentales ( $T=20^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=8$ , tiempo de reacción=48h y  $[\text{oxidante}] > [\text{s-triazinas}]$ ) la reacción es rápida y da lugar a la formación de tres productos que identifican mediante HPLC-MS: sulfóxido, sulfona y productos de hidrólisis de sulfona. Desde el punto de vista tecnológico estos autores indican que si la desinfección es realizada con HOCl además de actuar como inactivador patógeno, podría oxidar estos pesticidas. Los autores proponen el siguiente mecanismo general para oxidación de estas s-triazinas por HOCl.



Esquema 14.4

Fairhead estudió el efecto de la cloración del agua sobre los herbicidas prometryn y terbutryn,<sup>37</sup> encontrando que la desaparición de prometryn era muy rápida y dependía del pH del medio. El tiempo de vida media varía entre 4 y 10 min con pH entre 7.5 y 9.0. Ambos compuestos se degradan para dar lugar al correspondiente sulfóxido.

#### 14.4.1.2. *Productos de interacción con xenobióticos en agua.*

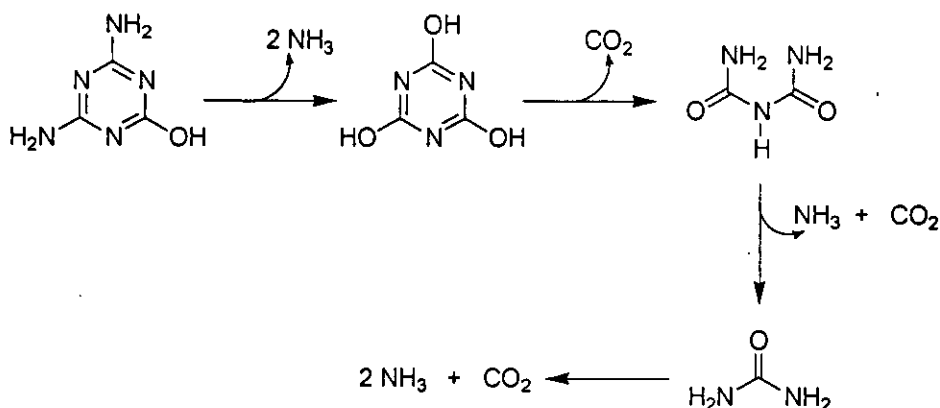
Un ejemplo de este tipo sería la interacción de los pesticidas residuales con compuestos minerales o con productos de oxidación que contienen nitrógeno y que proceden de la degradación biológica de compuestos orgánicos, como es el caso de la presencia de nitritos y nitratos en agua. Estos son transformados por microorganismos, en el suelo o en el tracto digestivo, en ión nitrito que es un importante agente nitrosante. Se ha demostrado la posibilidad de que algunos pesticidas puedan dar lugar a *N*-nitroso compuestos bajo determinadas condiciones químicas. Entre estos pesticidas se encuentran, propoxur (2-isopropoxifenil-*N*-metilcarbamato), carbaryl (1-naftil-metilcarbamato), simazina (6-cloro-*N,N'*-dietil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), atrazina, etc.<sup>38</sup>

#### 14.4.2. *Degradación biológica.*

Dentro de los agentes biológicos, se incluyen los degradadores de los pesticidas que normalmente suelen ser microorganismos.

Un ejemplo de microorganismo biodegradador de pesticidas es el caso de la bacteria *Klebsiella pneumoniae*<sup>39</sup>, que es capaz de mineralizar completamente los pesticidas tipo *s*-triazina. En estos organismos las *s*-triazinas con sustituyentes aminos son desaminados (esquema 1.5) para dar lugar al ácido cianúrico (1,3,5-triazina-2,4,6-triol), el cual es el sustrato de las enzimas ácido cianúrico amidohidrolasa que actúan rompiendo el anillo de la *s*-triazina para dar lugar a la biurea, que es convertida en urea. La urea y el amoníaco formado son utilizados como fuente de nitrógeno para el crecimiento del microorganismo.<sup>39</sup>

### Fotodegradación de herbicidas tipo s-triazina: antecedentes



Esquema 14.5 Metabolismo de un derivado de s-triazina (ammeline) por *K. pneumoniae*.

Existen tres tipos fundamentales de degradación llevada a cabo por los microorganismos:

- i) Co-metabolismo: biotransformación de una molécula de pesticida coincidiendo con las funciones metabólicas normales de los procesos vitales de estos organismos.
- ii) Catabolismo: el pesticida se utiliza como nutriente o fuente de energía.
- iii) Degradación enzimática por parte de microorganismo presentes en el suelo.

#### 14.4.3. Degradación fisicoquímica.

Dentro de los parámetros físicos se encuentran la temperatura y la luz. Por norma general un aumento en la temperatura, provoca un aumento en la velocidad de la degradación, y además hay sustancias que son fotodegradables. Tenemos así dos tipos de procesos, la descomposición térmica y la fotodegradación. La fotólisis de pesticidas es importante en la vegetación, superficie del suelo, agua y atmósfera.<sup>40</sup>

#### 14.5. Mecanismos de fotodegradación de pesticidas.

Actualmente los procesos de oxidación avanzada (AOP) son considerados una importante alternativa al uso de compuestos químicos para la degradación de pesticidas.<sup>41</sup>

Los AOP se basan principalmente en la química del radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ). Es un intermedio muy reactivo en agua, responsable de la oxidación de sustratos orgánicos. Los radicales  $\text{HO}_2^\bullet$  y su base conjugada  $\text{O}_2^{\bullet-}$  también participan en los procesos de degradación, pero son menos reactivos que el radical  $\text{HO}^\bullet$ .<sup>42</sup> El radical hidroxilo reacciona rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos por abstracción de hidrógeno o por adición electrófila sobre dobles enlaces. El nuevo radical reacciona con oxígeno molecular para dar el radical peroxilo, iniciando una secuencia de degradación oxidativa que puede dar lugar a la completa mineralización del pesticida.<sup>43</sup> El radical hidroxilo también puede atacar a anillos aromáticos con posiciones ocupadas por átomos de cloro, generando el derivado fenólico análogo.

La degradación de pesticidas cuyos mecanismos han sido recientemente revisados,<sup>44</sup> es posible a través de diferentes procesos fotoquímicos, los cuales requieren una fuente de radiación artificial (generalmente una lámpara de mercurio de alta presión o una lámpara de Xe) o la radiación solar.<sup>45-48</sup> Si bien la mayoría de estos métodos requieren largos periodos de tratamiento con fotones de alta energía y raramente se alcanza la completa degradación del contaminante. Las reacciones más comúnmente observadas cuando el contaminante es irradiado con radiación UV son la dechloración, sustitución de átomos cloro por grupos hidroxilo y la formación de radicales.<sup>49</sup> Por lo tanto podrían tener lugar *procesos fotoquímicos*, en donde son generadas especies tales como:  $e^-_{ac}$  (proceso de fotoionización), radicales generados mediante homólisis o heterólisis de enlaces, etc, o *procesos fotofísicos*, como fluorescencia, fosforescencia, etc. Alternativamente se podrían utilizar compuestos sensibles a la radiación UV que actúan como iniciadores para dar lugar a procesos de oxidación mediante fotosensibilizadores, que permiten el uso de longitudes de onda que no son absorbidas por los pesticidas.<sup>41</sup>

Dentro de los procesos de oxidación avanzada (AOP) tienen gran eficacia los de fotocatalisis heterogénea.<sup>41</sup> Los procesos heterogéneos emplean suspensiones de semiconductores como catalizador (ej.  $\text{TiO}_2$  / UV,  $\text{ZnO}$  / UV).

Los procesos de oxidación avanzada son reacciones inducidas por radiación, principalmente oxidaciones, que dependen de la generación de

radicales hidroxilo ( $\text{HO}^*$ ) por combinación con oxidantes o semiconductores añadidos.

El óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es el fotocatalizador más utilizado en la destrucción de pesticidas en agua.<sup>50</sup>  $\text{TiO}_2$  es un semiconductor que absorbe radiación a  $\lambda < 385 \text{ nm}$ , con la correspondiente promoción de un electrón desde la banda de valencia a la banda de conducción. Se genera así un poderoso agente oxidante que puede producir el radical hidroxilo en presencia de agua y oxígeno molecular.

El radical hidroxilo ( $\text{HO}^*$ ) también podría ser generado mediante diferentes mecanismos, dando lugar a procesos de fotodegradación inducida mediante el uso de sistemas  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{UV}$ ,  $\text{Fe}^{+3} / \text{UV}$ , etc.

La fotólisis inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  para la detoxificación de aguas residuales contaminadas con pesticidas apenas se utiliza.<sup>51</sup> Una de las razones es que la velocidad de fotólisis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua para dar lugar al radical  $\text{HO}^*$  es óptima para irradiación con longitudes de onda  $\lambda = 210\text{-}230 \text{ nm}$ . La competencia entre compuestos que absorben fotones es muy elevada en la región UV-C en el caso de muestras con aguas residuales, por lo que la velocidad de generación del radical  $\text{HO}^*$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  se reduce. Otra dificultad se encuentra en las fluctuaciones en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El reactivo de Fenton, es una mezcla de peróxido de hidrógeno e iones férricos o ferrosos, y son otra fuente de radicales hidroxilo. En condiciones ácidas (pH 3-5) este reactivo es un fuerte oxidante de compuestos orgánicos.<sup>52,53</sup> La utilización de este reactivo tiene tres ventajas: (1) el radical  $\text{HO}^*$  generado reacciona con compuestos orgánicos con velocidades de reacción altas  $10^7\text{-}10^{10} \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$ . Este radical reacciona con diferentes compuestos tales como: alcoholes, ésteres, tintes, fenoles clorados, pesticidas, etc.<sup>54</sup>; (2) los componentes del reactivo son fácilmente manejables y los productos generados, (agua, oxígeno e hidróxido férrico) no introducen más contaminación; (3) el peróxido de hidrógeno sólo es usado para el tratamiento de aguas residuales para minimizar la demanda química de oxígeno y los costes adicionales de sal ferrosa son bajos, así que este tratamiento es bastante económico. Además el ión ferroso puede ser regenerado electrolíticamente.<sup>55</sup>



Existe abundante bibliografía sobre los productos generados a partir de la fotodegradación de pesticidas. Sin embargo, hay poca información acerca de los mecanismos de reacción a través de los que tiene lugar la fotólisis de los pesticidas bajo típicas condiciones medioambientales.<sup>1</sup> La fotoquímica medioambiental de herbicidas ha sido examinada hace varios años.<sup>56</sup> Recientemente se ha analizado la cinética y mecanismos de fotodegradación de pesticidas tipo clorofenol.<sup>57</sup>

Se puede clasificar los estudios de fotodegradación en cuatro categorías: degradación directa, degradación mediante fotosensibilizadores, degradación fotocatalítica, y degradación mediante reacción con el radical hidroxilo( $\text{HO}^{\bullet}$ ).

#### 14.5.1. Fotodegradación directa.

El sol es la fuente de radiación inductora de las reacciones fotoquímicas más importantes de los sistemas naturales, como la fotosíntesis, la visión, o el control de la concentración de ozono en las capas altas de la atmósfera.

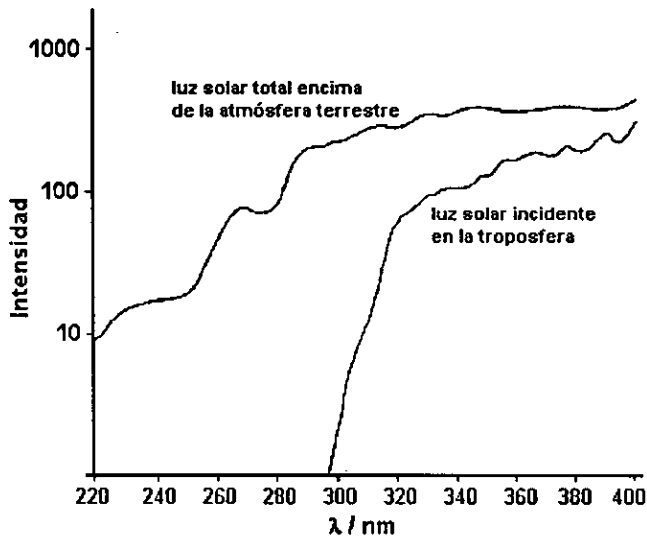


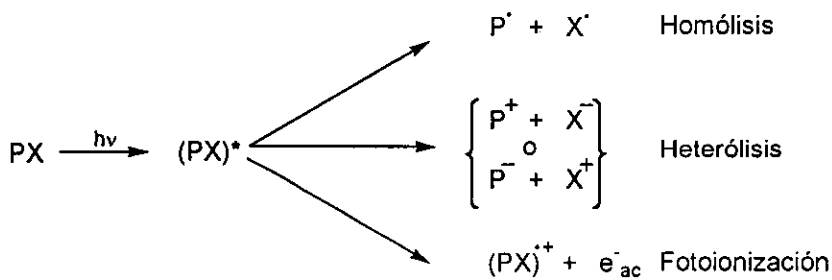
Figura 14.1

El espectro de distribución de la energía solar incidente en la troposfera no presenta radiaciones con longitudes de onda inferiores a 295 nm porque los rayos solares son filtrados por la capa de ozono, que comienza a absorber

fuertemente cerca de 200 nm, alcanzando el máximo a 255 nm y va decreciendo hasta cerca de los 340 nm, y además el oxígeno absorbe para todas las longitudes de onda por debajo de 200 nm.

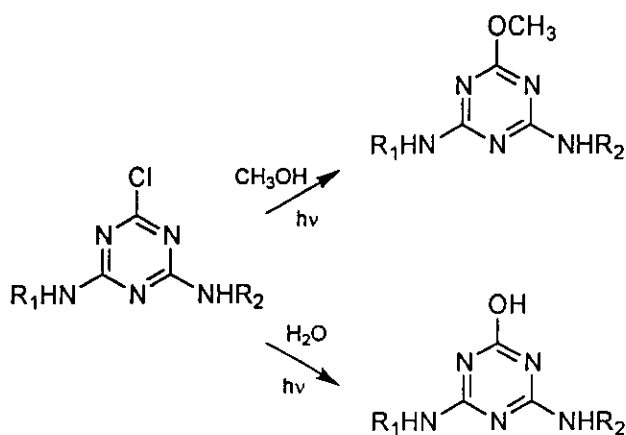
La mayoría de los pesticidas muestran bandas de absorción UV-Vis en la zona del UV lejano. La radiación solar que alcanza la superficie terrestre (principalmente UV-A, y cierta cantidad de radiación UV-B) no contiene radiación en esta región del espectro electromagnético,<sup>58,59</sup> por lo tanto la fotodegradación directa de pesticidas por radiación solar es poco importante o nula. Existen abundantes trabajos de fotodegradación pero mediante técnicas que utilizan radiación estacionaria y/o irradiación láser.

La fotólisis directa de pesticidas implica la generación de estos compuestos en estado excitado, singlete o triplete. Estos estados excitados pueden dar lugar a diferentes procesos de homólisis, heterólisis, o fotoionización, tal y como se indica en el esquema 14.6.



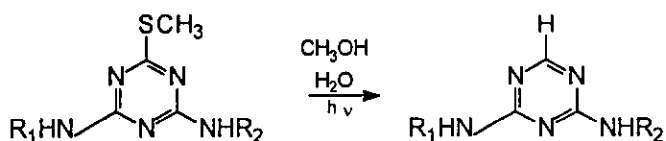
Esquema 14.6 Procesos a través de los cuales puede tener lugar mediante fotólisis directa.

Pape y Zabik estudiaron la fotólisis a 254nm de atrazina, propazina (6-cloro-*N,N'*-diisopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina), simazina, atraton (*N*-etil-*N'*-isopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina), prometon (*N,N'*-diisopropil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina), simeton (*N,N'*-dietil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina), ametryn, prometryn y simetryn (*N,N'*-dietilamino-6-(metilsulfanil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) en agua, metanol, etanol, n-butanol, y benceno.<sup>60</sup> La fotólisis en medio acuoso de atrazina, propazina y simazina da lugar a las correspondientes 2-hidroxi-triazinas, y en metanol genera las correspondientes 2-metoxi-triazinas, etc. Se observaron rendimientos muy altos, próximos al 90%. Sin embargo el atraton, prometon y simeton no pudieron ser fotolizados en ninguno de los disolventes estudiados



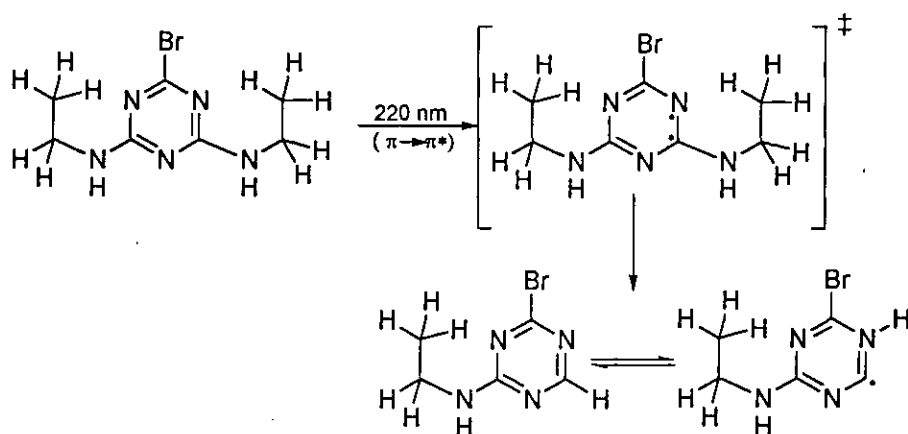
Esquema 14.7

La irradiación de ametryn, prometryn y simetryn en agua y metanol, etanol, etc. da lugar a los 2-H derivados. A longitudes de onda superiores a 300 nm no observaron reacción fotoquímica.



Esquema 14.8

En un trabajo posterior, estos autores estudiaron la fotólisis de 2-fluoro- y 2-bromo-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina en metanol y agua a 254 y 300 nm, siendo los productos mayoritarios los derivados 2-hidroxi y 2-metoxi correspondientes. Como productos resultantes de la fotólisis de 2-azida-4-etilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina en metanol a 254 nm encontraron 2-amino-4-etilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina, 2-amino-4-etilamino-1,3,5-triazina, y 2-azido-4-etilamino-1,3,5-triazina. Estudiaron también la fotólisis a 300-360 nm, de los análogos 2-iodo- de la atrazina, propazina en agua, metanol, etanol y 1-butanol siendo en este caso los productos mayoritarios los correspondientes derivados 2-alcoxi y 2-hidroxi.<sup>61</sup> Estos autores sugieren que la desalquilación de las s-triazinas transcurre a través de un estado de transición cíclico tipo Chugaev (Esquema 14.9)



Esquema 14.9

La atrazina sufre fotodeshalogenación en disolución acuosa, seguida por fotodesalquilación del compuesto hidroxilado para dar lugar a la especie monoalquilada y a la especie desalquilada totalmente.<sup>62</sup>

Se realizó el estudio de la fotodegradación de atrazina, propazina, y simazina mediante microsonda láser usando como radiación de excitación 266 nm.<sup>63</sup> El análisis de los productos de fotodegradación muestra como principal proceso la apertura del anillo con o sin expulsión del cloro.

Larson y col. estudiaron la velocidad de degradación de atrazina, ametryn, prometryn y prometon en agua destilada y en aguas naturales. Utilizaron radiación solar y una lámpara de mercurio como fuentes de irradiación. Para los experimentos realizados en el laboratorio encuentran tiempos de vida media de aproximadamente 25 h cuando utilizan la fuente de irradiación artificial. Estos tiempos de vida media aumentan hasta 39 h cuando se utiliza la radiación solar. Como productos de fotodegradación encontrados fueron los derivados dealquil y un producto de oxidación.<sup>64</sup>

Doré y col. estudiaron las fototransformaciones en disolución acuosa de la atrazina, utilizando 254 nm como radiación de excitación y radiación policromática.<sup>65</sup> Los principales fotoproductos encontrados por fotodegradación mediante radiación UV, identificados por su espectro de masas, fueron hidroxí atrazina, 6-cloro-N-isopropil-2,4-diamino-1,3,5-triazina, 6-cloro-N-etil-2,4-diamino-1,3,5-triazina, ammeline (2-hidroxi-4,6-diamino-1,3,5-triazina), 6-cloro-2,4-diamino-1,3,5-triazina y 6-hidroxi-N-etil-2,4-diamino-1,3,5-triazina. Los autores proponen un complejo mecanismo que incluye oxidación,

desalquilación e hidrólisis. Sugieren también la participación importante de radicales en estos procesos.

Barceló y col. estudiaron la fotodegradación del herbicida propazina en disolución acuosa, simulando la emisión solar.<sup>66</sup> Según estos autores, la principal vía de fotodegradación corresponde a la desalquilación, hidroxilación, y deshalogenación, resultando deisopropilpropazina, hidroxipropazina y los análogos con H en la posición 2 como productos. En este trabajo los autores proponen un mecanismo de fotodegradación.

Se estudió la fotodegradación de cyanazine [2-(4-cloro-6-etilamino-1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-metilpropionitrilo en disolución acuosa sobre la que se hacía pasar una corriente de oxígeno usando una lámpara de mercurio de baja presión que emite monocromáticamente a 254 nm.<sup>67</sup> Los rendimientos cuánticos de fotodegradación se encuentran en un intervalo de 0.05 a 0.10% a temperaturas entre 10 y 40 °C. Como hipótesis acerca del mecanismo de reacción para el proceso de fotodegradación, los autores proponen la existencia de radicales libres en el mecanismo de reacción.

Ha sido estudiado el uso a escala industrial de radiación UV para reducir la cantidad de atrazina presente en el agua de bebida.<sup>68</sup> La eficacia en la eliminación de atrazina depende solamente de la radiación UV incidente. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mejora la fotodegradación, pero se requiere altas dosis de radiación UV. El producto de fotodegradación principal identificado fue la hidroxiatrazina.

Niessner y col. estudiaron la fotodegradación en medio acuoso de atrazina por radiación UV en presencia de O<sub>2</sub> y usando una combinación de O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> en una planta piloto de tratamiento de agua de bebida.<sup>69</sup> La velocidad de fotodegradación no se veía mejorada por ésta última combinación con respecto al O<sub>2</sub>. Sin embargo, experimentos llevados a cabo a gran escala en condiciones reales la degradación de atrazina y desetilatrazina mejoraba con el incremento de la dosis de O<sub>3</sub> y el aumento de la dosis de radiación.

Lai y col. estudiaron la fotodegradación de simazina por radiación UV en presencia y ausencia de O<sub>3</sub>.<sup>70</sup> La desaparición de simazina aumenta con la intensidad de la radiación UV, dando lugar a productos de clorados, mientras la combinación de radiación UV con O<sub>3</sub>, da lugar a la formación de compuestos desalquilados, desaminados, y de clorados.

También se ha estudiado la fotólisis por radiación UV de dos productos de fotodegradación de atrazina, la desetilatrazina y desisopropil atrazina.<sup>51</sup> Se observó una reducción significativa en la velocidad de fotodegradación en la superficie del agua, que los autores atribuyen a la presencia de radicales que actúan como trampa. No realizaron la identificación de los productos de fotólisis.

Se estudió la fotodegradación de disoluciones acuosas tamponadas (pH=7-9) de ametryn, atraton, atrazina, propazina, simazina y terbutilazina (2,4-(*N*-*ter*tbutil-*N*-etil)-diamino-6-cloro-1,3,5-triazina) por irradiación con una lámpara de xenon, conteniendo pequeños porcentajes de acetonitrilo.<sup>71</sup> Determinaron en estas condiciones los rendimientos cuánticos de fotodegradación, obteniendo valores comparables entre ellos. Se analizó la dependencia con la temperatura para la fotodegradación de terbutilazina, lo que les permite estimar la energía de activación del proceso  $\sim 13\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . El rendimiento de fotodegradación obtenido para el atraton es muy bajo  $\sim 0.2\%$ , lo cual indica que en las condiciones de trabajo no hay una fotodegradación importante. Los rendimientos cuánticos obtenidos en acetonitrilo y hexano para la terbutilazina son aproximadamente la mitad del obtenido para la fotodegradación en agua. De los datos obtenidos se puede estimar un tiempo de vida media de estos pesticidas de 39 h a 3 meses bajo la acción de la luz solar.

Se estudió la fotodegradación de terbutilazina 254 nm y con luz solar simulada ( $\lambda > 290$  nm).<sup>72</sup> En pocos minutos se genera el derivado 2-hidroxil correspondiente, para a continuación tener lugar la desalquilación a ammeline (4,6-diamino-2-hidroxi-1,3,5-triazine).

Mansour y col. estudiaron la fotólisis de metamitron (4-amino-6-fenil-3-metil-1,2,4-triazina-5-ona y terbutilazina por radiación UV-Vis a diferentes longitudes de onda en agua y en suspensiones de suelo en agua.<sup>73</sup> Este pesticida metamitron se degrada rápidamente, dando lugar a desaminometamitron, que es mucho más estable. En el caso de la terbutilazina, se observó una mejora en la eficacia de fotodegradación por la presencia de ácidos húmicos, dando lugar a productos de oxidación de cadenas laterales, tales como desetilterbutilazina.

Se estudió la fotodegradación de cinco triazinas insaturadas no comerciales con actividad como pesticidas en medio acuosos, utilizando como fuente de

radiación una lámpara de mercurio.<sup>74</sup> Observaron que la eficacia de la fotodegradación se mejora por la presencia de sustituyentes insaturados.

Albanis y Konstantinou, estudiaron la fotodegradación de atrazina, propazina, y prometryn,<sup>75</sup> encontrando tiempos de vida media de estos compuestos de 1-2 meses en agua y de 1 mes en suelo. La presencia de sustancias húmicas producen la reducción de la velocidad de fotodegradación en agua y un aumento en suelo. Los productos de fotodegradación mayoritarios fueron 2-hidroxi y desalquil derivados.

Se usó una lámpara de mercurio de baja presión para el estudio de la fotodegradación de metribuzin (4-amino-6-*tert*butil-4,5-dihidro-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-ona) en agua.<sup>76</sup> Como fotoproductos principales identificaron desaminometribuzin, dicetometribuzin, y desaminodicetometribuzin, junto a otros seis metabolitos desconocidos resultantes de la fotodegradación sobre las cadenas laterales, alguno de los cuales eran muy estables a la fotólisis. También obtienen a partir de la degradación de las cadenas laterales y por apertura del anillo, ácido monocarboxílico, dicarboxílico y cetocarboxílico.

Mansour y col. estudiaron la fotodegradación de terbutilazina en agua destilada y el suelo usando luz solar simulada ( $\lambda \geq 290$  nm), en presencia y ausencia de ácidos húmicos.<sup>77</sup> El tiempo de vida media en agua, en ausencia o presencia de ácidos húmicos, varía entre 23 h y 8 h respectivamente. El proceso de fotodegradación sigue una ley cinética de pseudorden uno. La principal vía de degradación es la desalquilación, siendo los principales fotoproductos detectados desetilterbutilazina, y desisobutilterbutilazina.

Raschke y col.<sup>76</sup> estudiaron la fotodescomposición de las 4-amino-1,2,4-triazin-3,5-dionas y 4-amino-1,2,4-triazin-tionas en disolución acuosa en presencia de oxígeno y a diferentes valores de pH. En estas condiciones observaron desaminación, descarboxilación y desalquilación. El proceso de desalquilación resultó lento y no selectivo.

Se ha estudiado la degradación de s-triazinas, ametryn, desmetryn, prometryn, y terbutryn mediante fotólisis de destello láser a 193 nm,<sup>78</sup> observando que estos compuestos daban lugar a procesos de fotoionización monofotónicos y con rendimientos cuánticos menores del 10%. No se ha observado fotoionización apreciable usando longitudes de onda mayores.

Comber estudió la fotólisis de atrazina y simazina presente en agua de río a diferentes valores de pH y con distintos contenidos de carbono orgánico disuelto, usando también muestras tamponadas. Utilizó luz artificial mediante tubos fluorescentes ( $300 \text{ nm} < \lambda < 400 \text{ nm}$ ) y luz solar como fuentes de radiación para estudiar la fotólisis.<sup>79</sup> Observó fotodegradación en un amplio intervalo de longitudes de onda en condiciones de pH=4, pero cuando se trabaja en condiciones próximas a pH neutro solamente se produce la fotodegradación a longitudes de onda inferiores a 300 nm. Teniendo en cuenta la velocidad de hidrólisis de estos pesticidas a diferentes valores de pH, el autor estima tiempos de vida media, que van de semanas a años en función del tipo de agua superficial

El Irgarol 1051 (4,6-(*N*-*terc*butil-*N*-ciclopropil)-diamino-2-metiltio-1,3,5-triazina) que se utiliza para el tratamiento de las estructuras de los barcos, es algo estable respecto a la hidrólisis, pero sufre fotodegradación en disolución acuosa por acción de la luz solar,<sup>80</sup> siendo más rápido el proceso en aguas naturales. Se han observado tres fotoproductos principales, dos de ellos eran estables incluso seis meses después de la irradiación.

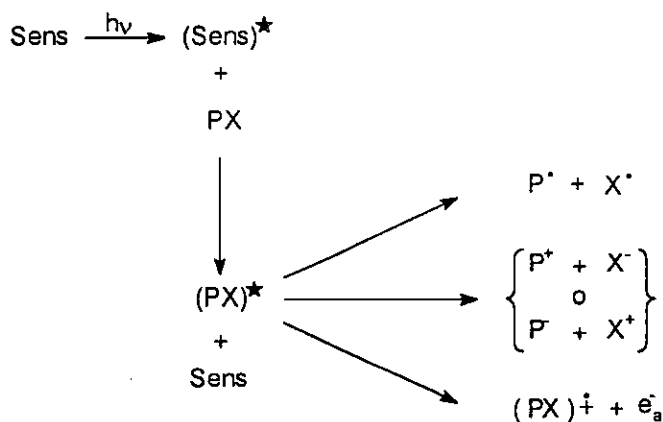
Lin y col. estudiaron el efecto de la luz solar simulada sobre la toxicidad de la atrazina en las aguas superficiales,<sup>81</sup> concluyendo que la toxicidad de los herbicidas se reduce, posiblemente debido a la fotodegradación. La reducción de toxicidad es mayor en el agua de mar que en agua dulce.

Breithaupt y Schwack estudiaron la adición fotoinducida del fungicida anilazine (4,6-dicloro-*N*-(2-clorofenil)-1,3,5-triazina) a ciclohexeno y metil oleato por irradiación con una lámpara halógena.<sup>82</sup> Ambos compuestos olefínicos fueron usados como modelos de los constituyentes olefínicos de las cutículas de las plantas. Este fungicida reacciona con los dobles enlaces *cis* de ambas olefinas. Se propone que la reacción transcurre a través de radicales, siendo el paso inicial la rotura del enlace C-Cl. Se concluye que las reacciones fotoquímicas dentro de la cutícula de la planta pueden dar lugar a la formación de residuos de anilazine ligados a biomoléculas insaturadas.



14.5.2. Degradación mediante el uso de fotosensibilizadores.

Un sistema de fotodegradación consiste en la combinación de sustrato, luz y un agente oxidante en ausencia o presencia de un fotosensibilizador el cual absorbe radiación. Los procesos en los que intervienen los fotosensibilizadores, implican estados excitados del fotosensibilizador. Se transfiere energía desde el estado excitado al pesticida, lo que puede dar lugar a diferentes procesos, tal como sucedía en el caso de la fotodegradación directa (esquema 14.9).



**Esquema 14.10** Procesos a través de los cuales puede tener lugar el proceso de fotólisis en presencia de fotosensibilizadores.

Una ventaja importante de la utilización de fotosensibilizadores es la posibilidad de usar radiación de longitudes de onda mayores que las correspondientes a las bandas de absorción características de los pesticidas.

La acetona (1%) fue usada como fotosensibilizador en el estudio de la fotodegradación de atrazina, atraton, ametryn en agua con radiación a  $\lambda > 290$  nm usando una lámpara de mercurio de presión media.<sup>83</sup> La fotoestabilidad aumenta en el orden ametryn < atrazina < atraton. Los principales fotoproductos en todos los casos fueron los correspondientes de-N-alquil y de-N,N'-dialquil triazinas, e hidroxitriazinas. La observación de dos diferentes de-N-alquil productos sugieren que la de-N-alquilación tiene lugar en dos pasos. Se han obtenido rendimientos más altos para el de-N-etil derivado que para el de-N-isopropil derivado de triazina. La irradiación de ametryn dio lugar también al de-metilíto-ametryn. No se observaron productos en ausencia de radiación

después de 96 h, mostrando que la degradación ocurre exclusivamente debido al proceso iniciado fotoquímicamente.

Los productos de fotooxidación de ametryn, atraton, atrazina, propazina, y simazina han sido estudiados en agua, usando la radiación solar.<sup>84</sup> En este trabajo se utilizaron como fotosensibilizadores azul de metileno, rojo bengala y riboflavina y el mononucleótido flavina. Se obtuvieron como principales productos de fotodegradación desalquil-s-triazinas y otros productos de oxidación, con rendimientos próximos al 60%.

La degradación de atrazina mediante el uso de fotosensibilizadores fue investigada en agua destilada, y en agua de mar sintética que contenía ácidos húmicos, usando radiación solar simulada.<sup>85</sup> El principal fotoproducto encontrado fue la hidroxiatrazina. La velocidad de degradación era mayor en agua de mar, lo que evidencia la degradación de hidroxiatrazina.

Se ha estudiado la fotodegradación de cinco triazinas insaturadas no comerciales pero con actividad como pesticidas en agua conteniendo un 5% de acetona como fotosensibilizador, y usando una lámpara de mercurio como fuente de radiación.<sup>74</sup> La fotodegradación fue más eficaz en presencia de acetona.

Bendig y col. estudiaron la oxidación fotocatalítica mediante el uso de fotosensibilizadores de los herbicidas tipo triazina utilizando la luz solar.<sup>86</sup> Como fotosensibilizador usaron los complejos de Tris(bipiridil)rutenio adsorbidos en TiO<sub>2</sub>. Los autores discuten las necesidades termodinámicas y cinéticas para que tenga lugar el proceso fotosensibilizado. La eficacia de la fotosensibilización parece estar relacionada con la adsorción del fotosensibilizador y de las s-triazinas sobre el TiO<sub>2</sub>.

#### *14.5.3. Degradación fotocatalítica.*

Existen diferentes definiciones para la fotocatalisis<sup>87-89</sup>. Se usará degradación fotocatalítica para referirse a fotoprocesos cíclicos en los cuales los pesticidas son fotodegradados pero se produce la regeneración espontánea del catalizador lo que permite continuar la secuencia indefinidamente hasta que el sustrato, el pesticida, es destruido.

Pelizzetti y col. estudiaron la degradación fotocatalizada por  $\text{TiO}_2$  de atrazina, simazina, trietazina, prometon, y prometryn en disolución acuosa utilizando luz solar simulada para lo que emplearon un lámpara de Xe como fuente de radiación.<sup>90</sup> Todos los pesticidas son rápidamente degradados en estas condiciones, pero no se observó la mineralización completa, identificaron diferentes intermedios, siendo el ácido cianúrico el fotoproducto final común a todos los herbicidas. Se propone el mecanismo para explicar los fotoproductos observados, que incluye al menos tres tipos de reacciones: sustitución del cloro, y de los grupos metiltio y metoxi por el grupo hidroxilo, desalquilación de los grupos alquilamino y finalmente la desaminación con la formación de los derivados hidróxido. Posteriormente estos autores<sup>91</sup> han estudiado la degradación fotocatalizada por  $\text{TiO}_2$  en presencia de especies oxidantes inorgánicas, como  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  y  $\text{KIO}_4$ , observando un aumento de la velocidad de fotodegradación de atrazina y otros contaminantes orgánicos en presencia de éstos; la atrazina se degrada completamente a ácido cianúrico.

En otro trabajo se estudió la mineralización fotocatalizada por  $\text{TiO}_2$  de atrazina, en aguas de origen agrícola y aguas residuales contaminadas.<sup>92</sup> El tiempo de vida media observado fue menor de una hora en presencia de  $\text{TiO}_2$  y en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se comprobó además que la fotodegradación era más eficaz si se realizaba en sistemas cerrados.

Bellobono y col. usaron membranas que contenían el fotocatalizador  $\text{TiO}_2$  inmovilizado (30% peso) para estudiar la fotomineralización de atrazina en disoluciones saturadas con ozono.<sup>93</sup> Observaron que si junto a este fotocatalizador usaban  $\mu$ -peroxo-bis[*N,N'*-etilen-bis(salicildeneiminato) dimetiformamida cobalto (III)] y una mezcla de tri-(*t*-butil)- y tri-(*i*-propil)vanadato (V) la velocidad de fotomineralización aumentaba 1.5 y 10 veces respectivamente.

La fotodegradación de prometryn y prometon ha sido seguida en disolución acuosa utilizando membranas que contienen  $\text{TiO}_2$ , y usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como fuente de oxígeno.<sup>94</sup> Las reacciones estudiadas se siguieron en condiciones de pseudoorden uno. Los rendimientos de fotodegradación fueron más bien altos, 40% para el prometryn y 66% para el prometon. El ácido cianúrico fue encontrado como producto fotoestable.

La fotodegradación con radiación UV de disoluciones acuosas ácidas (pH=2.4) de atrazina fue estudiada en presencia de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{Na}_4\text{W}_{10}\text{O}_{32}$ .<sup>95</sup> Ambas catálisis son eficaces, aumentando notablemente la velocidad de fotodegradación. El mecanismo de fotodegradación varía dependiendo del catalizador. Los autores sugieren que en presencia de  $\text{TiO}_2$  la especie oxidante es el  $\text{HO}^\bullet$ , mientras que en el caso del  $\text{Na}_4\text{W}_{10}\text{O}_{32}$  tiene lugar la abstracción de  $\text{H}^\bullet$  de las cadenas alquílicas laterales de la atrazina y la deshalogenación por transferencia electrónica en los metabolitos desalquilados. Ninguno de estos catalizadores es capaz de mineralizar el anillo aromático de la atrazina.

Héquet y col. muestran que los complejos porfirina y ftalocianina, usados como fotocatalizadores para la degradación de atrazina eran capaces de romper el anillo de triazina más eficazmente que el  $\text{TiO}_2$ .<sup>96</sup> El mejor tiempo de vida media encontrado para la fotodegradación fue de aproximadamente 200 min, usando como fotocatalizador ftalocianina de hierro e irradiando con lámpara de mercurio de baja presión.

#### 14.5.4. Degradación por reacción con el radical hidroxil ( $\text{HO}^\bullet$ ).

Alguno de los más frecuentes métodos de oxidación avanzados incluyen moléculas que por fotólisis generan el radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ). Esto se puede llevar a cabo de diferentes maneras,

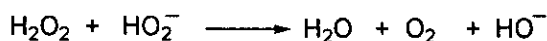
##### i) Fotólisis de $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El mecanismo más comúnmente aceptado para la fotólisis del  $\text{H}_2\text{O}_2$  es la rotura de la molécula en radicales hidroxilo con un rendimiento cuántico de dos  $\text{HO}^\bullet$  formados por cada cuanto de radiación absorbido.



$\phi(\text{HO}^\bullet)=0.98$  a 254 nm ( $\epsilon=18.6 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{cm}^{-1}$ ).<sup>41</sup>

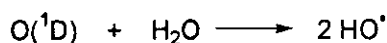
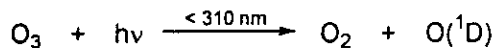
Por otro lado el peróxido de hidrógeno se dismuta con velocidad máxima al pH de su valor de  $\text{pK}_a$  (11.6).



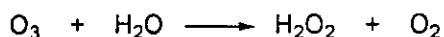
##### ii) Fotólisis de $\text{O}_3$ .

Existen numerosos trabajos en donde se estudia la descomposición de ozono por radiación en sistemas acuosos. Se ha propuesto un proceso en dos

etapas que suponen la homólisis de O<sub>3</sub> inducida por radiación y la producción de radicales HO<sup>•</sup> por reacción de oxígeno singlete (O<sup>1</sup>D) formado, que reacciona con agua.

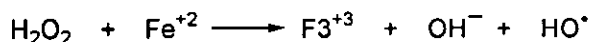


Sin embargo también se ha observado que la fotólisis de ozono disuelto en agua da lugar a la producción de peróxido de hidrógeno, en una secuencia de reacciones en donde los radicales hidroxilo no escapan de la jaula de disolvente.

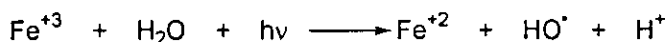


iii) Fotólisis de una disolución acuosa de Fe<sup>+3</sup>, generándose por oxidación de Fe<sup>+2</sup> por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reactivo de Fenton).

El sistema Fenton es una mezcla de sal ferrosa y peróxido de hidrógeno. El ión ferroso reacciona con peróxido de hidrógeno y produce radical hidroxilo, ión férrico e ión hidróxido.



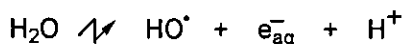
En agua, los cationes férricos hidratados son fotorreducidos generando radical HO<sup>•</sup>, siendo este proceso favorecido por el complejo Fe(OH)<sup>2+</sup> que predomina en condiciones ácidas.



iv) Radiólisis del agua.

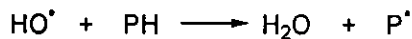
La técnica de radiólisis de pulso es un poderoso método para la generación de radicales y el estudio de sus reacciones en disolución, incluyendo radicales libres orgánicos e inorgánicos e iones metálicos en estados de oxidación inusuales.

Esta técnica se utiliza frecuentemente con disoluciones acuosas diluidas, donde la energía es principalmente empleada en la producción de especies reactivas derivadas del agua, electrón solvatado e<sub>ac</sub><sup>-</sup>, radical hidroxilo HO<sup>•</sup> y átomos de hidrógeno H<sup>•</sup>.



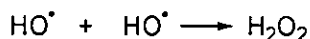
El radical HO<sup>•</sup> generado por cualquiera de estas vías en presencia de compuestos orgánicos puede reaccionar :

- i) Por abstracción de H<sup>•</sup>.

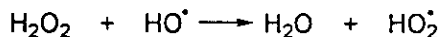


- ii) Reacciones radical-radical.

La elevada concentración local de radicales hidroxilo hace que pueda dimerizar rápidamente dando lugar a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

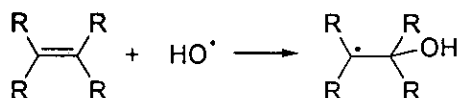


Si se trabaja en exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, los radicales hidroxilo pueden generar radicales hidroxiperoxilo, que son menos reactivos y no contribuyen a la degradación oxidativa de los sustratos orgánicos. La concentración de HO<sub>2</sub><sup>•</sup> se regula con el pH del medio de reacción, es decir, se controla la eficacia de la dismutación del superóxido.



- iii) Adición electrofílica.

La adición electrofílica de radicales HO<sup>•</sup> a sistemas π, da lugar a la formación de radicales orgánicos



- iv) Transferencia electrónica.

La reducción de los radicales hidroxilo a anión hidróxido por un sustrato orgánico es de particular interés en el caso donde la abstracción de hidrógeno o la adición electrofílica son reacciones desfavorables, por ejemplo por la halogenación múltiple o debido a efectos estéricos.



Larson y col. estudiaron la velocidad de degradación de atrazina, ametryn, prometryn y prometon en agua destilada y en aguas naturales en ausencia y presencia de perclorato y sulfato férrico. Utilizaron la radiación solar y una lámpara de mercurio como fuentes de irradiación. Al añadir estas sales de hierro la velocidad de desaparición de las s-triazinas aumenta de una forma notable, así para una concentración de perclorato férrico 0.26 mM el tiempo de

vida media de la atrazina disminuye tres ordenes de magnitud, desde 1500 min ( $k \sim 4.6 \cdot 10^4 \text{ min}^{-1}$ ) hasta aproximadamente 1 min ( $k \sim 0.51 \text{ min}^{-1}$ ) en agua destilada. Estos autores atribuyen la desaparición de las s-triazinas a la reacción de estas con el  $\text{HO}^\bullet$  generado en la fotorreacción del complejo  $\text{Fe}(\text{OH})^{+2}$ . En aguas naturales el tiempo de vida media aumenta hasta 900 min debido a la presencia de compuestos presentes en el agua, tales como materia orgánica y/o ion carbonato que actúan como scavengers del  $\text{HO}^\bullet$ .<sup>64</sup>

Haag y Yao midieron las constantes de velocidad para la reacción del radical  $\text{HO}^\bullet$  con diferentes aguas de bebida contaminadas, con atrazina y simazina.<sup>54</sup> Se usaron diferentes métodos para la generación de este radical, entre ellos el método foto-Fenton que fue utilizado con ambos componentes. Las velocidades encontradas fueron  $(2.6 \pm 0.4) \cdot 10^9$  y  $(2.8 \pm 0.2) \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  respectivamente.

Cernák y Cernáková estudiaron la aplicación de la combinación  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{UV}$  para la eliminación de atrazina, prometryn, terbutilazina, y terbutryn.<sup>97</sup> Encontrando el máximo de degradación en los primeros cinco minutos, mayores exposiciones a la radiación UV fueron ineficaces.

Se realizó una comparación entre la oxidación fotoquímica de atrazina usando la combinación  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{UV}$  y otros métodos avanzados de oxidación.<sup>98</sup> Se utilizó una radiación monocromática emitiendo a 254 nm como fuente de radiación. Los fotoproductos mayoritarios encontrados para la fotooxidación fueron hidroxiatrazina, *N* y *N,N'*-desalquilado, deaminado y hidroxiderivados de atrazina.

Se estudió la fotólisis de dos productos de la fotodegradación de atrazina, desetilatrizina y deisopropilatrizina usando la combinación  $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{UV}$ .<sup>51</sup> Se observaron significativas reducciones de la velocidad de fotodegradación en las aguas superficiales, lo que los autores atribuyen a la presencia de radicales que actúan como trampa.

Hapeman y col. examinaron la fotólisis de atrazina directa e indirecta, usando nitratos como precursores de radical  $\text{HO}^\bullet$ .<sup>99</sup> El radical  $\text{HO}^\bullet$  se generaba por irradiación de disoluciones de nitrato con radiación de 290 nm usando una lámpara de Xe. Los productos encontrados fueron 20% de 6-amino-2-cloro-4-isopropilamino-s-triazina, 10% 6-amino-2-cloro-4-etilamino-s-triazina, 6% 4-

acetamida-2-cloro-6-isopropilamina-s-triazina, 3% 4-acetamida-2-cloro-6-etilamino-s-triazina, 16% clorodiamino-s-triazina y 3% de hidroxí atrazina, para el 87% de conversión de atrazina. Las constantes de velocidad fueron  $(4.0 \pm 0.6) \cdot 10^{-3}$  y  $(2.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  para la fotólisis directa e indirecta respectivamente.

El estudio de los modelos de reacción de fotooxidación de metribuzin (4-amino-6-*tert*butil-3-metiltio-1,2,4-triazina-5(4H)-ona) en agua usando la radiación UV de una lámpara de mercurio muestran un pronunciado efecto del oxígeno en la velocidad de degradación, con una influencia menor de la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>100</sup> Los autores sugieren que el proceso se inicia a partir de la reacción del metribuzin en estado excitado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  u  $\text{O}_2$ .

La degradación de atrazina mediante el proceso foto-Fenton, fue estudiada en agua usando radiación entre 330-400 nm.<sup>101</sup> Según los autores, la irradiación a estas longitudes de onda no aumenta la degradación del herbicida. Los principales caminos de reacción para la degradación de atrazina fueron la *N*-desalquilación y la decloración.

Huston et al. estudiaron la degradación mediante el sistema foto-Fenton ( $\text{Fe(III)/H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ;  $300 < \lambda < 400 \text{ nm}$ ) de distintos pesticidas, entre ellos las s-triazinas atrazina y simazina, y los pesticidas alaclor, aldicarb, carbofuran, etc. Mientras estos últimos se mineralizan completamente, las s-triazinas se degradan para dar lugar al ácido cianúrico como producto final; identifican como productos intermedios desalquil y decloro derivados.<sup>102</sup>

Bellobono y col. usaron cinéticas competitivas para obtener las constantes de velocidad para la reacción de ametryn, atrazina, propazina, y prometryn con radicales  $\text{HO}^\bullet$  a  $\text{pH}=7.0$  sobre membranas fotocatalíticas,<sup>103</sup> en presencia y ausencia de trialquil vanadatos como promotores fotocatalíticos de  $\text{TiO}_2$  inmovilizado. Las constantes de velocidad obtenidas son  $k(\text{triazina}+\text{HO}^\bullet)=1.5 \cdot 10^{10}$ ,  $0.95 \cdot 10^{10}$ ,  $1.1 \cdot 10^{10}$  y  $1.3 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , respectivamente para ametryn, atrazina, propazin, y prometryn. Los autores señalan que la presencia del grupo metiltio en la posición 6 (ametryn, prometryn) en vez del cloro (atrazina, propazina) parece inducir una mayor reactividad.



La reactividad del radical HO<sup>•</sup> ha sido estudiada respecto a la simazina y terbutilazina absorbidas sobre una dispersión sobre una capa fina de polvo de dióxido de silicio, usado como portador no reactivo.<sup>104</sup> Los radicales HO<sup>•</sup> fueron generados por fotólisis de peróxido de hidrógeno en fase gas usando como fuente de radiación una lámpara de UV. Las velocidades de degradación observados para simazina y terbutilazina siguen una ley cinética de pseudoorden uno y tienen valores similares.

Von Gunten y col. recientemente han revisado la degradación de atrazina por reacción con HO<sup>•</sup> en procesos de oxidación avanzada, identificando como principales productos de degradación: 6-amino-2-cloro-4-isopropilamino-1,3,5-triazina, 6-amino-2-cloro-4-etilamino-1,3,5-triazina, 4-acetamida-2-cloro-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, 4-acetamida-6-amino-2-cloro-1,3,5-triazina, clorodiamina-1,3,5-triazina, 2-cloro-4-etilimino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, 6-amino-2-cloro-4-etilimino-1,3,5-triazina.<sup>105</sup> La constante de velocidad para la reacción entre atrazina y HO<sup>•</sup> tiene un valor de  $3 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , aproximadamente tres veces mas alta que la obtenida para los diferentes productos de fotodegradación. El ataque de HO<sup>•</sup> sobre el grupo etilo estaba favorecido respecto al ataque sobre el grupo isopropilo.

Peñuela y col. han hecho un estudio comparativo de la fotodegradación de atrazina y desetilatrastina en disolución acuosa (agua desionizada y aguas naturales superficiales) mediante TiO<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y FeCl<sub>3</sub> / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y fotólisis. Las muestras fueron irradiadas usando una lámpara de xenon y radiación solar. Estas dos triazinas no se degradan cuando las muestras son preparadas en agua ionizada y son irradiadas por radiación solar; en aguas naturales se observa un ligero aumento de la fotodegradación debido a la presencia de iones nitrato que favorecen la fotólisis. La atrazina se degrada más rápidamente que la desetilatrastina cuando se usa FeCl<sub>3</sub> tanto si se irradia la muestra con la lámpara de Xe como si se usa la radiación solar. Este estudio muestra que la desetilatrastina es más estable que la atrazina.<sup>106</sup>

#### 14.6. Bibliografía.

- (1) *Environmental Chemistry of Herbicides*; Grover, R.; Cessna, A. J., Eds.; CRC Press: Boca Raton (Florida), 1991; Vol. II.
- (2) Cabras, P.; Angioni, A. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 967-973.
- (3) Hodgson, E.; Levi, P. E. *Environmental Health Perspectives.* **1996**, *104*, suppl. 1, 97-106.
- (4) Drevenkar, V.; Fingler, S.; Fröbe, Z. In *Chemical Safety. International Reference Manual*; Richardson, M., Ed.; VCH: Weinheim, 1994, p 297-310.
- (5) Foster, S. S. D.; Chilton, P. J.; Stuart, M. E. *J. IWEM* **1991**, *5*, 186-193.
- (6) Wilcock, B.; Fox, M. *Soil & Water.* **1987**, 18-21.
- (7) Faust, S. D.; Aly, O. M. *J. Am. Wat. Works. Assoc.* **1964**, *56*, 267-279.
- (8) Blair, A.; Malke, H.; Cantor, K.; Burmeister, L.; Wiklund, K. *Scand. J. Work Environ. Health* **1985**, *11*, 397.
- (9) Blair, A.; Dosemeci, M.; Heineman, E. F. *Am. J. Ind. Med.* **1993**, *23*, 729.
- (10) Tanner, R. W.; Laangston, J. W. *Neurology* **1990**, *40*, 17.
- (11) Hileman, B. *Chem. Eng. News* **1994**, 19.
- (12) Gray, L. E.; Ostby, J. S.; Kelcee, W. R. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1994**, *129*, 46.
- (13) Bryant, E. A.; Fulton, G. P.; Budd, G. C. *Disinfection Alternatives for Safe Drinking Water*, Van Nostrand Reinhold: New York (U.S.A.), 1992.
- (14) *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*; Roberts, T.; Hutson, D. H.; Lee, P. W.; Nicholls, P. H.; Plimmer, J. R., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998; Vol. 1.
- (15) *The Pesticide Manual*; 10th ed.; Tomlin, C., Ed.; British Crop Protection Council, The Royal Society of Chemistry: Surrey, 1995.
- (16) Ashton, F. M.; Crafts, A. S. *Mode of Action of Herbicides*; Wiley: New York, 1973.

- (17) University of California, D., Oregon State University, Michigan State University, Cornell University, and University of Idaho.; USDA/Extension Service/ National Agricultural Pesticide Impact Assessment Program; Vol. 2001.
- (18) Lamoureux, G. L.; Simoneaux, B.; Larson, J. *ACS Symp. Ser. 1998*, **683**(*Triazine Herbicides: Risk assessment*).
- (19) *Pesticide Transformation Products. Fate and Significance in the Environment*, Somasundaram, L.; Coats, J. R., Eds.; American Chemical Society: Washington, D.C. (U.S.A.), 1991; Vol. 459.
- (20) Chan, G. Y. S.; Hudson, M. J.; Isaacs, N. S. *J. Phys. Org. Chem. 1992*, **5**, 600-608.
- (21) Mascolo, G.; López, A.; Passino, R.; Ricco, G.; Tiravanti, G. *W. Res. 1994*, **28**, 2499-2506.
- (22) López, A.; Mascolo, G.; Tiravanti, G.; Santori, M.; Passino, R. *Wat. Sci. Tech. 1994*, **30**, 53-59.
- (23) Miller, S. *Environ. Sci. Technol. 1993*, **27**, 2292.
- (24) Newman, A. *Environ. Sci. Technol. 1993*, **2**, 2295.
- (25) Fleming, B. *Pulp & Paper 1991*, 115.
- (26) Brown, J.; Jones, F.; Beattie, S. P.; Godfree, A. F. *Water Services 1990*, 15.
- (27) Cantor, K. P. *Cancer Causes Control 1997*, **8**, 292-308.
- (28) Frazén, R.; Kronberg, L. *Environ. Sci. Technol. 1994*, **28**, 2222.
- (29) Eder, E.; Weinfurter, E. *Chemosphere. 1994*, **29**, 2455-2466.
- (30) Owusu-Yaw, J.; Wheeler, W. B.; Wei, C. I. In *Water Chlorination. Environmental Impact and Health Effects*; Lewis Publishers, Inc.: Chelsea (U.S.A.), 1990; Vol. 6, p 179.
- (31) Thomas, E. L.; Jefferson, M. M.; Bennett, J. J.; Learn, D. B. *Mutat. Res 1987*, **188**, 35.
- (32) Sen, A. C.; Owusu-Yaw, J.; Wheeler, W. B.; Wei, C. I. *J. Food Sci. 1989*, **54**, 1057.
- (33) Masri, M. S. *Food Chem. Toxicol. 1985*, **24**, 923.
- (34) Bull, R. J.; McCabe, L. J. In *Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects*; Lewis Publishers, Inc.: Chelsea (U.S.A.), 1985; Vol. 5, p 111.

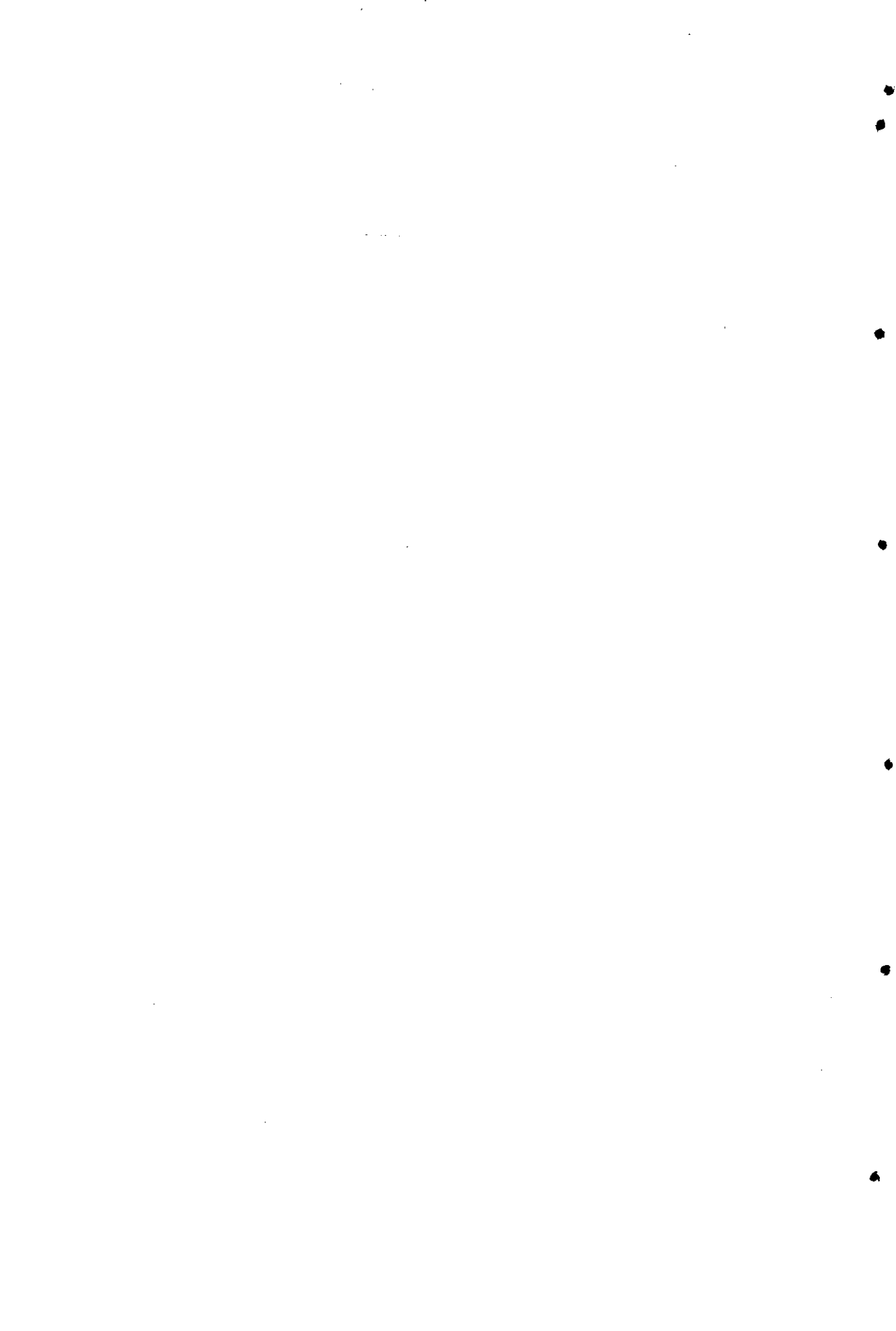
- (35) Bull, R. J.; Bimbaum, L. S.; Cantor, K. P.; Rose, J. B.; Butterworth, B. E.; Pegram, R.; Tuomisto, J. J. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1995**, *28*, 155-166.
- (36) Mascolo, G.; López, A.; Földényi, R.; Passino, R.; Tiravanti, G. *Environmental Science & Technology.* **1995**, *29*, 2987-2991.
- (37) Fairhead, A. P. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management.* **1994**, *8*, 399-401.
- (38) Cova, D.; Molinari, G. P.; Rossini, L. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **1990**, *20*, 234-240.
- (39) Karns, J. S.; Eaton, R. W. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1017-1022.
- (40) Matsumura, F. 1985.
- (41) Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 671-98.
- (42) Bielski, B. H. J.; Cabelli, D. E.; Arudi, R. J. L.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1985**, *14*.
- (43) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Rosss, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513-886.
- (44) Burrows, H. D.; Canle L., M.; Santaballa, J. A.; Steenken, S. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **2002**, *67*, 71-108.
- (45) Gehr, R.; Wright, H. *Wat. Sci. Tech.* **1998**, *38*, 15-23.
- (46) Foster, D. M.; Rachwal, A. J.; White, S. L. *J. Inst. Water Env. Manag.* **1991**, *5*, 466-477.
- (47) Blatchley, E. R.; Do-Quang, Z.; Janex, M. L.; Laîne, J. M. *Wat. Sci. Tech* **1998**, *38*, 63-69.
- (48) Lazarova, V.; Janex, M. L.; Fiksdal, L.; Oberg, C.; Barcina, I.; Pommeuy, M. *Wat. Sci. Tech.* **1998**, *38*, 1096-117.
- (49) Chiron, S.; Fernández-Alba, A.; Rodríguez, A.; García-Calvo, E. *Wat. Res.* **2000**, *34*, No2.
- (50) Tinucci, T.; Borgarello, E.; Minero, C.; Pelizzetti, E.; Ollis, D. F., Ekabi, H. A., Eds.; Elsevier: 1993, p 585.
- (51) Beltrán, F. J.; González, M.; Rivas, F. J.; Álvarez, P. *Environ. Toxicol. Chem.* **1996**, *15*.
- (52) Ruppert, G.; Bauer, R. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **1993**, *73*.

- (53) Zepp, G. R.; Faust, B. C.; Hoign, J. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*.
- (54) Haag, W. R.; Yao, C. C. D. *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*.
- (55) Casero, I.; Sicilia, D.; Rubio, S.; Bendito, D. P. *Wat. Res.* **1997**, *31*, No. 8., 1985-1995.
- (56) Marcheterre, L.; Choudhry, G. G.; Webster, G. R. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **1988**, *103*, 61-126.
- (57) Burrows, H. D.; Ernestova, L. S.; Kemp, T. J.; Skurlatov, Y. I.; Purmal, A. P.; Yermakov, A. N. *Prog. React. Kinet.* **1998**, *23*, 145-207.
- (58) Krupa, S. V.; Kickert, R. N.; Jäger, H. J. *Elevated ultraviolet (UV)-B radiation and agriculture*; Springer-Verlag: Berlin, 1998.
- (59) Murov, S. L.; Carmichael, I.; Hug, G. L. *Handbook of Photochemistry*; 2nd ed.; Marcell Dekker, Inc.: New York, 1993.
- (60) Pape, B. E.; Zabik, M. J. *J. Agr. Food Chem.* **1970**, *18*, 202-207.
- (61) Pape, B. E.; Zabik, M. J. *J. Agr. Food Chem.* **1972**, *20*, 316-319.
- (62) Crosby, D. G. In *Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action*; Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1976; Vol. 2, p 825-890.
- (63) Giardini-Guidoni, A.; Mele, A.; Pizzela, G.; Teghil, R. *Organic Mass Spectrometry* **1991**, *26*, 779-785.
- (64) Larson, R. A.; Schlauch, M. B.; Marley, K. A. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 2057-2062.
- (65) Brun, O. L.; Merlet, N.; Croue, J. P.; Doré, M. *Sciences et techniques de l'eau* **1993**, *26*, 97-101.
- (66) Barceló, D.; Durand, G.; Bertrand, N. d.; Albaigés, J. *The Science of the Total Environment.* **1993**, *132*, 283-296.
- (67) Benítez, F. J.; Beltrán-Heredia, J.; González, T. *Ozone Sci. & Eng.* **1994**, *16*, 213-234.
- (68) Bourguine, F. P.; Chapman, J. I.; Kerai, H.; Duval, J. L.; Green, J. G.; Hamilton, D. *Journal of the Chartered Institution of Water and Environmental Management* **1995**, *9*, 417-423.
- (69) Zwiener, C.; Weil, L.; Niessner, R. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1995**, *58*, 247-264.

- (70) Lai, M.-S.; Jensen, J. N.; Weber, A. S. *Water Environment Research* **1995**, *67*, 340-346.
- (71) Palm, W. U.; Zetzsch, C. *Intern. J. Anal. Chem.* **1996**, *65*, 313-329.
- (72) Sanlaville, Y.; Schmitt, P.; Mansour, M.; Meallier, P. *Fresenius Envir. Bull.* **1997**, *6*, 418-424.
- (73) Mansour, M.; Feicht, E. A.; Behechti, A.; Scheunert, I. *Chemosphere* **1997**, *35*, 39-50.
- (74) Korte, F.; Kostantinova, T.; Mansour, M.; Ilieva, P.; Bogdanova, A. *Chemosphere* **1997**, *35*, 51-54.
- (75) Albanis, T. A.; Konstantinou, I. K. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1998**, *217*, U82.
- (76) Raschke, U.; Werner, G.; Wilde, H.; Stottmeister., U. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1998**, *115*, 191-197.
- (77) Mountacer, H.; Ferhat, M.; Mansour, M. *Fresenius Envir. Bull.* **1998**, *7*, 670-677.
- (78) Canle L., M.; Fernández, M. I.; Santaballa, J. A.; Steenken, S. In *Electronic Conference on Heterocyclic Chemistry*; Rzepa, H. S., Kappe, O., Eds.; Imperial College Press: 1998.
- (79) Comber, S. D. W. *Pestic. Sci.* **1999**, *55*, 696-702.
- (80) Okamura, H.; Aoyama, I.; Liu, D.; Maguire, J.; Pacepavicius, G. J.; Lau, Y. L. *J. Environ. Sci. Health* **1999**, *B34*, 225-238.
- (81) Lin, Y. J.; Karuppiyah, M.; Shaw, A.; Gupta, G. *Ecotoxicol. Env. Safety* **1999**, *43*.
- (82) Breithaupt, D. E.; Schwack, W. *Chemosphere* **2000**, *41*, 1401-1406.
- (83) Burkhard, N.; Guth, J. A. *Pestic. Sci.* **1976**, *7*, 65-71.
- (84) Rejto, M.; Saltzman, S.; Acher, A. J.; Muszkat, L. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 138-142.
- (85) Durand, G.; Barceló, D.; Albaigés, J.; Mansour, M. *Chromatographia* **1990**, *29*, 120-124.
- (86) Lobedank, J.; Bellmann, E.; Bendig, J. J. *Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **1997**, *108*, 89-93.
- (87) Kisch, H.; Hennig, H. *EPA Newsletter* **1983**, *20*.

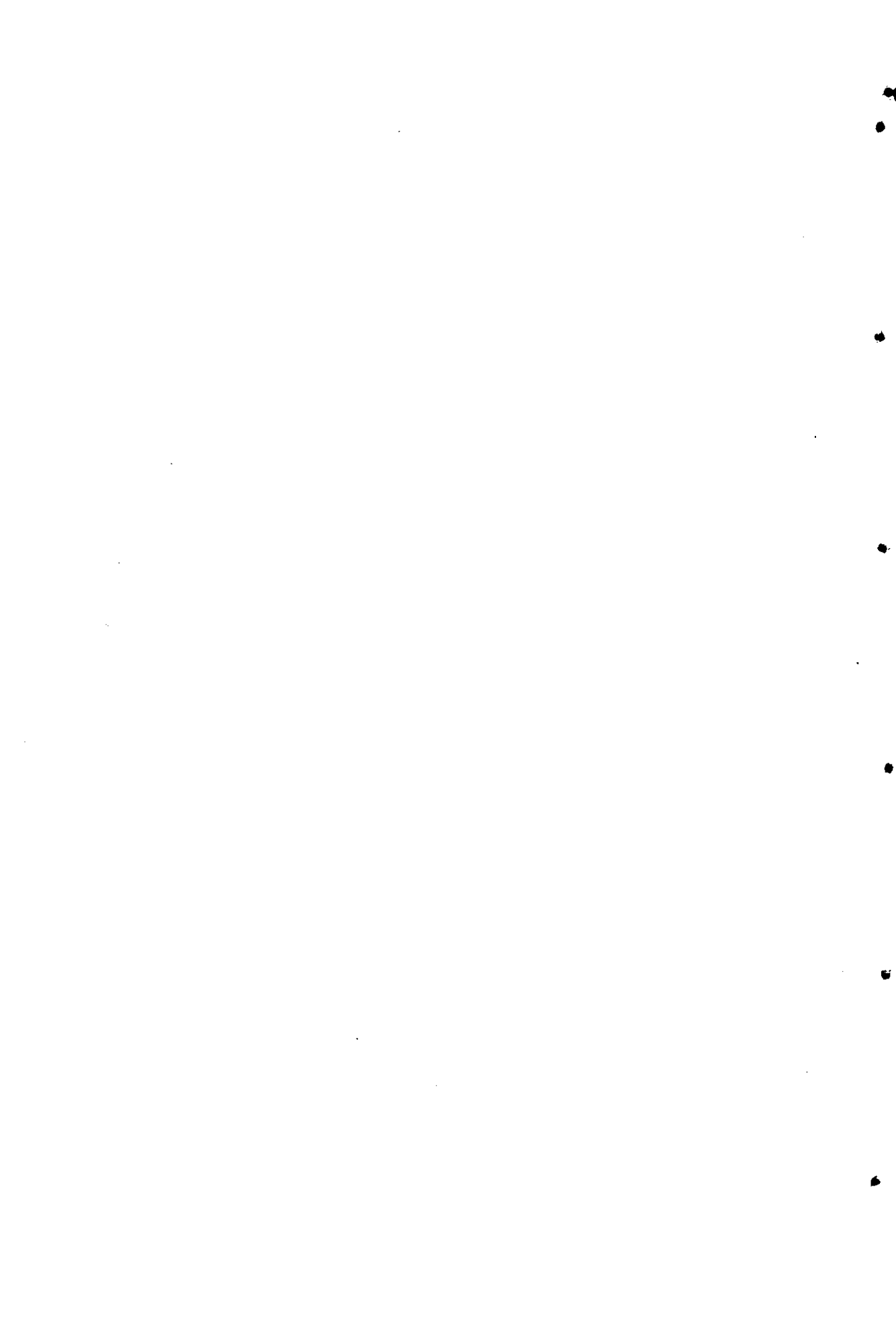
Parte II - Fotodegradación

- (88) Mirbach, M. J. *EPA Newsletter* 1984, 20.
- (89) Carassiti, V. *EPA Newsletter* 1984, 21.
- (90) Pellizzetti, E.; Maurino, V.; Minero, C.; Carlin, V.; Pramauro, E.; Zerbini, O.; Tosato, M. L. *Environ. Sci. Technol.* 1990, 24, No. 10., 1559-1565.
- (91) Pelizzetti, E.; Carlin, V.; Minero, C.; Grätzel, M. *New. J. Chem.* 1991, 15, 351-359.
- (92) Muszkat, L.; Bir, L.; Feigelson, L. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 1995, 87, 85-88.
- (93) Gianturco, F.; Chiodaroli, C. M.; Bellobono, I. R.; Raimondi, M. L.; Moroni, A.; Gawlik, B. *Fresenius Envir. Bull.* 1997, 6, 461-468.
- (94) Borio, O.; Gawlik, B. M.; Bellobono, I. R.; Muntau, H. *Chemosphere.* 1998, 37, No. 5., 975-989.
- (95) Texier, I.; Ouazzani, J.; Delaire, J.; Giannotti, C. *Tetrahedron* 1999, 55, 3401-3412.
- (96) Héquet, V.; Cloirec, P. L.; González, C.; Meunier, B. *Chemosphere* 2000, 41.
- (97) Cernák, O.; Cernáková, M. *Water Supply* 1992, 10, 171-176.
- (98) Laar, J. d.; Dore, M.; Suty, H. *Revue des Sciences de l'eau* 1995, 8, 23-42.
- (99) Torrents, A.; Anderson, B. G.; Bilboulia, S.; Johnson, W. E.; Hapeman, C. J. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31.
- (100) Muszkat, L.; Feigelson, L.; Bir, L.; Muszkat, K. A. *Chemosphere* 1998, 36, 1485-1492.
- (101) Pratap, K.; Lemley, A. T. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3285-3291.
- (102) Huston, P. L.; Pignatello, J. J. *Wat. Res.* 1999, 33(5), 1238-1246.
- (103) Bellobono, I. R.; Pinacci, P. L.; Riva, G.; Lagrasta, C. *Fresenius Envir. Bull.* 1998, 7, 277-288.
- (104) Palm, W. U.; Millet, M.; Zetzsch, C. *Ecotoxicol. Env. Safety* 1998, 41, 36-43.
- (105) Acero, J. L.; Stemmler, K.; Gunten, U. v. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34, 591-597.
- (106) Peñuela, G. A.; Barceló, D. *Journal of AOAC International.* 2000, 83, No. 1.





15. Fotodegradación de biocidas tipo s-  
triazina: Experimental

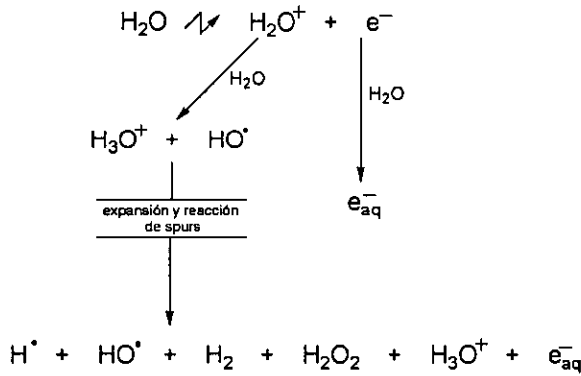


15. EXPERIMENTAL

15.1. Radiólisis de pulso (PR).

La técnica de radiólisis de pulso es un poderoso método para la generación de radicales y el estudio de sus reacciones en disolución, incluyendo radicales libres orgánicos e inorgánicos e iones metálicos en estados de oxidación inusuales.

Esta técnica se utiliza frecuentemente con disoluciones acuosas diluidas, donde la energía es principalmente empleada en la producción de especies reactivas derivadas del agua, electrón solvatado ( $e^-_{aq}$ ), radical hidroxilo  $HO^\bullet$  y átomos de hidrógeno  $H^\bullet$ .



Esquema 15.1. Radiólisis del agua.

La siguiente figura muestra el espectro de absorción UV-Vis para los radicales primarios generados a partir de la radiólisis del agua.

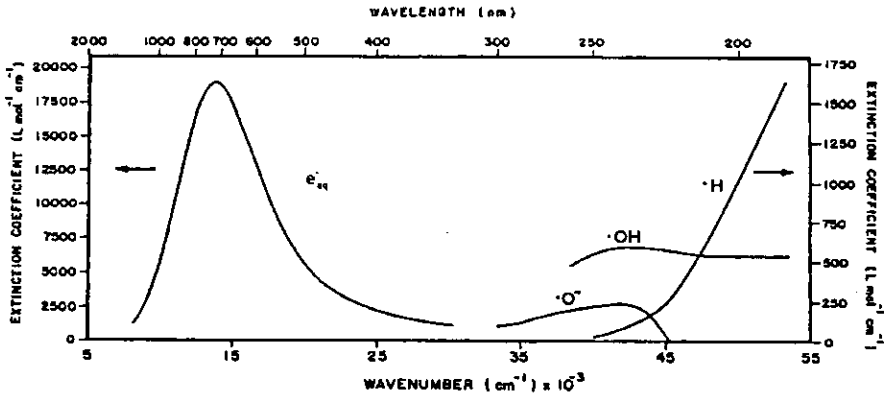


Figura 15.1. Espectro de absorción para  $e^-_{aq}$ ,  $HO^\bullet$ ,  $O^\bullet$ , y  $H^\bullet$ .

Los productos iniciales de la radiólisis se generan dentro de pequeños volúmenes aislados, llamados spurs, en donde hay una elevada concentración de radicales. Cuando el spur se expande mediante difusión una fracción de estas especies reaccionan entre ellas, generando  $H_2O_2$  y  $H_2$ , mientras que el resto pasa al seno de la disolución, resultando una disolución homogénea de radicales. Para el agua neutra se ha determinado la siguiente estequiometría:



donde el coeficiente de cada especie representa el valor del llamado rendimiento químico de radiación (G), siendo  $G=n^{\circ}$  de moléculas formadas/100  $eV \cong 103.6 \cdot G \text{ nmol} \cdot J^{-1}$

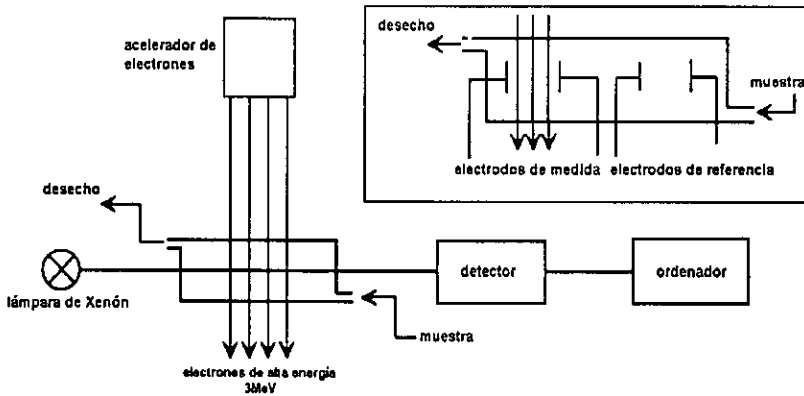


Figura 15.2. Esquema del sistema de radiólisis de pulso. Sobrepuesto, esquema de la celda de conductividad.<sup>2</sup>

Los experimentos de radiólisis fueron realizados con un acelerador Van der Graaff capaz de suministrar un haz de electrones de 3 MeV (High Voltage Engineering Corp., Type K, Boston, MA), y pulsos de electrones de 0.1-2  $\mu s$  de duración. Los electrones son emitidos por un cátodo a elevada temperatura dentro de una cámara de alto vacío, acelerados y magnéticamente dirigidos. La celda de medida se encuentra 10 cm por debajo de la ventana de salida del tubo del acelerador. La dosis del pulso de electrones puede variar 2-60 Gy, dependiendo de la duración del pulso y de la temperatura del cátodo. En función de estas condiciones la concentración inicial de las especies reactivas (radicales) varía entre  $1 \cdot 10^{-6}$  y  $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Para el estudio de estas reacciones se utilizaron pulsos de 300 ns y una dosis aproximada de 5 Gy por pulso. En estas condiciones se ha estimado que se generan HO<sup>•</sup>, e<sub>aq</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> en concentraciones alrededor de 3·10<sup>-6</sup> mol·dm<sup>-3</sup>.<sup>3</sup>

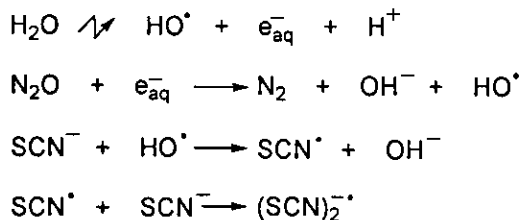
La muestra se renueva totalmente después de cada pulso manteniendo el flujo constante de la disolución a través de la celda de medida.

Cada medida es la media obtenida para varios pulsos, lo que permite mejorar la relación señal-ruido.

Para la detección se utilizó una lámpara pulsada de Xe- 450W. La luz pasa a través de la celda de medida (Suprasil QS, 2x1x1cm<sup>3</sup>) y de ahí al monocromador, dirigiéndose después al fotomultiplicador en donde se genera la señal eléctrica. Un sistema de obturadores asegura que la luz analizadora comience a iluminar la muestra inmediatamente después del impacto del pulso de electrones, evitando así que tengan lugar reacciones fotoiniciadas.

También se realizaron medidas de conductividad, para lo que fue necesario utilizar celdas específicas capaces de detectar en intervalos de tiempo breves la diferencia de conductividad entre los electrodos de medida, por donde pasa el haz de electrones, y los electrodos de referencia. Para tiempos inferiores a 0.1ms se empleó detección DC, y para tiempos superiores detección AC, con el fin de evitar fenómenos de polarización en los electrodos.

Cuando las reacciones se siguen ópticamente, es necesario realizar antes de cada medida una dosimetría, es decir se determina la densidad óptica máxima correspondiente a la generación de un radical conocido, en este caso el radical (SCN)<sub>2</sub><sup>•-</sup>, sabiendo que [G((SCN)<sub>2</sub><sup>•-</sup>)=G(HO<sup>•</sup>)=6.0·10<sup>-7</sup> mol·J<sup>-1</sup> y ε<sub>480</sub>(SCN)<sub>2</sub><sup>•-</sup>=7600 mol<sup>-1</sup>·dm<sup>3</sup>·cm<sup>-1</sup>]<sup>4</sup>. El (SCN)<sub>2</sub><sup>•-</sup> se generó a partir de una disolución 10 mM de KSCN saturada con NO<sub>2</sub>. A continuación se muestran, esquema 3.2, las reacciones que tienen lugar y mediante las que se genera este radical.



Esquema 15.2.Reacciones que intervienen en la generación del radical (SCN)<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

A continuación se muestra el espectro de absorción UV-Vis correspondiente a este radical.

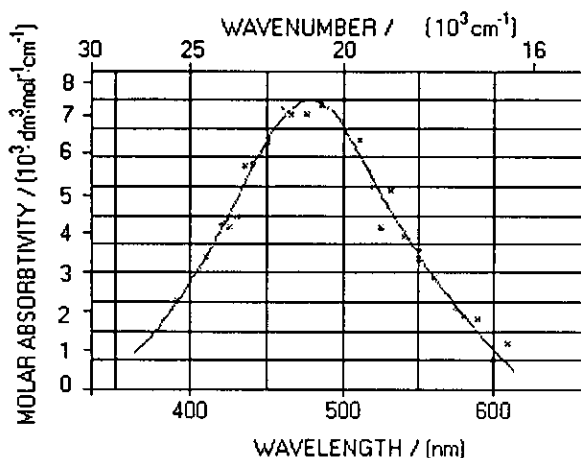
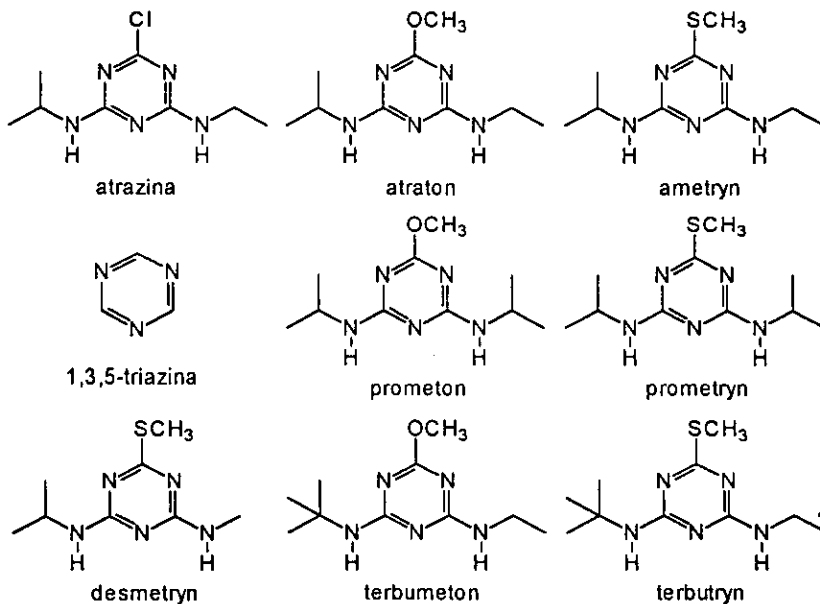


Figura 15.3 Espectro de absorción UV-Vis del radical aniónico  $(SCN)_2^{*-5}$ .

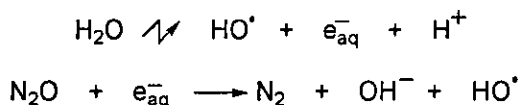
Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El pH se ajustó con NaOH o HClO<sub>4</sub>, para trabajar en medio neutro se utiliza una disolución reguladora de fosfato.

Como reactivos frente a los que se estudió la reactividad de las distintas s-triazinas mostradas en el esquema 15.3



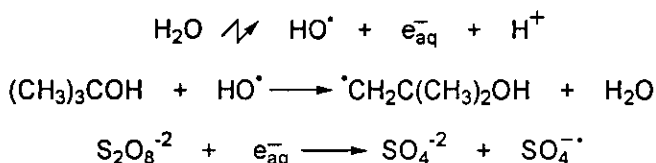
Esquema 15.3. Estructura de las s-triazinas estudiadas.

se utilizaron aquellos que se generan directamente de la radiólisis del agua (esquema 8.1)  $e^-_{aq}$  [ $G(e^-_{aq})=2.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ ] y  $\text{HO}^\bullet$  radical [ $G(\text{HO}^\bullet)=2.7 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ ]. Este radical se genera también a partir de la reacción del  $e^-_{aq}$  con  $\text{N}_2\text{O}$ , por lo que el rendimiento cuántico es  $G(\text{HO}^\bullet)=G(\text{HO}^\bullet)+G(e^-_{aq})=6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ .



Esquema 15.4. Reacciones que intervienen en la formación del radical  $\text{HO}^\bullet$ .

También se utilizaron otros radicales que se obtienen por reacción de éstos con otras especies presentes en la disolución, como el radical sulfato  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  sabiendo que [ $G(\text{SO}_4^{\bullet-})=2.8 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{J}^{-1}$ ,  $\epsilon_{450\text{nm}}=1100 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ ] <sup>6,7</sup>. En el esquema 3.5 se muestran las reacciones que intervienen en la formación de este radical a partir de los radicales primarios que se generan de la radiólisis del agua.



Esquema 15.5. Reacciones que intervienen en la formación del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ .

A continuación se muestra el espectro de absorción UV-Vis correspondiente a este radical.

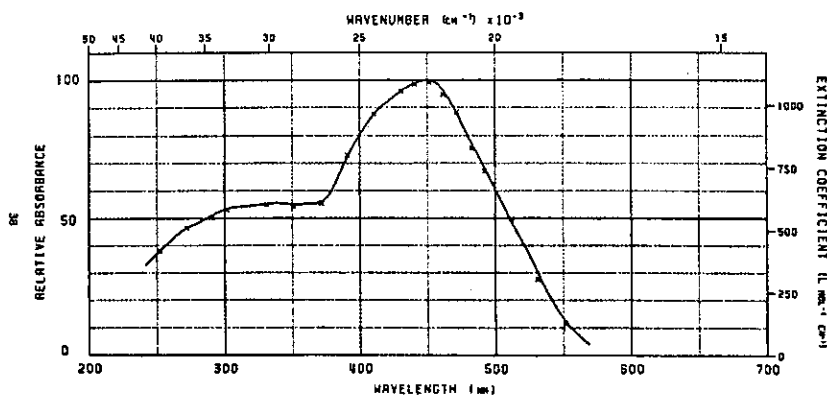
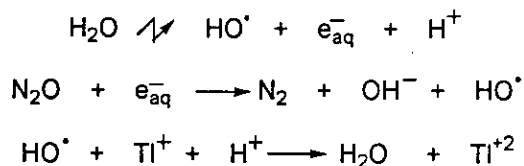


Figura 15.4. Espectro de absorción UV-Vis del radical aniónico  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ .

Otro reactivo frente al que se estudió la reactividad de las s-triazinas y que se genera a partir de la reacción del radical HO<sup>•</sup> es el TI<sup>+2</sup>. A continuación se muestran las reacciones que intervienen en la formación de TI<sup>+2</sup> a partir de los radicales primarios que se generan de la radiólisis del agua.

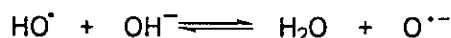


Esquema 15.6. Reacciones que intervienen en la formación de TI<sup>+2</sup>.

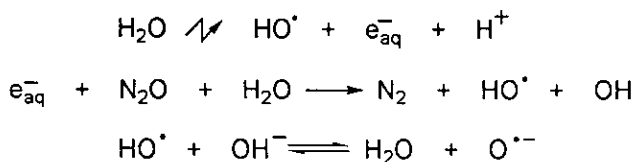
Teniendo en cuenta que se genera por reacción HO<sup>•</sup>, se puede estimar el rendimiento químico de TI<sup>+2</sup>, como G(TI<sup>+2</sup>)=G(HO<sup>•</sup>)=6·10<sup>-7</sup> mol·J<sup>-1</sup>.<sup>1</sup>

En este caso no se observó reacción de las s-triazina con el TI<sup>+2</sup>.

Se trató también de estudiar la reacción con el radical O<sup>•-</sup>, que se obtiene a partir de la radiólisis del agua, por desprotonación del radical HO<sup>•</sup> (pK<sub>a</sub>=11.9)<sup>1</sup>. Para este radical el rendimiento químico G es 6.6·10<sup>-7</sup> mol·J<sup>-1</sup>, ya que en las condiciones de pH en que se trabajó (pH>13) el equilibrio,



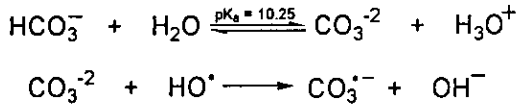
se encuentra totalmente desplazado hacia la derecha, por lo que G(O<sup>•-</sup>)=G(HO<sup>•</sup>)<sup>1</sup>. Además el H<sup>•</sup> generado por radiólisis del agua reacciona con HO<sup>•</sup> dando lugar a e<sup>-</sup><sub>aq</sub>, que reacciona con N<sub>2</sub>O para dar lugar a HO<sup>•</sup>, con lo que G(O<sup>•-</sup>)=G(HO<sup>•</sup>)+G(H<sup>•</sup>).<sup>8</sup>



Esquema 15.7. Reacciones que intervienen en la formación del radical O<sup>•-</sup>.

Debido a las condiciones de pH en que se trabajó, pH>13, se genera también el radical CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>, por lo que se producen interferencias que impiden el estudio detallado de la reacción del radical hidroxilo con las s-triazinas.





Esquema 15.8. Reacciones que intervienen en la formación del radical  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ .

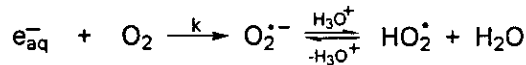
### 15.1.1. Preparación de muestras de reacción.

Las muestras se prepararon teniendo en cuenta la reacción con el radical que se estudiaba, siendo necesario saturar las disoluciones con distintos gases, ajustar debidamente el pH del medio y utilizar diferentes reactivos que sirvan para eliminar las especies primarias que no se desee que puedan interferir en la reacción.

La concentración de s-triazina utilizada fue  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  en todos los casos.

#### 15.1.1.1. Reacción con el electrón solvatado.

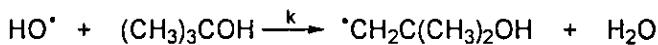
Cuando se estudia la reacción con el electrón, las disoluciones se saturan con argón para eliminar el oxígeno del medio que podría reaccionar con el  $e_{\text{aq}}^-$ , generando el par de radicales  $\text{O}_2^{\bullet-} / \text{H}_2\text{O}^\bullet$  ( $\text{p}K_a=4.8$ )<sup>9</sup>



siendo  $k=1.9 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , reacción en agua pura con  $\text{O}_2$ . El radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  está caracterizado por una intensa banda de absorción centrada sobre  $\lambda_{\text{max}}=245 \text{ nm}$ ,  $\epsilon_{245 \text{ nm}}=2350 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$ .<sup>10</sup>

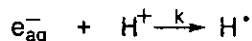
Esta reacción podría interferir en la reacción de reducción de las s-triazinas, ya que podría competir con éstas, y por tanto, en la determinación de la constante de velocidad para la reacción de reducción, al margen de la posible reacción del  $\text{O}_2^{\bullet-}$  con las s-triazinas.

Para eliminar el radical  $\text{HO}^\bullet$  generado junto al  $e_{\text{aq}}^-$ , se añade t-butanol a la disolución, que reacciona con este radical:



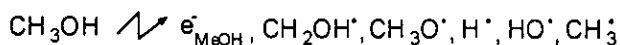
siendo  $k=5 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .<sup>8</sup> El radical generado tiene un bajo coeficiente de absorción a  $\lambda > 200 \text{ nm}$  y además es poco reactivo, por lo que no interfiere en la reacción de reducción.

Se trabajó en condiciones de pH=7, descartando así la desaparición de  $e_{aq}^-$  por reacción con los protones del medio,

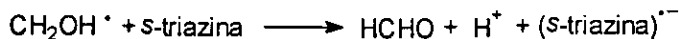
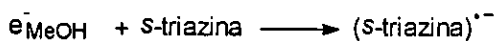


donde  $k=2.2 \cdot 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Debido a la baja solubilidad de alguna de las s-triazinas estudiadas se utilizó metanol, 4%, para preparar las muestras; como consecuencia de la radiación se produce una mezcla de radicales:<sup>10</sup>



muchos de los cuales reaccionan rápidamente con metanol, siendo los  $e_{MeOH}^-$  y  $CH_2OH^\bullet$  los que se generan en mayor proporción. Ambos son radicales reductores pudiendo generar por reacción con la s-triazina el mismo radical aniónico que el generado por reacción con los electrones solvatados que provienen de la radiólisis del agua.



Dado que se trabaja con un porcentaje bajo de metanol, el rendimiento de estos radicales será despreciable en comparación con el obtenido de la radiólisis del agua.

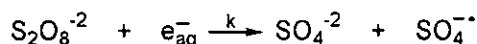
La concentración de s-triazina utilizada fue  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  en todos los casos.

#### 15.1.1.2. Reacción con $SO_4^{\bullet -}$ .

Tal y como se indicó en el apartado anterior, las disoluciones se saturan con Ar para eliminar el  $O_2$  del medio, y se utiliza *t*-butanol para eliminar el radical  $^\bullet OH$  que se genera en la radiólisis del agua.

En este caso en lugar de utilizar un radical que se produce de forma directa a partir de la radiólisis del agua, se utilizó un radical que se genera por reacción de uno de éstos con otra especie presente en la disolución.

El radical sulfato,  $SO_4^{\bullet -}$  se forma rápidamente por reacción de hidrólisis reductiva del electrón solvatado con el anión  $S_2O_8^{2-}$ ,



donde  $k=1.1 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .

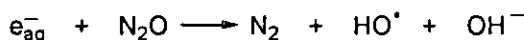
El radical  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  que se caracteriza por un máximo de absorción centrado sobre 450 nm ( $\epsilon_{450\text{nm}}=1100 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).<sup>7</sup>

Se trabajó en condiciones de pH=7, evitando así que parte de los electrones generados en la radiólisis del agua reaccionen con  $\text{H}^+$  del medio generando el radical  $\text{H}^{\cdot}$ .

En este caso no se utilizó metanol para preparar las disoluciones de s-triazina, ya que se utilizó el propio *t*-butanol para disolverlas. Al igual que ocurre con el metanol, como consecuencia del proceso de radiólisis, se podrán generar radicales que no van a interferir debido a que se producen en menor cantidad respecto al radical  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  y además éstos son menos reactivos.

#### 15.1.1.3. Reacción con el radical $\text{HO}^{\cdot}$ .

Cuando se estudia la reacción con el radical  $\text{HO}^{\cdot}$ , las disoluciones se saturan con  $\text{N}_2\text{O}$ , que actúa como scavenger de  $\text{e}_{\text{aq}}^-$  generando un radical  $\text{HO}^{\cdot}$  adicional.



Una ventaja del uso de  $\text{N}_2\text{O}$  como scavenger de  $\text{e}_{\text{aq}}^-$ , es que éste es inerte con respecto al ataque sobre otros radicales libres, al igual que su producto  $\text{N}_2$ .

Se trabajó a pH=7, evitando así la generación de radicales  $\text{H}^{\cdot}$  por reducción de  $\text{H}^+$ , que podrían interferir en la reacción.

No se utilizó metanol para preparar las muestras.

#### 15.1.1.4. Reacción con $\text{Ti}^{+2}$ .

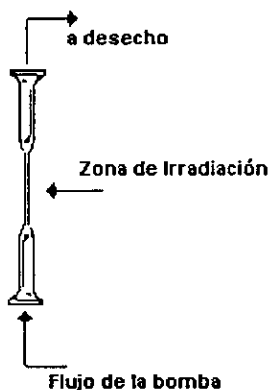
En este caso en lugar de utilizar un producto directo de la radiólisis del agua, se utiliza  $\text{Ti}^{+2}$ , que se genera por reacción de uno de los radicales primarios de la radiólisis del agua, el radical  $\text{HO}^{\cdot}$ , con otra especie presente en disolución,  $\text{Ti}^+$ .

El  $\text{Ti}^{+2}$  se prepara a partir de una disolución saturada de  $\text{N}_2\text{O}$ , que contiene  $\text{Ti}^+$  a pH ≈3. El  $\text{N}_2\text{O}$  actúa como scavenger del  $\text{e}_{\text{aq}}^-$ , produciendo radical  $\text{HO}^{\cdot}$ . El  $\text{Ti}^{+2}$  se genera por oxidación del  $\text{Ti}^+$  por  $\text{HO}^{\cdot}$ . Para evitar la formación de



Los experimentos de fotólisis de destello fueron realizados con láseres de excímeros, 193nm ArF<sup>\*</sup> (Lambda Physik EMC150E), 248m, KrF<sup>\*</sup> (Lambda Physik EMG103MSC) capaces de generar pulsos de 20 ns con  $10 < E < 80$  mJ (energía medida a la salida del láser). Se utilizaron filtros para atenuar la intensidad del láser.

La muestra se renovaba totalmente después de cada pulso, manteniendo el flujo constante de la disolución a través de la celda de medida. Las celdas empleadas fueron Suprasil de cuarzo.

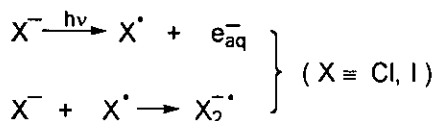


**Figura 15.6.** Celda empleada para la irradiación de las muestras mediante LFP.

Cada medida es la media obtenida para varios pulsos, lo que permite mejorar la relación señal-ruido.

La detección fue óptica y se utilizó una lámpara de Xe como luz analizadora. La luz pasa a través de la celda de medida, de ahí al monocromador, para pasar a continuación al fotomultiplicador en donde se genera la señal eléctrica. Un sistema de obturadores asegura que la luz analizadora comience a iluminar la muestra inmediatamente después del impacto de la luz del láser, evitando así otras reacciones fotoionizadas.

Para la determinación de los rendimientos cuánticos de fotoionización de los compuestos estudiados fue preciso realizar una actinometría para cada uno de los láseres utilizados y para cada compuesto estudiado. Así cuando la emisión láser es de 193 nm (ArF<sup>\*</sup>) se utiliza NaCl [ $\Phi_{FI}(Cl^-)=0.41\pm 0.08$ ]<sup>12</sup> y para 248 nm (KrF<sup>\*</sup>) KI [ $\Phi_{FI}(I^-)=0.22\pm 0.03$ ]<sup>12</sup> como actinómetros. La reacción que tiene lugar es:



y se observa la señal debida al  $e_{aq}^-$

Las disoluciones de NaCl y KI se preparan con absorbancias a la longitud de onda de excitación igual a la absorbancia de los compuestos que se estudian a esta misma longitud de onda.

Se realizaron experimentos de fotólisis sobre blanco, es decir, sobre agua y mezcla agua-metanol (4%) saturadas con Ar, comprobando que no hay señal detectable, lo que confirma que la fotoionización del blanco a 193 nm es despreciable.

Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El pH se ajustó con NaOH o HClO<sub>4</sub>, para trabajar en medio neutro se utiliza una disolución de fosfato como disolución reguladora. Los rendimientos cuánticos de fotólisis de las distintas especies de fosfato son despreciables en las condiciones de trabajo empleadas.<sup>13</sup>

Los espectros se construyeron promediando los valores de  $\Delta OD$  a un mismo tiempo para cada  $\lambda$ .

### 15.2.1. Preparación de muestras de reacción.

#### 15.2.1.1. Fotólisis de s-triazina. Determinación del rendimiento cuántico de fotoionización a 193 nm y 248 nm.

La disolución se satura con Ar para eliminar el O<sub>2</sub> del medio que reacciona con el  $e_{aq}^-$  generado de la fotólisis de la s-triazina, dando lugar al radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Esta reacción podría interferir en la determinación del rendimiento de  $e_{aq}^-$ .

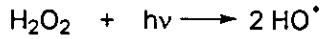
Se determina la absorbancia a 193 nm y 248 nm, y se prepara una disolución del actinómetro correspondiente, con este mismo valor de absorbancia a cada longitud de onda.

Se trabajó en condiciones de pH=7.

La concentración de s-triazina utilizada fue  $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup> en todos los casos.

15.2.1.2. *Reacción con el radical HO<sup>•</sup>.*

La disolución se satura con Ar y se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para generar el radical HO<sup>•</sup>. El peróxido de hidrógeno al ser irradiado por luz UV se disocia generando el radical HO<sup>•</sup>.



El rendimiento cuántico para esta fotólisis depende de la longitud de onda utilizada, así para 254 nm se obtiene un rendimiento cuántico próximo a 1.<sup>14</sup>

Se trabaja a pH=6, ya que en medio ácido y neutro el proceso de fotólisis primario de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da lugar casi completamente al radical hidroxilo HO<sup>•</sup>, mientras que en medio básico, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se fotoliza para dar lugar a ozono.

15.3. Fotólisis en estado estacionario a 254 nm.

Otra de las técnicas empleadas en el estudio de fotodegradación de s-triazinas fue la irradiación con una lámpara de vapor de mercurio de baja presión que emite radiación prácticamente monocromática a 254 nm. En la figura 1.1 se muestra la lámpara utilizada junto a su espectro de emisión.

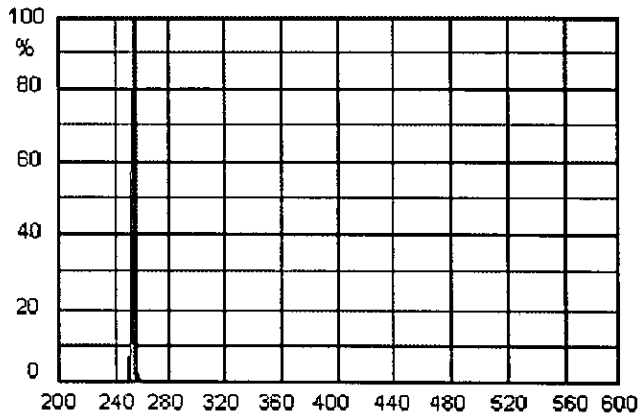
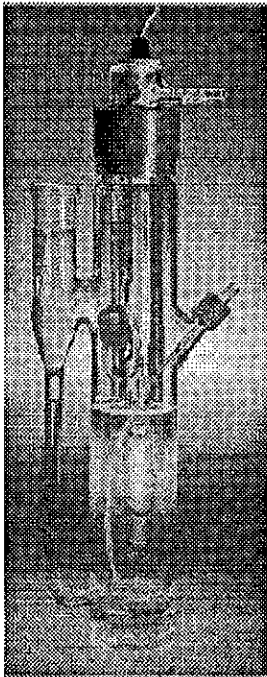


Figura 15.7. Lámpara de mercurio de baja presión TNN 15/32 Merck-Schuardt.

Con el fin de poder realizar medidas en continuo, se ha construido una celda de cuarzo sellada, con dos capilares de entrada y salida, que permiten el flujo a su través de la disolución procedente del fotoreactor, bombeada por medio de una bomba peristáltica BREVETÉ S.G.D.G., SOMA 3, que permite un flujo comprendido entre 1 ml/h y 1000 ml/h. La construcción de la celda se ha realizado de modo que, a flujos bajos, no se genere turbulencia en su interior, para evitar interferencias de fenómenos físicos de mezcla. La muestra se renueva manteniendo el flujo constante de la disolución a través de la celda de medida y se mantiene a temperatura constante  $298.0 \pm 0.1$  K.

### 15.3.1. Preparación de las muestras de reacción.

Las muestras se preparan por disolución de s-triazina en agua bidestilada sin modificar el pH de la disolución resultante.

### 15.3.2. Determinación de $C_I$ empleando un electrodo selectivo de iones cloruro.

La concentración de iones cloruro se cuantificó empleando un electrodo selectivo de cloruro Ingold y un electrodo de referencia Crison conectados al pH-metro antes mencionado, tal y como se describe en el capítulo 3.

Para la cuantificación previamente se realizó un calibrado, mostrado en la figura 17.8, con cloruro sódico (Merck, calidad p.a)

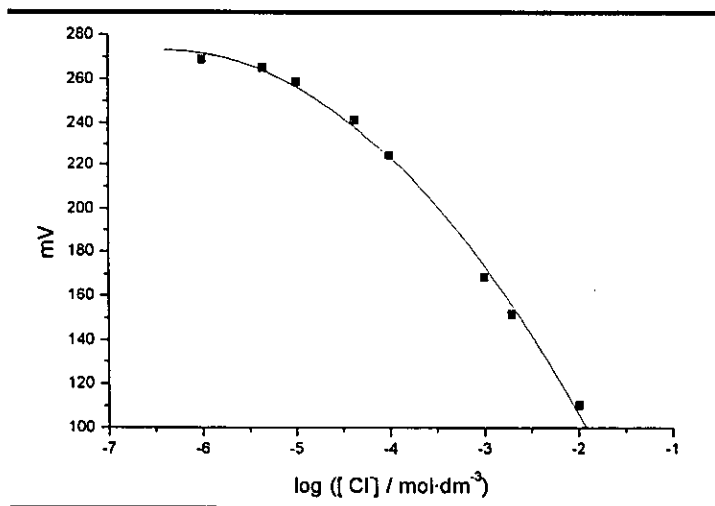
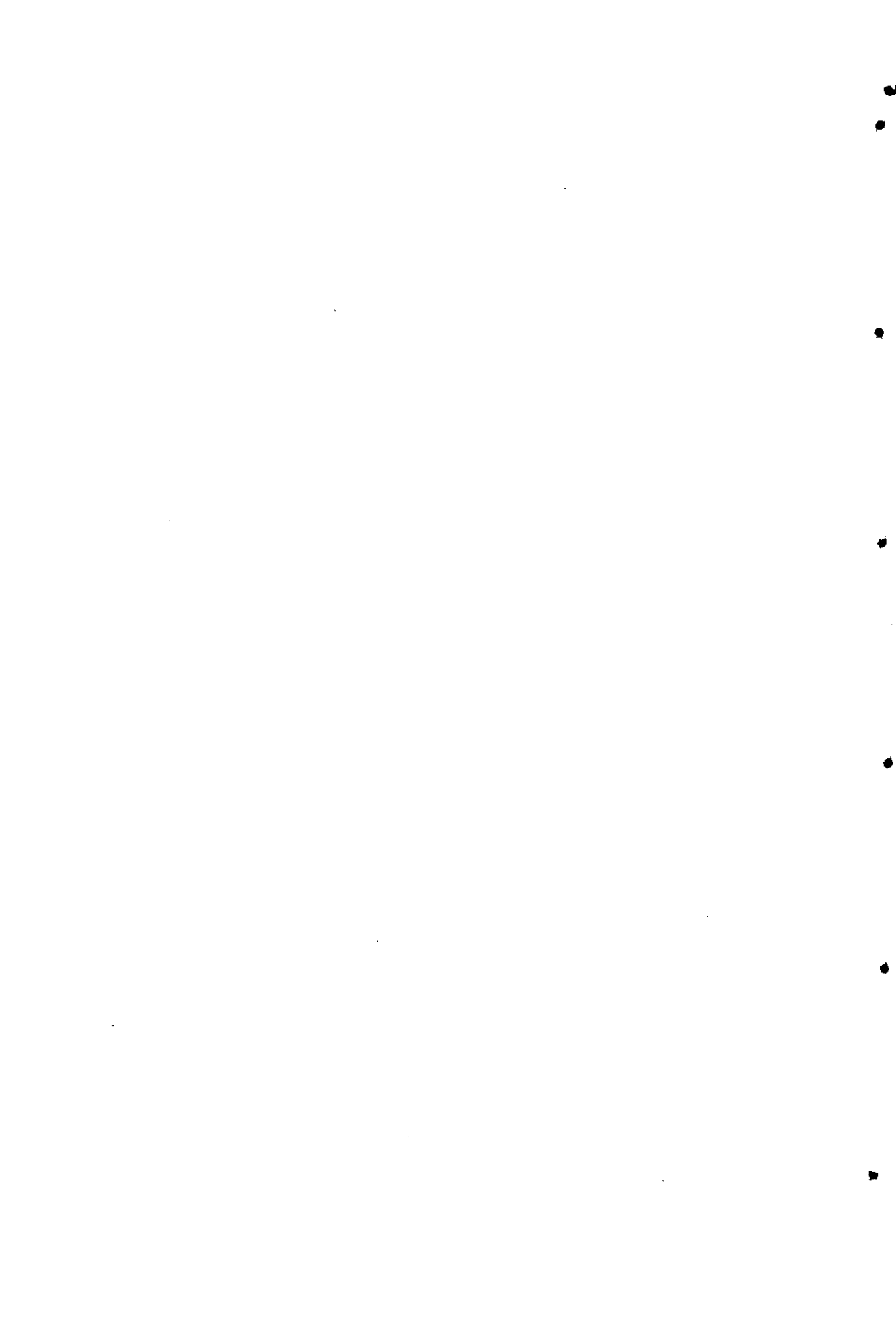


Figura 15.8. Calibrado del electrodo selectivo de ión cloruro.

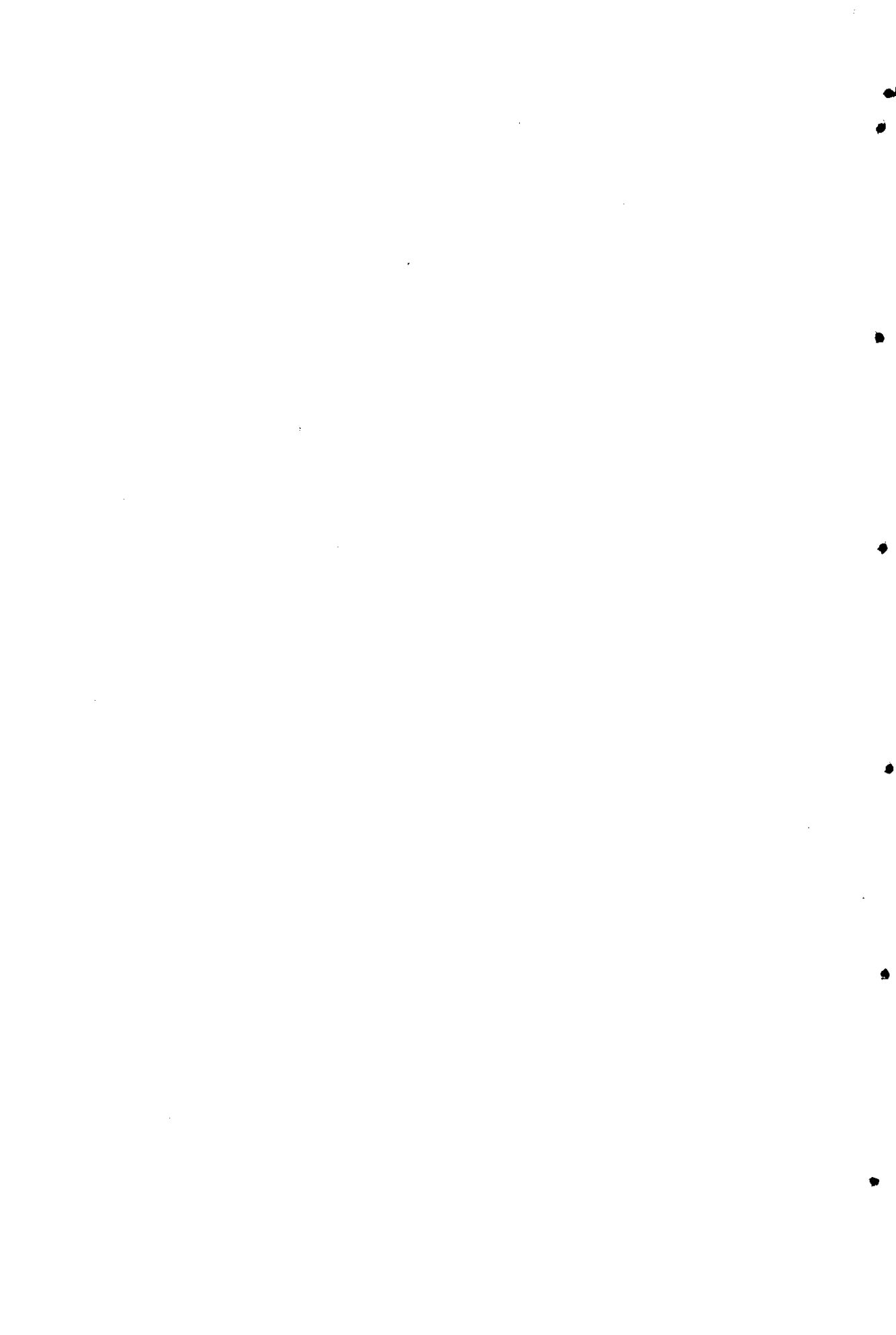


#### 15.4. Bibliografía.

- (1) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Rosss, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513-886.
- (2) Sonntag, C. v.; Schuchmann, H.-P. *Methods in Enzymology*. **1994**, *233*, 3-20.
- (3) Canle L., M.; Santaballa, J. A.; Steenken, S. *Chem. Eur. J* **1999**, *5*, 1192-1201.
- (4) Schuler, R. H.; Hartzell, A. L.; Behar, B. *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 192.
- (5) Wishart, J. F.; Nocera, D. G. *Photochemistry and Radiation Chemistry. Complementary Methods for the Study of Electron Transfer*. Washington, 1998.
- (6) Faria, J. L.; Steenken, S. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 10869-10874.
- (7) Hug, G. L. *Optical Spectra of Nonmetallic Inorganic Transient Species in Aqueous Solution*. National Standard Reference Data System (National Bureau of Standards). 1981; Vol. 69.
- (8) Ioele, M.; Steenken, S.; Baciocchi, E. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, No. 16., 2979-2987.
- (9) Larson, R. A.; Weber, E. J. *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*, 1994.
- (10) Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Truscott, T. G. In *Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Contributions to the Chemistry of Biology and Medicine*; Pergamon Press., p 1-19.
- (11) Schwarz, H. A.; Dodson, R. W. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3643.
- (12) Iwata, A.; Nakashima, N.; Kusaba, M.; Izawa, Y.; Yamanaka, C. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *207*, 137.
- (13) Steenken, S.; Goldbergerova, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3928-3934.
- (14) Ogata, Y.; Tomizawa, K.; Furuta, K. In *The Chemistry of Peroxides*.



16. Fotodegradación de biocidas tipo s-  
triazina: Resultados



Se han generado una serie de radicales derivados de herbicidas tipo s-triazinas y se han estudiado los mecanismos de algunas de sus reacciones. Para ello se utilizaron las técnicas de radiólisis de pulso y fotólisis de destello.

### 16.1. Radiólisis de pulso.

Mediante esta técnica se estudió la reacción de estos compuestos frente a los radicales generados por radiólisis del agua, estudiando las reacciones de reducción y oxidación monoelectrónica por  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  y  $\text{Ti}^{+2}$ , y adición de los radicales  $\text{HO}^{\cdot}$  y  $\text{O}^{\cdot-}$ .

#### *16.1.1. Reacción de reducción monoelectrónica. Reacción con el electrón solvatado.*

Previo al seguimiento de la reacción de reducción monoelectrónica, se estudió el decaimiento de la banda de absorción correspondiente al electrón solvatado (figura 3.1)  $e_{\text{aq}}^-$  a 750 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  en agua).

Las figuras 16.1, 16.2 y 16.3 muestran los espectros de absorción UV-Vis para la reacción de reducción monoelectrónica de alguna de las s-triazinas estudiadas. Se observa la desaparición de la banda correspondiente al electrón solvatado. En el caso de ametryn se ha observado la aparición de una banda centrada sobre 300 nm simultáneamente a la desaparición de la banda correspondiente al  $e_{\text{aq}}^-$  (750 nm). Dada la coincidencia en la constante de velocidad de ambos procesos, probablemente corresponda al radical aniónico de la s-triazina. Este proceso no se ha observado para atraton, prometon, terbumeton, y atrazina.

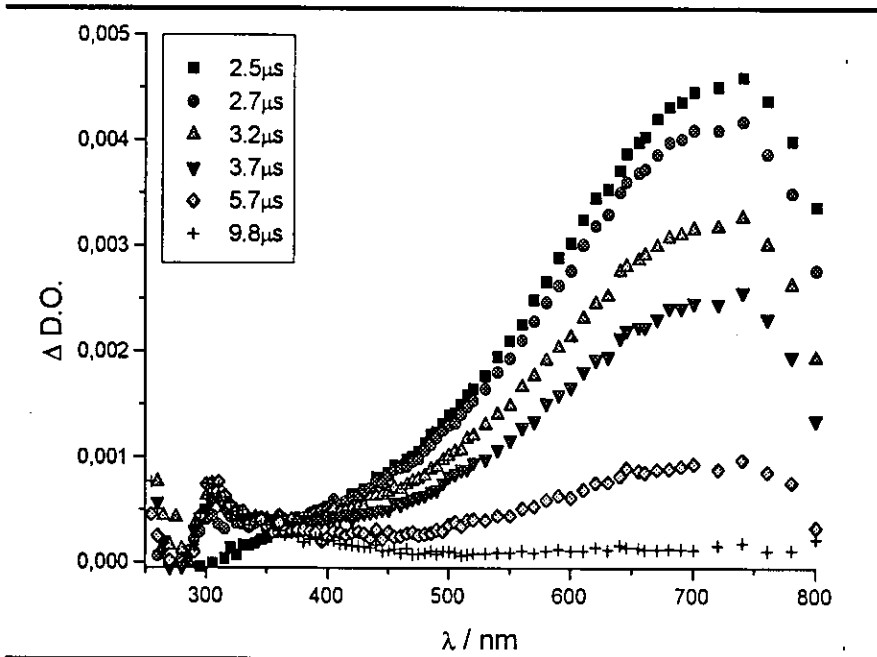


Figura 16.1. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de reducción monoeléctrica de ametryn con  $e_{aq}^-$ . [ametryn] =  $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH] = 100 mM; pH = 7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] = 1 mM); 5% MeOH; T = 298.0 K.

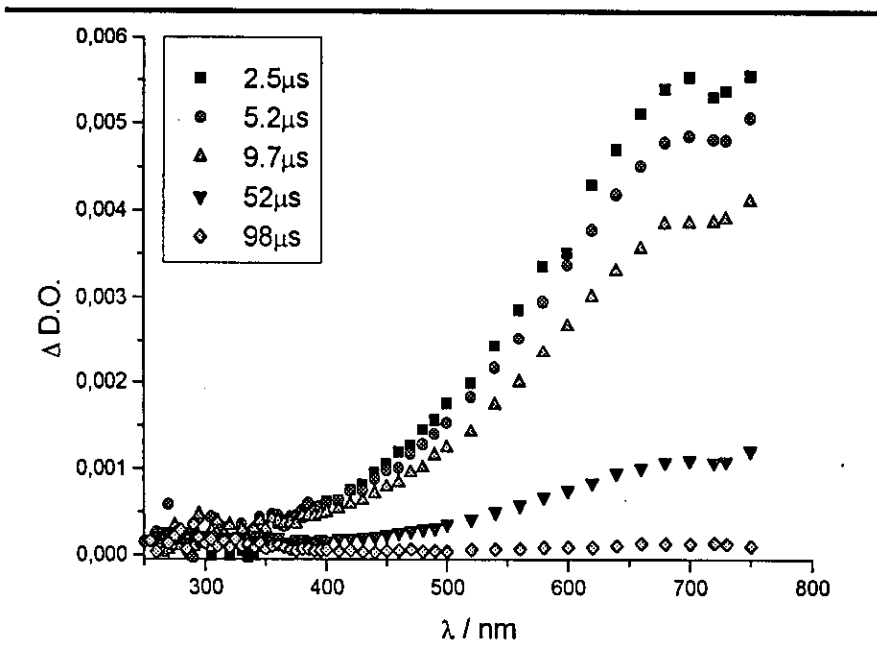


Figura 16.2. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de reducción monoeléctrica de atraton con  $e_{aq}^-$ . [atraton] =  $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH] = 100 mM; pH = 7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] = 1 mM); 5% MeOH; T = 298.0 K.

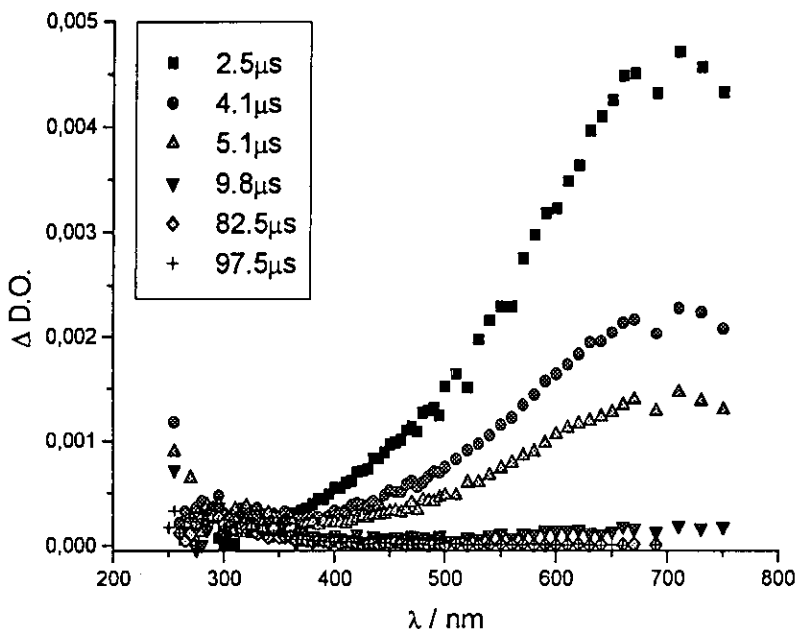


Figura 16.3. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de reducción monoeléctrica de atrazina con  $e_{aq}^-$ . [atrazina] =  $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH] = 100 mM; pH = 7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] = 1 mM); 5% MeOH; T = 298.0 K.

Se trabajó en condiciones de pseudoorden uno,  $[s\text{-triazina}] \gg [e_{aq}^-]$ .

En todos los casos los datos cinéticos fueron adecuadamente ajustados por ecuaciones de orden uno. Las constantes cinéticas de orden uno, corresponden al promedio de al menos seis experiencias.

A partir de la representación de  $k_{obs}$  frente a la concentración de s-triazina se pueden determinar las distintas  $k_{e_{aq}^-}$ .

En las figuras 16.4, 16.5 y 16.6 se ilustra la dependencia de la constante de velocidad observada con la concentración de s-triazina.

La representación de la constante cinética de primer orden frente a la concentración de s-triazina, se ajusta a una línea recta del tipo  $y = a + b \cdot X$ , por lo que se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{obs} \cdot [e_{aq}^-] = (k_0 + k_{e_{aq}^-} \cdot [s\text{-triazina}]) \cdot [e_{aq}^-] \quad \text{Ec.16.1.}$$

donde  $k_0$  corresponde a la desaparición del  $e_{aq}^-$  en ausencia de s-triazina, y  $k_{e_{aq}^-}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de reducción monoeléctrica de la s-triazina con el electrón.

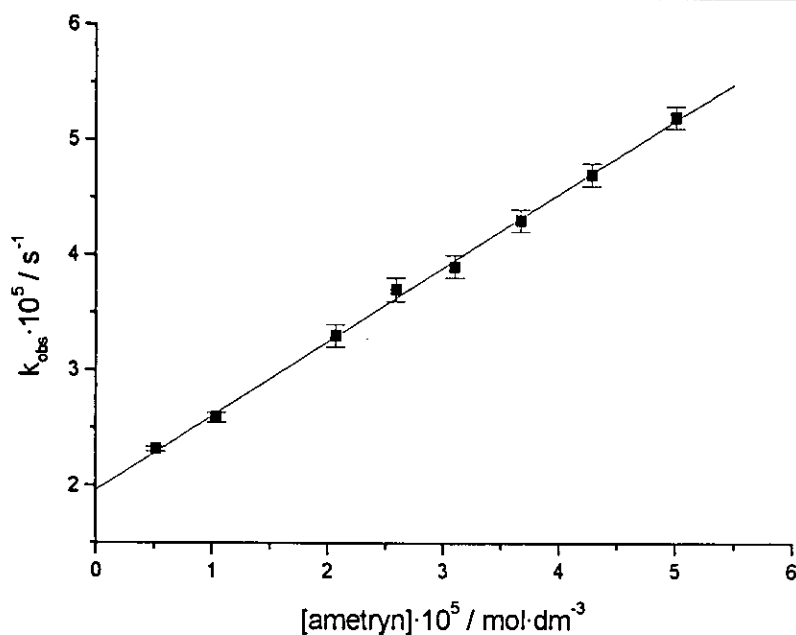


Figura 16.4. Influencia de la concentración de s-triazina en la velocidad de reacción de reducción mono-electrónica de ametryn con  $e_{\text{aq}}^-$ .  $[\text{t-BuOH}] = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ ); 5% MeOH;  $T = 298.0 \text{ K}$ .

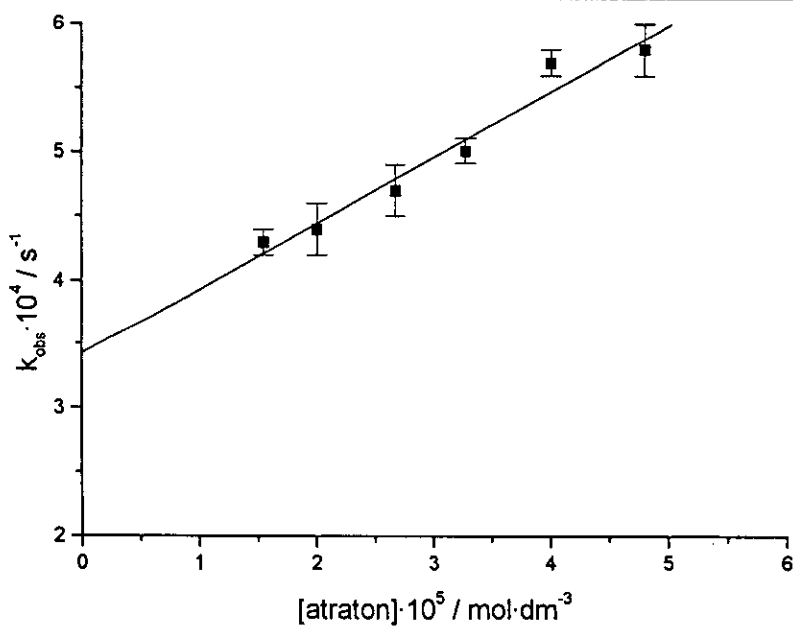


Figura 16.5. Influencia de la concentración de s-triazina en la velocidad de reacción de reducción mono-electrónica de atraton con  $e_{\text{aq}}^-$ .  $[\text{t-BuOH}] = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ ); 5% MeOH;  $T = 298.0 \text{ K}$ .



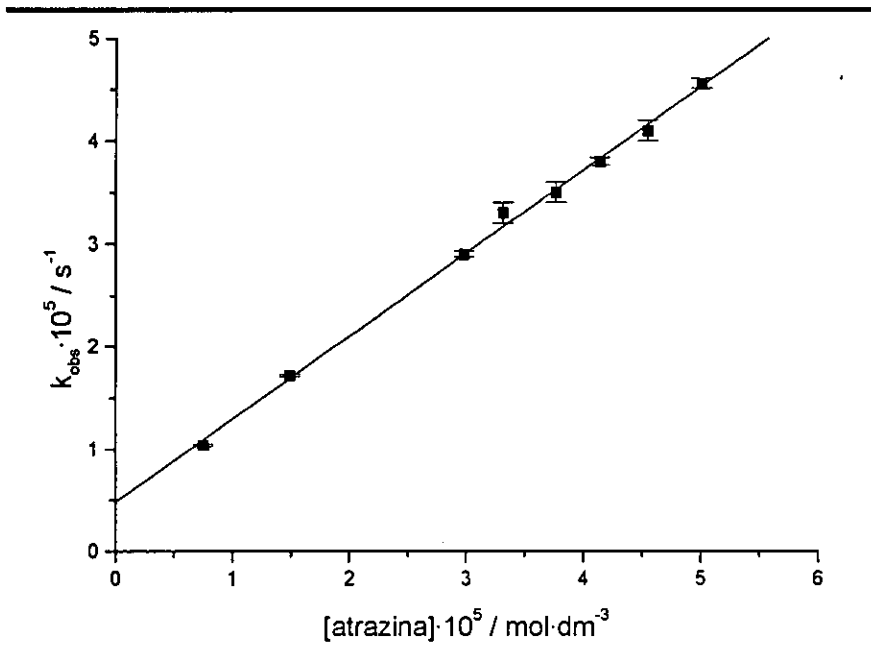


Figura 16.6. Influencia de la concentración de s-triazina en la velocidad de reacción de reducción monoeléctrica de atrazina con  $e_{aq}^-$ . [*t*-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); 5% MeOH; T=298.0 K

En la siguiente tabla se recogen las constantes de velocidad para las distintas s-triazinas estudiadas.

Tabla 16.1.

s-triazina	$k_{e_{aq}^-} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	s-triazina	$k_{e_{aq}^-} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
1,3,5-triazina	$(1.20 \pm 0.04) \cdot 10^{10}$	prometon	$(3.7 \pm 0.4) \cdot 10^8$
ametryn	$(6.4 \pm 0.1) \cdot 10^9$	terbutryn	$(5.0 \pm 0.2) \cdot 10^9$
atraton	$(5.1 \pm 0.5) \cdot 10^8$	terbumeton	$(4.8 \pm 0.3) \cdot 10^8$
atrazina	$(8.1 \pm 0.1) \cdot 10^9$	desmetryn	$(7.7 \pm 0.1) \cdot 10^9$
prometryn	$(7.3 \pm 0.5) \cdot 10^9$		

A continuación se muestra la variación de la densidad óptica del radical aniónico de ametryn con el pH del medio.

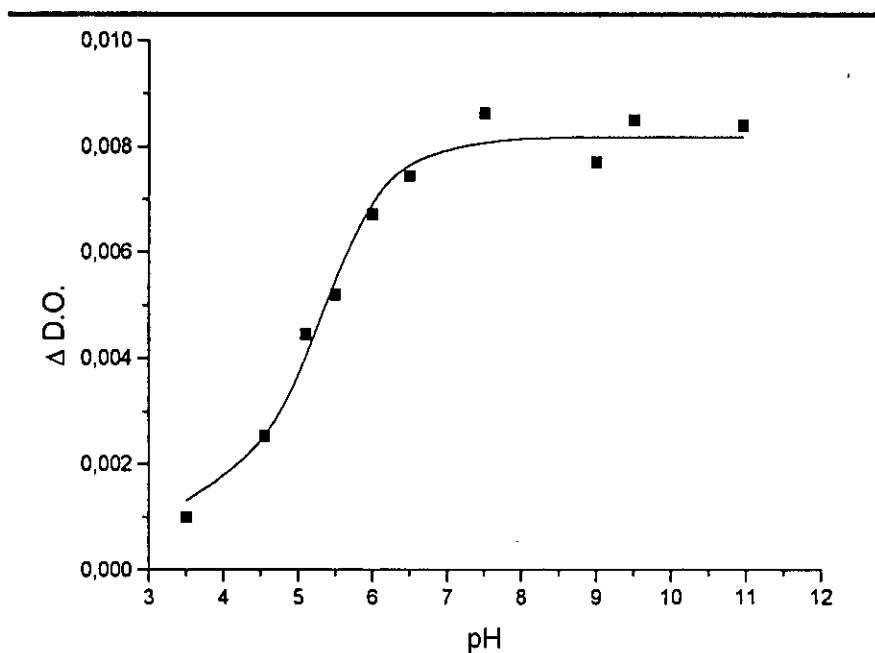


Figura 16.7. Determinación del pK de ametryn. [ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH]=100 mM; 5% MeOH; T=298.0 K;  $\lambda$ =300 nm

Esta dependencia de la densidad óptica con el pH del medio que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$D.O. = \frac{D.O._{min} + D.O._{max} \cdot 10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad \text{Ec. 16.2}$$

Ajustando los valores experimentales de densidad óptica obtenidos se obtiene un pK=5.2±0.1. Valor que concuerda con el pK<sub>a</sub> de las s-triazinas que aparece en la bibliografía, excepto para el caso de la atrazina que presenta un pK<sub>a</sub>=1.68.<sup>1</sup>

La variación de densidad óptica para el radical aniónico se asigna, por tanto, a la desaparición de la triazina precursora (véase capítulo 18).

#### 16.1.2. Reacción de oxidación monoelectrónica. Reacción con el radical SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>.

Para seguir la reacción de oxidación monoelectrónica, se siguió el decaimiento de la banda de absorción correspondiente al radical SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> (figura 15.4) SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> a 450 nm ( $\lambda_{max}$  en agua).

A continuación se muestran (figuras 16.8, 16.9 y 16.10) los espectros de absorción UV-Vis para la reacción de oxidación monoeléctricas de alguna de las s-triazina estudiadas con  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ .

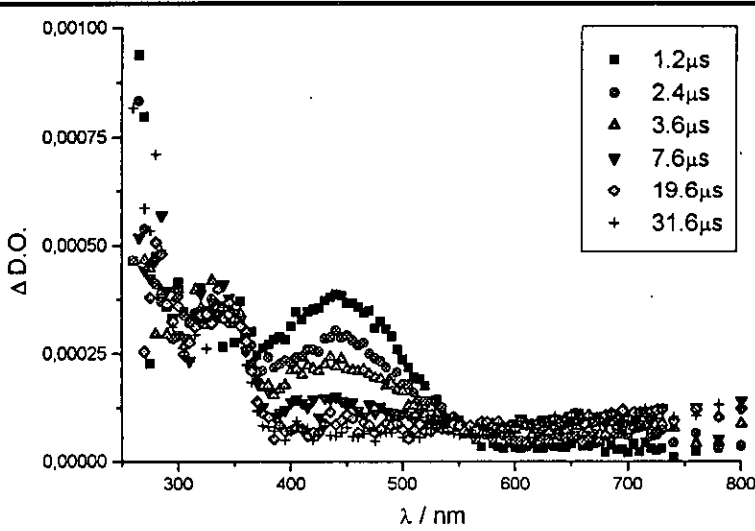


Figura 16.8. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de oxidación monoeléctrica de ametryn con  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ . [ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH]=100 mM; [K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]=10 mM; pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); 5%MeOH; T=298.0 K.

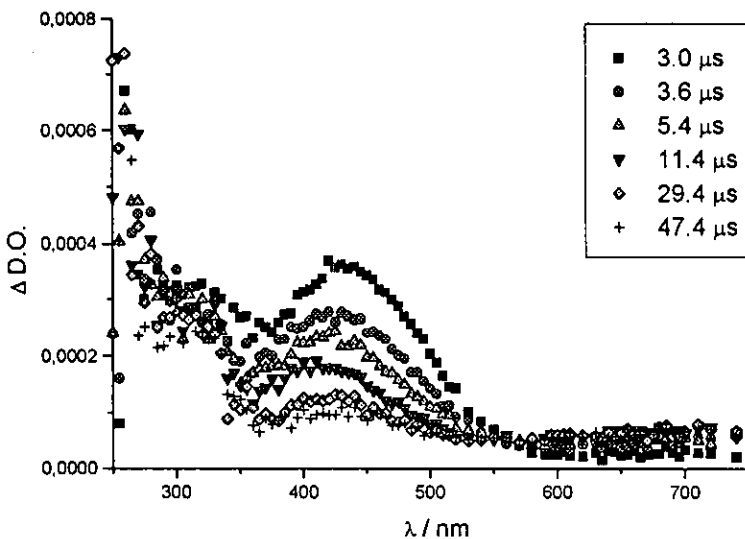


Figura 16.9. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de oxidación monoeléctrica de atraton con  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ . [atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; [t-BuOH]=100 mM; [K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]=10 mM; pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); 5%MeOH; T=298.0 K.

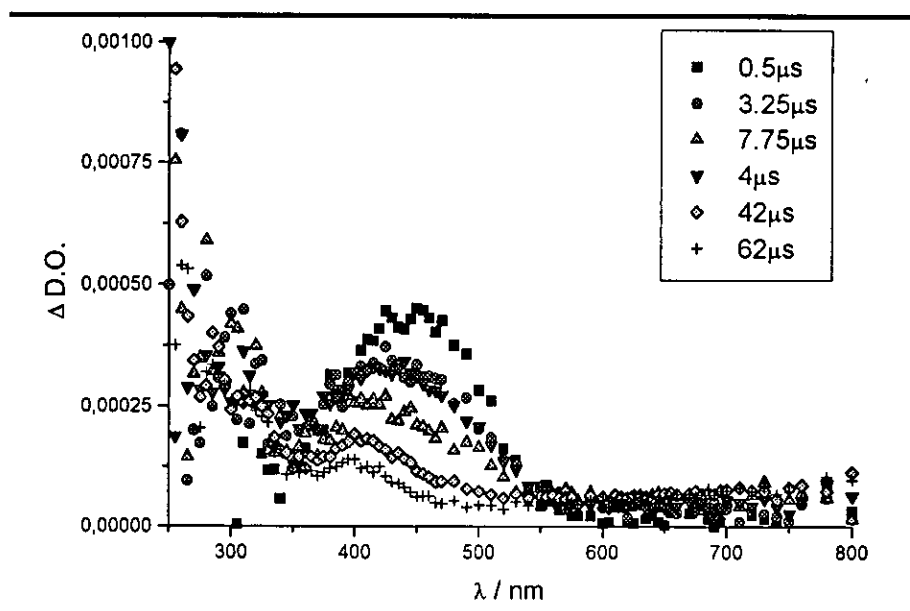


Figura 16.10. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de oxidación monoeléctronica de atrazina con  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . [atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol $\cdot$ dm $^{-3}$ ; [t-BuOH]=100 mM; [ $\text{K}_2\text{SO}_4$ ]=10 mM; pH=7([ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ]=1 mM); 5%MeOH; T=298.0 K.

Se trabajó en condiciones de pseudoorden uno,  $[\text{s-triazina}] \gg [\text{SO}_4^{\bullet-}]$ .

Los datos cinéticos fueron ajustados mediante ecuaciones de orden uno. Las constantes cinéticas de orden uno obtenidas corresponden al promedio de al menos seis experiencias.

A partir de la representación de  $k_{\text{obs}}$  frente a la concentración de s-triazina se puede determinar  $k_{\text{SO}_4^{\bullet-}}$ .

En las siguientes figuras (figuras 16.11, 16.12 y 16.13) se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de s-triazina.

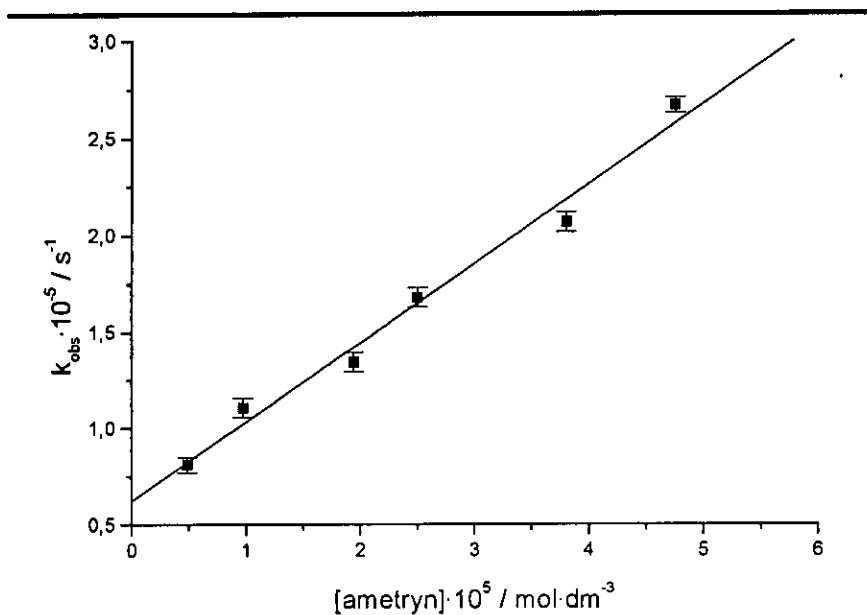


Figura 16.11. Influencia de la concentración de *s*-triazina en la velocidad de reacción de oxidación monoeléctronica de ametryn con  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ .  $[t\text{-BuOH}] = 100 \text{ mM}$ ;  $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 10 \text{ mM}$ ;  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ ); 5% MeOH;  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ;  $T = 298.0 \text{ K}$ .

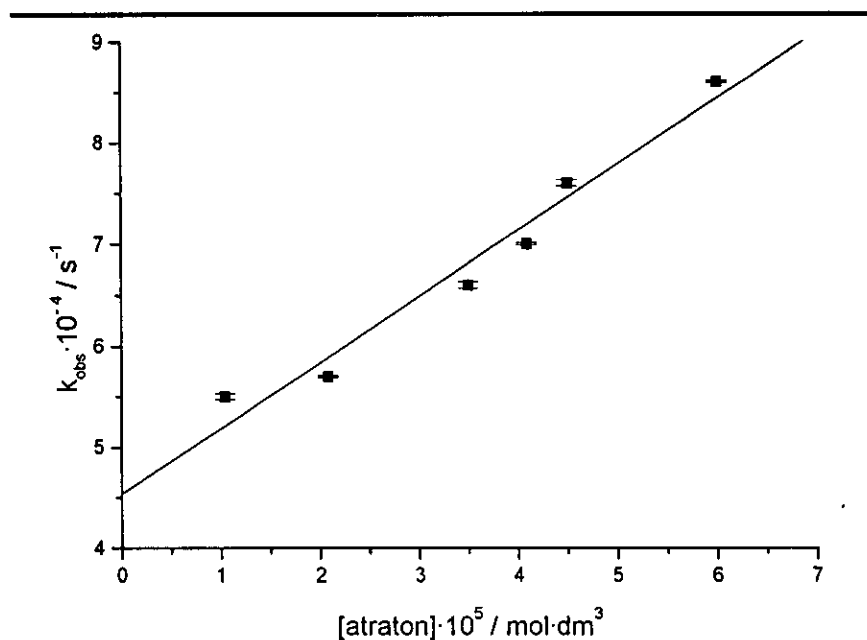


Figura 16.12. Influencia de la concentración de *s*-triazina en la velocidad de reacción de oxidación monoeléctronica de atraton con  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ .  $[t\text{-BuOH}] = 100 \text{ mM}$ ;  $[\text{K}_2\text{SO}_4] = 10 \text{ mM}$ ;  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ ); 5% MeOH;  $\lambda = 450 \text{ nm}$ ;  $T = 298.0 \text{ K}$ .

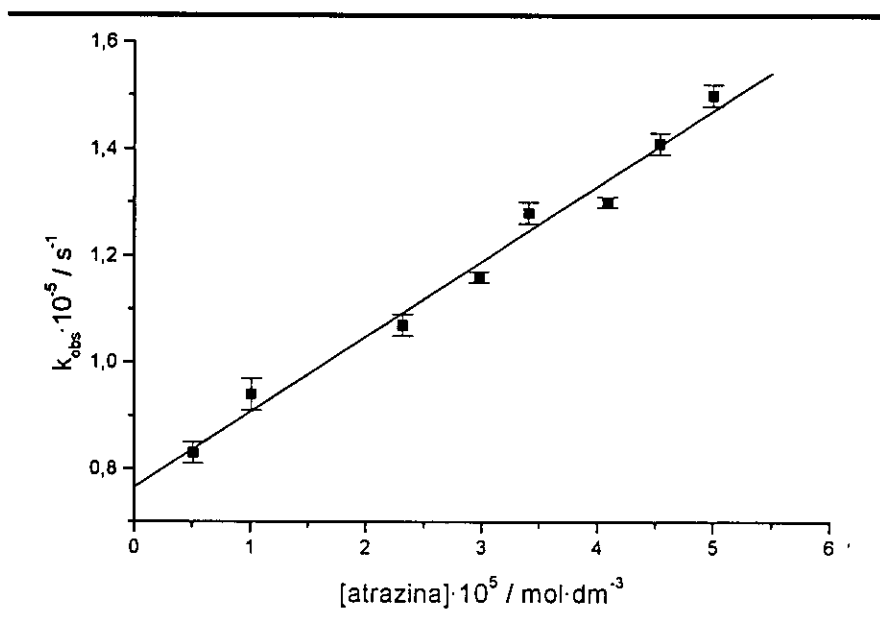


Figura 16.13. Influencia de la concentración de s-triazina en la velocidad de reacción de oxidación monoeléctrica de atrazina con  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . [t-BuOH]=100 mM;  $[\text{K}_2\text{SO}_4]=10$  mM; pH=7 ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4]=1$  mM); 5% MeOH;  $\lambda=450$  nm; T=298.0 K.

La representación de la constante cinética de primer orden frente a la concentración de s-triazina, se ajusta a una línea recta del tipo  $y=a+b \cdot X$ , por lo que se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{SO}_4^{\bullet-}] = (k_0 + k_{\text{SO}_4^{\bullet-}} \cdot [s\text{-triazina}]) \cdot [\text{SO}_4^{\bullet-}] \quad \text{Ec. 16.3}$$

donde  $k_0$  corresponde a la desaparición del  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en ausencia de s-triazina, y  $k_{\text{SO}_4^{\bullet-}}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de la s-triazina con este radical.

En la siguiente tabla se recogen las constantes de velocidad obtenidas para las distintas s-triazinas estudiadas.

Tabla 16.2.

s-triazina	$k_{\text{SO}_4^{\bullet-}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	s-triazina	$k_{\text{SO}_4^{\bullet-}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
1,3,5-triazina	N.R.	prometryn	$(5.2 \pm 0.2) \cdot 10^9$
ametryn	$(4.1 \pm 0.2) \cdot 10^9$	prometon	$(4.1 \pm 0.2) \cdot 10^9$
atraton	$(6.5 \pm 0.6) \cdot 10^8$	terbutryn	$(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^9$
atrazina	$(1.4 \pm 0.1) \cdot 10^9$	terbumeton	$(3.1 \pm 0.2) \cdot 10^9$

N.R. = no reacciona

16.1.3. Reacción con el radical HO<sup>\*</sup>. Reacción de adición.

Debido a que el máximo de absorción que caracteriza este radical (figura 3.1) es muy débil no se puede utilizar esta longitud de onda para seguir las reacciones del radical HO<sup>\*</sup>, por lo que se utilizó como longitud de onda de trabajo la correspondiente a la aparición del producto de reacción.

A continuación se muestran (figuras 16.14, 16.15 y 16.16) los espectros de absorción UV-Vis para la reacción de adición del radical HO<sup>\*</sup> de alguna de las s-triazinas estudiadas.

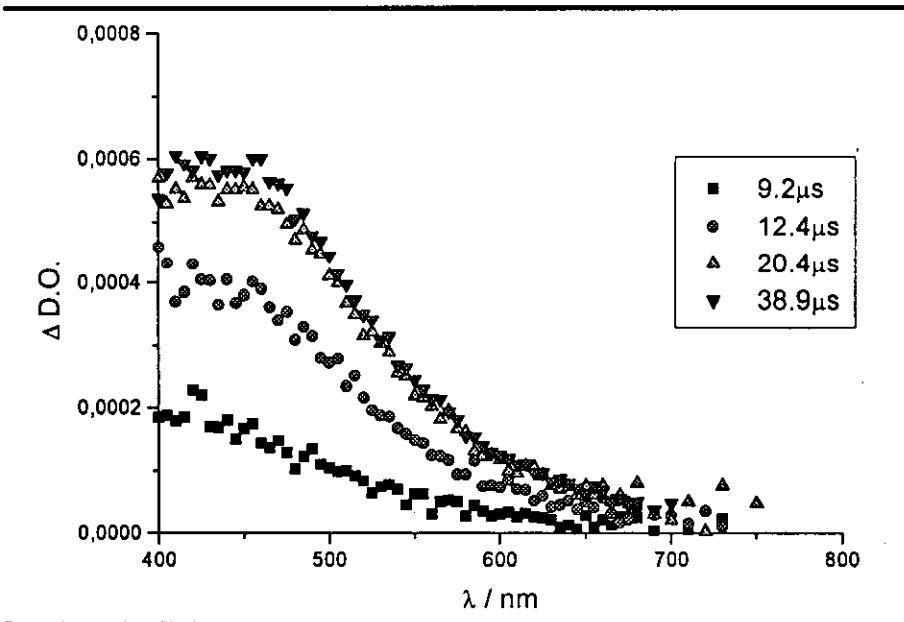


Figura 16.14. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de adición del radical HO<sup>\*</sup> al ametryn. [ametryn]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>; disolución saturada con N<sub>2</sub>O, pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); T=298.0 K.

Se trabajó en condiciones de pseudoorden uno, [s-triazina]>>[HO<sup>\*</sup>].

Los datos cinéticos fueron ajustados mediante ecuaciones de orden uno. Las constantes de orden dos, corresponden al promedio de al menos seis experiencias.

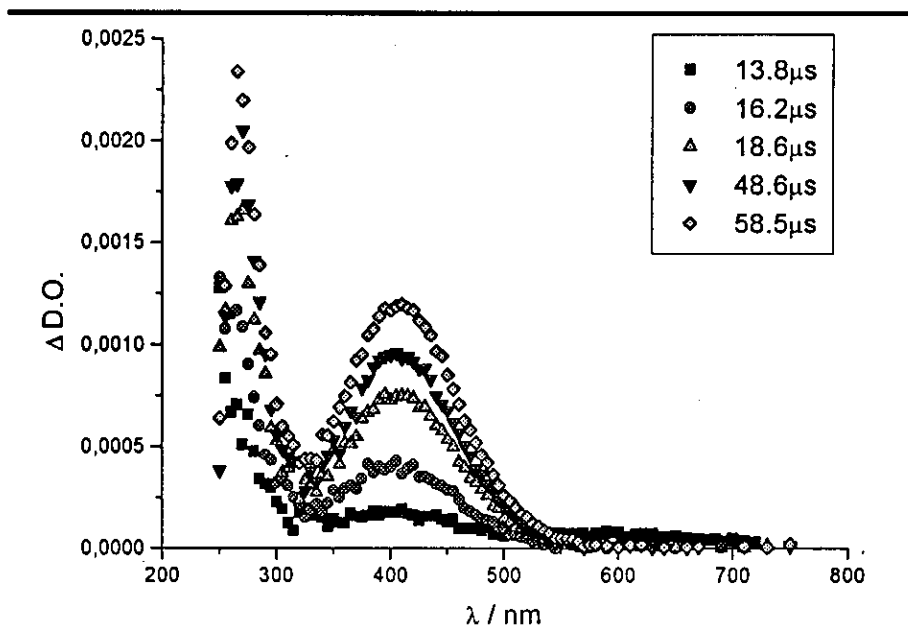


Figura 16.15. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de adición del radical  $\text{HO}^\bullet$  al atraton.  $[\text{atraton}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; disolución saturada con  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ );  $T = 298.0 \text{ K}$ .

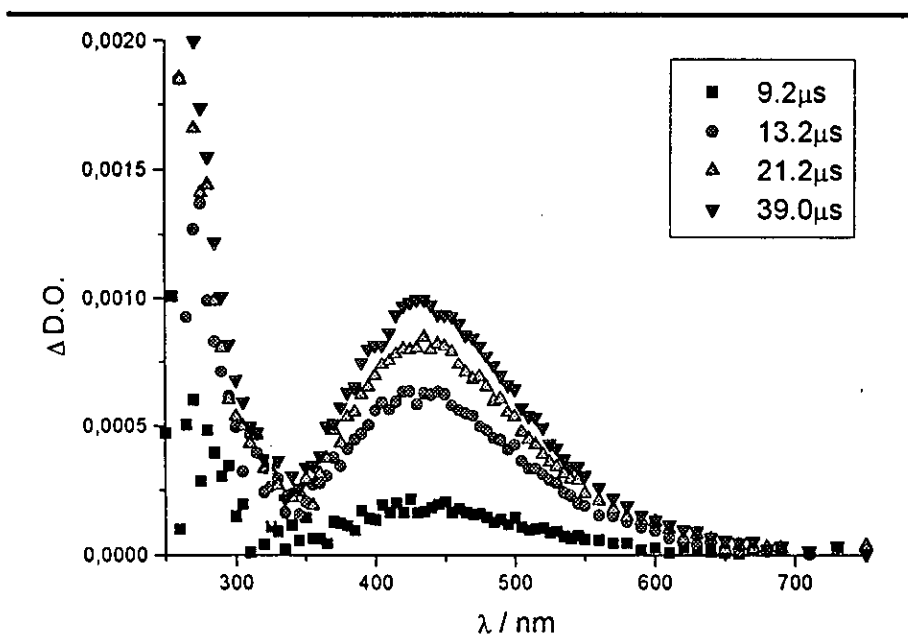


Figura 16.16. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de adición del radical  $\text{HO}^\bullet$  a la atrazina.  $[\text{atrazina}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; disolución saturada con  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{pH} = 7$  ( $[\text{KH}_2\text{PO}_4] = 1 \text{ mM}$ );  $T = 298.0 \text{ K}$ .



En las figuras 16.17, 16.18 y 16.19 se muestra la dependencia de la constante de velocidad observada frente a la concentración de s-triazina.

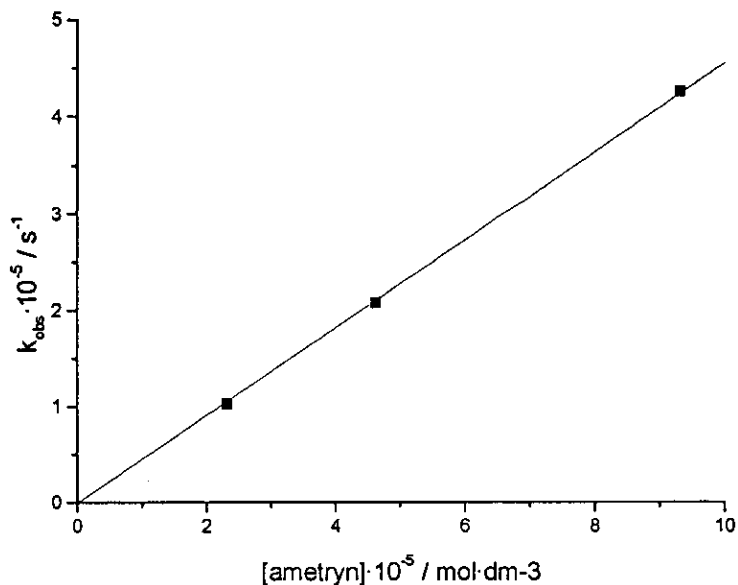


Figura 16.17. Influencia de la concentración de s-triazina en la formación del aducto de ametryn con HO•. pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); λ=450 nm; T=298.0 K.

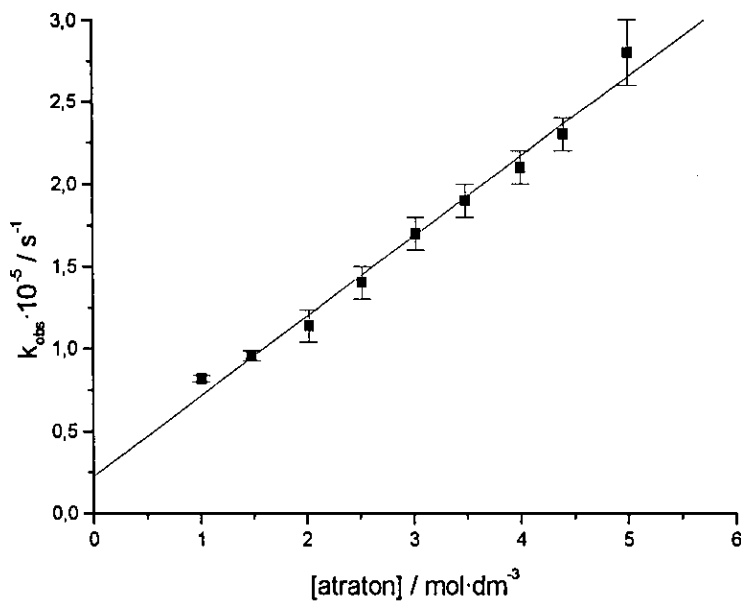


Figura 16.18. Influencia de la concentración de s-triazina en la formación del aducto de atraton con HO•. pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); λ=450 nm; T=298.0 K.

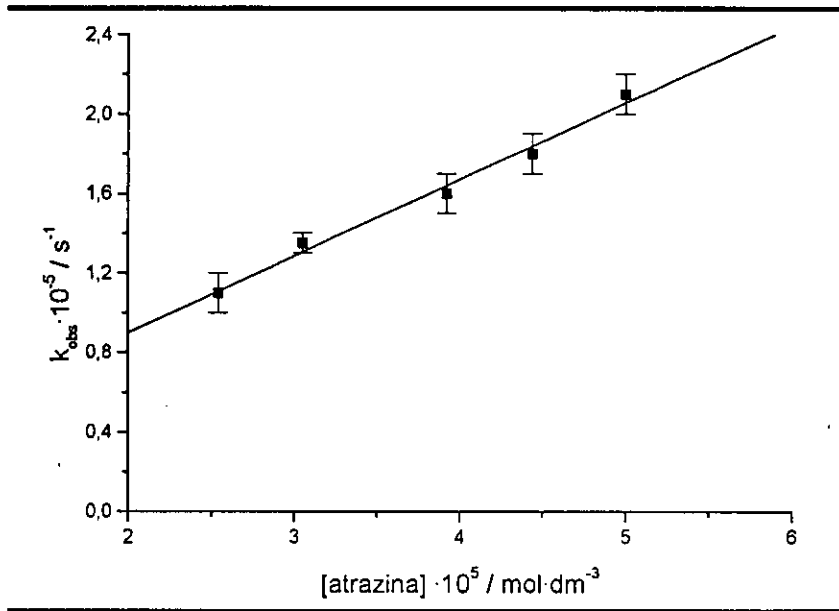


Figura 16.19. Influencia de la concentración de s-triazina en la formación del aducto de atrazina con HO<sup>•</sup>. pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); λ=450 nm; T=298.0 K.

La representación de la constante cinética de primer orden frente a la concentración de s-triazina, se ajusta a una línea recta del tipo  $y=a+b \cdot X$ , por lo que se puede establecer la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{obs} \cdot [HO^{\bullet}] = (k_0 + k_{HO^{\bullet}} \cdot [s - triazina]) \cdot [HO^{\bullet}] \quad \text{Ec.16.4}$$

donde  $k_0$  corresponde a la desaparición del HO<sup>•</sup> en ausencia de s-triazina, y  $k_{HO^{\bullet}}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de la s-triazina con este radical.

En la siguiente tabla se recogen las constantes de velocidad obtenidas para las distintas s-triazinas estudiadas.

Tabla 16.3.

s-triazina	$k_{HO^{\bullet}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$	s-triazina	$k_{HO^{\bullet}} / \text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$
1,3,5-triazina	N.R.	prometon	$(3.1 \pm 0.5) \cdot 10^9$
ametryn	$(4.3 \pm 0.3) \cdot 10^9$	terbutryn	$(2.2 \pm 0.3) \cdot 10^9$
atraton	$(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^9$	terbumeton	$(3.5 \pm 0.2) \cdot 10^9$
atrazina	$2.2 \cdot 10^9$	desmetryn	$(3.0 \pm 0.3) \cdot 10^9$
prometryn	$(3.5 \pm 0.1) \cdot 10^9$		

N.R. = no reacciona

Se siguió la reacción de adición del radical HO<sup>•</sup> mediante medidas de conductividad. Para realizar estas medidas se utiliza como referencia la reacción de oxidación de la *N,N*-dimetilamina por HO<sup>•</sup> para la que la reacción transcurre exclusivamente por oxidación monoelectrónica,<sup>2</sup> generándose el radical catiónico correspondiente. Las medidas de conductividad se realizaron con disoluciones saturadas de N<sub>2</sub>O a pH=10, que contenían concentraciones de 1·10<sup>-4</sup> mol·dm<sup>-3</sup>.

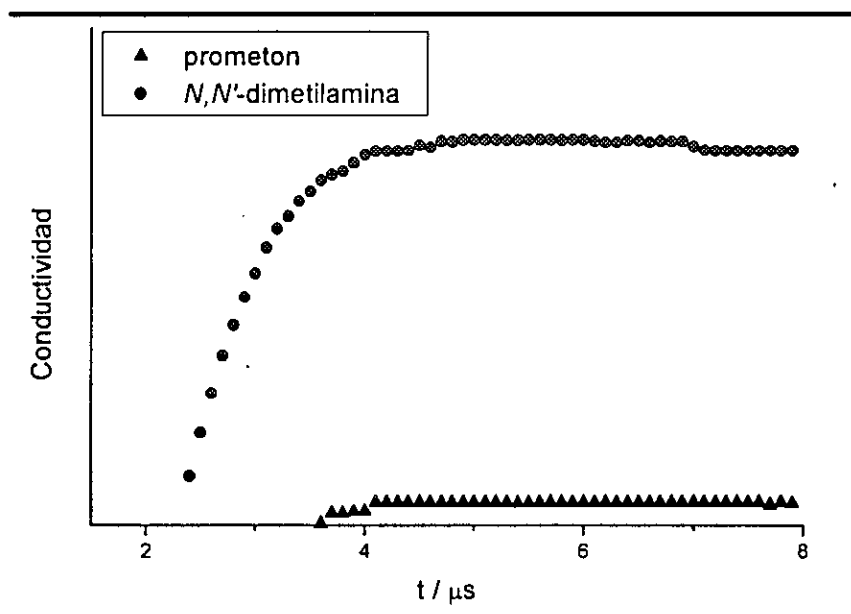


Figura 16.20. Medida de conductividad para la reacción de *N,N*'-dimetilamina y prometón con HO<sup>•</sup>. [*N,N*'-dimetilamina]=[prometon]=1·10<sup>-4</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, pH=10

Se determinó el pK del aducto de HO<sup>•</sup> generado para atraton y prometón siguiendo la variación con el pH de la banda de absorción centrada sobre 450 nm. A continuación se muestra la variación de la densidad óptica a distintos valores de pH.

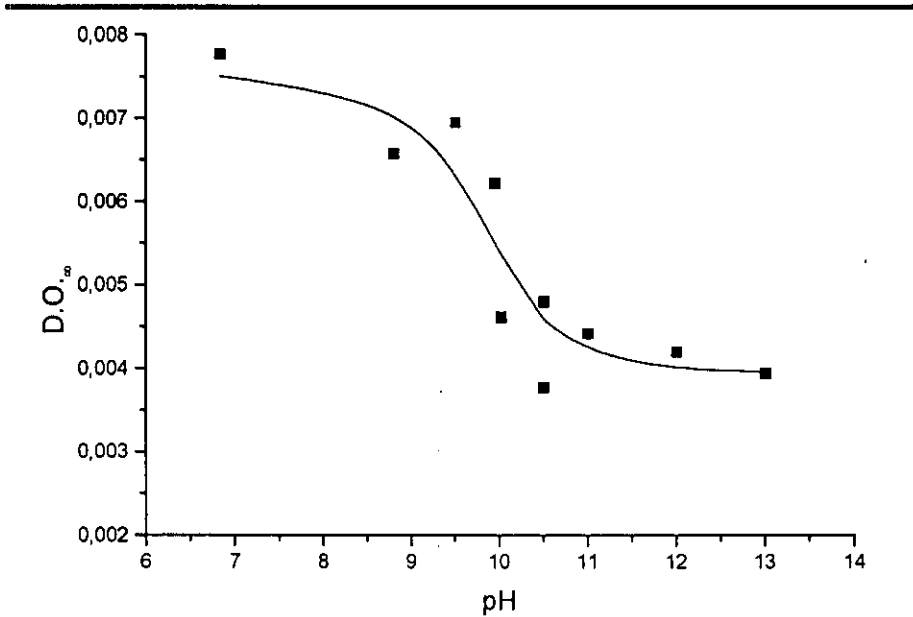


Figura 16.21. Determinación del pK del aducto de prometon con HO<sup>•</sup>. [prometon]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM); λ=450 nm; T=298.0 K.

Esta dependencia de la densidad óptica con el pH del medio que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$O.D. = \frac{OD_{\min} + OD_{\max} \cdot 10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad \text{Ec.16.5}$$

Ajustando los valores experimentales de densidad óptica obtenidos se obtiene un pK=9.8±0.2

### 16.2. Fotólisis de Destello.

Mediante esta técnica se han buscado caminos alternativos a las reacciones antes descritas para radiólisis de pulso que ayudan a confirmar los procesos propuestos para la fotorreactividad de las s-triazinas.

#### 16.2.1. Reacción con el radical HO<sup>•</sup>.

Se obtiene el siguiente espectro para el producto de reacción de prometon con HO<sup>•</sup>.

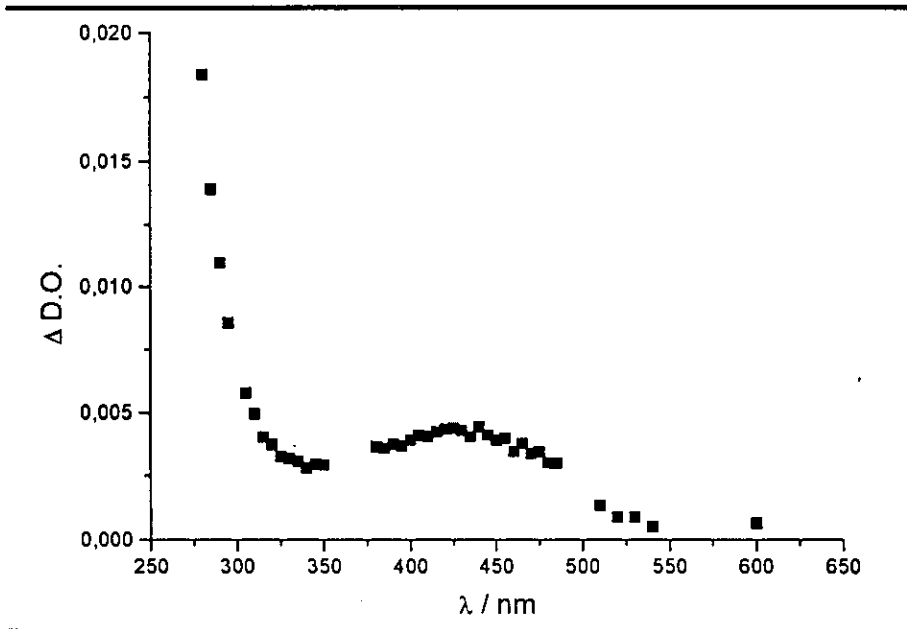


Figura 16.22. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de prometon con HO<sup>•</sup> obtenido mediante LFP. Láser 248 nm, t=0.3 μs, Ar, [prometon]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0.1 mol·dm<sup>-3</sup>; pH=6; T=298.0 K

Análogo al que se obtenía mediante radiólisis.

#### 16.2.2. Fotólisis de s-triazina. Determinación del rendimiento cuántico de fotoionización a 193 nm.

Para la fotólisis de las s-triazinas se obtuvieron espectros de absorción de UV-Vis en los cuales se apreciaba la desaparición de una banda de absorción centrada a 750 nm, que corresponde a la desaparición del electrón solvatado, y

a la vez aparecía un máximo de absorción centrado a 300 nm, tal y como se muestra en la siguiente figura.

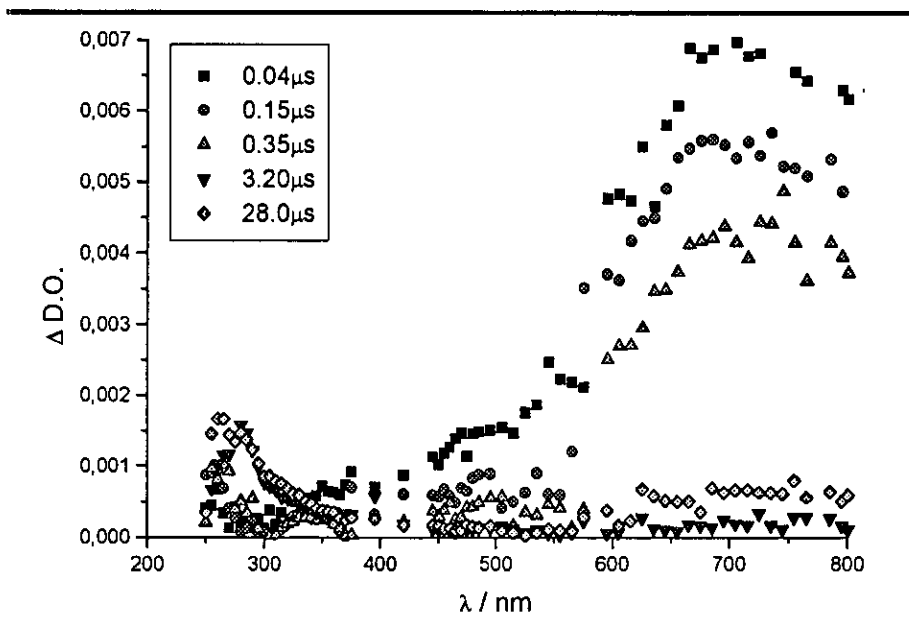


Figura 16.23. Espectro de absorción UV-Vis para la fotólisis de ametryn a 193 nm. Ar, [ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7, T=298.0 K.

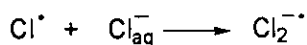
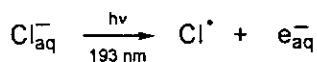
Se determinó el rendimiento cuántico de estas s-triazinas a 193 nm. Para lo que se estudió la dependencia entre el  $\Delta$  D.O. del electrón solvatado ( $e_{aq}^-$ ) frente a la energía del láser, encontrándose para todas ellas una dependencia lineal tal y como se ilustra en las siguientes figuras.

El rendimiento cuántico se obtiene por comparación del rendimiento obtenido de  $e_{aq}^-$  en estas reacciones, con el obtenido a partir de una disolución de NaCl que tenga la misma D.O. (Ecuación 16.6)

$$\frac{\Phi_{FI}(s\text{-triazina})}{\Phi_{FI}(Cl^-)} = \frac{m(s\text{-triazina})}{m(Cl^-)} \quad \text{Ec.16.6}$$

donde  $\Phi_{FI}$  representa el rendimiento cuántico de fotoionización para s-triazina y  $Cl^-$ , y  $m$  representa la pendiente de cada una de las rectas de la figura 16.25.

Para el ion  $Cl^-$   $\Phi_{FI}(193 \text{ nm})^3 = 0.41 \pm 0.08$



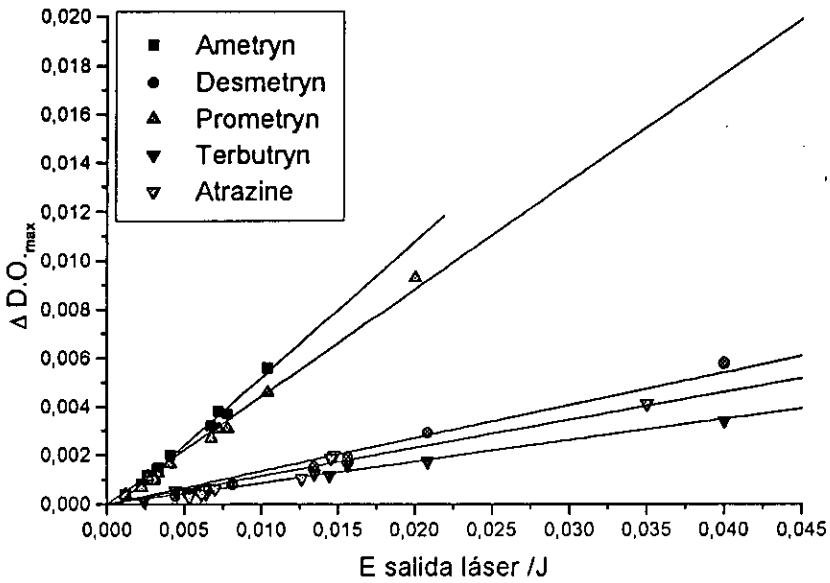


Figura 16.24. Influencia de la energía del láser en el rendimiento del  $e_{aq}^-$ .  
 $[s\text{-triazina}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , Ar, pH=7

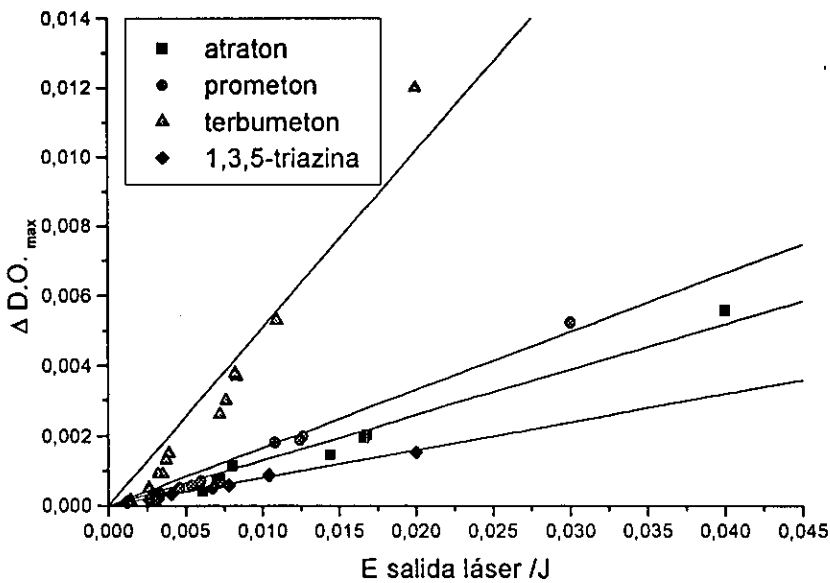


Figura 16.25. Influencia de la energía del láser en el rendimiento del  $e_{aq}^-$ .  
 $[s\text{-triazina}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , Ar, pH=7

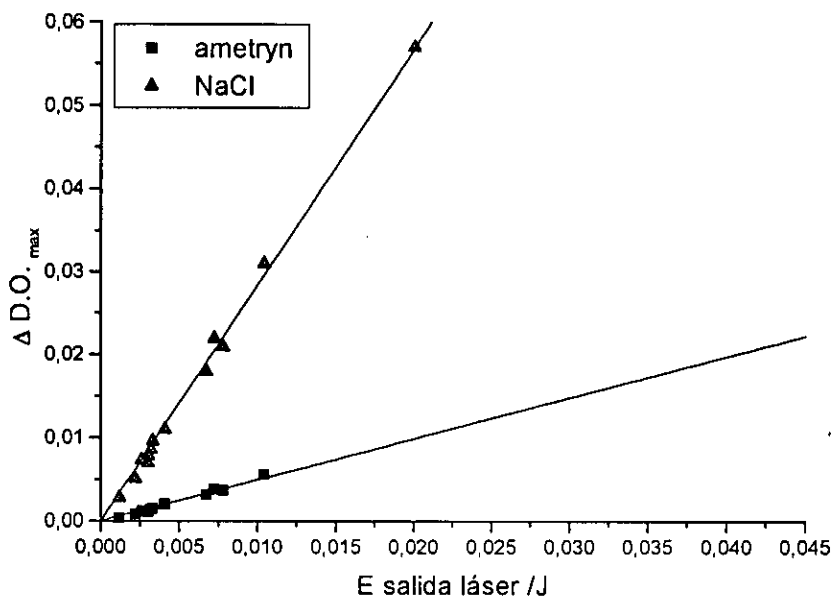


Figura 16.26. Determinación del rendimiento cuántico para la fotólisis de ametryn.

En la siguiente tabla se recogen los valores obtenidos para los rendimientos cuánticos de fotoionización,  $\Phi_{FI}$ , obtenidos para cada una de las s-triazinas estudiadas.

Tabla 16.4.

s-triazina	$\Phi_{FI}(193 \text{ nm})$	s-triazina	$\Phi_{FI}(193 \text{ nm})$
1,3,5-triazina	0.005	prometon	0.147
ametryn	0.071	terbutryn	0.129
atraton	0.078	terbumeton	0.065
atrazina	0.124	desmetryn	0.070
prometryn	0.129		



16.3. Fotólisis en estado estacionario a 254 nm.

Para la fotólisis de las s-triazinas se obtuvieron los siguientes espectros de absorción UV-Vis, en los cuales se observa la desaparición de la banda centrada sobre 220 nm correspondiente a las s-triazinas, tal y como se pone de manifiesto en las siguientes figuras.

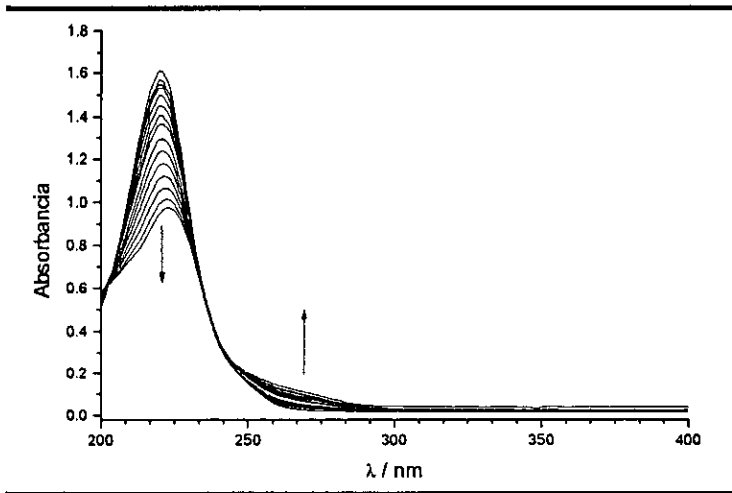


Figura 16.27. Espectro de absorción UV-Vis para la fotodegradación de prometon a 254 nm. [prometon]= $4.6 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 7$  h; T=298.0 K.

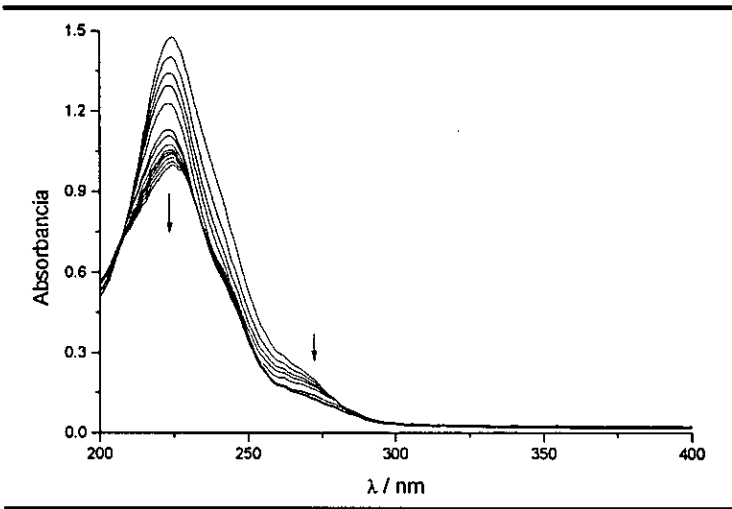


Figura 16.28. Espectro de absorción UV-Vis para la fotodegradación de prometryn a 254 nm. [prometryn]= $4.6 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 7$  h; T=298.0 K.

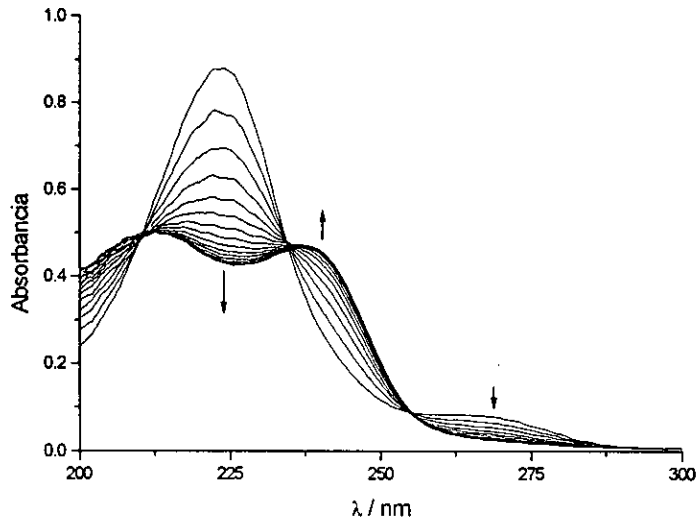


Figura 16.29. Espectro de absorción UV-Vis para la fotodegradación de atrazina a 254 nm. [atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 1$  h; T=298.0 K.

Para el caso de la atrazina se siguió además el aumento en la concentración de Cl<sup>-</sup> como resultando del proceso de fotodegradación. En las figuras 16.30 y 16.31 se muestran las trazas cinéticas correspondientes a la desaparición de la atrazina y a la aparición de Cl<sup>-</sup> respectivamente.

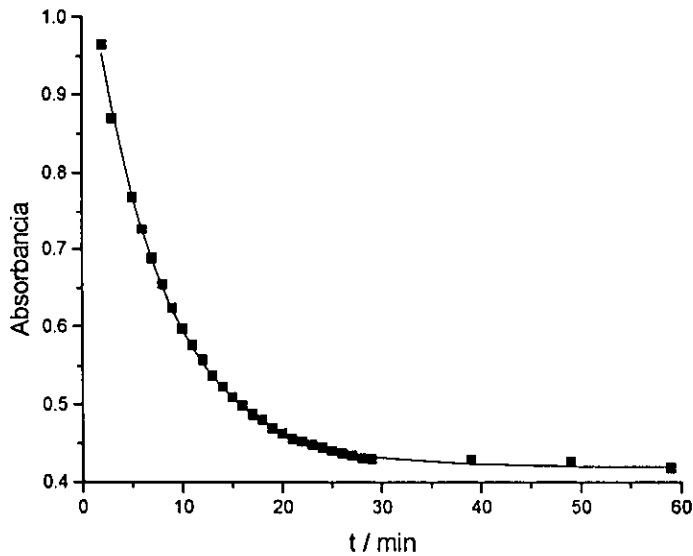


Figura 16.30. Fotodegradación de atrazina a 254 nm. [atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 1$  h;  $\lambda = 254$  nm; T=298.0 K.

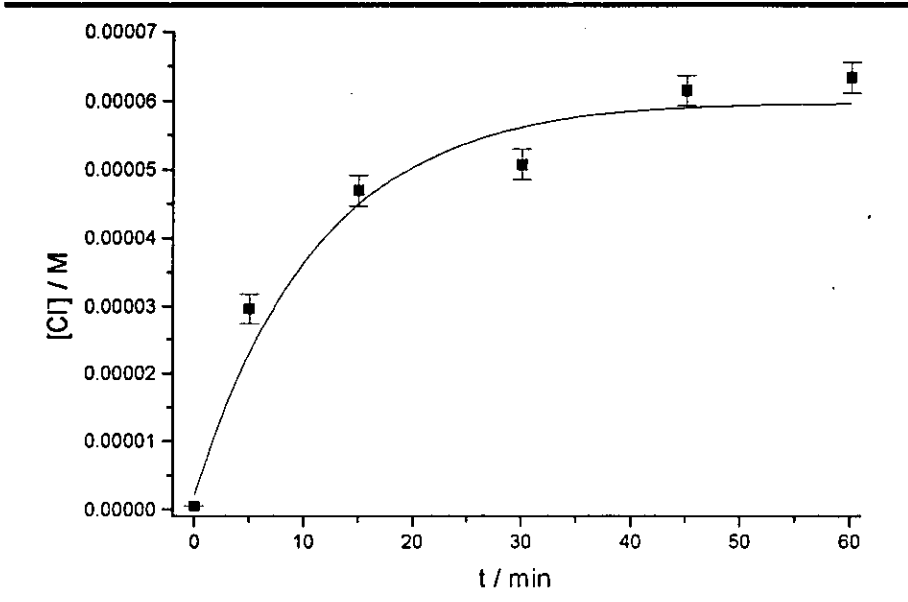


Figura 16.31. Cinética de generación del cloruros en la fotodegradación de atrazina a 254 nm. [atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH=6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 1$  h; T=298.0 K.

Ambos procesos se ajustan a una ecuación de orden uno, obteniéndose los siguientes valores para la constante de velocidad

$$k=0.138 \pm 0.002 \text{ min}^{-1} \text{ (medidas ópticas)}$$

$$k=0.11 \pm 0.02 \text{ min}^{-1} \text{ (medidas de [Cl}^{-}\text{])}$$

valores que están en buen acuerdo entre sí.

Se determinó también la variación del pH como consecuencia de la fotodegradación de atrazina, en este caso se observó una disminución del pH con el tiempo de irradiación, tal y como muestra la siguiente figura.

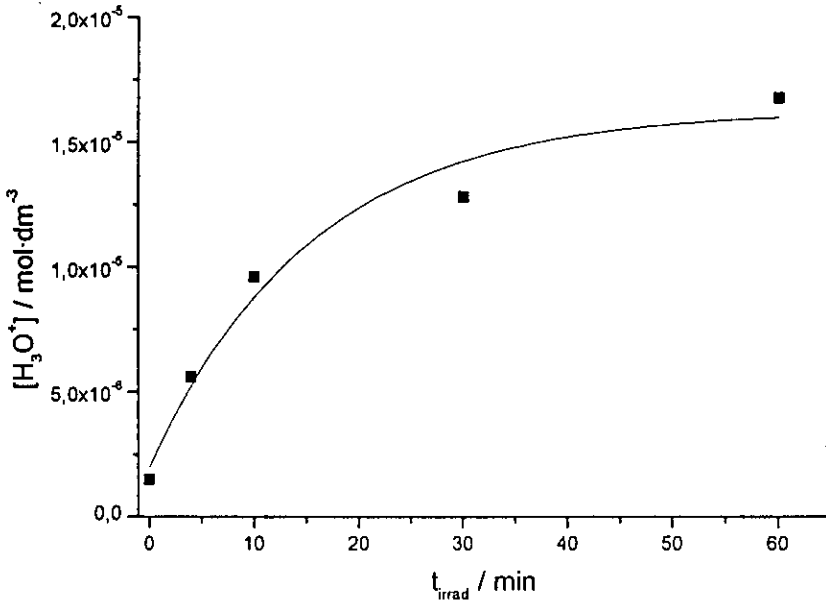


Figura 16.32. Variación del pH en la fotodegradación de atrazina a 254 nm. [atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol-dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 1$  h; T=298.0 K.

Este proceso se ajusta a una ecuación de orden uno, obteniéndose el siguiente valor para la constante de velocidad

$$k=0.06 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$$

Para las metiltio-s-triazinas, se llevó a cabo la reacción de derivatización de tioles con monobromobimano (capítulo 10: análisis de productos), que da lugar a la formación de un derivado que fluoresce. En este caso se observó un aumento del derivado monobromobimano con el tiempo de irradiación (figura 16.33)

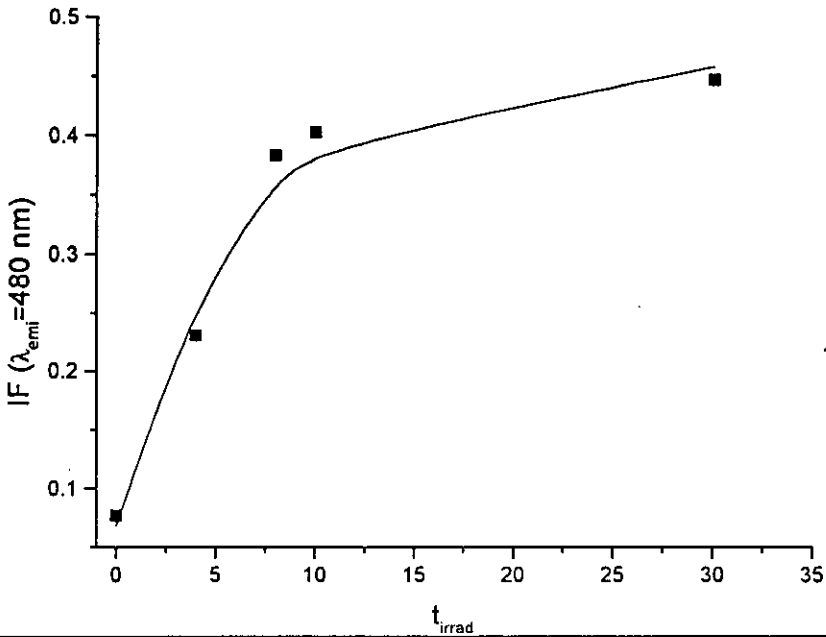


Figura 16.33. Generación del derivado monobromobimano de metanotiol formado a partir de la fotodegradación de prometryn a 254 nm. [prometryn]= $3.5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; pH=8; 5%MeOH;  $\lambda_{\text{exc}} = 394 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emi}} = 480 \text{ nm}$  T=298.0 K.

El proceso se ajusta a un proceso de orden uno, obteniéndose el siguiente valor para la ecuación de velocidad

$$k = 0.17 \pm 0.04 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$$

Valor que está en buen acuerdo con el obtenido para la desaparición de prometryn, tal y como se puede ver en la tabla 16.5.

Para estas s-triazinas también se observó un aumento del pH del medio con el tiempo de irradiación.

Fotodegradación de biocidas tipo s-triazina: resultados

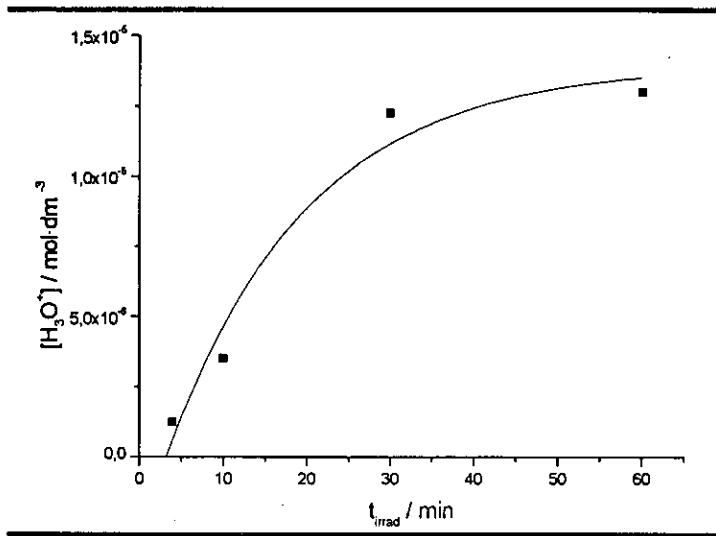


Figura 16.34. Variación del pH en la fotodegradación de ametryn a 254 nm. [ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol-dm<sup>-3</sup>; pH=6; 5%MeOH;  $t_{irrad}$  =1 h; T=298.0 K.

Este proceso se ajusta a una ecuación de orden uno, y se obtiene la siguiente constante de velocidad

$$k=0.06 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$$

Como se puede ver en la siguiente figura, a medida que aumenta el tiempo de irradiación se produce un aumento en la concentración de 2-hidroxi derivado

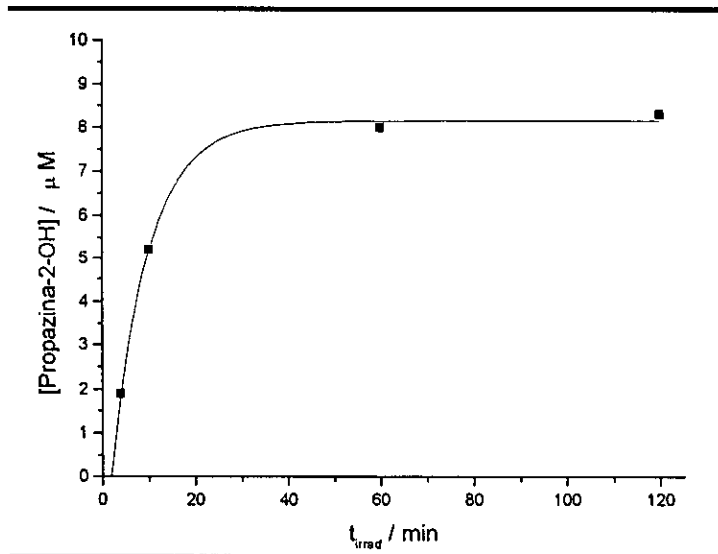


Figura 16.35. Generación de 2-hidroxi a partir de la fotodegradación de prometryn a 254 nm. [prometryn]= $3.5 \cdot 10^{-5}$  mol-dm<sup>-3</sup>; pH=6; 5%MeOH;  $\lambda_{exc}$  =394 nm;  $\lambda_{emi}$  =480 nm T=298.0 K.

En la siguiente tabla se recogen las constantes de velocidad obtenidas para la fotodegradación de las distintas s-triazinas estudiadas

Tabla 16.5.

s-triazina	k / min <sup>-1</sup>				
	Seguimiento óptico	Formación de 2-hidroxiderivado	Seguimiento MeSH	Seguimiento Cl <sup>-</sup>	Seguimiento H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
atrazina	0.138±0.002		-	0.11±0.02	0.06±0.02
ametryn	0.16±0.03			-	0.06±0.03
prometryn	0.116±0.001	0.12±0.01	0.17±0.04	-	
desmetryn	0.179±0.004		0.16±0.01	-	
terbutryn	0.16±0.02			-	

**16.4. Bibliografía.**

- (1) Dean, J. R.; Wade, G.; Barnabas, I. J. *Journal of Chromatography A* **1996**, *733*, 295-335.
- (2) Holcman, J.; Sehested, K. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*.
- (3) Iwata, A.; Nakashima, N.; Kusaba, M.; Izawa, Y.; Yamanaka, C. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *207*, 137.



## 17. Análisis de productos: Fotodegradación



## 17. ANÁLISIS DE PRODUCTOS.

Para la determinación de los productos resultantes de fotodegradación de s-triazinas se emplearon las técnicas de HPLC y GC/MS.

### 17.1. Condiciones cromatográficas.

#### 17.1.1. GC/MS

El análisis por GC/MS se realizó usando una columna capilar DB-WAX (30 m x 0.323 mm), con inyección splitless. La detección por espectrometría de masas se realizó mediante ionización por impacto electrónico, en modo de barrido total (Scan) y por selección de los diferentes iones moleculares característicos de los compuestos estudiados (SIM).

-Programa de temperatura:

	°C / min	°C	"Hold time"
Inicial		55	1.00
Rampa 1	15	210	0.00
Rampa 2	2	235	0.00
Rampa 3	5	275	3.00

-Temperatura del inyector: 240 °C

-Presión de la columna: 30 kPa

-Tiempo de splitless: 30 s

-Volumen de inyección: 1.0 µL

-Gas portador: helio

- Condiciones del espectrómetro de masas.

-Ionización por impacto electrónico (70 eV)

-Temperatura de la interfase: 245 °C

-Temperatura de la fuente de ionización: 250 °C

-Barrido en modo Scan y SIR.

### 17.1.2. HPLC.

#### 17.1.2.1. Condiciones cromatográficas.

Los análisis de HPLC fueron realizados en un sistema Waters equipado con una unidad de flujo, desgasificador en línea de cuatro canales, inyección automática, horno para columnas y módulo para el control de temperatura, y como detector se empleó un sistema de photodiode Array.

Se utilizó una columna de fase reversa C-18 Inertsil 5 $\mu$ m, de 250x4.6 mm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo:agua en gradiente, a 303 K, con un flujo de 1.2 mL/min y volumen de inyección de 100  $\mu$ L. La detección se hizo a 220 nm.

t/ min	%Acetonitrilo	%Agua
0	0	100
15	75	25
20	100	0
25	0	100

Se comprobó la linealidad de respuesta del detector con los compuestos analizados.

#### 17.2. Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon en medio acuoso (0.5 $\mu$ M) conteniendo aproximadamente un 0.7% de metanol. Las muestras así preparadas fueron fotolizadas mediante radiación láser 193 nm (20-40 mJ por pulso; 100 y 400 disparos pulsos) y por irradiación continua con una lámpara de mercurio de baja presión (254 nm). En este último caso las muestras se irradiaron durante 7 horas, tomando muestras cada 2 min durante los 10 primeros, y el resto cada 30 min.

Para los análisis de GC/MS una alícuota de la disolución fotolizada (0.5 mL) fue evaporada usando corriente de nitrógeno, y el residuo resultante se disolvió en acetato de etilo. Para el análisis por HPLC las muestras se utilizaron directamente.

**17.3. Resultados.**

*17.3.1. Fotólisis a 193 nm.*

El análisis mediante GC-MS de las distintas muestras de triazinas fotolizadas indica que en las condiciones experimentales empleadas la fotodegradación es poco importante, encontrando en todos los casos derivados desalquilados y la triazina de partida como productos finales. En la tabla 17.1 se muestran los productos encontrados.

s-triazina de partida	Productos encontrados
Terbutryn	Terbutryn
	Terbutryndesisobutil
	Terbutryndesetil
	Terbutryndesetildesisobutil
Prometryn	Prometryn
	Prometryn desisopropil
Desmetryn	Desmetryn
	Desmetryn desetil
Atraton	Atraton
	Atraton desetil

Tabla 17.1. Resultados obtenidos para el análisis de las diferentes disoluciones de triazinas fotolizadas con concentración de 100ng/μL, por GC/MS en modo SIM.

*17.3.2. Fotólisis a 254 nm.*

Mediante el análisis por GC/MS, de las muestras irradiadas de atrazina, atraton, terbumeton y ametryn se observó la desaparición de estos compuestos con el tiempo de irradiación y sólo se identificaron productos de fotodegradación de atraton y ametryn: atraton desisopropil y 4-metilamina-6-isopropilamina-1,3,5-triazina, respectivamente.

Por otro lado los resultados obtenidos por HPLC muestran la formación, en todos los casos, excepto para prometon y terbumeton, del derivado 2-hidroxi correspondiente así como la desaparición de la s-triazina, como resultado de la fotodegradación. Claramente, los derivados conteniendo un grupo -OMe en la

posición 2 son más estables a la fotodegradación. Para terbutryn y desmetryn, se identificaron sus derivados 2-hidroxi por analogía con los espectros de absorción UV-Vis y tiempos de retención con los que se caracterizan la 2-hidroxi-atrazina y la 2-hidroxi-propazina. En la tabla 17.2 se recogen los porcentajes de degradación de las s-triazinas.

Tabla 17.2.

s-triazina	t <sub>irra</sub> / min	% degradación
atracina	60	100
desmetryn	60	100
prometryn	60	100
prometon	120	17
terbutryn	120	73
terbumeton	360	18

Esta transformación no es cuantitativa, así para el prometryn sólo el 24% se transforma en 2-OH-prometryn. Además junto a éste se detectó un producto adicional para todos los casos, excepto para terbumeton y atrazina, que se caracteriza por el mismo tiempo de retención y espectro de absorción UV-Vis para las s-triazinas estudiadas. Para este producto no se ha podido identificar una estructura por el momento.

Para el estudio de la fotodegradación de las metiltio-s-triazinas, se llevó a cabo la reacción con monobromobimamo, utilizada para la identificación de tioles (Apartado 10.3), con los productos resultantes de la fotodegradación de estas s-triazinas. Se observó que a medida que aumenta el tiempo de irradiación, se produce un aumento en la señal correspondiente al derivado tiol. En la figura 17.1, se muestran los espectros de emisión de fluorescencia a distintos tiempos de irradiación, correspondientes a la reacción de monobromobimamo para la fotodegradación de desmetryn.

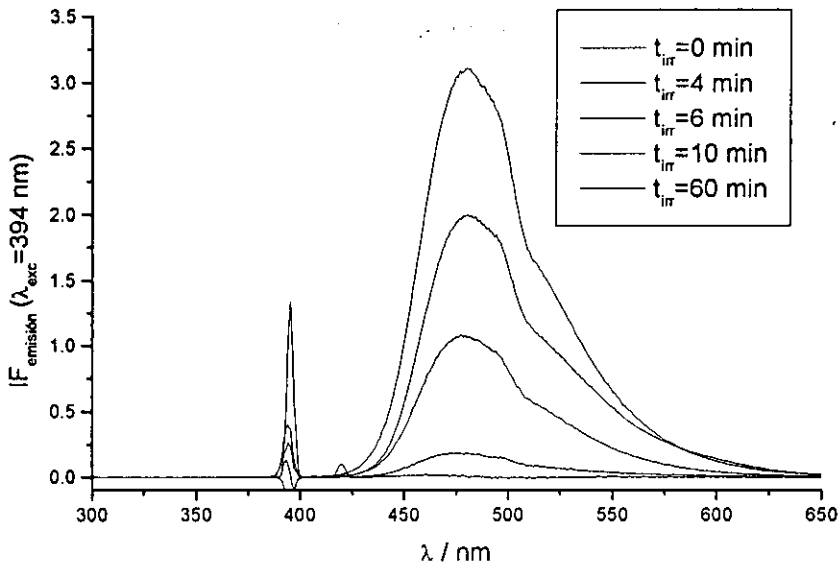
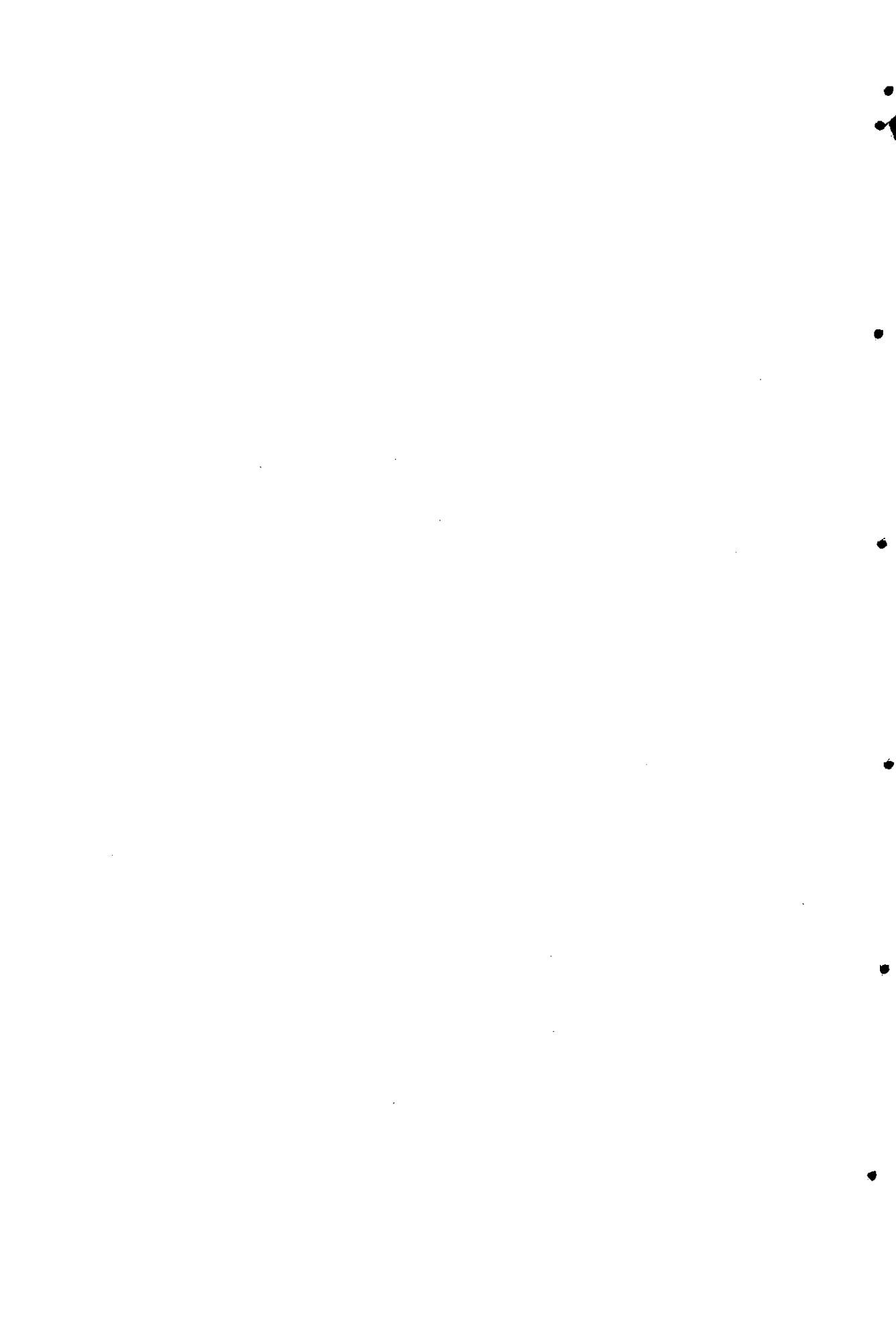


Figura 17.1. Espectro de emisión de fluorescencia del producto de fotodegradación de desmetryn a 254nm,  $\lambda_{\text{exc}}=394 \text{ nm}$ .  $[\text{desmetryn}]=2.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ;  $[\text{mBrB}]=4.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ . pH=8.

Este mismo tipo de resultados se obtuvo para prometryn y terbutryn.





18. Fotodegradación de biocidas tipo s-  
triazina: Discusión



Se han generado una serie de radicales derivados de herbicidas tipo s-triazinas y se ha estudiado su reactividad. Para ello se emplearon las técnicas de radiólisis de pulso y fotólisis de destello.

### 18.1. Generación del radical aniónico derivado de las s-triazinas. Reacción de mono-reducción electrónica

El electrón es el agente reductor por excelencia<sup>1</sup> tal como se espera a partir de su potencial de reducción  $E^{\circ} = -2.9 \text{ V}^2$ . Muchos compuestos reaccionan con él a velocidades próximas al control por difusión o mediante procesos puramente controlados por difusión. Su modo de reacción puede ser generalmente representado como procesos de transferencia mono-electrónica. El electrón hidratado actúa como nucleófilo en sus reacciones con moléculas orgánicas, y su reactividad se ve aumentada por sustituyentes que retiren carga unidos a dobles de enlaces en alquenos o a anillos aromáticos.

Mediante la ecuación de Debye-Smoluchowski (ecuación 18.1), para reacciones entre iones, se pueden determinar los límites superiores para las constantes cinéticas de control por difusión para las reacciones en disoluciones muy diluidas<sup>3</sup>.

$$k_D = 4\pi N_a \cdot (D_B + D_C) \cdot (r_B + r_C) \cdot \frac{W}{e^W - 1}; \quad W = \frac{z_B \cdot z_C \cdot e^2}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r k_B T \cdot (r_B + r_C)} \quad \text{Ec.18.1}$$

donde:

- $D_B$  y  $D_C$  son los coeficientes de difusión de B y C en el disolvente.
- $r_B$  y  $r_C$  son los radios de B y C.
- $z_B$  y  $z_C$  son las cargas de B y C.
- Para calcular W, se considera que  $(r_B + r_C)$  es igual al valor de a en la ecuación de Debye-Hückel, es decir el diámetro iónico medio.
- $k_B$  es la constante de Boltzmann ( $1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ )
- $\epsilon_0$  y  $\epsilon_r$  son la permitividad del vacío y la constante dieléctrica del disolvente respectivamente.  $\epsilon_r = 78.4$ , para el agua a  $25^\circ\text{C}$

Aceptando las aproximaciones de esta ecuación, moléculas esféricas, radios iguales y mediante la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 18.2), la cual no

hace referencia a la carga de las especies que se difunden y supone además que la fuerza viscosa es proporcional a la velocidad resulta:

$$D_B \approx \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta r_B} \quad \text{Ec.18.2}$$

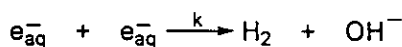
donde  $\eta$  es la viscosidad del disolvente, que para agua a 25°C y 1 atm tiene un valor de  $8.90 \cdot 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Mediante las ecuaciones 18.1 y 18.2 y considerando que en las condiciones de pH de trabajo, pH=7, las s-triazinas se encuentran desprotonadas,  $pK_a \sim 5^4$  la reacción tendrá lugar entre una especie neutra, la s-triazina, y una especie cargada, el electrón solvatado, con todo esto se obtiene un valor para la constante de velocidad por difusión de  $k_D = 1.4 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Comparando este valor con las constantes de velocidad para la reacción de mono-reducción electrónica obtenidas para las distintas s-triazinas estudiadas, éstas son aproximadamente de un orden de magnitud inferior, por lo que las reacciones estudiadas se encuentran cerca del control por difusión, sin alcanzarlo.

Para estudiar la reacción de las s-triazinas se trabajó en condiciones de pseudoorden uno, en exceso de s-triazina. Encontrando una dependencia lineal (capítulo 9) de la constante de velocidad observada ( $k_{\text{obs}} / \text{s}^{-1}$ ), para la desaparición del electrón solvatado, con la concentración de s-triazina, pudiéndose establecer la siguiente ecuación de velocidad

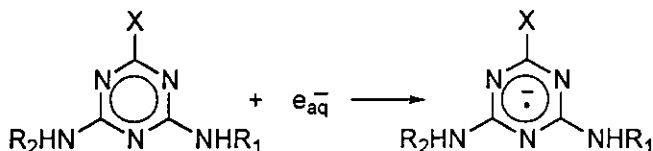
$$v = k_{\text{obs}} \cdot [e_{\text{aq}}^-] = (k_0 + k_{e_{\text{aq}}^-} \cdot [s\text{-triazina}]) \cdot [e_{\text{aq}}^-] \quad \text{Ec.18.3}$$

donde  $k_{e_{\text{aq}}^-}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de la s-triazina con el electrón y  $k_0$  corresponde a la desaparición del  $e_{\text{ac}}^-$  en ausencia de s-triazina. Que la ordenada en el origen sea distinta de cero se puede justificar teniendo en cuenta que a pesar de que el electrón tiene un tiempo de vida suficientemente largo como para detectar su presencia espectrofotométricamente, el electrón decae unimolecularmente generando hidrógeno e ion hidróxido



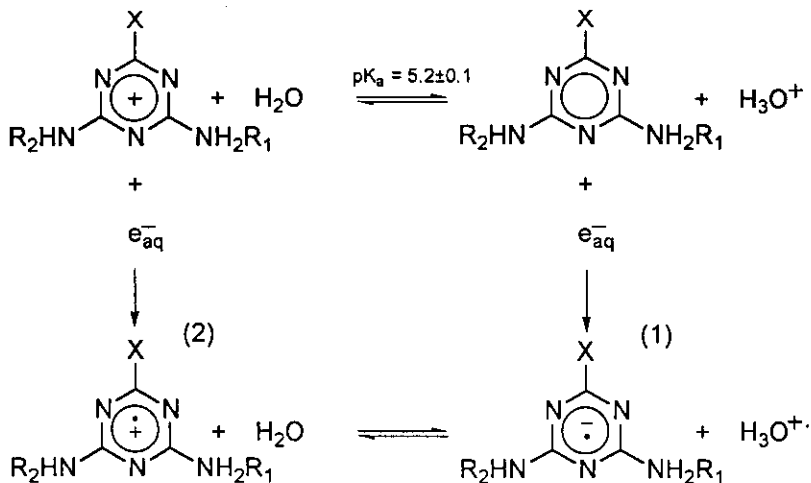
donde  $k = 5 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  <sup>5</sup>, además se trata de una especie muy reactiva que podría reaccionar con cualquier impureza presente en el medio.

Como consecuencia de la reacción del  $e_{aq}^-$ , reacción de mono-reducción, con las s-triazinas se genera el radical correspondiente que se caracteriza por tener un máximo de absorción centrado sobre 300 nm (figura 16.1)



Esquema 18.1

A partir de la dependencia de la velocidad observado con el pH (figura 16.7) se obtuvo un  $pK_a = 5.2 \pm 0.1$ , que correspondería al de la s-triazina. A pH mayores que 5 la especie mayoritaria corresponde a la especie neutra, y en estas condiciones tendría lugar la formación del radical aniónico (1), a pH inferiores a este se formaría una nueva especie (2) muy inestable que no ha podido ser detectada en las condiciones experimentales.



Esquema 18.2

De las constantes de velocidad observadas (tabla 18.1) para la formación del radical aniónico se puede concluir que la especie más reactiva frente al  $e_{ac}^-$  sería el radical catiónico (2), lo que estaría de acuerdo con lo esperado.

Tabla 18.1.

pH	$k_{obs}$ (600 nm) / $s^{-1}$
5	$(6.9 \pm 0.5) \cdot 10^5$
11	$(3.53 \pm 0.01) \cdot 10^5$

Mediante la técnica de fotólisis de destello se obtuvo un espectro igual al obtenido mediante radiólisis de pulso, observándose que después del pulso del láser (20 ns) los espectros se caracterizan por una banda de absorción con un máximo sobre 720 nm, banda que corresponde al  $e^-_{aq}$ .

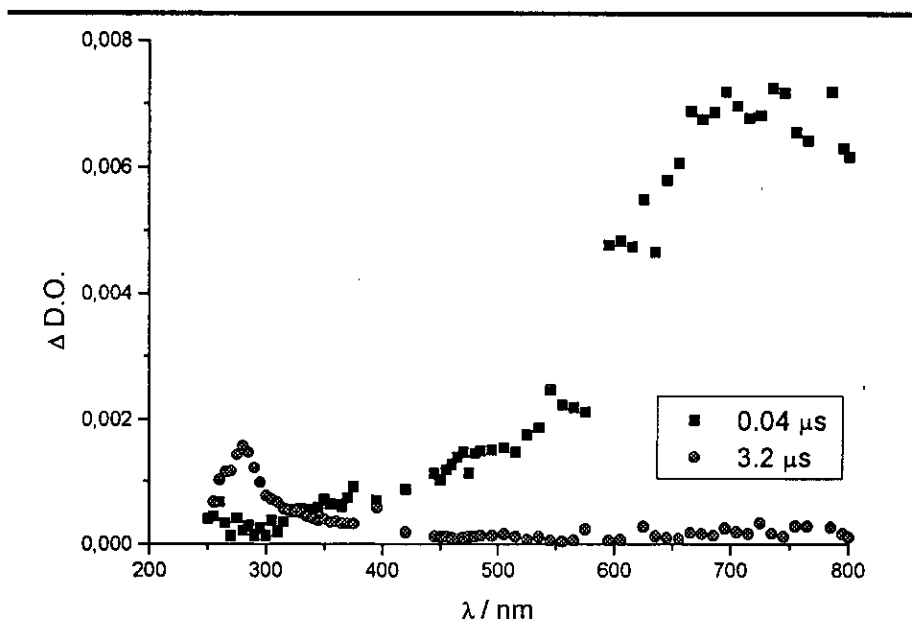
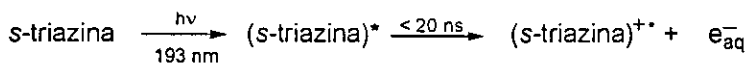


Figura 18.1. Espectro de absorción correspondiente al radical aniónico de ametryn, obtenido mediante LFP (193 nm).

La formación de  $e^-_{aq}$  es una prueba de la fotoionización de las s-triazinas, y como aparece inmediatamente como consecuencia del pulso del láser, el estado excitado correspondiente deberá tener un tiempo de vida inferior a 20 ns.



Esquema 18.3

El electrón solvatado formado por fotoionización desaparece, al mismo tiempo que aparece una nueva banda de absorción centrada sobre 290 nm, probablemente debido a que la s-triazina sin fotoionizar actúa como trampa de  $e^-$  generando el correspondiente radical aniónico. Esto está de acuerdo con las constantes de velocidad observadas para la reacción del electrón con las s-triazinas.

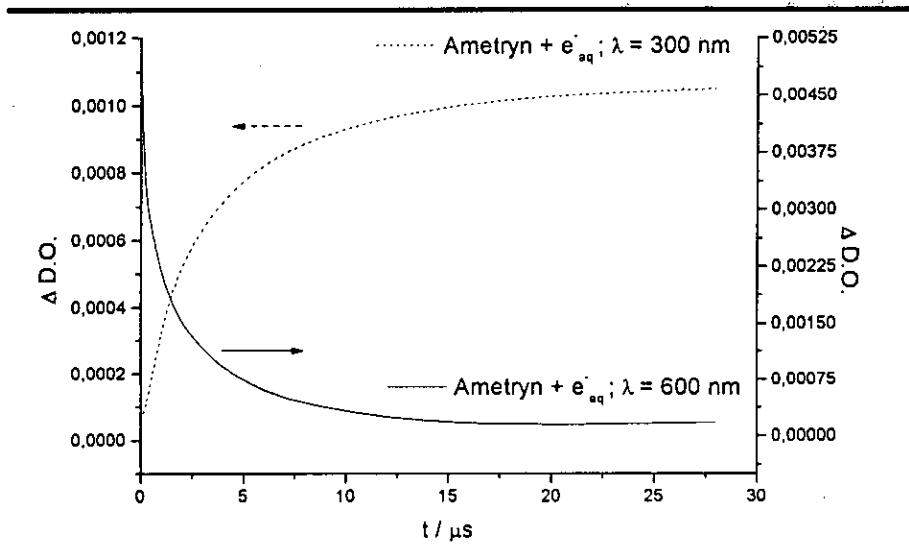
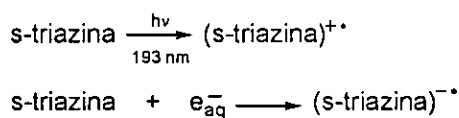


Figura 18.2. Trazas cinéticas correspondientes a la desaparición del e<sub>ac</sub><sup>-</sup> y formación del radical aniónico de ametryn. LFP (193 nm), saturada con Ar, [ametryn]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7; T=298.0 K

Así una fracción de s-triazina ametryn se ioniza,  $\Phi_{FI}(193\text{ nm})=0.071$ , para dar lugar al correspondiente radical catiónico y e<sub>aq</sub><sup>-</sup>. Dado que la reacción de s-triazina con e<sub>aq</sub><sup>-</sup> es muy rápida, del orden de 10<sup>9</sup> mol<sup>-1</sup>·dm<sup>3</sup>·s<sup>-1</sup>, este reacciona rápidamente con la s-triazina que no se ha fotoionizado para dar lugar al correspondiente radical aniónico, observándose el decaimiento del e<sub>ac</sub><sup>-</sup> y simultáneamente la aparición del radical aniónico (figura 18.1), tal y como se indica en el siguiente esquema



Esquema 18.4

Para todas las s-triazinas estudiadas se encontró un rendimiento cuántico de fotoionización bajo para radiación de excitación de 193 nm (6.4 eV por fotón). Estos valores bajos indicarían que el decaimiento del estado excitado ocurre a través de otros procesos distintos de la ionización. En todos los casos, figuras 16.23 y 16.24, se encontró una dependencia lineal entre la ΔD.O. del electrón solvatado y la energía del pulso láser de 193 nm lo que indica que el proceso es monofotónico.

También se intentó estudiar la fotoionización de las s-triazinas, empleando un radiación menos energética, 248 nm (4.9 eV por fotón). En estas condiciones se observa cierto grado de fotoionización, aparece señal a 720 nm correspondiente a  $e^-_{aq}$ , pero debido a que es muy débil no se puede determinar el rendimiento cuantico. Probablemente el proceso sea bifotónico, y la energía que proviene de un fotón (248 nm, 4.9 eV) no sea suficiente para ionizar las s-triazinas. Por lo tanto para que la fotoionización ocurra serán necesarios, al menos dos fotones. Tal como se indicó anteriormente, la energía proporcionada por el pulso láser de 193 nm es 6.4eV por fotón, es capaz de ionizar las s-triazinas mediante un proceso monofotónico, lo cual es termodinámicamente factible si se considera  $\sim 3.5 \text{ eV}^6$  como energía adicional debida a la solvatación de los productos de fotoionización, por lo que  $\sim 9.9 \text{ eV}$  sería la energía disponible para el proceso de ionización, mientras que cuando la radiación de excitación es 248 nm la energía disponible es 8.4 eV (el láser contribuye con 4.9 eV por fotón y  $3.5 \text{ eV}^6$  adicionales debidos a la solvatación de los productos de fotoionización). Se pueden establecer así los límites para ionización en agua de las s-triazinas  $8.4 \leq PI \leq 9.9 \text{ eV}$ .

## 18.2. Reacción de mono-oxidación electrónica.

### 18.2.1. Reacción con $HO^\bullet$ .

El radical  $HO^\bullet$  es un importante oxidante monoelectrónico. Su potencial de reducción es  $E^\circ (HO^\bullet, H^\bullet/H_2O) = 2.7 \text{ V}^2$ ;  $E^\circ V(HO^\bullet/OH^\bullet) = 1.8 \text{ V}^2$ . A pesar de ello, el  $HO^\bullet$  normalmente no reacciona por transferencia electrónica, pero sí por adición, no sólo con compuestos orgánicos que posean dobles enlaces, si no también con aniones e incluso iones metálicos.<sup>7</sup>

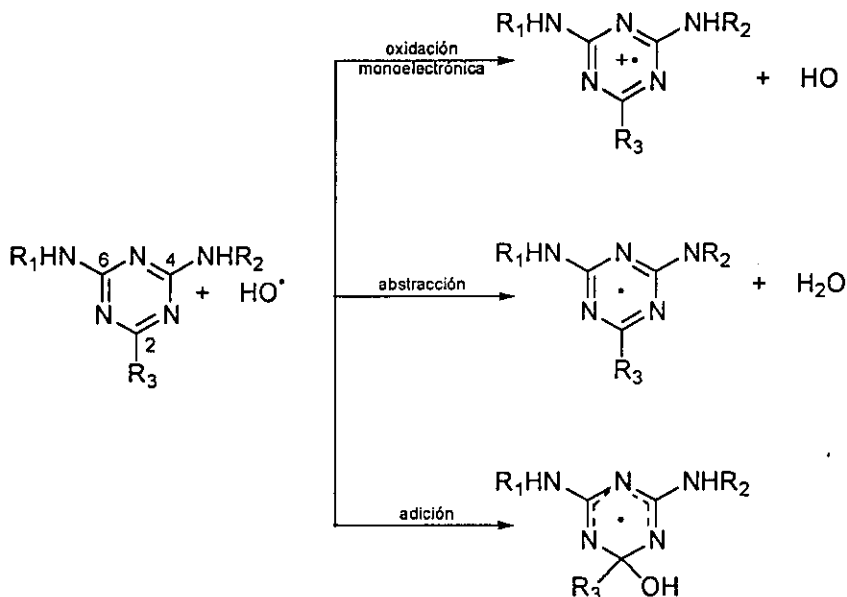
Este radical reacciona con compuestos heterocíclicos que contienen dobles enlaces mediante la adición a un átomo de carbono insaturado<sup>8-14</sup>, y con compuestos heterocíclicos saturados por abstracción de hidrógeno de un carbono.<sup>15</sup> Para los derivados de piridina y pirimidina, compuestos heterocíclicos de seis miembros, este radical reacciona de forma selectiva mediante reacciones de adición<sup>8-10,12,13</sup> y de H-abstracción<sup>15</sup>

Esta tendencia a la adición en vez de a la oxidación probablemente sea debida a la estabilización del estado de transición por la formación de un nuevo



enlace, mientras que la transferencia electrónica requiere reorganización de enlaces y de disolvente lo que supone un cambio importante en la energía libre para alcanzar el estado de transición.

En el esquema 18.5 se muestran las posibles reacciones que podrían tener lugar entre el radical HO<sup>•</sup> y las s-triazinas estudiadas.



Esquema 18.5 Posibles vías para la reacción de s-triazina con el radical HO<sup>•</sup>.

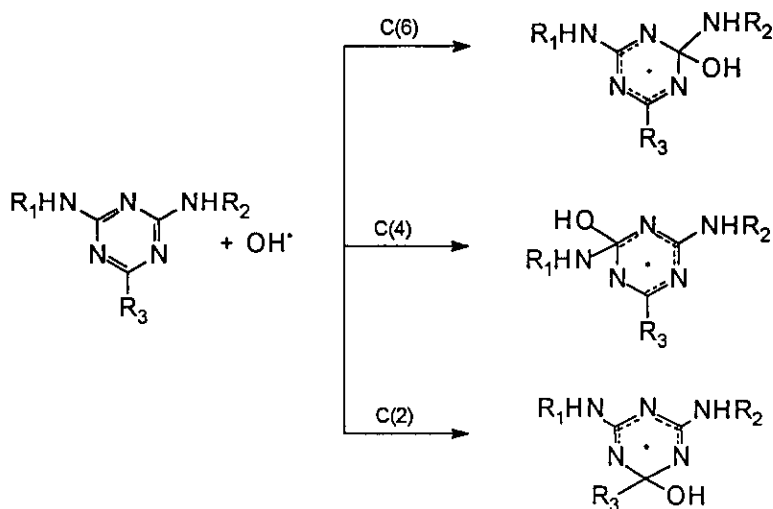
Para comprobar el mecanismo a través del cual tiene lugar la reacción, se realizaron experimentos con detección de conductividad, tratando de comprobar si tenía lugar la adición del radical HO<sup>•</sup>, una reacción de oxidación o la abstracción de un hidrógeno. Así un aumento de la conductividad durante la reacción indicaría una reacción de oxidación debido al aumento de la concentración de ion HO<sup>-</sup>, mientras que si la conductividad no experimentase ningún cambio indicaría un proceso de adición, y por tanto la formación de un aducto de HO o un proceso de abstracción de hidrógeno.

En el caso de la reacción de la s-triazina prometón no se observó cambio notable en la conductividad.

Comparando las conductividades obtenidas para la *N,N*-dimetilanilina y el prometón se obtiene que la reacción con la s-triazina tiene lugar casi cuantitativamente (97%) *vía* adición al anillo aromático para formar el aducto del radical HO<sup>•</sup> mientras que sólo el 3% transcurre *vía* oxidación

monoelectrónica o bien *vía* abstracción de hidrógeno ( $H^{\bullet}$ ). Existe abundante bibliografía<sup>7-14</sup>, en donde se indica que la principal *vía* de reacción del radical  $HO^{\bullet}$  es la adición, por lo que basándose en esto se podría descartar la abstracción de hidrógeno como proceso a través del cual tiene lugar la reacción de las s-triazinas con  $HO^{\bullet}$ . Sobre la base de los resultados de conductividad y la información bibliográfica, se puede establecer que la reacción principal de las s-triazinas estudiadas con el radical hidroxilo es la adición.

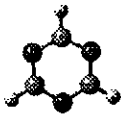
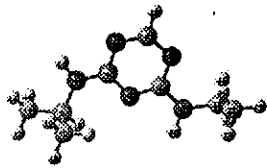
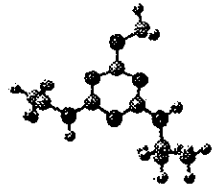
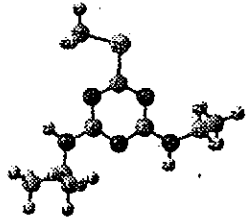
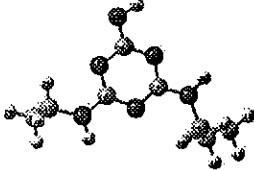
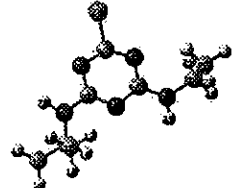
Tal y como se indicó anteriormente la adición tiene lugar sobre dobles enlaces. Para las s-triazinas estudiadas la adición tendrá lugar sobre alguno de los átomos de carbono, C(2), C(4), y C(6), ya que la adición sobre cualquiera de los nitrógenos del heterociclo (N(1), N(3) y N(5)) es menos probable que ocurra, ya que debido a la naturaleza nucleofílica del radical  $HO^{\bullet}$ , el ataque de éste sobre otro átomo de afinidad electrónica comparable, como es el nitrógeno, es desfavorable.



Esquema 18.6

Un análisis de la densidad electrónica de carga en  $C_2$  para las distintas s-triazinas muestra (Tabla 18.2) que en todos los casos existe cierta deficiencia electrónica en esta posición.<sup>16</sup> Esto está de acuerdo con la discusión anterior, en el sentido de que la adición del radical  $HO^{\bullet}$  debería ocurrir en la posición  $C_2$ .

Tabla 18.2.

B3LYP/6-31g(d,p)		
Compuesto	Carga posición 2	Estructura
Triazina	0.242926	
TH	0.251430	
TOMe	0.685101	
TSMe	0.272177	
TOH	0.656304	
TCI	0.266696	

El aducto de HO<sup>•</sup> generado evoluciona hasta dar los productos finales de oxidación. En la bibliografía<sup>17</sup> se encuentra para la fotodegradación de atrazina, atraton, y ametryn, la 2-hidroxi-atrazina como producto mayoritario de fotodegradación. La et y col. también encontraron 2-hidroxi atrazina como producto resultante de la reacción de atrazina con HO<sup>•</sup>, generado mediante el sistema H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV.<sup>18</sup> También concuerda con los resultados de fotólisis a 254 nm.

No se observó reacción de este radical con la 1,3,5-triazina, probablemente debido a que no tiene sustituyentes que activan el anillo para que tenga lugar la adición del radical HO<sup>•</sup>. La excepción observada para la reacción de HO<sup>•</sup> con 1,3,5-triazina no concuerda con los resultados teóricos (Tabla 18.2). Esto podría ser debido al hecho de que los cálculos realizados se refieren al vacío.

Se determinaron los pK<sub>a</sub> del aducto de HO<sup>•</sup> para dos de las s-triazinas estudiadas, obteniéndose pK<sub>a</sub>=9.8±0.2 para el atraton y pK<sub>a</sub>=9.8±0.2 para el prometon. Estos valores representan un límite inferior porque a valores de pH algo elevados se produce una importante interferencia del radical CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> [ε(600 nm)=2000±100 mol<sup>-1</sup>·dm<sup>3</sup>·cm<sup>-1</sup>].<sup>19,20</sup>

Como vía alternativa para la generación del aducto de HO<sup>•</sup> se utilizó la técnica de fotólisis de destello utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y λ=248 nm para generar el radical HO<sup>•</sup>. El espectro de absorción UV-Vis resultante es esencialmente el mismo al obtenido mediante radiólisis de pulso, confirmando así la asignación de la banda a 420 nm al aducto de HO<sup>•</sup>

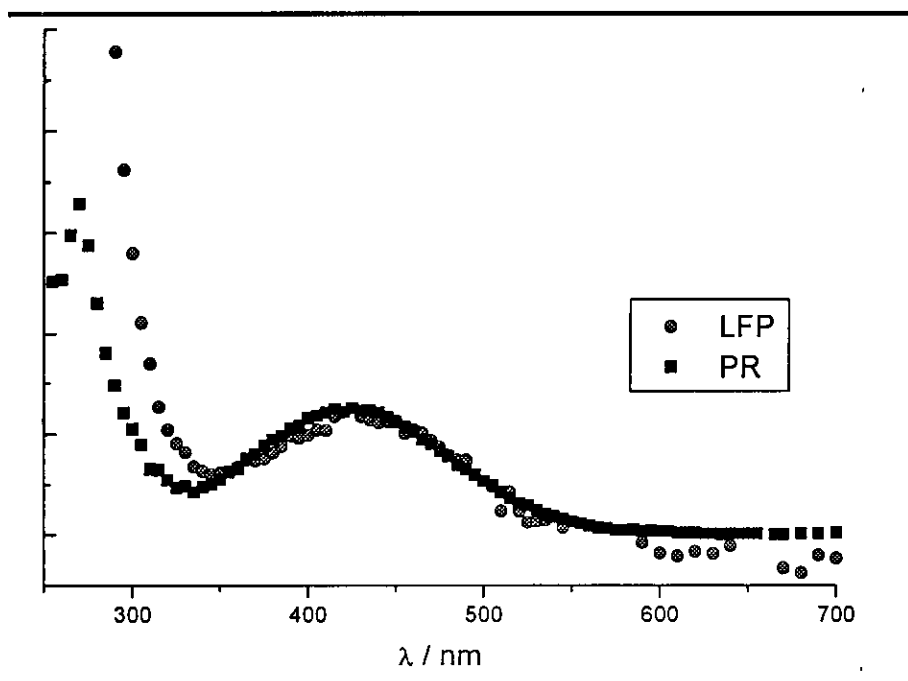


Figura 18.3. Espectro de absorción UV-Vis para la reacción de prometon con HO• [prometon]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>, pH=6, T=298.0 K. LFP: láser 248 nm, Ar, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=0.1·mol·dm<sup>-3</sup>. PR: N<sub>2</sub>O

Para las s-triazinas estudiadas se encontró, tal y como se muestra en el capítulo 9, una dependencia lineal de la velocidad de desaparición del radical HO• con la concentración, pudiendo escribirse la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{HO}^\bullet] = (k_0 + k_{\text{HO}^\bullet} \cdot [\text{s-triazina}]) \cdot [\text{HO}^\bullet] \quad \text{Ec.18.4}$$

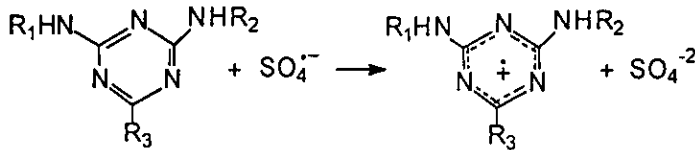
donde  $k_0$  corresponde a la desaparición del HO• en ausencia de s-triazina, y  $k_{\text{HO}^\bullet}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de la s-triazina con este radical.

### 18.2.2. Reacción con SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>.

El radical aniónico SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>, al igual que el radical HO• es un fuerte oxidante mono-electrónico [E°(SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)=2.43 V].<sup>21</sup>

Este radical aniónico reacciona con diferentes compuestos aromáticos para dar lugar a radicales hidroxiclohexadienilo (OH-adtuctos), cuya formación puede ser explicada bien por adición del SO<sub>4</sub><sup>•-</sup> al anillo, seguido por hidrólisis o

bien mediante transferencia electrónica desde el anillo a  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , seguido por hidroxilación del radical catiónico resultante<sup>22</sup>. Para otros compuestos aromáticos, derivados metilados de benceno<sup>23,24</sup>, *N*-fenilglicina<sup>25</sup> la oxidación tiene lugar mediante transferencia electrónica resultando como producto de oxidación el correspondiente radical catiónico.



Esquema 18.7 Radical catiónico.

En el tiempo de desaparición del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ , 60  $\mu\text{s}$ , no se observó la aparición de ningún máximo de absorción por encima de 250 nm, por lo que probablemente el tiempo de vida de este radical,  $[\text{s-triazina}]^{\bullet+}$ , sea inferior a la escala de tiempo utilizada, o bien su coeficiente de absorción molar sea inferior al del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$ . En posteriores trabajos se ha estimado para el radical  $[\text{s-triazina}]^{\bullet+}$ , generado por fotólisis (266 nm), un tiempo de vida media no superior a los 2 ns.<sup>16</sup>

No se observó reacción de mono-oxidación electrónica para la 1,3,5-triazina, probablemente debido a que no tiene sustituyentes dadores de electrones, capaces de estabilizar la carga positiva que se generaría, estabilizando así el radical generado.

Para las *s*-triazinas estudiadas se encontró, tal y como se muestra en el capítulo 9, una dependencia lineal de la velocidad de desaparición del radical  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  con la concentración, pudiendo escribirse la siguiente ecuación de velocidad

$$v = k_{\text{obs}} \cdot [\text{SO}_4^{\bullet-}] = (k_0 + k_{\text{SO}_4^{\bullet-}} \cdot [\text{s-triazina}]) \cdot [\text{SO}_4^{\bullet-}] \quad \text{Ec.18.5}$$

donde  $k_0$  corresponde a la desaparición del  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  en ausencia de *s*-triazina, y  $k_{\text{SO}_4^{\bullet-}}$  corresponde a la constante de velocidad de orden dos debida a la reacción de la *s*-triazina con este radical.

### 18.2.3. Reacción con $Tl^{+2}$

Como vía alternativa para la generación de los radicales aniónicos de las s-triazinas estudiadas, se utilizó el  $Tl^{+2} / Tl^{+}$  ( $E^{\circ}=2.22 \text{ V}$ )<sup>26</sup> como agente oxidante y no se encontró reacción.

A partir de los resultados obtenidos para la reacción de oxidación mono-electrónica con distintos oxidantes se pueden establecer los límites en lo que se encuentra el potencial de reducción de estas s-triazinas. La no existencia de reacción de monooxidación con  $Tl^{+2}$ ,  $E^{\circ}=2.22 \text{ V}$ <sup>26</sup>, nos indicaría que el límite inferior para el potencial redox es 2.22 V. Si se encontró reacción de monooxidación electrónica cuando el oxidante utilizado fue el radical  $\cdot SO_4^{-}$  [ $E^{\circ}(SO_4^{\cdot-}/SO_4^{-2})=2.43 \text{ V}$ ]<sup>21</sup>, y en la bibliografía se encuentra que también hay reacción de monooxidación cuando se emplea como oxidante  $^{*}UO_2^{2+}$  [ $E^{\circ}(^{*}UO_2^{2+}/UO_2^{\cdot+})=2.65 \text{ V}$ ]<sup>27</sup>, por lo que el potencial de reducción de estas s-triazinas está limitado entre  $2.4 < E^{\circ} < 2.6 \text{ V}$ . Este alto valor observado para  $E^{\circ}([s\text{-triazina}]^{*+} / s\text{-triazina})$  tiene importantes implicaciones para el mecanismo de acción de estos herbicidas. Estos herbicidas actúan inhibiendo el transporte electrónico durante la fotosíntesis.<sup>28,29</sup>

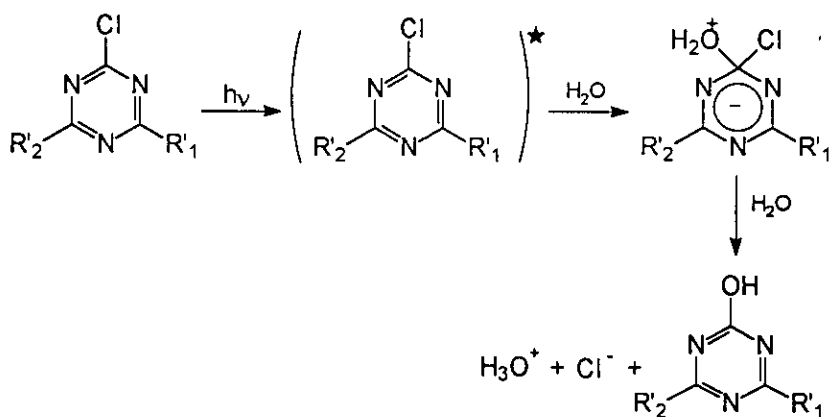
### 18.3. Fotólisis a 193 nm y en estado estacionario a 254 nm.

El análisis de productos de las muestras irradiadas a 254 nm de s-triazina indicaron que en todos los casos, excepto prometon y terbumeton, el producto principal obtenido era la 2-hidroxi-triazina correspondiente. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en la bibliografía. Así, Pape y Zabik<sup>30</sup> encontraron para la fotólisis directa de atrazina, ametryn, prometryn, etc. el 2-hidroxi-derivado con rendimientos altos (~90%). Doré y col. también identificaron la 2-hidroxi-atrazina como uno de los posibles productos de fotodegradación a esta longitud de onda.<sup>31</sup> Esto está de acuerdo con la observación de que la atrazina sufre fotodeshalogenación en medio acuoso, dando lugar al compuesto hidroxilado, que posteriormente sufre fotodesalquilación.<sup>32</sup>

Como ya se indicó anteriormente, el análisis de la densidad electrónica de carga en las s-triazinas (ver tabla 18.2) indica que en la posición C<sub>2</sub> hay una deficiencia electrónica en todos los casos. Esta deficiencia es menos acusada

en el caso de los derivados con sustituyentes  $-OH$ , y  $-OMe$  en esta posición. Este hecho está de acuerdo con la observación de generación preferencial de 2-OH derivados como producto de fotólisis, así como el hecho de que la fotólisis de 2-OH y 2-OMe derivados sea más lenta.<sup>33</sup>

Se observó un aumento de la concentración de cloruros así como una disminución del pH a medida que aumentaba el tiempo de irradiación, es decir tendría lugar un proceso de fotodeshalogenación que daría lugar al 2-hidroxi derivado correspondiente. Esto permite proponer el siguiente mecanismo para el proceso



Esquema 18.8

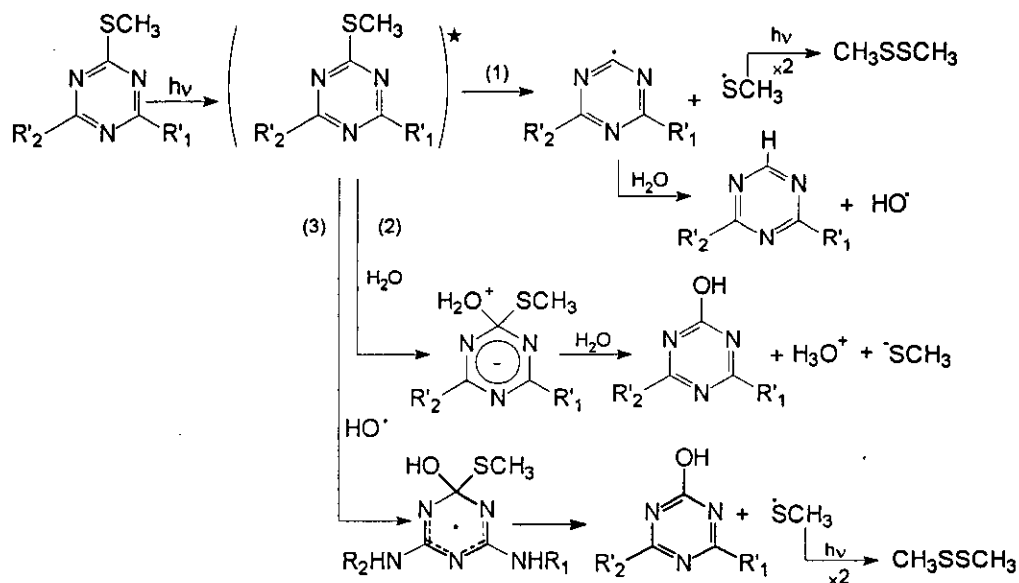
Lo que justificaría además la disminución del pH.

Las constantes de velocidad obtenidas para el proceso de desaparición de atrazina, aparición de ion cloruro y de  $H_3O^+$  son  $(0.138 \pm 0.002)$ ,  $(0.11 \pm 0.02)$  y  $(0.06 \pm 0.02) \text{ min}^{-1}$  respectivamente, en razonable acuerdo entre si.

Para la fotólisis de las metiltio-s-triazinas, se observó una disminución en el pH, así como un aumento en la concentración de 2-hidroxi-derivado, y de metanotiol con el tiempo de irradiación. Además para el caso del ametryn, se detectó mediante su espectro de masas el 4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina. Esto concuerda con la observación de Pape y Zabik<sup>30</sup> que obtuvieron como productos derivados de la fotodegradación de ametryn, prometryn y simetryn en agua, los 2-H derivados. Barceló y col. también identificaron como fotoproducto, el 2-H derivado de propazina junto con los 2-hidroxi y desalquil derivados.<sup>34</sup>



A la vista de los resultados se puede proponer el siguiente mecanismo para el proceso.

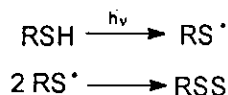


Esquema 18.9

Dado que se trabajó a 254 nm, longitud de onda para la cual no tiene lugar la generación de radicales HO<sup>•</sup> a partir del agua, y se trabajó también en ausencia de promotores del radical HO<sup>•</sup>, la vía (3) propuesta en el anterior mecanismo debería ser muy minoritaria con respecto al resto. Para el ametryn, prometryn, terbutryn y desmetryn se encontró como producto principal el 2-hidroxi-derivado, lo que está de acuerdo con la bibliografía.<sup>30</sup>

Los valores de las constantes de velocidad para la desaparición de prometryn, formación de metanotiol y 2-hidroxi-derivado son (0.116±0.001) y (0.17±0.04) min<sup>-1</sup> respectivamente en razonable acuerdo entre sí.

Transcurrido un cierto tiempo (figura 16.31) se observa una disminución de la concentración de metanotiol con el tiempo de irradiación que podría ser debido a la fotólisis del tiol.



Esquema 17.10.

Además se identificaron por GC/MS algunos derivados desalquilados derivados de la fotodegradación a 193 nm de las s-triazinas: terbutryn, prometryn, desmetryn y atraton tal y como se indica en el capítulo 17. Esto está de acuerdo con las observaciones de Albanis y Konstantinou para el prometryn. Estos autores obtuvieron como fotoproductos mayoritarios 2-hidroxi y diversos desalquilderivados.<sup>35</sup>

La observación de productos de desalquilación de las triazinas implica un proceso de homólisis o heterólisis de un enlace C-N. Por otra parte, tal y como se ha discutido anteriormente, la formación de los 2-OH derivados por adición de HO<sup>•</sup>, HO<sup>-</sup> o H<sub>2</sub>O seguida de eliminación del sustituyente original es un proceso favorable. Por tanto, los resultados apuntan que la desalquilación se origina a partir de un estado excitado, que decae energéticamente por homólisis o heterólisis del enlace C-N. Está hipótesis se ve refrendada por el hecho de que la fotólisis a 193 nm condujo en todos los casos a la observación de productos desalquilados, en tanto que la fotólisis a 254 nm tan solo condujo a su observación en el caso del atraton. Este último es uno de los casos en que la reacción de adición es en la posición menos favorable (veáse apartado 18.2).

Doré y col. obtuvieron también junto con el 2-hidroxi- derivado de atrazina varios desalquilderivados, lo que estaría de acuerdo con los productos obtenidos.<sup>31</sup>

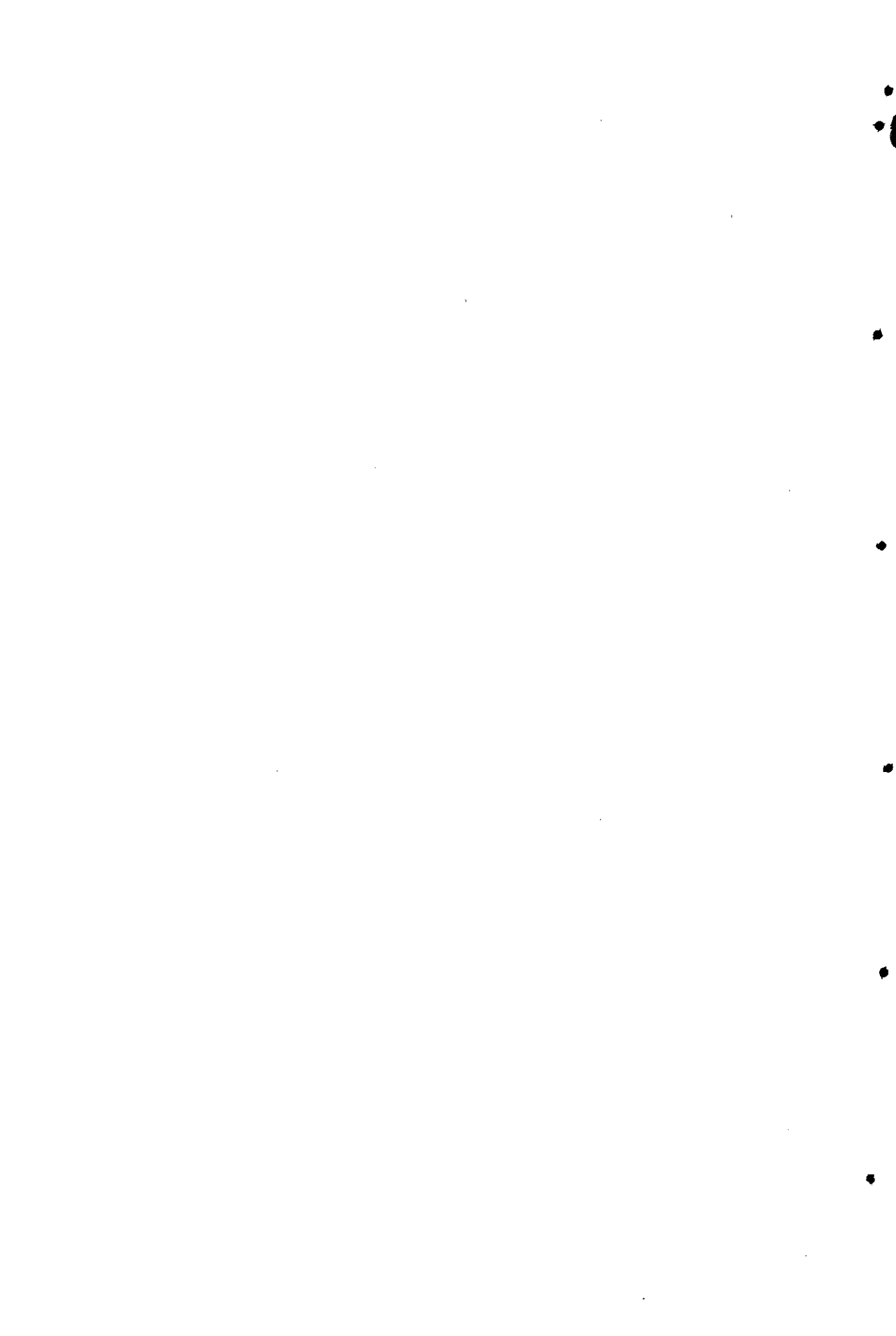
Estudios realizados acerca de la fotodegradación del herbicida propazina indicaron, que como principales fotoproductos se obtienen los correspondientes desalquilados, junto a los derivados 2-hidroxi, y deshalogenado, dando lugar a desisopropilpropazina, 2-hidroxi y 2-H análogos.<sup>34</sup>

#### 18.4. Bibliografía.

- (1) Sonntag, C. v.; Schuchmann, H.-P. *Methods in Enzymology*. 1994, 233, 3-20.
- (2) Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Rosss, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 1988, 17, 513-886.
- (3) *Diffusion Limited Reactions*; Rice, S. A., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1985; Vol. 25.
- (4) Dean, J. R.; Wade, G.; Barnabas, I. J. *Journal of Chromatography A* 1996, 733, 295-335.
- (5) von Sonntag, C. *The Chemical Basis of Radiation Biology*; Taylor and Francis: London, 1987.
- (6) Braun, M.; Fan, J. Y.; Fuss, W.; Kompa, K. L.; Müller, G.; Schmid, W. E. *Methods in Laser Spectroscopy*; Plenum Press: New York, 1986.
- (7) Steenken, S. *Top. Curr. Chem.* 1996, 177(Electron Transfer II), 125-145.
- (8) Fujita, S.; Steenken, S. *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 2540-2545.
- (9) Hazra, D. K.; Steenken, S. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105, 4380-4386.
- (10) Novais, H. M.; Steenken, S. *J. Phys. Chem.* 1987, 91, 426-433.
- (11) O'Neill, P.; Steenken, S.; Van der Linde, H.; Schulte-Frohlinde, D. *Radiat. Phys. Chem.* 1978, 12, 13-17.
- (12) Steenken, S.; O'Neill, P. *J. Phys. Chem.* 1978, 82, 372-4.
- (13) Steenken, S.; O'Neill, P. *J. Phys. Chem.* 1979, 83, 2407-12.
- (14) Candeias, L. P.; Steenken, S. *Chemistry* 2000, 6, 475-84.
- (15) Schuchmann, M. N.; Steenken, S.; Wroblewski, J.; von Sonntag, C. *Int. J. Radiat. Biol.* 1984, 46, 225-232.
- (16) Azenha, M. E.; Burrows, H. D.; Canle L., M.; Coimbra, R.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Rodrigues, A.; Santaballa, J. A.; Steenken, S., En proceso de publicación.
- (17) Marcheterre, L.; Choudhry, G. G.; Webster, G. R. B. *Environmental Contamination and Toxicology* 1988, 103, 61-126.
- (18) Laat, J. d.; Dore, M.; Suty, H. *Revue des Sciences de l'eau* 1995, 8, 23-42.

- (19) Czapski, G.; Lyman, S. V.; Schwarz, H. A. *J. Phys. Chem.* **1999**, *103*, 3447.
- (20) Zuo, Z.; Cai, Z.; Katsumura, Y.; Chitose, N.; Muroya, Y. *Radiat. Phys. Chem.* **1999**, *55*.
- (21) Wardman, P. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1989**, *18*, 1637.
- (22) Dogan, I.; Steenken, S.; Schulte-Frohlinde, D.; Içli, S. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 1887-1894.
- (23) O'Neill, P.; Steenken, S.; Schulte-Frohlinde, D. *J. Phys. Chem.* **1975**, *79*, 2773-9.
- (24) Sehested, K.; Holcman, J.; Hart, E. J. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1363-7.
- (25) Canle L., M.; Santaballa, J. A.; Steenken, S. *Chem. Eur. J* **1999**, *5*, 1192-1201.
- (26) Schwarz, H. A.; Dodson, R. W. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 3643.
- (27) Burrows, H. D.; Formosinho, S. J.; Miguel da G., M.; Pinto Coelho, F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1976**.
- (28) Cremlyn, R. *J. Agrochemicals* Chichester, 1991.
- (29) Cooping, L. G.; Hewitt, H. G. *Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents* Cambridge, 1998.
- (30) Pape, B. E.; Zabik, M. J. *J. Agr. Food Chem.* **1970**, *18*, 202-207.
- (31) Brun, O. L.; Merlet, N.; Croue, J. P.; Doré, M. *Sciences et techniques de l'eau* **1993**, *26*, 97-101.
- (32) Crosby, D. G. In *Herbicides. Chemistry, degradation and mode of action*; Kearney, P. C., Kaufman, D. D., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1976; Vol. 2, p 825-890.
- (33) Azenha, M. E.; Burrows, H. D.; Canle L., M.; Coimbra, R.; Fernández, M. I.; Santaballa, J. A., En proceso de publicación.
- (34) Barceló, D.; Durand, G.; Bertrand, N. d.; Albaigés, J. *The Science of the Total Environment.* **1993**, *132*, 283-296.
- (35) Albanis, T. A.; Konstantinou, I. K. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **1998**, *217*, U82.

## 19. Anexos: Fotodegradación



**ANEXO 1. REACCIÓN DE REDUCCIÓN MONOELECTRÓNICA.**

**Tabla 1. Influencia de la concentración de s-triazina en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[s-triazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[s-triazina]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> 10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
6.42	7.4±0.2
5.9	6.8±0.2
5.13	5.5±0.2
4.43	5.0±0.5
3.04	3.2±0.4
1.52	1.2±0.1
7.6	0.75±0.01

**Tabla 2. Influencia de la concentración de Ametryn en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[ametryn] 10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> 10 <sup>5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	5.2±0.1
4.28	4.7±0.1
3.67	4.3±0.1
3.1	3.9±0.1
2.59	3.7±0.1
2.07	3.3±0.1
1.04	2.59±0.04
5.18	2.32±0.02

**Tabla 3. Influencia de la concentración de atraton en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[atraton]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-4</sup> / s <sup>-1</sup>
4.81	5.8±0.3
4.01	5.7±0.1
3.28	5.0±0.1
2.68	4.7±0.5
2.01	4.4±0.2
1.55	4.3±0.1

**Tabla 4. Influencia de la concentración de atrazina en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[atrazina]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	4.56±0.05
4.54	4.1±0.1
4.13	3.80±0.04
3.76	3.5±0.1
3.31	3.3±0.1
2.98	2.90±0.03
1.49	1.72±0.01
0.75	11.04±0.01



**Tabla 5. Influencia de la concentración de prometryn en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[prometryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[prometryn]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
4.97	4.24±0.04
4.41	3.5±0.1
3.93	3.4±0.1
3.49	2.8±0.1
3.1	3.1±0.2
2.07	1.9±0.1
1.03	1.3±0.1
0.515	0.83±0.02

**Tabla 6. Influencia de la concentración de prometon en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[prometon]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[prometon]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-4</sup> / s <sup>-1</sup>
4.37	6.4±0.2
3.83	6.1±0.2
3.35	5.7±0.2
2.07	5.3±0.5
1.04	5.1±0.3
0.52	4.9±0.3

**Tabla 7. Influencia de la concentración de terbutryn en la reacción de reducción monoeléctrica.**

[terbutryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[terbutryn]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-9</sup> / s <sup>-1</sup>
4.97	3.3±0.1
4.4	2.72±0.04
3.75	2.50±0.05
3.09	2.28±0.04
2.58	2.03±0.04
1.93	1.74±0.04
0.97	1.19±0.03
0.48	0.83±0.02

**Tabla 8. Influencia de la concentración de terbumeton en la reacción de reducción monoeléctrica.**

[terbumeton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[terbumeton]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-4</sup> / s <sup>-1</sup>
5	6.40±0.03
4.37	6.1±0.1
3.83	5.8±0.1
2.65	5.4±0.1
1.33	4.6±0.1

**Tabla 9. Influencia de la concentración de desmetryn en la reacción de reducción monoelectrónica.**

[desmetryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[desmetryn]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-9</sup> / s <sup>-1</sup>
4.58	4.0±0.1
4.17	3.6±0.1
3.78	3.3±0.1
3.4	3.0±0.1
3.13	2.9±0.1
1.09	1.34±0.01
0.55	0.79±0.01

**Tabla 10. Determinación del pK<sub>s</sub> del radical de ametryn**

[ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, λ=300 nm, saturada con Ar, 5% MeOH, T=298.0 K.

pH	ΔD.O.
3.5	0.001
4.55	0.00254
5.1	0.00445
5.5	0.0052
6	0.00672
6.5	0.00745
7.5	0.00863
9	0.0077
9.5	0.0085
10.95	0.0084

**ANEXO 2. REACCIÓN DE OXIDACIÓN MONOELECTRÓNICA.  
REACCIÓN CON EL RADICAL  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ .**

**Tabla 1. Influencia de la concentración de ametryn en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[ametryn]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup>
4.75	266800±4000
3.8	206900±5000
2.5	168100±5000
1.94	134200±5000
0.97	110700±5000
0.486	80820±4000

**Tabla 2. Influencia de la concentración de atraton en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[atraton]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-4</sup> / s <sup>-1</sup>
6	8.6±0.1
4.5	7.6±0.3
4.09	7.0±0.1
3.5	6.6±0.3
2.08	5.7±0.1
1.04	5.5±0.3

**Tabla 3. Influencia de la concentración de atrazina en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[atrazina]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	1.50±0.02
4.54	1.41±0.02
4.09	1.30±0.01
3.41	1.28±0.02
2.98	1.16±0.01
2.32	1.07±0.02
1.01	0.94±0.03
0.51	0.83±0.02

**Tabla 4. Influencia de la concentración de prometryn en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[prometryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[prometryn]= $5 \cdot 10^{-5}$ mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	3.30±0.01
4	2.60±0.01
3	2.20±0.02
2	1.80±0.01
1	1.20±0.01
0.5	0.85±0.02

**Tabla 5. Influencia de la concentración de prometon en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[prometon]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[prometon]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
4.5	2.4±0.1
4.04	2.2±0.1
3.03	1.7±0.1
2.02	1.30±0.04
1.12	1.03±0.02

**Tabla 6. Influencia de la concentración de terbutryn en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[terbutryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[terbutryn]·10 <sup>5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	2.30±0.02
4.54	1.92±0.03
3.79	1.88±0.03
3.09	1.49±0.01
2.53	1.31±0.02
2.07	1.15±0.03
1.04	1.04±0.02
0.52	0.84±0.03

**Tabla 7. Influencia de la concentración de terbumeton en la reacción de oxidación monoelectrónica.**

[terbumeton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, [t-BuOH]=100 mM, [K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>]=10 mM, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=450 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

[terbumeton]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
4.28	1.29
3.96	1.26
3.35	1.20
2.83	1.16
2.22	1.02
1.11	0.95
0.55	0.83

ANEXO 3. REACCIÓN DE ADICIÓN DEL RADICAL OH<sup>•</sup>.Tabla 1. Reacción de adición del radical OH<sup>•</sup> a ametryn.

[ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[ametryn]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup>
2.31	103000
4.62	215000
4.62	200000
9.3	393000
9.3	459000

Tabla 2. Reacción de adición del radical OH<sup>•</sup> a atraton.

[atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[atraton]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	2.8±0.2
4.4	2.3±0.1
4	2.1±0.1
3.48	1.9±0.1
3.02	1.7±0.1
2.52	1.4±0.1
2.02	1.14±0.05
1.48	0.96±0.03
1.01	0.82±0.02



**Tabla 3. Reacción de adición del radical OH<sup>\*</sup> a atrazina.**

[atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[atrazina]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	2.1±0.1
4.44	1.8±0.1
3.92	1.6±0.1
3.05	1.35±0.05
2.54	1.1±0.1

**Tabla 4. Reacción de adición del radical OH<sup>\*</sup> a prometryn.**

[prometryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[prometryn]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup>
2.3	110000
2.3	96400
4.6	171000
9.3	358000

**Tabla 5. Reacción de adición del radical OH<sup>\*</sup> a prometon.**

[prometon]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[prometon]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	2.05±0.2
4.4	1.97±0.1
4	1.77±0.1
3.47	1.72±0.2
3.02	1.40±0.1

**Tabla 6. Reacción de adición del radical OH<sup>•</sup> a terbutryn.**

[terbutryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[terbutryn]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup>
3.8	156000
5.8	211500
7.7	243500

**Tabla 7. Reacción de adición del radical OH<sup>•</sup> a terbumeton.**

[terbumeton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[terbumeton]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> ·10 <sup>-5</sup> / s <sup>-1</sup>
5	2.2±0.1
4.44	2.09±0.1
3.95	1.97±0.04
3.51	1.7±0.1
2.93	1.6±0.1
2.46	1.29±0.04
2.02	1.16±0.02
1.1	0.90±0.02

**Tabla 8. Reacción de adición del radical OH<sup>•</sup> a desmetryn.**

[desmetryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =430 nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O, T=298.0 K.

[desmetryn]·10 <sup>-5</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	k <sub>obs</sub> / s <sup>-1</sup>
1.12	422000
4.5	211000
6.7	253000
9	320000

**Tabla 9. Determinación del  $pK_a$  del aducto de OH de prometon.**

[prometon]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>,  $\lambda=430$  nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O,  
T=298.0 K.

pH	$\Delta D.O.$
6,83	0,00777
8,8	0,00658
9,5	0,00695
9,95	0,00622
10,02	0,00462
10,5	0,00377
10,5	0,0048
11	0,00443
12	0,0042
13	0,00395

**Tabla 10. Determinación del  $pK_a$  del aducto de OH de atraton.**

[atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>,  $\lambda=430$  nm, 5% MeOH, saturada con N<sub>2</sub>O,  
T=298.0 K.

pH	$\Delta D.O.$
8	0,0093
9	0,0094
10	0,0074
10,5	0,007
11	0,0065

#### ANEXO 4. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁTICO DE FOTOIONIZACIÓN A 193 nm.

Tabla 1. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de s-triazina.

[s-triazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / s-triazina	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.02	0.00154	0.127
0.0104	0.00087	0.076
0.0078	0.0006	0.056
0.0072	0.00068	0.056
0.00672	0.00051	0.052
0.00406	0.00034	0.029
0.0033	0.00034	0.025
0.0032	0.00020	0.023
0.00304	0.00028	0.021
0.003	0.00020	0.019
0.0026	0.00018	0.02
0.00118	0.00011	0.0071

Tabla 2. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de ametryn.

[ametryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / ametryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.0104	0.0056	0.031
0.0078	0.0037	0.021
0.0072	0.0038	0.022
0.00672	0.00321	0.018
0.00406	0.002	0.011

Parte II - Fotodegradación

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / ametryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.0033	0.0015	0.0096
0.0032	0.0014	0.0086
0.00304	0.0011	0.0078
0.003	0.0012	0.007
0.0026	0.00118	0.0074
0.0022	0.00081	0.0051
0.00118	0.00040	0.0028

Tabla 3. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de atraton.

[atraton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / atraton	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.04	0.00557	0.0285
0.0168	0.00203	0.0112
0.0166	0.00195	0.0109
0.0144	0.00147	0.009
0.008	0.00113	0.0045
0.0072	0.000767	0.00408
0.007	0.000735	0.00409
0.0061	0.000402	0.00403

Tabla 4. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de atrazina.

[atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / atraton	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.035	0.0041	0.0131
0.0147	0.00198	0.0061

Anexos

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / atraton	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.0145	0.00187	0.0062
0.0126	0.00106	0.0049
0.007	0.00064	0.0028
0.0063	0.00065	0.0027
0.0053	0.00029	0.0024

**Tabla 5. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de prometryn.**

[prometryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / prometryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.02	0.0093	0.0289
0.0104	0.0046	0.0149
0.0078	0.0031	0.0103
0.0072	0.0031	0.0102
0.00672	0.0027	0.0085
0.0033	0.0013	0.0044
0.0032	0.0013	0.0039
0.00304	0.0011	0.0037
0.003	0.00099	0.0031
0.0026	0.00112	0.0034
0.0022	0.00069	0.0023

**Tabla 16. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de prometón.**

[prometon]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	ΔD.O. <sub>max</sub> / prometryn	ΔD.O. <sub>max</sub> / NaCl
0.0126	0.00199	0.00589
0.0124	0.00188	0.00538
0.0108	0.00182	0.00511
0.006	0.000714	0.00276
0.0054	0.000567	0.00255
0.0046	0.000521	0.00235
0.0033	0.000365	0.00195

**Tabla 7. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de terbutryn.**

{terbutryn}= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM), λ=600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	ΔD.O. <sub>max</sub> / prometryn	ΔD.O. <sub>max</sub> / NaCl
0.04	0.00341	0.0114
0.0208	0.00173	0.00579
0.0156	0.00159	0.00468
0.0144	0.00118	0.00349
0.0066	0.000671	0.0015
0.01344	0.00124	0.00359
0.0064	0.000432	0.00144
0.00608	0.000608	0.00146
0.006	0.000564	0.00114
0.0052	0.000506	0.000986
0.0044	0.000559	0.00109
0.00236	0.000148	0.000681

Anexos

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / prometryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.00608	0.000605	0.00183

Tabla 8. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de terbumeton.

[terbumeton]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / Terbumenton
0.02	0.012
0.0109	0.0053
0.0083	0.0037
0.0082	0.0038
0.0076	0.003
0.0072	0.0026
0.0039	0.0015
0.0037	0.00131
0.0035	0.0009
0.0032	0.0009
0.0026	0.0005
0.0014	0.00016

Tabla 9. Influencia de la energía del láser en la fotoionización de desmetryn.

[desmetryn]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>, pH=7 ([KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]=1 mM),  $\lambda$ =600 nm, 5% MeOH, saturada con Ar, T=298.0 K.

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / desmetryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.04	0.0058	0.0319
0.0208	0.00291	0.0168
0.0156	0.00192	0.0124
0.00812	0.000827	0.00587
0.01344	0.00152	0.0102



Parte II - Fotodegradación

E / J	$\Delta D.O._{max}$ / desmetryn	$\Delta D.O._{max}$ / NaCl
0.0064	0.000557	0.00485
0.00608	0.000464	0.004
0.006	0.000515	0.0038
0.0052	0.000422	0.00394
0.0044	0.000309	0.0027

## ANEXO 5. FOTÓLISIS A 254 nm.

Tabla 1. Calibrado de un electrodo selectivo de ion cloruro.

NaCl; I=0.1 mol·dm<sup>-3</sup> (NaNO<sub>3</sub>); T=298.0 K.

[Cl <sup>-</sup> ]·10 <sup>3</sup> / mol·dm <sup>-3</sup>	mV
0.0102	110.3
0.002	151.3
0.0010	168.3
1.02·10 <sup>-4</sup>	224.5
4.2·10 <sup>-5</sup>	241.1
1.0·10 <sup>-5</sup>	258.5
4.05·10 <sup>-6</sup>	265
9.9·10 <sup>-7</sup>	268.7

Los datos obtenidos se ajustan a una ecuación del tipo

$$mV=A+B\cdot X+C\cdot X^2$$

donde X=log [Cl<sup>-</sup>], Obteniéndose los siguientes valores:

$$A = (-81\pm 15); B = (-111\pm 8); C = (-8.7\pm 0.1)$$

Tabla 2. Fotodegradación de atrazina a 254 nm.

[atrazina]=5·10<sup>-5</sup> mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH; t<sub>irrad</sub> = 1 h; λ =225 nm; T=298.0 K.

t / min	Abs	t / min	Abs	t / min	Abs	t / min	Abs
2	0.9646	11	0.5757	19	0.47	27	0.4346
3	0.8698	12	0.5579	20	0.463	28	0.4316
5	0.769	13	0.5379	21	0.4566	29	0.43
6	0.7273	14	0.523	22	0.4529	39	0.4292
7	0.6881	15	0.5094	23	0.4487	49	0.4265
8	0.6551	16	0.4983	24	0.4452	59	0.4183
9	0.6244	17	0.4875	25	0.4409		
10	0.5972	18	0.4802	26	0.4377		

**Tabla 3. Cinética de generación del cloruros en la fotodegradación de atrazina a 254 nm.**

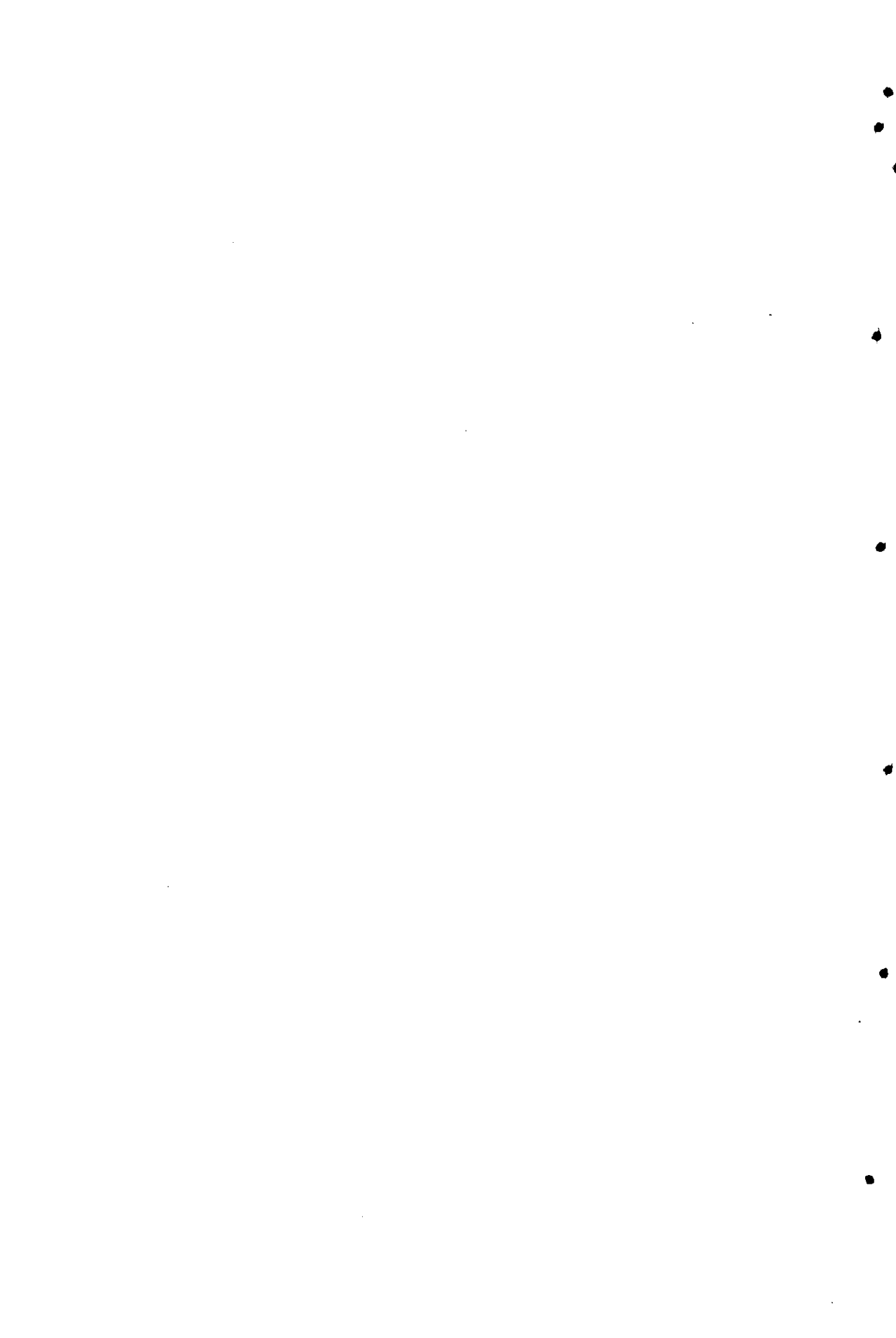
[atrazina]= $5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH~6; 5%MeOH;  $t_{\text{irrad}} = 1$  h; T=298.0 K.

$t_{\text{irrad}} / \text{min}$	[Cl] / M
0	$5.3 \cdot 10^{-7}$
5	$2.9 \cdot 10^{-5}$
15	$14.7 \cdot 10^{-5}$
30	$35.1 \cdot 10^{-5}$
45	$46.1 \cdot 10^{-5}$
60	$66.3 \cdot 10^{-5}$

**Tabla 4. Generación del derivado monobromobimane de metanotiol formado a partir de la fotodegradación de prometryn a 254 nm.**

[prometryn]= $3.5 \cdot 10^{-5}$  mol·dm<sup>-3</sup>; pH=8; 5%MeOH;  $\lambda_{\text{exc}} = 394$  nm;  $\lambda_{\text{emi}} = 480$  nm  
T=298.0 K.

$t_{\text{irrad}} / \text{min}$	IF <sub>emisión</sub>
0	0.0766
4	0.2301
8	0.383
10	0.40253
30	0.44647
60	0.28107
90	0.15198



20. Papers produced out of this thesis, so far



## Nitrogen vs. Sulfur Reactivity in the Oxidation of Amino Acids and Peptides. Is it so different?

Halogens in their different forms are world-wide disinfectants, despite the fact that mutagenic and carcinogenic compounds are formed during halogenation processes.<sup>1</sup> For this reason, it would be relevant to understand in detail the mechanism of oxidation of biochemically relevant compounds, like amino acids and peptides, by halogens. Moreover, these reactions can also occur *in vivo* in human cells, being initiated by the myeloperoxidase / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / X<sup>-</sup> enzymatic system, which generates XO<sup>-</sup>, giving rise to processes and products entirely similar to those taking place during water treatment<sup>2</sup>

Amino acids and peptides can react with aqueous halogens through different ways, depending on the functional groups present in the molecule. These processes are always bimolecular, the halogen atom being transferred from the oxygen of HOX to a nucleophilic position (either a N- or S-containing group) of the amino acid or peptide.

S-containing amino acids and peptides react much faster than N-containing compounds. Furthermore, S-containing amino acids and peptides also undergo oxidation by ClO<sup>-</sup>, a process that does not take place in the case of the N-containing ones. The following rate constants for reaction with aqueous chlorine illustrate such differences:

$$k_{(\text{Gly} + \text{HOCl})} = 1.13 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{Cys} + \text{HOCl})} = 1.24 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{Cys} + \text{ClO}^-)} = 1.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{Gly-Gly} + \text{HOCl})} = 9.01 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{Gluthation} + \text{HOCl})} = 1.3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$k_{(\text{Gluthation} + \text{ClO}^-)} = 3.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

The reason for such difference of reactivity seems to be due to the different nucleophilicity of amino- and thiol- or thioether groups.

On the other hand, the products of oxidation are also different. When the chlorination takes place on the N, an (N-Cl)-intermediate is formed that subsequently decomposes to nitriles, amines and carbonyl compounds (in the case of amino acids)<sup>3</sup> or to N-(2-imino,1-oxo-alkyl)-amino acids (in the case of peptides)<sup>4</sup>

If, otherwise, the halogenation takes place on the S, sulfonyl halides or halosulfonium ions are formed, depending on whether the reacting S-group is a thiol, a sulfide or a disulfide. These are short-lived intermediates and undergo a very fast hydrolysis to yield, respectively, disulfides, sulfoxides and sulfonic acids.<sup>5</sup>

*Papers produced out of this thesis, so far*

Considering the chemical and biochemical relevance of the described processes, it would be of most relevance to know in detail their mechanisms, and reaction products, in order to be able to control or prevent them.

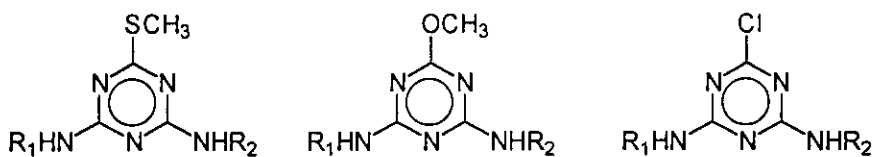
- 
- (1) R.L. Jolley, L.W. Condie, J.D. Johnson, S. Katz, R.A. Minear, J.S. Maticce and V.A. Jacobs, eds., *Water Chlorination: Chemistry Environmental and Health Effects*, Lewis Publishers, Michigan, 1990, vols. 1-6.
  - (2) L.A. Márquez and H.B. Dunford, *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 7950.
  - (3) X.L. Armesto, M. Canle L., M.V. García, J.A. Santaballa, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, 27, 453.
  - (4) J.M. Zgliczyński, T. Stelmazyńska, J. Domanski, W. Ostrowski, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 235, 419.
  - (5) X.L. Armesto, M. Canle L., M.I. Fernández, M.V. García, J.A. Santaballa, *Tetrahedron*, 2000, 1103.



**Photo- and Radiation chemical oxidation of s-triazine-based herbicides.**

s-triazine derivatives are extensively used as herbicides<sup>[1]</sup> since they are able to inhibit photosynthesis and interfere with other enzymic processes that are fundamental for plant metabolism. Their degradation takes place through dealkylation of the amino groups and hydroxylation in the sixth position. It seems that photodegradation processes may occur in a similar way.<sup>[2]</sup>

This work is focused on the study of the mechanism of photodegradation of s-triazine-based herbicides in aqueous solution, using the laser flash photolysis technique. The structures of the s-triazine-based herbicides used are shown below.



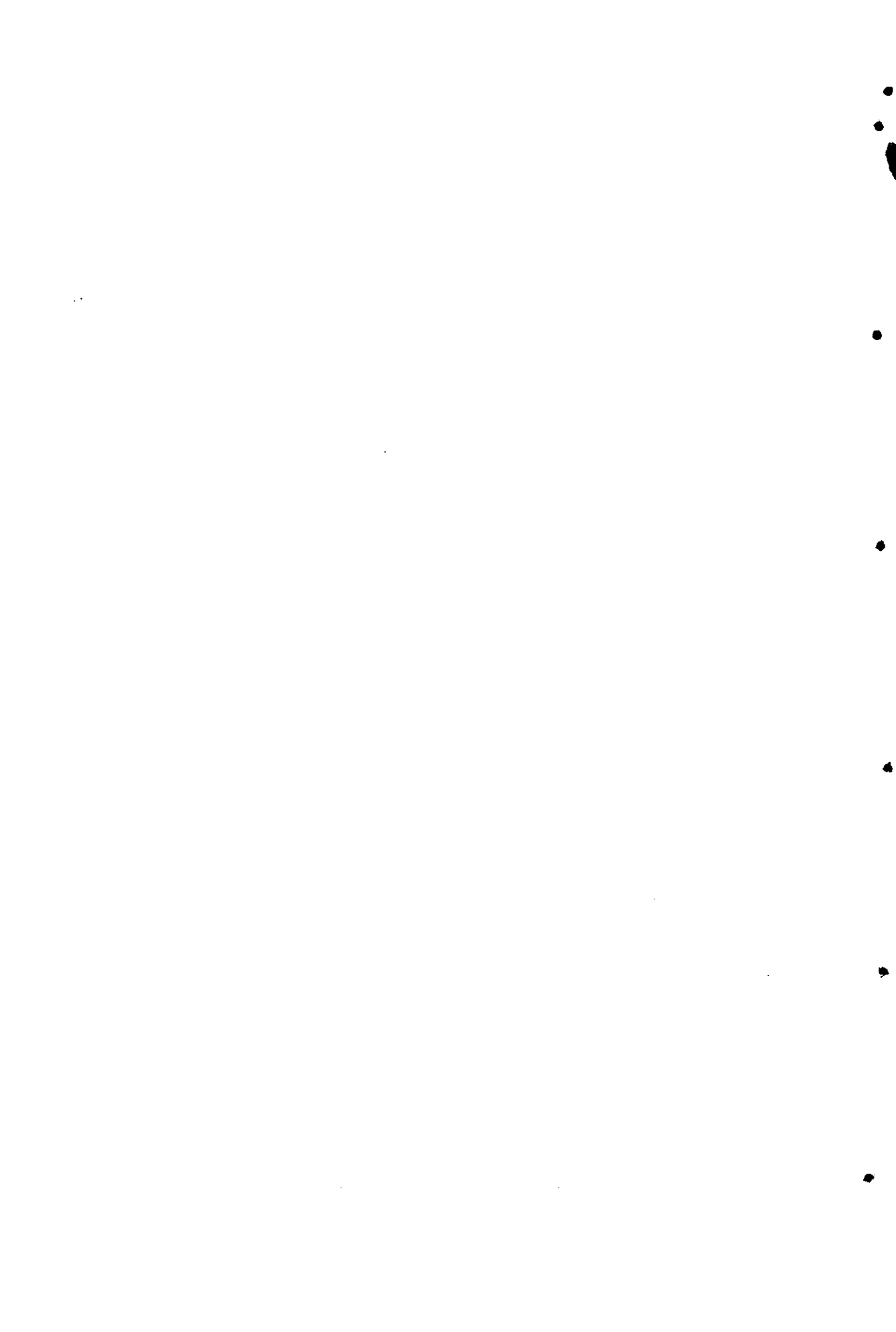
Photolysis experiments were carried out using exciting light of 193 and 248 nm. Low percentages of photoionization were observed in both cases. Photoionization at 193nm is a monophotonic process, and the corresponding quantum yield values have been determined. In turn, the optical density measured for the  $e^-_{aq}$  when 248nm was used, was so low that the photoionization quantum yield could not be obtained.

The results available so far are indicative that these triazine-based herbicides are not photodegraded to a reasonable extent by sunlight.

As an alternative method of degradation, and as a tool to understand the laser flash photolysis results, we have also studied by pulse radiolysis the reactivity of these herbicides toward several oxidizing radicals:  $SO_4^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $O^{\cdot-}$ ,  $TI^{*2}$  and toward the  $e^-_{(aq)}$ .

[1]. Tomlin, C.; *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Surrey (U.K.) and The Royal Society of Chemistry, Cambridge (U.K.), 1994.

[2]. Burkhard, N. and Guth, J. A.; *Pestic. Sci.*, 1976, 7, 65



**HOCl vs N-Cl-Taurine Chlorination of Aminoacids**

Is well-known that HOCl can react with aminoacids, peptides and amines produces N-Cl-compounds<sup>1</sup> or S-Cl-compounds<sup>2</sup> depending on the functional groups in the molecule.

By the way, Taurine is one of the most abundant free amino acids in mammalian tissues and appears to act as a trap for HOCl produced by the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> enzymatic system of leukocytes forming the oxidant taurine monochloramine.<sup>3</sup> Therefore N-Cl-Taurine can act as oxidant like HOCl, but is much less reactive and less toxic.

N-Cl-Taurine was formed by a not enzymatic reaction with HOCl, not decomposes at neutral pH and it can be used like HOCl for forming N-Cl- or S-Cl-compounds.

The processes of chlorination of aminoacids with both chlorinating agents are always bimolecular, the halogen atom being transferred from the HOCl or N-Cl-taurine to a nucleophilic position (either a N- or S-containing group) of the amino acid. The reactions are followed by using a stopped-flow spectrophotometer, monitoring the absorbance decrease at 292 (maximum absorbance for HOCl) or 255 nm (maximum absorbance of N-Cl-Tau). The dependence of rate constant with the pH are in the following figures.

---

[1] X.L. Armesto, M. Canle L., M.V. García, J.A. Santaball, *Chem. Soc. Rev.*, **1998**, 7, 453

[2] X.L. Armesto, M. Canle L., M.I. Fernández, M.V. García, J.A. Santaballa, *Tetrahedron*, **2000**, 1103

[3] Leath A. Marquez, H. Brian Dunford, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, 7950



[http://www.ch.ic.ac.uk/ectoc/echet98/ectoc\\_ma.html](http://www.ch.ic.ac.uk/ectoc/echet98/ectoc_ma.html)

**PHOTODEGRADATION OF TRIAZINE-BASED PESTICIDES: LASER FLASH  
PHOTOLYSIS OF S-TRIAZINES**

**M. Canle L.<sup>a,b</sup> M.I. Fernández,<sup>a,b</sup> J.A. Santaballa,<sup>a</sup> S. Steenken<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Departamento de Química Fundamental e Industrial. Universidade da Coruña. A Zapateira, s/n. E-15071 A Coruña. Galicia, SPAIN. E-mail: mcanle@udc.es* <sup>b</sup>*Max-Planck Institut für Strahlenchemie. Stiftstraße, 34-36. D-45470 Mülheim an der Ruhr, GERMANY.*

**Abstract.**

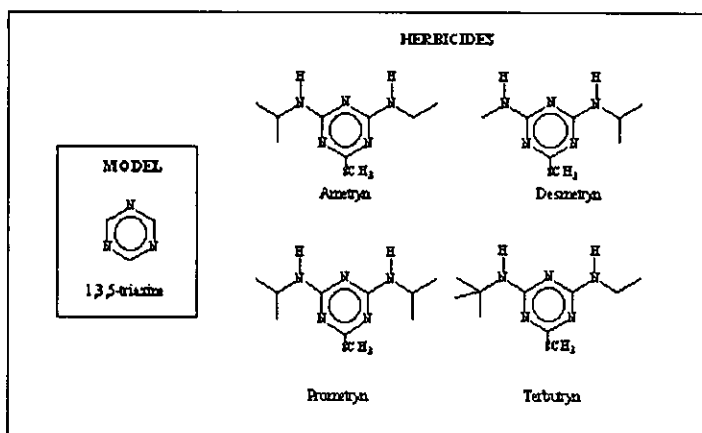
As part of a project to clarify the mechanism of photodegradation of different pesticides under environmental-like conditions, we have studied the laser-flash photolysis of s-triazine itself and other four s-triazine derivatives commonly used as herbicides: Ametryn, Desmetryn, Prometryn and Terbutryn. All the studied compounds undergo monophotonic photoionization with very low quantum yields ( $f_{PI}$ =0.07, 0.07, 0.13, 0.13 and 0.05, respectively) when the excitation is performed with 193 nm light. No reaction is observed with higher wavelength light. We conclude that, in the absence of photosensitizers, s-triazines are not photodegraded.

**Introduction.**

s-Triazines, six-membered aromatic rings with three carbons and three nitrogens alternating about the ring, are widely used in agriculture as herbicides.[1] In fact, in the last decade these compounds represented the second largely sold group of herbicides in the U.S.[2] Their herbicidal activity is due to their capability to inhibit certain reactions that are essential for photosynthesis.[3] The increasing usage of these compounds leads to a rise of their presence in natural waters.[4] Such problem is especially relevant in areas with permeable soils, due to the pollution of groundwater drinking resources.[5] Despite these facts, little information is available on the photolysis of s-triazines under typical environmental conditions.[6] In contrast, there is growing public concern about the possible effects of such pollutants on human health and on the environment.[7] The fact that major monitoring studies were already performed long ago proofs such concern. Thus, Hörmann *et al.* monitored, already in 1976, the triazine herbicide residues in many different streams of Central Europe.[8] Methods of degradation like chlorination, ozonation, oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultrafiltration have been carried out for long.[9] Some studies on the products of photodegradation of s-triazines have also been performed.[10]ÑÑ In the framework of a wider project aiming to clarify the mechanism of photodegradation of different pesticides in aqueous solution, we have studied the laser-flash photolysis of the triazine-based sulfur-containing herbicides Ametryn, Desmetryn, Prometryn, and Terbutryn. (1,3,5)-Triazine was also used as a model compound.

**Experimental.**

The s-triazines were of the highest purity commercially available (ca. 99 % ), and used without further purification. All other chemicals and gases were of the highest purity available. Water was obtained from a Millipore-Milli Q system.



The laser flash photolysis (LFP) experiments were carried out using: a) 193 nm ( $\text{ArF}^+$ ) excimer laser (Lambda Physik EMG150E), b) 248 nm ( $\text{KrF}^+$ ) excimer laser (Lambda Physik EMG103MSC), c) 266 nm  $\text{Nd}^{3+}$  YAG (JK Lasers System 2000) and ), d) 308 nm ( $\text{XeCl}^+$  excimer laser (Lambda Physik EMG150E). Such devices provided unfocused 20 ns pulses (15 ns for the 266 nm  $\text{Nd}^{3+}$  YAG) with  $10 < E < 80$  mJ/pulse. Transmission filters were used to attenuate the intensity when necessary. The detection was optical, using a pulsed Xe lamp as analyzing light. The optical signals were digitized using Textronix transient recorders and interfaced to a computer that controlled the whole system. All solutions were deaerated and flown through Suprasil quartz cells. The LFP experiments were carried out at ca.  $293 \pm 2$  K. NaCl, [11]f was used for actinometry at 193 nm, the solutions being prepared with an absorbances at the excitation wavelength equal within 5% to that of the photolyzed substrate. Blank experiments of photolysis of Ar-saturated water showed no signal, confirming that the photoionization of water by 193 nm light is negligible. The extinction coefficient of the solvated electron,  $\epsilon(e_{\text{aq}}^-, 600 \text{ nm}) = 13300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  was used as a reference value to obtain the extinction coefficients of the organic radicals. [12]

### Results and discussion.

LFP of the different triazines was carried out in aqueous solution of pH ca. 7 with 193, 248, 266 and 308 nm light (*i.e.*: photon energies of 6.40, 5.00, 4.67 and 4.03 eV). A photoionization process was observed when exciting with 193 nm light, and no reaction at all when the excitation was carried out with 248, 266 or 308 nm light. Figures 1 and 2 show, respectively, the time-resolved spectrum recorded after 193 nm LFP of an Ar-saturated and  $\text{O}_2$ -saturated solutions of Ametryn.

Parte II

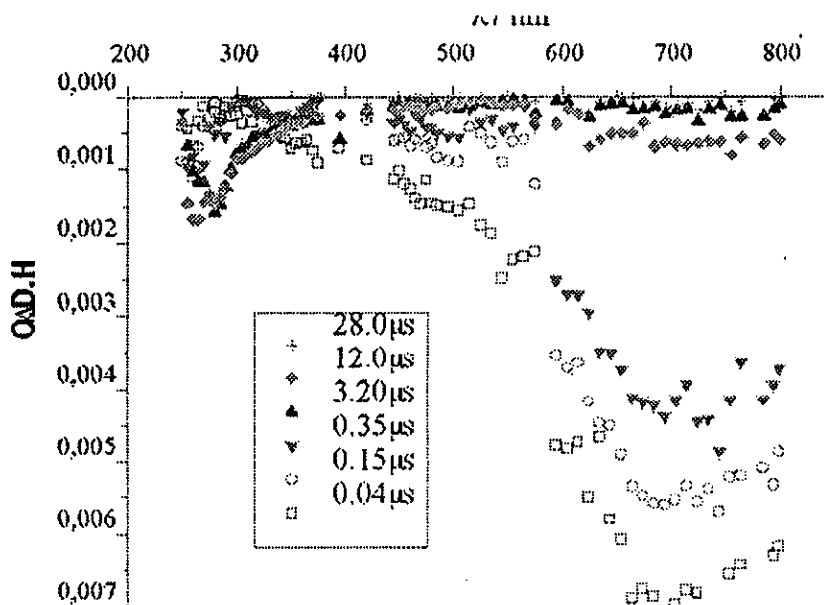


Figure 1: time resolved spectrum following 193 nm LFP of Ar-satd. 50  $\mu$ M Ametryn in 5% MeOH, pH ca. 7. Spectra recorded at the indicated times after the pulse.

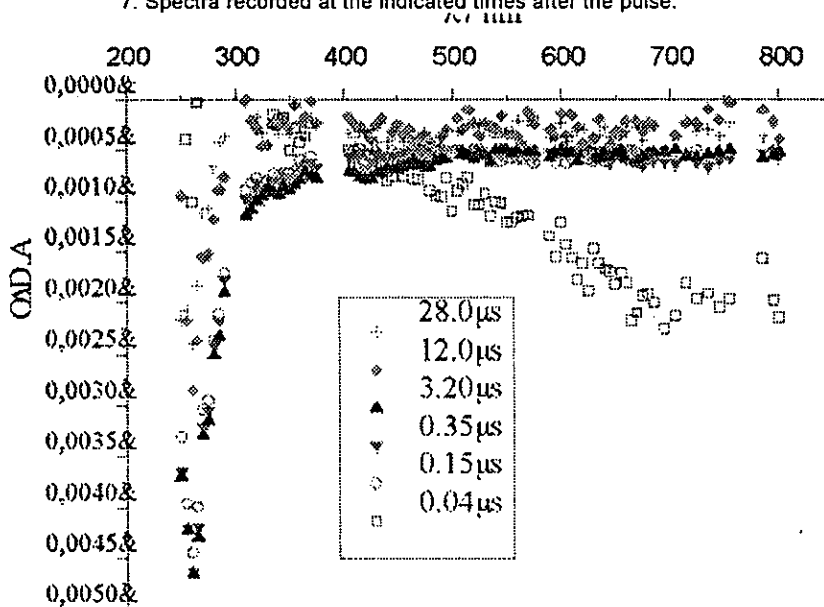


Figure 2: time resolved spectrum following 193 nm LFP of  $O_2$ -satd. 50  $\mu$ M Ametryn in 5% MeOH, pH ca. 7. Spectra recorded at the indicated times after the pulse.

The intense band centered at 720 nm that appears in the Ar-saturated experiment (Figure 1) corresponds to  $e_{aq}^-$ [13]. In the presence of  $O_2$  (Figure 2), an excellent  $e_{aq}^-$  scavenger, such band disappears within 100 ns. The scavenging capacity of  $O_2$  is explained by the formation of  $O_2^{\cdot-}$  through the process  $O_2 + e_{aq}^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$ . The data available

are not enough to identify the transient species absorbing at ca. 270 nm. For all the studied compounds the 193 nm photoionization is a monophotonic process, as determined from  $[\Delta]O.D. (e^-_{aq})$  vs.  $(E / mJ)$  plots (shown in Figure 3). The photoionization quantum yields ( $f_{PI}$ ) were also obtained by comparing the yield of  $e^-_{aq}$  in the LFP of the different triazines with that of  $e^-_{aq}$  for NaCl actinometry solutions of the same optical density as the substrates at the excitation wavelength ( $f_{PI}(Cl^-)=0.41\pm 0.08$ ).<sup>7</sup> The obtained  $f_{PI}$  values are compiled in Table 1. The very low values obtained suggest the existence of many effective decay pathways other than electron photoejection for the excited states generated upon photolysis to relax. It also appears as if the presence of bulky electron donating groups increases the ease of photoionization, which would be in agreement with a stabilization of the so-formed radical cation.

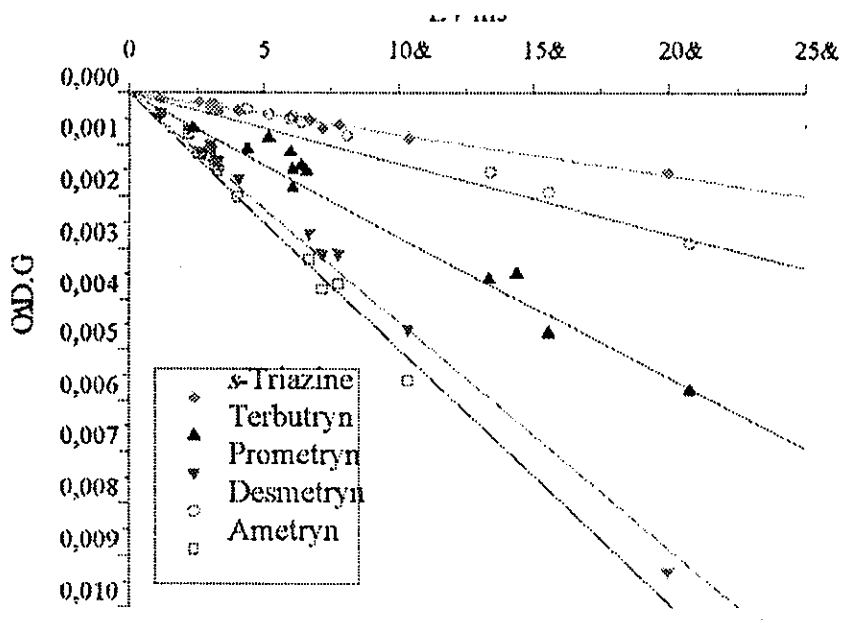


Figure 3: photolysis of 193 nm LFP for the photoionization of Ar-saturated aqueous solutions of the different triazines studied.

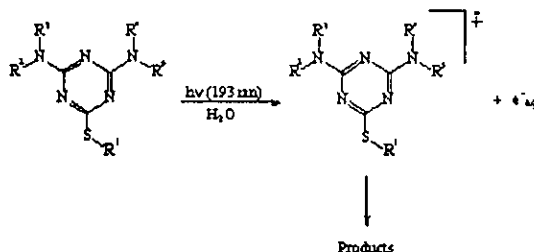
Table 1:  $f_{PI}$  observed upon 193 nm LFP or Ar-satd. solutions of the different used triazines.

Model	$f_{PI}$
s-Triazine	0.005
Herbicides	$f_{PI}$
Ametryn	0.071
Desmetryn	0.070



Prometryn	0.129
Terbutryn	0.129

In all cases the electron photoejection and electron hydration processes took place within the laser pulse, *i.e.*: in less than 20 ns. This is in agreement with previous observations of such processes taking place in less than 27 ps,[14] and would, in practice, mean that no ion-pair recombination takes place after the laser pulse.[15] The results presented here allow us to predict that the photoionization threshold of triazine derivatives must be around 9.9 eV, of which 6.4 eV are provided by the exciting 193 nm photons and 3.5 eV come from the hydration of the photoionization products.[16] On the basis of the experimental evidences available, the general mechanism proposed in Scheme 1 can be put forward for the far-UV induced photodegradation of triazines:



**Scheme 1:** general mechanism describing the far-UV photoionization of s-triazines.

From an environmental point of view, it is remarkable the fact that for all the studied triazines the only photo-initiated processes were observed when exciting with 193 nm light, which is not contained in the solar spectral irradiance.[17] This, in practice, means that s-triazine based herbicides do not undergo photodegradation upon exposition to sunlight. Further research is in progress on photosensitization based degradation of s-triazines, as well as on the applications of radiation chemistry for the degradation of such compounds.

**Conclusion.**

Triazine-based herbicides are not photodegraded by sunlight. Instead, these compounds can be photodegraded (with low yields) by the action of far-UV radiation.

**Acknowledgments.**

M.I.F. acknowledges a Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD, Germany) grant. MCL thanks the EU for a Training and Mobility of Researchers contract to work in the Max-Planck Institut für Strahlenchemie (Mülheim an der Ruhr, Germany), and for supporting a series of visits to the Paterson Institute for Cancer Research Free Radical Research Facility (Manchester, U.K.) within the Access to Large Scale Facilities activity.

Thanks are also due to the Universidade da Coruña for different leaves of absence to MCL.

### References.

---

- [1] Worthing, R.C.; *The pesticide manual*, 9<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Surrey (U.K.), 1991.
- [2] National Research Council. *Regulating Pesticides in Food*. National Academy Press, Washington, D.C., 1987.
- [3] Ashton, F.M.; Crafts, A.S. *Mode of Action of Herbicides*. Wiley, N.Y, 1973.
- [4] (a) Spear, R.; Chap. 6 in: *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W.J.; Laws, E.R. (Eds.), vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, 1991. (b) Miles, C.J.; Chap. 5 in *Pesticide Transformation Products. Fate and Significance in the Environment*. Somasundaram, L.; Coats, J.R. (Eds.), ACS Symp. Ser. 459, ACS, 1991; (c) Belluck, D.A.; Benjamin, S.L.; Dawson, T.; Chap 18 in *Pesticide Transformation Products. Fate and Significance in the Environment*. Somasundaram, L.; Coats, J.R. (Eds.), ACS Symp. Ser. 459, ACS, 1991; (d) Aherne, G.W.; Chap. 4 in *Chemistry, Agriculture and the Environment*. Richardson, M.L. (Ed.), RSC, London, 1991. (e) Funari, E.; Bottoni, P.; Giuliano, G.; Chap. 14 in in *Chemistry, Agriculture and the Environment*. Richardson, M.L. (Ed.), RSC, London, 1991.
- [5] (a) Galassi, S.; Guzzella, L. *Acqua-Aria*, 1990, 3, 231. (b) Hormann, W.D.; Tournayre, H.; Egli, H. *Pest. Monit. J.*, 1979, 13, 128.
- [6] Grover, R.; Cessna, A.J. (Eds.) *Environmental Chemistry of Herbicides*. Vol. II, CRC Press, Boca Raton (Florida), 1991.
- [7] (a) Hodgson, E.; Lefi, P.E. *Environment Health Perspectives*, 1996, 104, 97. (b) Drevenkar, V.; Fingler, S.; Fröbe, Z. *Chemical Safety International Reference Manual*, pp.297-310(1994).
- [8] Hörmann, W.D.; Tournayre, J.C.; Egli, H. *Pesticides Monitoring Journal*, 1979, 13, 128.
- [9] (a) Erickson, L.E.; Lee, K.H. *CRC Critical Rev. in Env. Control*, 1989, 19, 1. (b) Fairhead, A.P. *J. Inst. Water Env. Manag.*, 1994, 8, 399. (c) Hapeman, C.J. *ACS Symp. Ser.*, 1994, 554, 223. (d) Mascolo, G.; López, A.; Földényi, R.; Passino, R.; Tiravanti, G. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29, 2987. (e) López, A.; Mascolo, G.; Földényi, R.; Tiravanti, G.; Santori, M. *Water Supply*, 1995, 13, 265.
- [10] (a) Schmidt, S.; Mattusch, J.; Werner, G. *Z. Chem.*, 1989, 29, 239. (b) ernák, O.; ernáková, M. *Water Supply*, 1992, 171. (c) Muszkat, L.; Geigelson, L.; Bir, L.; Muszkat, K.A. *Chemosphere*, 1998, 36, 1485.
- [11]  $\rho_{\text{I}}(\text{Cl}^-)=0.41$ . Iwata, A.; Nakashima, N.; Kusaba, M.; Izawa, Y.; Yamanaka, C. *Chem. Phys. Lett.* 1993, 207, 137.
- [12] Hug, G.L. *Natl. Stand. Ref. Data Ser.* 1981, 69, 1
- [13] Jou, F.Y.; Freeman, G.R. *J. Phys. Chem.* 1977, 81, 909.
- [14] Mialocq, J.C.; Amouyal, E.; Bernas, A.; Grand, D. *J. Phys. Chem.* 1982, 86, 3173.
- [15] M. Canle L., J.A. Santaballa, S. Steenken. Submitted to publication (1998).
- [16] (a) De Violet, P.F. *Rev. Chem. Interm.* 1981, 4, 121. (b) Braun, M.; Fan, J.Y.; Fuss, W.; Kompa, K.L.; Müller, G.; Schmid, W.E. *Methods in Laser Spectroscopy*, Prior, Z.; Ben-Reuven, A.; Rosenbluh, M., Eds., Plenum Press, N.Y. (U.S.A.), 1986.
- [17] Murov, S.L.; Carmichael, I.; Hug, G.L. *Handbook of Photochemistry*. 2<sup>nd</sup> de. Marcell Dekker, Inc., N.Y. (U.S.A.), 1993.



Pergamon

Tetrahedron 56 (2000) 1103–1109

TETRAHEDRON

# First Steps in the Oxidation of Sulfur-Containing Amino Acids by Hypohalogenation: Very Fast Generation of Intermediate Sulfenyl Halides and Halosulfonium Cations

X. L. Armesto, M. Canle L.,\* M. I. Fernández, M. V. García and J. A. Santaballa\*

*Departamento de Química Fundamental e Industrial, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña. A Zapateira, s/n. E-15071 A Coruña, Galicia, Spain*

Received 25 June 1999; revised 19 November 1999; accepted 2 December 1999

**Abstract**—Sulfur-containing amino acids show an extraordinary binding towards HOCl/ClO<sup>-</sup>. During the process, the Cl is transferred from the O to the S of the amino acid. Met reacts with HOCl one order of magnitude faster than the non-S containing amino acids ( $k_{(Met+HOCl)}=8.7 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Instead, Cys reacts as its thiolate (RS<sup>-</sup>), two orders-of-magnitude faster ( $k_{(RS^-+HOCl)}=1.2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Cys reacts also with ClO<sup>-</sup> ( $k_{(RS^-+ClO^-)}=1.9 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Such processes take place much more readily than the corresponding N-halogenation of the non-sulfur containing amino acids. To our knowledge, these are the first kinetic measurements of the rate of formation of sulfenyl halides and halosulfonium cations in aqueous solution. Sulfenyl chlorides and chlorosulfonium ions derived from amino acids are elusive, and sulfide-type amino acids (Met) eventually yield sulfoxides (MetO), while thiol-type amino acids (Cys) lead to disulfides (Cys<sup>2</sup>Cys) and sulfonic acids (Cya). The fate of sulfur-containing amino acids upon oxidation with HOCl/ClO<sup>-</sup> seems to be related to their mutagen-inactivation ability. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

## Introduction

Halogens in their different aqueous forms, and particularly chlorine derivatives, are disinfectants used worldwide, with well-known benefits and risks that have been the subject of controversy and debate for a long time.<sup>1</sup> The direct correlation between the halogen-based water disinfection and carcinogenicity/mutagenicity of different toxic compounds commonly present in water is well documented.<sup>2</sup>

The last years have seen a blossom of literature concerned with the *in vivo* halogenation via the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> system, which generates HOCl (in general, HOX, if X<sup>-</sup> is present),<sup>3</sup> giving rise to processes and products entirely similar to those taking place during water treatment. Such processes are relevant in relation to many important biological processes, like aging.<sup>4</sup>

In connection with these processes, different authors have reported on the sulfur-based inactivation of some of the mentioned mutagens found in treated tap water,<sup>3f,j,5</sup> as well as on the activity of sulfur-containing compounds against the toxicity derived from other substances.<sup>6</sup>

A relatively abundant chemical literature is available on the

**Keywords:** sulfenyl halides; halosulfonium cations; *in vivo* halogenation; amino acids; water chlorination.

\* Corresponding authors. E-mail: mcanle@udc.es; arturo@udc.es

use of halogen electrophiles to oxidize various sulfur compounds, for example: sulfur-containing amino acids and peptides,<sup>7</sup> thiols,<sup>8</sup> sulfides,<sup>9</sup> sulfoxides,<sup>10</sup> sulfones,<sup>9c</sup> etc. Surprisingly, no detailed mechanistic studies of these reactions have been carried out; particularly remarkable is the lack of kinetic evidence for the mechanistic involvement of sulfenyl halides and halosulfonium cations, usually claimed as the reaction intermediates for these oxidations.<sup>11</sup>

Considering the biochemical relevance of these processes, and in the framework of a wider project aiming to clarify the reaction mechanisms of model sulfur compounds toward halogen electrophiles and the reasons for their implication in the reduction of the mutagenicity, we have studied the mechanism of oxidation of two essential sulfur-containing amino acids, cysteine (Cys) and methionine (Met),<sup>12</sup> by aqueous chlorine.

## Results and Discussion

The chlorination of Cys takes place in some milliseconds, as proven by the disappearance of the ClO<sup>-</sup> absorption band. In the case of Met, the disappearance of ClO<sup>-</sup> was also observed, the process being slower than for Cys. In turn, the chlorination under similar conditions of analogous amino acids and peptides containing no S is much slower, ranging from tenths of a second to seconds.<sup>13</sup>

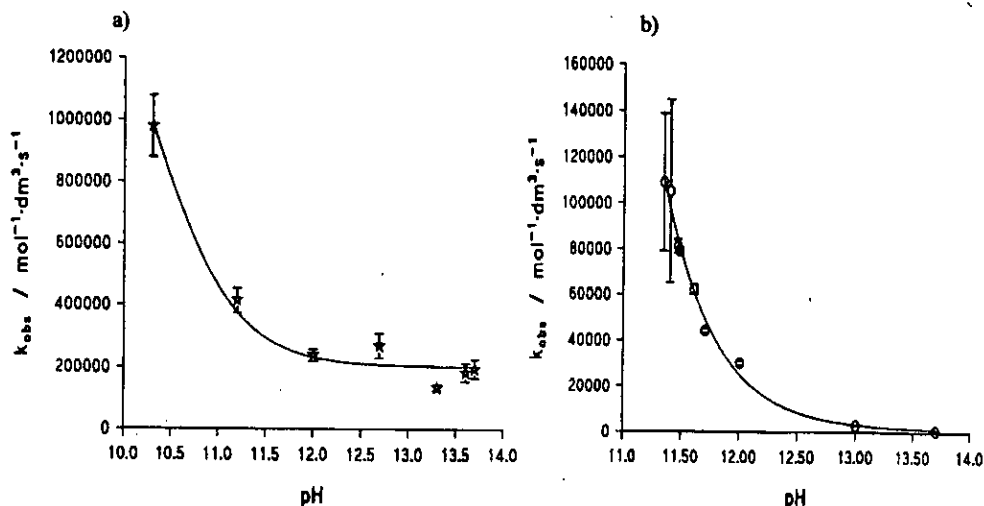


Figure 1. Dependence of  $k_{\text{obs}}$  for reaction of: (a) Cys, (b) Met, and  $\text{HOCl}/\text{ClO}^-$  with the acidity of the medium.  $I=0.50 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $T=298.0 \text{ K}$ .

The kinetic data were accurately fit by a second-order kinetic law, first-order with respect to each reagent:

$$\text{rate} = k_{\text{obs}} [\text{S-compound}] [\text{chlorinating agent}]$$

The observed rate constant depends strongly on pH, as shown in Fig. 1(a) and (b).

In a mildly basic or near-neutral medium the reactions were too fast to be monitored, even on the stopped-flow time scale. For this reason, the kinetics had to be carried out at higher pH values in all cases.

In order to interpret these kinetic results, the different species present in aqueous solution must be taken into account. The chlorinating agent has two possible species related by the equilibrium depicted in Scheme 1 [ $pK_a(\text{HOCl})=7.26 \pm 0.04$ ].<sup>13d</sup>



Scheme 1. Possible chlorinating species.

The prominence of  $\text{HOCl}$  as an active agent at the pH values at which the kinetic studies were carried out will, obviously, depend on its oxidizing power. Since this is known to be much higher than that of  $\text{ClO}^-$ , it must be taken into account for mechanistic purposes.<sup>13a</sup>

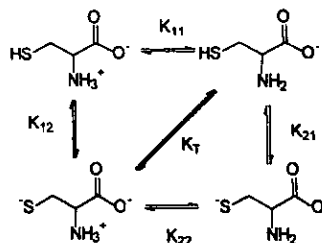
Cys could be present in the form of eight different species, interrelated by three macroscopic, twelve microscopic and six tautomerization equilibria.<sup>14</sup> The case of Met is simpler: four species could be present, with two macroscopic, four microscopic and one tautomerization equilibria. Considering the possible species for both reagents, 16 processes for Cys and 8 for Met could take place. However, under the conditions of basicity used in this study, and considering the  $pK_a$  values<sup>15</sup> for the different ionization sites of Cys [ $pK_a(-\text{CO}_2\text{H})=1.88 \pm 0.02$ ,

$pK_a(-\text{NH}_3^+)=8.15 \pm 0.06$ ,  $pK_a(-\text{SH})=10.29 \pm 0.08$ ] and Met [ $pK_a(-\text{CO}_2\text{H})=2.20 \pm 0.04$ ,  $pK_a(-\text{NH}_3^+)=9.05 \pm 0.02$ ], the conclusion can be drawn that only the species shown in Schemes 2 and 3 should be considered, i.e. four species in the case of Cys and two in the case of Met.

The number of possible elementary processes reduces to eight in the case of Cys and four for Met. Scheme 4 exemplifies such processes for Cys (notice that the chlorination process could, in principle, take place either in the S or in the N, or in both).

However, the mechanistic possibility of chlorination in the amino group can be discarded for these compounds on the basis of the following pieces of evidence:

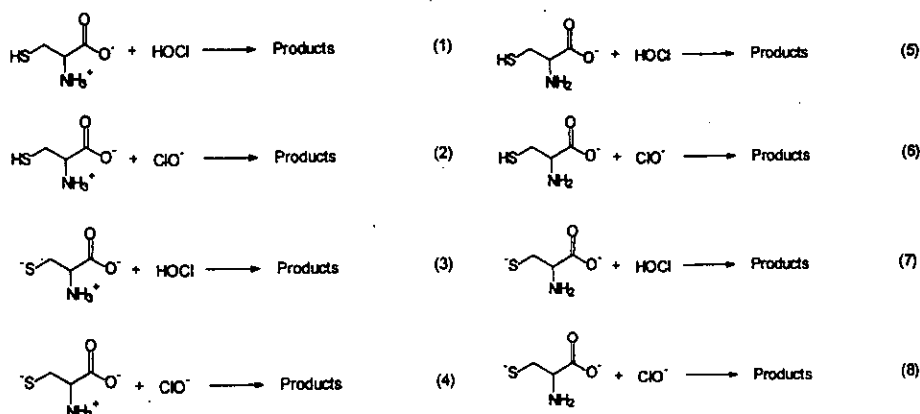
1. The well-known UV bands corresponding to the (N-Cl)-compound at ca. 255 nm are not observed.<sup>13,16,17</sup>



Scheme 2. Simplified ionization scheme for Cys.



Scheme 3. Simplified ionization scheme for Met.

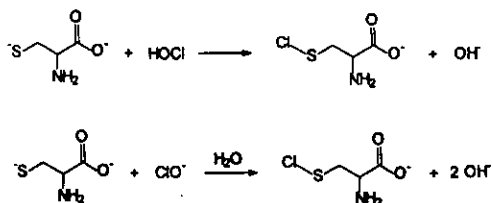


Scheme 4. Possible processes for the chlorination of Cys.

- Under similar conditions of acidity, the oxidation of Cys and Met by aqueous chlorine is at least one order-of-magnitude faster than that for the non-sulfur containing amino acids with similar  $pK_{a2}$ .
- Using the rate constants known for nitrogenated compounds with similar  $pK_{a2}$ , much lower values for reaction rate are predicted, so the  $k_{\text{obs}}$  values cannot be explained on the basis of a mechanism via chlorination on the amino group.<sup>13</sup>
- (*N*-Cl)-amines are known to undergo different processes, yielding aldehydes, ketones,  $\alpha$ -keto acids and nitriles as final reaction products, depending on the acidity of the medium.<sup>17</sup> None of these compounds were found as the products of oxidation of Met or Cys. In turn, MetO (a sulfoxide) was found as the product of oxidation of Met (a sulfide), while cystine (Cys<sup>2</sup>Cys, a disulfide) and cysteic acid (Cya, a sulfonic acid), were the products of oxidation of Cys (a thiol).

### Mechanism of chlorination of Cys

Processes (1)–(5) can be quickly discarded for Cys, since they do not lead to the observed dependence of  $k_{\text{obs}}$  on the acidity of the medium. Processes (6) and (7) are kinetically indistinguishable, and is therefore necessary to use chemical reasoning to discern between them. In a similar case, namely the chlorination of amines, the mechanism has been shown to take place through transfer of Cl from the oxygen atom of HOCl to the free amino group.<sup>13</sup> It is well established that the oxidizing power of HOCl is much



Scheme 5. Proposed mechanism for the chlorination of Cys.

higher than that of  $\text{ClO}^-$ ,<sup>13</sup> while an  $\text{RS}^-$  species is some  $10^4$  times more reactive as a nucleophile than the protonated analogue  $\text{RSH}$ .<sup>18</sup> These facts allow process (6) in Scheme 4 to be discarded. Of course, it is possible to claim the possibility of a proton transfer taking place within the solvent cage, a thermodynamically favorable process, since  $pK_a(\text{HOCl}) < pK_a(-\text{SH})$ , but this would be entirely equivalent to process (7) in Scheme 4.

On the other hand, it is clear from the observed dependence of  $k_{\text{obs}}$  with the pH that at high pH values,  $k_{\text{obs}}$  is different from zero reaching a constant value of ca.  $2 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  (Fig. 1). This would represent a pH-independent pathway, which can only be explained by accepting the existence of a reaction between  $\text{ClO}^-$  and the  $-\text{S}^-$  group of Cys, i.e. process (8) in Scheme 4. The occurrence of this process must be due to the high nucleophilicity of  $\text{RS}^-$  species.

Hence, the mechanism should take place through processes (7) and (8), i.e. via Cl transfer from the oxygen of HOCl and  $\text{ClO}^-$  to the negatively charged sulfur of Cys to yield the corresponding sulfonyl chloride, (*S*-Cl)-Cys, as depicted in Scheme 5.

The rate equation that can be derived for the process of chlorination of Cys is:

$$\text{rate}_{\text{Cys}} = \left[ \left( k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})} \frac{[\text{H}^+]}{K_C + [\text{H}^+]} + k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)} \frac{K_C}{K_C + [\text{H}^+]} \right) \cdot \frac{K_S}{K_S + [\text{H}^+]} \right] \cdot [\text{HOCl}]_0 \cdot [\text{Cys}]_0$$

where  $\text{RS}^-$  represents the thiolate form of Cys,  $k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})}$  and  $k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)}$  are the second-order rate constants for such elementary processes,  $K_C$  is the ionization constant for HOCl,  $K_S$  the ionization constant for the thiol group of Cys and  $[\text{HOCl}]_0$  and  $[\text{Cys}]_0$  are the total concentrations of the reagents. The kinetic data are adequately fit by this equation, as shown in Fig. 1(a).

This mechanism is in agreement with the observation of Cys<sup>+</sup>Cys and Cya as products of the oxidation of Cys by HOCl and also with results from the literature (see Experimental). The initially formed (S-Cl)-Cys could further react with Cys or with itself, or undergo hydrolysis, eventually leading to Cys<sup>+</sup>Cys and Cya, although such processes are not the object of this study. Thiols are known to oxidize to disulfides and subsequently to sulfonic acids.<sup>19</sup> The observation of increasing concentration of Cl<sup>-</sup> after the oxidation, leading to a quantitative recovery of Cl<sup>-</sup> (based on [HOCl]<sub>0</sub>) ca. 20 min after oxidation is in agreement with the observed reaction products, which is an evidence for the decomposition of (S-Cl)-Cys. The mechanism leading to Cys<sup>+</sup>Cys formation could be similar to the decomposition of (S-NO)-thiols.<sup>20</sup> Cys<sup>+</sup>Cys can be then further oxidized to Cya,<sup>19</sup> which, on the contrary, is in agreement with the lower yield observed for Cya relative to Cys<sup>+</sup>Cys. The detailed mechanism of decomposition of these sulfenyl chlorides in this kind of reaction is currently under study.

**Mechanism of chlorination of Met**

In the case of Met, only processes that are analogous to (1), (2), (5) and (6) in Scheme 4, but replacing the -SH group by a -SCH<sub>3</sub>, are possible. Processes (1), (2) and (6) are readily discarded since they do not lead to the observed dependence of *k*<sub>obs</sub> with the acidity of the medium. Hence, the chlorination of Met takes place through Cl transfer from the oxygen of the HOCl to the sulfur of Met to yield the corresponding chlorosulfonium cation, as depicted in Scheme 6.

The rate equation derived for the process of chlorination of Met is:

$$\text{rate}_{\text{Met}} = k_{(\text{Met} + \text{HOCl})} \frac{[\text{H}^+]}{K_C + [\text{H}^+]} [\text{HOCl}]_0 [\text{Met}]_0$$

where *k* is the second-order rate constant for the elementary process and *K*<sub>C</sub>, [HOCl]<sub>0</sub> and [Met]<sub>0</sub> are defined as in the case of Cys. The kinetic data are adequately fit by this equation, as shown in Fig. 1(b).

This mechanism is also in agreement with the observation of MetO as the oxidation product (see Experimental). Sulfides are known to oxidize to sulfoxides under various conditions.<sup>9,16,21</sup> The fact that the concentration of Cl<sup>-</sup> continuously increases after oxidation until a quantitative recovery of Cl<sup>-</sup> (based on [HOCl]<sub>0</sub>) is reached ca. 20 min after oxidation is in agreement with the observed reaction product. Hydrolysis of the intermediate chlorosulfonium cation should eventually yield MetO. The detailed mechanism of decomposition of these chlorosulfonium cations in this kind of process is currently under study.

**Final considerations**

Using the experimental values for *K*<sub>C</sub> and *K*<sub>S</sub>, the second-

order rate constants can be obtained for the different processes. Thus, for Cys:

$$k_{(\text{RS}^- + \text{HOCl})} = 1.2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

$$k_{(\text{RS}^- + \text{ClO}^-)} = 1.9 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

and for Met:

$$k_{(\text{Met} + \text{HOCl})} = (8.7 \pm 0.2) \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$$

The rate constant *k*<sub>(RS<sup>-</sup>+HOCl)</sub> obtained for the reaction between the thiolate form of Cys and HOCl is presumably not within the diffusion-control limit, indicating that such process is mostly chemically-controlled, although with a low energy barrier for recombination of both reagents.

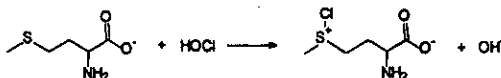
To our knowledge, these are the first kinetic measurements of the rate of formation of chlorosulfonium cations or sulfenyl chlorides in aqueous solution.

In both mechanisms OH<sup>-</sup> is produced during the chlorination process. In principle, this is not thermodynamically favored, but in a way similar to the case of non-sulfur containing amino acids, several water molecules are expected to participate in the transition state,<sup>13a</sup> so that additional stabilization is achieved by solvating OH<sup>-</sup>, lowering the bonding angle strain and avoiding a bent proton transfer.

When these rate constants are compared with those for non-sulfur containing amino acids,<sup>13a</sup> it turns out that in the case of Met the process is ca. one order-of-magnitude faster, while for Cys (in its RS<sup>-</sup> form) it is two orders-of-magnitude faster. This difference in reactivity is due to the fact that sulfides are ca. 10<sup>5</sup> times less reactive as nucleophiles than thiolates.<sup>18</sup>

The observed reaction of Cys (RS<sup>-</sup> form) with ClO<sup>-</sup> is not detected in the case of the reaction with nitrogenated compounds.<sup>13</sup> Such difference must again be attributed to the enormously higher nucleophilic reactivity of thiolates compared to amines (ca. four orders-of-magnitude higher).<sup>18</sup> The rate constant for this process, *k*<sub>(RS<sup>-</sup>+ClO<sup>-</sup>)</sub>, is roughly two orders-of-magnitude lower than those obtained for the most nucleophilic amines,<sup>13</sup> but still rather higher than, for example, those of aromatic amines or amides.<sup>13b</sup>

The much higher reactivity observed for HOCl toward Cys and Met relative to non-sulfur containing amino acids has important biochemical implications; when sulfur-containing amino acids are present the halogen electrophiles will react preferably with them, and the major products formed will be those derived from such a reaction. The sulfenyl chlorides or the halosulfonium ions formed by reaction of thiols and



Scheme 6. Proposed mechanism for the chlorination of Met.

sulfides with halogenating agents are short-lived intermediates and react readily with water yielding, respectively, disulfides, sulfonic acids and sulfoxides.<sup>7,8</sup> In turn, (*N*-halo)-amines, compounds with a relatively long lifetime,<sup>17</sup> are known to lead to toxic<sup>22</sup> and/or mutagenic compounds.<sup>2</sup> Hence, the observed sulfur-based mutagen inactivation<sup>3,5</sup> must be attributed to differences in toxicity between the products generated upon *S*- and *N*-chlorination.

### Conclusion

The reaction between sulfur-containing amino acids and aqueous chlorine takes place through a second-order process in which the Cl is transferred from the oxygen of HOCl to the sulfur atom of the amino acid. Sulfide-type amino acids, like Met, react with HOCl ca. one-order of magnitude faster than the non-sulfur containing amino acids ( $k_{(\text{Met}+\text{HOCl})} = (8.7 \pm 0.2) \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ), yielding sulfoxides. Thiol type amino acids, like Cys, react ca. one-two orders-of-magnitude faster ( $k_{(\text{RS}^-+\text{HOCl})} = 1.2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). We found that thiol-type amino acids, like Cys, can also react at a relatively high rate with  $\text{ClO}^-$  ( $k_{(\text{RS}^-+\text{ClO}^-)} = 1.9 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). The products of oxidation of thiols are disulfides and sulfonic acids. These are the first kinetic measurements of the rate of the first elementary steps for the formation of sulfenyl chlorides or chloro-sulfonium cations. On the basis of the proposed mechanisms, the available observations of mutagen inactivation by sulfur-containing amino acids must be attributed to greater nucleophilicity and to the different toxicity of the products generated upon *S*-chlorination and *N*-chlorination.

### Experimental

#### Reagents

Aqueous chlorine solutions were prepared by adjusting appropriate NaOCl solutions to the desired pH. Acid pH values were avoided in order not to have interference from  $\text{Cl}_2(\text{aq})$ . The way in which the concentration of aqueous chlorine was titrated, as well as the detailed experimental procedure, have been described elsewhere.<sup>16</sup> All other chemicals were commercially available (Fluka, Merck) and used without further purification. The pH of the medium was adjusted with standard NaOH solutions. The ionic strength was kept to  $0.50 \text{ mol dm}^{-3}$  with  $\text{NaClO}_4$ . In order to slow down the process, all the kinetics were followed in basic or alkaline medium.

#### Kinetic studies

The reactions were monitored by measuring the decrease in the absorption of the  $\text{ClO}^-$  ion at 292 nm in a Hi-Tech Scientific SF-61 MX stopped-flow spectrophotometer was used. The reagents and the cell holder were water-flow thermostated to within  $\pm 0.1 \text{ K}$ .

The experimental data were accurately fit by a second-order kinetic rate equation. The values reported here for the second-order rate constants are an average of those obtained

for 5–10 kinetic runs (standard deviations from the experimental data are shown in Fig. 1).

#### Product analysis

1 mM Met and Cys were treated with 1 mM HOCl at different pH values between 7 and 12, under conditions similar to those used for the kinetic studies, except for the ionic strength, that was not controlled for the sake of simplicity. The reactions were started and left to proceed for ca. 15–20 min. Then, without any further work-up procedure, the aqueous samples were used as such and the reaction products analyzed by TLC, HPLC and  $\text{Cl}^-$  ion selective detection.

For the TLC analysis, 10 cm silica gel plates were used, and *n*-BuOH/AcOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (80:20:20  $\text{cm}^3$ ) and *n*-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (70:30  $\text{cm}^3$ ) mixtures used as eluents for development of the plates. Using the first eluent, Methionine sulfoxide (MetO) was found as the product of oxidation of Met with HOCl. In the case of Cys, Cys<sup>^</sup>Cys and Cya were found as the products of oxidation using both eluents.

The HPLC analyses were performed with a system equipped with a flow unit, automatic injection, column oven with temperature-control and photodiode array UV-Vis and scanning fluorescence detectors. The flow rate used was  $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$  and 5  $\mu\text{L}$  of the sample were injected in all cases. The linearity of response of the detector to all analyzed products was checked, and the so-obtained calibrations used for calculation of reaction yields.

For the HPLC analysis of the products of oxidation of Met with HOCl, a reversed-phase 250 mm length, 3.9 mm internal diameter Alltech column, packed with Partisil OD53, 5 mm, was used with a 7.5 mm length, 4.6 mm internal diameter Alltech precolumn, filled with Partisil OD53, 5 mm. The mobile phase was 5:95 MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  at 298.0 K. The detection was carried out at 210 nm. Under such conditions, 74, 76, 76 and 75% yield of MetO ( $t_R \approx 2.8 \text{ min}$ ) were obtained at the pH values of 6, 7, 8, 12, after oxidation of Met ( $t_R \approx 3.5 \text{ min}$ ) with HOCl.

For the HPLC analysis of the products of oxidation of Cys with HOCl, two different procedures were used.

1. A normal-phase 300 mm length, 3.9 mm internal diameter Waters column packed with Porasil 125 Å, 10 mm was used. The mobile phase was 70:30 *n*-PrOH/ $\text{H}_2\text{O}$ , at 298.0 K. The detection was carried out at 210 nm. Under such conditions, a 22% yield of Cys<sup>^</sup>Cys ( $t_R \approx 7.6 \text{ min}$ ) was obtained after oxidation of Cys ( $t_R \approx 4.4 \text{ min}$ ) with HOCl, with evidence for the presence of Cya ( $t_R \approx 3.0 \text{ min}$ ).
2. A derivatization procedure was followed using *o*-phthalaldehyde/2-mercaptoethanol (OPA/MCE), to generate fluorescent derivatives, following an established procedure that permits quick and straightforward fluorimetric assay of amino acids down to the nanomole range.<sup>23</sup> A reversed-phase 250 mm length, 3.9 mm internal diameter Alltech column packed with Partisil OD53, 5 mm was used with a 7.5 mm length, 4.6 mm internal diameter Alltech precolumn filled with Partisil

OD53, 5 mm. The mobile phase was a 72:20:8 mixture of H<sub>2</sub>O/0.25 mol dm<sup>-3</sup> sodium propionate (pH≈6.5)/CH<sub>3</sub>CN at 298.0 K. The fluorescence detection was carried out with  $\lambda_{\text{excitation}}=360$  nm and  $\lambda_{\text{emission}}=455$  nm. The minimal fluorescence yield of cysteine/cystine OPA/MCE derivatives was solved by pre-treatment with iodoacetic acid.<sup>24</sup> The yields of the fluorescent OPA/MCE amino acid derivatives were quantified by comparison with the peak produced by homoserine ( $t_{\text{R}}\approx 30.0$  min), that was used as internal standard. Under these conditions, and for the different pH values used, a mean of 31% yield of Cya ( $t_{\text{R}}\approx 5.0$  min) and 11% of Cys<sup>+</sup>Cys ( $t_{\text{R}}\approx 12.0$  min) were obtained after oxidation of Cys ( $t_{\text{R}}\approx 12.0$  min) with HOCl. However, these yields must be taken as lower limits, since the stability of the OPA/MCE derivatives of Cys, Cya and Cys<sup>+</sup>Cys is not high, according to the available studies.<sup>23b</sup> Moreover, it is worth noting that using this method the peaks corresponding to Cys and Cys<sup>+</sup>Cys would elute at the same time, since the latter is reduced to the former.

The concentration of Cl<sup>-</sup> generated after oxidation of Met and Cys by aqueous chlorine was measured with a Cl<sup>-</sup> selective electrode. Both for the oxidation of Cys and Met with HOCl, a quantitative recovery (100%) of Cl<sup>-</sup> was obtained ca. 20 min after starting the reaction, i.e. following decomposition of the initial oxidation product.

#### Acknowledgements

M.I.F. thanks the Xunta de Galicia for a PhD fellowship.

#### References

- (a) Miller, S. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2292. (b) Newman, A. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2296. (c) Bryant, E. A.; Fulton, G. P.; Budd, G. C. *Disinfection Alternatives for Safe Drinking Water*; V.C. Nostrand Reinhold: New York, 1992. (d) Fleming, B. *Pulp & Paper* **1991**, *115*. (e) Brown, J.; Jones, F.; Beattie, S. P.; Godfree, A. F. *Water Services* **1990**, *15*.
- (a) Franzén, R.; Kronber, L. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 2222. (b) Eder, E.; Weinfurter, E. *Chemosphere* **1994**, *29*, 2455. (c) Owusu-Yaw, J.; Wheeler, W. B.; Wei, C. I. *Water Chlorination. Environmental Impact and Health Effects*; Lewis: Chelsea, 1990; Vol. 6, pp 179. (d) Thomas, E. L.; Jefferson, M. M.; Bennett, J. J.; Learn, D. B. *Mutat. Res.* **1987**, *188*, 35. (e) Sen, A. C.; Owusu-Yaw, J.; Wheeler, W. B.; Wei, C. I. *J. Food Sci.* **1989**, *54*, 1057. (f) Masri, M. S. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *24*, 923. (g) Bull, R. J.; McCabe, L. J. *Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects*; Lewis: Chelsea, 1985; Vol. 5, pp 111.
- (a) Prütz, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *332*, 110. (b) Stevens, K. L.; Wilson, R. E.; Friedman, M. J. *Agric. Food Sci.* **1995**, *43*, 2424. (c) Lindvall, S.; Rydell, G. *Chem.-Bio. Interact.* **1995**, *97*, 53. (d) Matsumura, H.; Watanabe, M.; Matsumoto, K.; Ohta, T. *J. Toxicol. Environ. Health* **1994**, *43*, 65. (e) Watanabe, M.; Kobayashi, H.; Ohta, T. *Mutat. Res.* **1994**, *312*, 131. (f) Mathy-Hartet, M.; Deby-Dupont, G.; Deby, C.; Jadoul, L.; Vandenberghe, A.; Larny, M. *Mediators of Inflammation* **1995**, *4*, 437. (g) Shang, M.; Okuda, R. K.; Worthen, D. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 307. (h) Heinecke, J. W.; Li, W.; Mueller, D. M.; Bohrer, A.; Turk, J. *Biochem.* **1994**, *33*, 10 127. (i) Naskalski, J. W. *Ann. Biol. Clin.* **1994**, *52*, 451. (j) Drożdż, R.; Naskalski, J. W. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1993**, *31*, 71. (k) Cantin, A.; Woods, D. E. *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 38. (l) Schraufstatter, I. U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H.; Quehenberger, O.; Cochrane, C. G. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 554. (m) Tsan, M. F. *J. Cell. Physiol.* **1982**, *111*, 49. (n) Albrich, J. M.; McCarthy, C. A.; Hurst, J. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 210.
- (a) Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20 313. (b) Stadtman, E. R.; Berlett, B. S. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 485. (c) Stadtman, E. R. *Science* **1992**, *257*, 1220. (d) Vissers, M. C. M.; Winterbourn, C. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *285*, 53. (e) Schraufstatter, I. U.; Browne, K.; Harris, A.; Hyslop, P. A.; Jackson, J. H.; Quehenberger, O.; Cochrane, C. G. *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 554. (f) Weiss, S. I. *N. Engl. J. Med.* **1989**, *320*, 365.
- (a) Lyndvall, S.; Rydell, G.; Johansson, L.; Svensson, B. E.; Ulf, B. *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, *94*, 83. (b) Gaginella, T. S.; Grisham, M. B.; Walsh, T. R.; Mousmi, C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *263*, 1068. (c) Stewart, M. H.; Olson, B. H. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2918. (d) Bilzer, M.; Lauterburg, B. H. *J. Hepatol.* **1991**, *13*, 84.
- Friedman, M.; Wehr, C. M.; Schade, J. E.; MacGregor, J. T. *Food Chem. Toxicol.* **1982**, *20*, 887.
- (a) Cuq, J. L.; Aymard, C.; Chefer, C. *Food. Chem.* **1977**, *2*, 309. (b) Young, P. R.; Hsieh, L. S. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1419. (c) Winterbourn, C. C. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, *840*, 204. (d) Dudina, Y. I.; Formazyuk, V. Y.; Sergiyenko, V. I.; Gorshkova, T. N. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* **1995**, *31*; *Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 176903q.
- Field, L. *Disulfides and Polysulfides*; In *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S. Ed.; Plenum Press: New York, 1977 (Chapter 7).
- (a) Schank, K. *Synthesis of open-chain sulfones*. In: *The syntheses of sulphones, sulfoxides and cyclic sulphides*; Patai, S., Rappoport, Z., Eds.; Wiley: New York, 1994; Chapter 1. (b) Weber, J. V.; Schneider, M.; Salami, B.; Paquer, D. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* **1986**, *105*, 99. (c) Young, P. R.; Tii, M. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1416. (d) Grossert, J. S.; Harstaff, W. R.; Langler, R. F. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 421. (e) Oae, S. *Sulfoxides and Sulfilimines*. In: *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York, 1977; Chapter 8. (f) Truce, W. E.; Klingler, T. C.; Brand, W. W. *Sulfones and Sulfoximines*. In: *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum Press: New York, 1977; Chapter 10. (g) Marino, J. P. *Sulfur-Containing Cations*. In: *Topics in Sulfur Chemistry*; Senning, A., Ed.; Thieme: Stuttgart, 1976; Vol. 1. (h) Grossert, J. S.; Harstaff, W. R.; Langler, R. F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, *50*. (i) Harville, R.; Reed, S. F. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3976. (j) Montanari, F.; Cinquini, M. *Mechanisms of Reactions of Sulfur Compounds* **1968**; Vol. 3, p 121. (k) Harville, R.; Reed, S. F. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 3976. (l) Skattebøl, L.; Boulette, B.; Solomon, S. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3111. (m) Higuchi, T.; Gensch, K. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3874. (n) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; MacGregor, W. S. *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 2485. (o) Beneš, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1963**, *28*, 1171. (p) Kwart, H.; Miller, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 5008.
- (a) Mahadevappa, D. S.; Ananda, S.; Murthy, A. S. A.; Rangappa, K. S. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1673. (b) Ganapathy, K.; Jayagandhi, P. *Int. J. Chem. Kinet.* **1983**, *15*, 129. (c) Refs. 9c,e.
- (a) Böhme, H.; Fischer, H.; Grank, R. *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1949**, *563*, 54. (b) Böhme, H.; Boll, E. Z. *Anorg. Allg. Chem.* **1957**, *290*, 17. (c) Magee, P. S. *The Sulfur-Bromine Bond*. In: *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*; Senning, A., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1971; Vol. 1. (d) Russ,



- C. R.; Doublas, I. B. The Sulfur–Chlorine Bond. In: *Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry*; Senning, A., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1971; Vol. 1.
12. The symbolism used for amino acids and their derivatives is the one recommended by the IUPAC and IUB, to be found in *Pure Appl. Chem.* 1984, 56, 595. For cystine we used the symbol Cys<sup>2</sup>Cys with the aim to fulfil such recommendations by clearly indicating the presence of a S–S bond and, at the same time, editorial requirements (the symbols suggested by the IUPAC and IUB disrupt the evenness of the line spacing).
13. (a) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27, 453. (b) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Electronic Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1)*. ISBN 0 85404 899 5; Rzepa, H. S., Goodman, J. M., Leach, C., Eds.; Royal Society of Chemistry: London, 1996. (c) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* 1994, 26, 1135. (d) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Gazz. Chim. Ital.* 1994, 124, 519. (e) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1993, 49, 275.
14. Kallen, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1971, 93, 6236.
15. (a) Martell, A. E.; Smith, R. M. *Critical Stability Constants. Amino Acids*; Plenum: New York, 1989; Vol. 1. (b) Stewart, R. *The Proton: Applications to Organic Chemistry*; Academic Press: Orlando, 1985.
16. Armesto, X. L.; Canle, L. M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* 1993, 25, 331.
17. (a) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1998, 54, 521. (b) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* 1996, 9, 552. (c) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 1996, 105, 349. (d) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4659. (e) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Rodríguez, P.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1994, 50, 2265. (f) Armesto, X. L.; Canle M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1993, 181.
18. (a) Scudder, P. H. *Electron Flow in Organic Chemistry*; Wiley: New York, 1992. (b) Pearson, R. G.; Sobel, H.; Songstad, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 319.
19. (a) Zincke, T.; Frohneberg, W. *Ber.* 1910, 43, 837. (b) *Organic Chemistry of Sulfur*, Oae, S., Ed.; Plenum: New York, 1977. (c) Cremllyn, R. J. *An Introduction to Organosulfur Chemistry*; Wiley: Chichester, 1996.
20. Dicks, A. P.; Swift, H. R.; Williams, D. L. H.; Butler, R.; Al-Sadoni, H. H.; Cox, B. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1996, 481.
21. (a) Bennett, C. F.; Goheen, D. W.; MacGregor, W. S. *J. Org. Chem.* 1963, 28, 2485. (b) Beneš, J. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 1963, 28, 1171. (c) Higuchi, T.; Gensch, K. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3874. (d) Harville, R.; Reed, S. F. *J. Org. Chem.* 1968, 33, 3976. (e) Weber, J. V.; Schneider, M.; Slamini, B.; Paquer, D. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.* 1986, 105, 99.
22. (a) Bull, R. J.; Bimbaum, L. S.; Cantor, K. P.; Rose, J. B.; Butterworth, B. E.; Pegram, R.; Tuomisto, J. *J. Fundam. Appl. Toxicol.* 1995, 28, 155. (b) Henschler, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 1920. (c) Soldi, T.; Riganti, V.; Profumo, A.; Conio, O. *Microbiol. Alim. Nutr.* 1994, 12, 371.
23. (a) Roth, M. *Anal. Chem.* 1971, 43, 880. (b) Turnell, D. C.; Cooper, J. D. H. *Clin. Chem.* 1982, 28, 527.
24. Cooper, J. D. H.; Turnell, D. C. *J. Chromatogr.* 1982, 227, 158.

## Intracellular oxidation of dipeptides. Very fast halogenation of the amino-terminal residue

Xosé Luis Armesto, Moisés Canle L.,\* M. Isabel Fernández, M. Victoria García,\* Santiago Rodríguez and J. Arturo Santaballa\*

Departamento de Química Física e Enxeñaría Química I, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Rúa Alejandro de la Sota 1, E-15008, A Coruña, Galicia, España.  
E-mail: mcanle@udc.es, vicky@udc.es, arturo@udc.es; Fax: 34 981 167065;  
Tel: 34 981 167000

Received (in Cambridge, UK) 6th September 2000, Accepted 31st January 2001  
First published as an Advance Article on the web 2nd March 2001

Peptides undergo a very fast halogenation reaction with aqueous halogens. The process takes place *via* aliphatic electrophilic substitution with bimolecular rate constants of ca.  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The products formed are *N*-halopeptides, *i.e.*, the halogenation process takes place on the nitrogen atom at the amino-terminal moiety of the amino acid residue. At ratios [halogenating agent]/[dipeptide]  $\leq 1$ , no analytical or kinetic evidence has been found of halogenation on the peptide bond or on the oxygen atom of the carboxy-terminal residue. The intracellular oxidation of peptides to *N*-halo-peptides proceeds by an *in vivo* mechanism to reduce the oxidative stress caused by intracellular oxidants.

### Introduction

Halogenation in general, and chlorination in particular, is one of the biochemical mechanisms used by mammals as protection from pathogens.<sup>1</sup> It is well established that the enzymatic system myeloperoxidase/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$  ( $\text{X}^- = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$ )<sup>2</sup> is able to produce *in vivo* substantial amounts of HOCl,<sup>3</sup> which is a powerful cytotoxic oxidant against a variety of microorganisms.<sup>4-8</sup> In addition, HOCl reacts with nitrogen compounds, yielding *N*-chloro-derivatives,<sup>9</sup> which are able to oxidize *in vivo* a variety of compounds, such as nucleic acids,<sup>5,10</sup> nucleotides,<sup>11,12</sup> peptides,<sup>13</sup> etc.

The presence of organic nitrogenated compounds in natural waters, as peptides,<sup>14,15</sup> has led chemists to investigate their aqueous chemistry. The most widely used water-disinfection method is chlorination,<sup>16</sup> during which *N*-chloro-compounds are formed,<sup>9</sup> in a process entirely similar to the one taking place *in vivo* (see above). The benefits and risks of halogen-based water disinfection are well-known.<sup>16,17</sup>

With aqueous halogens, nitrogenated compounds undergo a very fast halogenation reaction to yield *N*-halo-derivatives, which can then undergo decomposition to yield ammonia, halide ions and the corresponding carbonyl compounds.<sup>9</sup>

In view of the biochemical and environmental relevance of halogenation processes, it seems important to clarify the mechanism of HOCl-mediated oxidation of peptides, as a first step to understanding the oxidative degradation of proteins.

The oxidation of amines and amino acids has been extensively studied.<sup>5,11,18-22</sup> However, that of peptides has received little attention.<sup>23</sup> In a previous communication we presented preliminary results for the oxidation of two peptides: Gly-Gly and Gly-Gly-OEt.<sup>†</sup> Here, we report a systematic study of the mechanism of halogenation of glycylamide, as a model compound, and of 12 dipeptides (see Scheme 1).

### Results and discussion

Under near-neutral conditions, the chlorination of dipeptides

† The IUPAC three-letter system has been used to denote  $\alpha$ -amino acids. Dipeptides are named following the names of the corresponding parent amino acids (Aa) as Aa<sub>1</sub>-Aa<sub>2</sub>.<sup>24,25</sup>

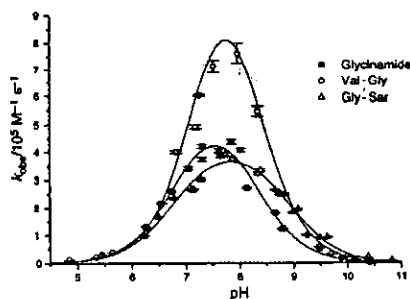


Fig. 1 Influence of the pH on the rate of chlorination of *N*-chloro-dipeptides. Conditions: [chlorinating agent] = [dipeptide] = 1.2 mM,  $I(\text{NaCl}) = 0.50 \text{ M}$ ,  $T = 298.15 \text{ K}$ .

takes place in some tenths of a millisecond, as proved by the simultaneous disappearance of the peak for the  $\text{ClO}^-$  in the UV absorption spectra,<sup>26</sup> and the growth of the characteristic UV band of *N*-chloroamines.<sup>9</sup> At constant pH, the process follows a second order kinetic law: first order in both the chlorinating agent and the dipeptide. The observed rate constant shows a strong dependence on the acidity of the medium, as shown in Fig. 1.

This dependence is adequately described by the empirical equation, eqn. (1), where  $a$ ,  $b$  and  $c$  are adjustable parameters and  $r$  is the reaction rate.

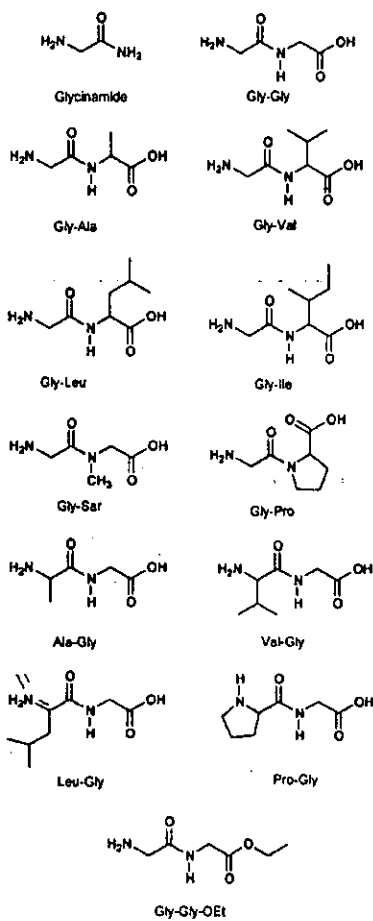
$$r = k_{\text{obs}}[\text{chlorinating agent}][\text{dipeptide}] = a \frac{[\text{H}^+]}{(b + [\text{H}^+])(c + [\text{H}^+])} [\text{chlorinating agent}][\text{dipeptide}] \quad (1)$$

A proper description of the reaction mechanism requires that all the species that may participate in the peptide hydrolysis in aqueous media are considered. These are shown in Scheme 2 (only acid-base equilibria are indicated).

Similarly, hypochlorous acid and the hypochlorite anion

coexist under the reaction conditions as the equilibrium  $\text{HClO} \rightleftharpoons \text{ClO}^- + \text{H}^+$ .

Taking into account all the possible species and reaction sites, more than thirty different processes arise as mechanistic possibilities for the chlorination of dipeptides.



Scheme 1

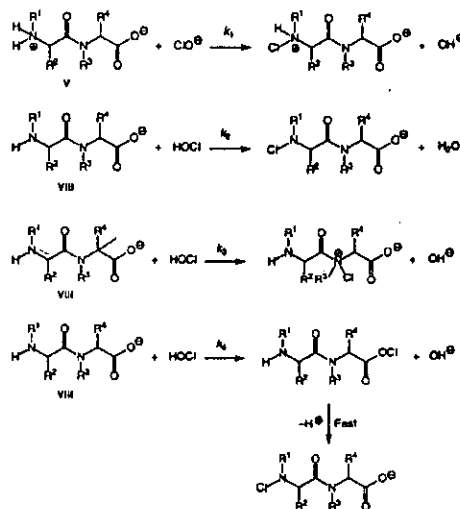
If the conditions of pH used in this work (4.5–13.0) and the  $pK_a$  values obtained for these compounds ( $pK_{a1}$ , ca. 1.5–2.0,  $pK_{a2}$ , ca. 8.5–9.0) are considered,<sup>27,28</sup> it seems reasonable to expect that species I, II, III, IV, VI and VII will be found in very low concentration.

Moreover, if the observed rate constants are considered, the corresponding bimolecular rate constant for chlorination involving those species should be higher than that of the diffusion limit.<sup>29</sup>

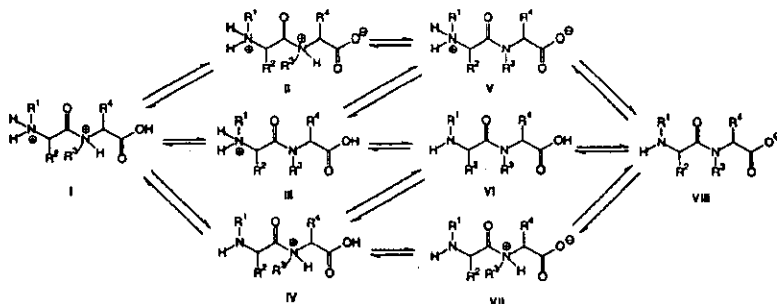
Bearing this in mind, only species V, VIII, HOCl and  $\text{ClO}^-$  remain as possible reacting species. As V and VIII both have three possible reaction centres, several elementary processes can be put forward. If the  $k_{\text{obs}}$  vs pH observed profiles are considered, only four of these processes are coherent with the obtained results, one taking place between  $\text{ClO}^-$  and species V, and three taking place between HOCl and species VIII, at different reaction sites, as shown in Scheme 3.

The general expression (2) can be deduced for the observed rate constant, where  $k_{\text{obs}}$  is the second order rate constant.

$$k_{\text{obs}} = k_1 K_1 \frac{[\text{H}^+]}{(K_{\text{Am}} + [\text{H}^+])(K_{\text{HOCl}} + [\text{H}^+])} \quad (2)$$



Scheme 3 Possible rate determining steps for the chlorination of dipeptides.



Scheme 2 Possible monoprotonation equilibria for dipeptides.

Table 1 Bimolecular rate constants for the chlorination of dipeptides and  $pK_{Am}$  values for the studied dipeptides,  $T = 298.15 \text{ K}$ ,  $I = 0.5 \text{ M}$  (KCl)

Dipeptide	$10^{-6} k_2 / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$pK_a$ (Experimental)	$pK_{Am}$ (Optimised)	$pK_{Am}$ (Literature)
Glycinamide	$4.3 \pm 0.3$	—	$7.90 \pm 0.07$	$7.95^a, 7.96^a$
Gly-Gly-OEt	$7.5 \pm 0.2$	$8.075 \pm 0.008$	—	$7.75^b, 7.710^c, 7.76^d$
Gly-Gly	$9.1 \pm 0.3$	$8.25 \pm 0.01$	—	$8.10^f, 8.25^f, 8.27^f, 8.33^g, 8.18^h, 8.17^i, 8.12^j, 8.20^k, 8.15^l, 8.25^m$
Gly-Sar	$12.6 \pm 0.6$	—	$8.58 \pm 0.07$	$8.55^n, 8.59^o, 8.61^p$
Gly-Ala	$8.8 \pm 0.9$	$8.310 \pm 0.005$	—	$8.29^q, 8.23^r, 8.19^s, 8.21^t$
Gly-Val	$9.5 \pm 0.7$	—	$8.3 \pm 0.1$	$8.33^u, 8.25^v, 8.22^w$
Gly-Ile	$6.4 \pm 0.5$	—	$8.1 \pm 0.1$	$8.15^x, 8.00^y$
Gly-Leu	$6.4 \pm 0.4$	—	$8.13 \pm 0.08$	$8.14^z$
Gly-Pro	$15 \pm 5$	—	—	$8.41^aa, 8.69^ab, 8.65^ac, 8.50^ad, 8.53^ae$
Ala-Gly <sup>e</sup>	$8.5 \pm 0.8$	$8.272 \pm 0.003$	—	$8.27^af, 8.18^ag, 8.21^ah$
Val-Gly	$6.0 \pm 0.4$	—	$7.94 \pm 0.06$	$7.89^ai, 8.02^aj$
Leu-Gly	$8.0 \pm 0.7$	—	$7.96 \pm 0.09$	$8.10^ak$
Pro-Gly	$18 \pm 3$	—	$8.7 \pm 0.1$	$8.97^al, 8.97^am$

<sup>a</sup>  $k_2 / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at different temperatures: 20.79 (286.0 K), 34.15 (292.6 K), 41.46 (297.0 K), 56.44 (303.0 K), 74 (308.0 K), 97.46 (314.0 K). [HOCl] = 0.002 M, [Ala-Gly] = 0.1 M, [NaOH] = 0.1 M,  $I$  (NaClO<sub>2</sub>) = 0.5 M. <sup>b</sup> Ref. 30. <sup>c</sup> Ref. 31. <sup>d</sup> Ref. 32. <sup>e</sup> Ref. 33. <sup>f</sup> Ref. 34. <sup>g</sup> Ref. 35. <sup>h</sup> Ref. 36. <sup>i</sup> Ref. 37. <sup>j</sup> Ref. 38. <sup>k</sup> Ref. 39. <sup>l</sup> Ref. 40. <sup>m</sup> Ref. 41. <sup>n</sup> Ref. 42. <sup>o</sup> Ref. 43. <sup>p</sup> Ref. 44. <sup>q</sup> Ref. 45. <sup>r</sup> Ref. 46. <sup>s</sup> Ref. 47. <sup>t</sup> Ref. 48. <sup>u</sup> Ref. 49. <sup>v</sup> Ref. 50. <sup>w</sup> Ref. 51. <sup>x</sup> Ref. 52.

If the elementary reaction between species V and ClO<sup>-</sup> were considered,  $k_1$  would be  $k_1$  (Scheme 3) and  $K_1$  would correspond to the ionisation constant for HOCl ( $K_{HOCl}$ ). On the other hand, accepting the process would involve species VIII and HOCl,  $k_1$  could be  $k_3$ ,  $k_5$  or  $k_4$  and  $K_1$  would be  $K_{Am}$ , i.e., the ionisation constant for the terminal amino group of species VIII.

Although the processes depicted in Scheme 3 are kinetically indistinguishable, it is hard to think of a bond-breaking/bond-making mechanistic sequence for a direct transfer of chlorine from ClO<sup>-</sup> to the positively charged amino group. Therefore, we propose that the elementary process in the halogenation of dipeptides by aqueous halogen under the experimental conditions must be the bimolecular reaction between the anionic form of the dipeptide (species VIII) and hypochlorous acid.

Thus, the rate equation becomes eqn. (3).

$$r = k_2 K_{Am} \left( \frac{[H^+]}{(K_{Am} + [H^+]) (K_{HOCl} + [H^+])} \right) [HOCl][VIII] \quad (3)$$

It follows that the maximum rate constant observed in Fig. 1 must occur at the arithmetic mean of the  $pK_a$  values of both reactants:  $pH_{max} = (pK_{Am} + pK_{HOCl})/2$ . This prediction is in good agreement with the observed behaviour.

Using eqn. (3) it is possible to estimate the bimolecular rate constant  $k_2$ , as well as the values of the ionisation constants  $K_{Am}$  and  $K_{HOCl}$ . These are shown in Table 1. The experimentally obtained  $pK_{Am}$  values agree with those optimised from the equation. There is also good agreement with the values available in the literature for this kind of compound (Table 1).

The observed rate constant obtained for glycineamide is of the same order of magnitude as those for dipeptides. Assuming a parallel between basicity and nucleophilicity scales, and an absence of any kind of  $\alpha$ -effect for dipeptides, if the chlorination were to take place on the nitrogen of the amide, then the expected rate constant would be much smaller, since the  $pK_a$  of an amide is much lower than that of the amino group [ $pK_{a-2}$  (glycinamide) = ca. -1.78].<sup>53</sup> On the other hand, dipeptides with substituents R<sup>1</sup> on the peptidic nitrogen (Gly-Sar and Gly-Pro in this study) show rate constants even higher than those obtained for dipeptides with R<sup>2</sup> = H.

It has been previously established that chlorination on the peptidic unsubstituted nitrogen is negligible provided the ratio [chlorinating agent]/[dipeptide] < 1.<sup>23</sup> The authors of this study estimated that the chlorination of *N*-acetyl-Gly is at least five orders of magnitude slower than the chlorination of the parent Gly. A detailed analysis of the reaction products by GC/MS showed no evidence of chlorination on the peptidic nitrogen of *N*-acetyl-L-Ala.<sup>24</sup> A similar result was obtained when HOCl was generated by means of the enzymatic system myeloperoxidase/

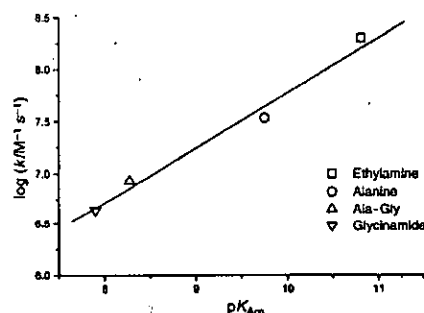


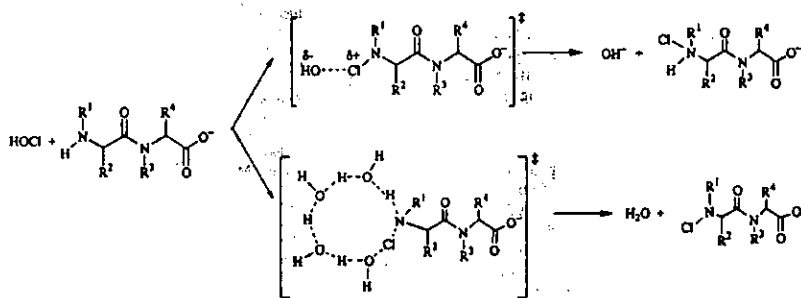
Fig. 2 Dependence of the bimolecular rate constant of chlorination ( $k_2$ ) with the  $pK_{Am}$  of the amino nitrogen ( $r = 0.99$ ).

$H_2O_2/Cl^-$ .<sup>25</sup> All this evidence allows us to conclude that halogenation on the peptidic nitrogen is negligible.

Another mechanistic alternative (see Scheme 3) would be halogenation taking place first on the oxygen atom of the carboxylate, with a subsequent fast transfer of the halogen to the nitrogen atom of the amino group. However, such an alternative pathway can be discounted, since the observed rate constants are of the same order of magnitude for dipeptides and their corresponding esters (Table 1). In addition, the behaviour observed in the chlorination of primary and secondary aliphatic amines is entirely analogous to that observed for dipeptides.<sup>18</sup>

Consequently, the chlorination of dipeptides must take place via transfer of the chlorine from HOCl to the nitrogen of the unprotonated terminal amino residue of the dipeptide ( $k_3$  in Scheme 3), i.e.  $k_1 = k_3$  in eqn. (3) and the process can be classified as an aliphatic electrophilic substitution.

Such a conclusion is supported by the fact that  $\log(k)$  is linearly dependent ( $\rho = 0.54 \pm 0.05$ ) on the  $pK_a$  of the amino nitrogen ( $pK_{Am}$ ), and therefore on its nucleophilicity (*vide supra*). As shown in Fig. 2, the more basic the amino group, the higher the rate of chlorination. Fig. 2 is formally similar to a Brønsted plot.<sup>26</sup> Accepting that the process is an aliphatic electrophilic substitution, where a positively charged chlorine atom is being transferred, the classical interpretation of a Brønsted plot for proton transfer could be extended to the present case. Under this assumption the chlorine atom is approximately half transferred at the transition state (TS) and there is a decrease in electron density on the nitrogen and an increase on the oxygen.



Scheme 4

The obtained bimolecular rate constants  $k_2$  (Table 1) show high values, but are still well below the diffusion control limit.<sup>24</sup> However, in the case of primary and secondary aliphatic amines and even amino acids, it has been postulated that the process may be diffusion controlled. This statement was based on the values found for the enthalpy of activation, less than 15 kJ mol<sup>-1</sup>.  $\Delta H^\ddagger = 0$  kJ mol<sup>-1</sup> has been estimated for the chlorination of Ala-Gly and other dipeptides.<sup>11</sup> The decrease in the bimolecular rate constant as the basicity/nucleophilicity of the compound decreases rules out this hypothesis.

Highly negative values have been found for the entropy of activation in the chlorination of Ala-Gly ( $-141 \pm 7$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>), as well as other dipeptides<sup>11</sup> and other nitrogenated compounds such as ammonia ( $-97 \pm 5$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) and primary and secondary aliphatic amines.<sup>13</sup> Such activation entropy values imply that the TS is more ordered than the reactants. Considering the nature of the reaction, this fact should be mostly associated with solvation effects and/or participation of the solvent in the TS.

Looking in detail at the proposed rate determining step, at least the two possibilities depicted in Scheme 4 should be considered. Both pathways could explain the observed  $\Delta S^\ddagger$  values. Negative  $\Delta S^\ddagger$  values are expected to be due either to formation of a cyclic structure or generation of a charged species.

The low  $\Delta H^\ddagger$  values support the formation of a cyclic structure at the TS, where the favourable interactions within the cycle lower the energy requirements of the reaction.

The observed activation parameters agree with the process in the Scheme 4 where, in addition to the transfer of the chlorine from HOCl to the nitrogen of the unprotonated terminal amino residue of the dipeptide, there is a direct participation of water molecules at the TS. The formation of a cyclic structure in the TS allows a rather synchronous transfer of Cl and H atoms, avoiding the formation of charged species and reducing charge development on the reaction centres at the TS.

Theoretical studies on ammonia chlorination by HOCl point to the participation of at least three water molecules at the TS.<sup>37</sup>

As shown in Table 1 the rate constants for chlorination of Gly-Sar and Gly-Pro are higher than expected. This difference cannot be attributed to changes in their basicity/nucleophilicity. A plausible explanation for this observation is the greater availability of the terminal amino group for reaction, *i.e.* peptides unsubstituted in the peptide bond may show a hydrogen-bond interaction between the terminal amino group and the hydrogen of the peptide bond, which, in the case of Gly-Sar or Gly-Pro, results in the reaction becoming faster.

## Conclusions

The oxidation of peptides by aqueous halogens takes place through a second-order process in which the halogen is transferred from the oxygen of HOX to the terminal amino residue of the peptide with direct participation of water molecules at

the TS. Despite the high rate constants found for the elementary process, this is controlled by its activation energy, and not by the diffusion of the reagents. The rate of the process is controlled by the basicity/nucleophilicity of the terminal amino group of the dipeptide. The available data agree with an aliphatic electrophilic substitution mechanism.

## Experimental

### Reagents

All peptides were purchased from Sigma, and used as received, without further purification. All other reagents used were Merck *pro analysi* products.

Aqueous chlorine solutions, prepared as described elsewhere,<sup>38</sup> were used as the chlorinating agent, their concentration being spectrophotometrically determined.<sup>39</sup>

The pH was adjusted using different buffer solutions (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and NaOH. The ionic strength was kept to 0.50 M using NaCl or NaClO<sub>4</sub>. Twice-distilled water was used in all cases to make up all solutions.

### Kinetic studies

The reactions were monitored spectrophotometrically by measuring either the increase of UV absorbance at  $\lambda = 250$  nm, where the *N*-chloro-dipeptides show a maximum absorption,<sup>11</sup> or the decrease of UV absorbance at 292 nm, the absorption maximum of ClO<sup>-</sup>.

In the range  $6 < \text{pH} < 12$ , the rate of the chlorination process became so fast that the use of Hi-Tech stopped-flow spectrophotometers became necessary. In a typical stopped-flow kinetic run the reaction was followed at 250 nm by mixing equal amounts of both reactants ( $[\text{HOCl} + \text{ClO}^-] = [\text{Dipeptide}] = 1.2 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>) properly adjusted to the working pH. At each pH the rate constant is an average of 5 to 10 kinetics runs.

Outside of that pH range it was possible to work under pseudo-first-order conditions, with the concentration of dipeptide at least 50-fold that of the chlorinating agent, and to use a conventional UV spectrophotometer. This time each rate constant has been measured twice.

pH values lower than *ca.* 4.5 were avoided in order to eliminate possible interference of direct chlorination by Cl<sub>2</sub> (aq). Kinetic runs were not carried out at pH > 13 to avoid simultaneous chlorination of the *N*-chloro-dipeptides' decomposition products.<sup>40</sup>

Most kinetic runs were followed at 25.0 °C. The reagents and cell holders were water-flow thermostated to within  $\pm 0.1$  °C. Kinetics between 15.0 and 40.0 °C were carried out to study the chlorination of ammonia ( $\Delta H^\ddagger = 4 \pm 1$  kJ mol<sup>-1</sup> and  $\Delta S^\ddagger = -97 \pm 5$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) and Ala-Gly.

First and second order rate equations were adequately fitted to the kinetic data using the Marquardt non-linear optimisation algorithm.<sup>41</sup> The same algorithm was used in fitting rate eqn. (3)

to ( $k_{obs}$ , pH) data. For each dipeptide between 10 and 19 pairs of values ( $k_{obs}$ , pH) were used to estimate the bimolecular rate constants ( $k_2$ ) and the optimised  $pK_a$  values reported in the Table 1. In this way, satisfactory standard deviations from the experimental data were achieved, as shown in Fig. 1.

**pH and  $pK_a$  determinations**

pH measurements were carried out using a conventional, properly calibrated, combined-glass electrode. Routine potentiometric techniques were used to determine the  $pK_a$  values of HOCI ( $7.16 \pm 0.03$  at  $I=0.5$  M and 298.15 K) and the dipeptides under the same conditions of ionic strength, type of electrolyte and temperature used in this work (Table 1). A combined-glass electrode was used to directly read the pH during the titration of the dipeptides in aqueous hydrochloric acid against standard aqueous sodium hydroxide.<sup>42,43</sup> The program MINQUAD was used to estimate the corresponding  $pK_a$  values.<sup>44</sup>

**Reaction products**

The product of chlorination of Pro-Gly was identified by MS as (*N*-Cl)-Pro-Gly. For this purpose, a Fisons Instruments' VG cuatro mass spectrometer was used (70 eV, EIMS):  $m/z$  207/209 (M<sup>+</sup> 13/4%), 70.1 (100) [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>N]<sup>+</sup>; 147 (8) [M - CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, 162 (8) [M - CO<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, 190 (5) [M - OH]<sup>+</sup>, 105 (33) [C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NCI]<sup>+</sup>.

*N*-Chloro-dipeptides are not stable for long, and undergo base-promoted decomposition. The decomposition products of *N*-chloro-dipeptides were found to be the corresponding 2-[*N*-alkyl-*N*-(2-imino-2-alkylethanoil)amino]-2,2-dialkylethanoic acid, ammonia or primary amines and chloride anion.<sup>19,25,26,45</sup>

**Acknowledgements**

The authors thank the autonomous government of the Xunta de Galicia (Spain) for financial support (project XUGA PGID99PX110302B). M. V. G. also thanks the Xunta de Galicia for a PhD fellowship. Thanks are also given to Dr Jayanta Kumar Ray for his critical reading of the manuscript and to the referees whose comments enhanced the quality of this paper.

**References**

- 1 S. T. Test and S. J. Weiss, *Adv. Free Radical Biol. Med.*, 1986, 2, 91.
- 2 K. Agner, in 'Structure and function of oxidation-reduction enzymes', ed. A. Akeson and A. Ehrenberg, Pergamon Press, London, 1972.
- 3 M. B. Lampert and S. J. Weiss, *Blood*, 1983, 62, 645.
- 4 A. J. Sbarra, R. J. Selvaraj, B. B. Paul, P. K. F. Poskitt, J. M. Zgliczyński, G. W. Mitchell, F. Louis and M. A. Asbell, in 'Granulocyte biochemistry and a hydrogen peroxide-dependent microbicidal system', ed. T. Greenawald and G. A. Jamieson, Alan R. Lisa, Inc., New York, 1977.
- 5 W. A. Prütz, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, 332, 110.
- 6 H. Fliss, *Mol. Cell. Biochem.*, 1988, 84, 177.
- 7 S. J. Weiss, *New J. Med.*, 1989, 320, 365.
- 8 I. U. Schraufstätter, K. Browne, A. Harris, P. A. Hyslop, J. H. Jackson, O. Quehenberger and C. G. Cochrane, *J. Clin. Invest.*, 1990, 85, 554.
- 9 X. L. Armesto, M. Canle L., M. V. García and J. A. Santaballa, *Chem. Soc. Rev.*, 1998, 27, 453.
- 10 H. Hayatsu, S. K. Pan and T. Ukita, *Chem. Pharm. Bull.*, 1971, 19, 2189.
- 11 C. Bernofsky, B. M. R. Bandara, O. Hinojosa and S. L. Strauss, *Free Radical Res. Commun.*, 1990, 9, 303.
- 12 W. H. Dennis, V. P. Olivieri and C. W. Krusé, *Water Res.*, 1979, 13, 357.
- 13 X. L. Armesto, M. Canle L., M. V. García, M. Losada and J. A. Santaballa, *Gazz. Chim. Ital.*, 1994, 124, 519.
- 14 J. R. Tuschall and P. L. Brezonik, *Limnol. Oceanogr.*, 1980, 25, 495.
- 15 K. Gocke, *Arch. Hydrobiol.*, 1970, 67, 285.
- 16 A. Newman, *Environ. Sci. Technol.*, 1993, 27, 2295.

- 17 D. Henschler, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, 33, 1920.
- 18 L. Abia, X. L. Armesto, M. Canle L., M. V. García and J. A. Santaballa, *Tetrahedron*, 1998, 54, 521.
- 19 X. L. Armesto, M. Canle L. and J. A. Santaballa, *Tetrahedron*, 1993, 49, 275.
- 20 X. L. Armesto, M. Canle L. and J. A. Santaballa, in 'Electronic Conference on Trends in Organic Chemistry (ECTOC-1)', ISBN: 0 850404 899 5', ed. H. S. Rezza, J. M. Goodman and C. Leach, 1996.
- 21 X. L. Armesto, M. Canle L., M. V. García and J. A. Santaballa, *Can. J. Chem.*, 1999, 77, 997.
- 22 X. L. Armesto, M. Canle L., M. I. Fernández, M. V. García and J. A. Santaballa, *Tetrahedron*, 2000, 56, 1103.
- 23 R. C. Ayotte and T. Gray, Jr., in 'Water Chlorination, Environmental Impact and Health Effects', Michigan, USA: 1973.
- 24 IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, 1984, 56, 595.
- 25 IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, 1984, 138, 9.
- 26 J. C. Morris, *J. Phys. Chem.*, 1966, 70, 3798.
- 27 D. D. Perrin, 'Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution', Butterworths, London, 1965.
- 28 A. E. Martell and R. M. Smith, 'Amino Acids', Plenum Press, New York, 1989.
- 29 M. Eigen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1964, 3, 1.
- 30 S. P. Datta and B. R. Rabin, *Trans. Faraday Soc.*, 1956, 52, 1117.
- 31 O. Yamanchi, H. Miyata and A. Nakahara, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1971, 44, 2716.
- 32 A. Neuberger, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 1937, 158, 68.
- 33 R. B. Marín, M. Chanberlin and J. T. Edsall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 495.
- 34 E. J. King, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1975, 71, 88.
- 35 E. R. B. Smith and P. K. Smith, *J. Biol. Chem.*, 1937, 122, 109.
- 36 N. C. Li, P. Tang and R. Mathur, *J. Phys. Chem.*, 1961, 65, 1074.
- 37 J. L. Biester and P. M. Ruoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, 81, 6517.
- 38 C. L. Leese and G. M. Timmis, *J. Chem. Soc.*, 1958, 4107.
- 39 J. P. Greenstein, *J. Biol. Chem.*, 1933, 101, 603.
- 40 D. J. Perkins, *Biochem. J.*, 1954, 57, 702.
- 41 A. P. Brunetti, E. J. Burke, M. C. Lim and G. H. Nancollas, *J. Solution Chem.*, 1972, 1, 153.
- 42 P. A. Levene, H. S. Simms and M. H. Pfaltz, *J. Biol. Chem.*, 1924, 61, 445.
- 43 N. V. Petrov, A. P. Borisova, I. A. Savich and V. I. Spitsyn, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1970, 192(3), 574.
- 44 E. Ellenbogen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5198.
- 45 A. P. Borisova, Y. V. Granorskii and I. A. Savich, *Vestn. Mosk. Univ., Ser. 2: Khim.*, 1967, 22, 41.
- 46 E. J. Cohn, *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exp. Pharmacol.*, 1931, 33, 781.
- 47 H. Sigel, *Inorg. Chem.*, 1975, 14, 1535.
- 48 G. Brookes and L. D. Pettit, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1975, 2106.
- 49 J. Melville and G. M. Richardson, *Biochem. J.*, 1935, 29, 187.
- 50 P. Feige, D. Mocker, R. Dreyer and R. Munze, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1989, 35, 3269.
- 51 W. L. Koltun, M. Fried and F. R. N. Gurd, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 233.
- 52 R. P. Pasternack, L. Gipp and H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 803.
- 53 A. R. Goldfarb, A. Mele and N. Gutstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 6194.
- 54 W. E. Pereira, Y. Hoyano, R. E. Summons, V. A. Bacon and A. M. Duffiel, *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 313, 170.
- 55 T. Stelmazyńska and J. M. Zgliczyński, *Eur. J. Biochem.*, 1978, 92, 301.
- 56 J. N. Bronsted and J. K. Z. Pedersen, *Phys. Chem.*, 1923, 108, 186.
- 57 J. Andrés, M. Canle L., M. V. García, L. F. Rodríguez and J. A. Santaballa, *Chem. Phys. Lett.*, submitted for publication.
- 58 X. L. Armesto, M. Canle L., M. Losada and J. A. Santaballa, *Int. J. Chem. Kinet.*, 1993, 25, 331.
- 59 A. Hussain, P. Trudell and A. J. Repta, *J. Pharm. Sci.*, 1970, 59, 1168.
- 60 X. L. Armesto, M. Canle L., M. I. Fernández, M. V. García, S. Rodríguez and J. A. Santaballa, *J. Org. Chem.*, in the press.
- 61 D. W. Marquardt, *J. Soc. Ind. Appl. Math.*, 1963, 11, 431.
- 62 A. Albert and E. P. Serjeant, 'Ionization Constants of Acids & Bases A Laboratory Manual', John Wiley & Sons, Inc., New York, 1962.
- 63 E. J. King, 'Acid-Base Equilibria', ed. E. A. Guggenheim, I. E. Mayer and F. C. Tompkins, Pergamon Press, New York, 1965.
- 64 A. Sabbatini, A. Vacca and P. Gans, *Talanta*, 1974, 21, 53.
- 65 X. L. Armesto, M. Canle L., M. V. García and J. A. Santaballa, *Tetrahedron*, 1997, 53, 12615.

## Intracellular Oxidation of Dipeptides. Base-Promoted Elimination from *N*-Halodipeptides to 2-[*N*-Alkyl-*N*-(2-*N*-alkylimino-2-alkylethanoyl)amino]-2,2-dialkylethanoic Acids

X. L. Armesto, M. Canle L.,\* M. I. Fernández, M. V. García,\* S. Rodríguez, and J. A. Santaballa\*

Departamento de Química Física e Enxeñaría Química I, Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña, Rúa Alejandro de la Sota 1, E-15008 A Coruña, Galicia, Spain

arturo@udc.es

Received September 8, 2000 (Revised Manuscript Received May 31, 2001)

One of the possible ways of intracellular oxidation of peptides is *via* the formation of the corresponding (*N*-*X*)-dipeptides, that then undergo base-promoted elimination to yield intermediate 2-[*N*-alkyl-*N*-(2-*N*-alkylimino-2-alkylethanoyl)amino]-2,2-dialkylethanoic acids, which subsequently hydrolyze. Such an elimination process is general-base catalyzed, with Brønsted  $\beta$  values ranging from 0.26 to 0.31, which suggests an essentially constant degree of proton transfer at the TS. For (*N*-*X*)-dipeptides, the ratio  $k_{N-B}/k_{N-Cl}$  ranges from 2.5 to 15, suggesting a structural dependence of the degree of *N*-*X* bond breaking at the TS. The values of  $\beta$  and  $k_{N-B}/k_{N-Cl}$  support a concerted asynchronous  $A_{AB}D_{HD}$  mechanism, its TS changing from reactant-like to slightly nitrenium-like depending on the structure of the starting dipeptide. As a consequence of the antiperiplanarity requirements of the reaction, the steric interaction between the leaving group and the substituent on the C bearing the H to be eliminated controls the reaction rate. Such steric interaction is rather important, as indicated by the steric crossed-interaction coefficient ( $\rho_{steric} = 0.33$ ). Semiempirical calculations show that bulky substituents in the vicinity of the reaction center imply additional energy requirements for the system to achieve the antiperiplanarity needed at the TS for the reaction to proceed. From the observations reported it follows that (*N*-*X*)-dipeptides lose their oxidizing power more readily than analogous (*N*-*X*)-amino acids or (*N*-*X*)-amines, opening a possible pathway to lessen intracellular halogen-based oxidative stress.

### Introduction

Hypohalous acids (HOX), and particularly HOCl, are common intracellular oxidants produced in polymorphonuclear neutrophils<sup>1,2</sup> by the action of the enzymatic system myeloperoxidase/ $H_2O_2/X^-$  ( $X = Cl^-, Br^-, I^-$ ).<sup>3,4</sup> Such HOXs are cytotoxic against a variety of microorganisms, including bacteria, fungi, and parasites, as well as against mammalian target cells such as tumor cells, leukocytes, platelets, and spermatozoa.<sup>5</sup> The relevance of such cytotoxic events is underlined by the fact that 0.18  $\mu$ mol of HOCl can be produced under optimal conditions by the amount of neutrophils contained in just 0.25 mL of blood.<sup>6</sup> In addition, HOXs react with N compounds, yielding (*N*-*X*) derivatives,<sup>7</sup> being able to oxidize *in vivo* a variety of compounds, such as nucleic

acids,<sup>8</sup> purine and pyrimidine bases,<sup>9</sup> nucleotides,<sup>10</sup> cytochromes,<sup>11</sup> peptides,<sup>12,13</sup> amino acids,<sup>14,15</sup> etc. The incubation of neutrophils with endogenous nitrogen compounds led to the generation of chloramines, dichloramines, and other (*N*-Cl) derivatives.<sup>16</sup> Chloramines are lipophilic and, although less toxic than HOCl, able to penetrate the hydrophobic cell membrane, with the subsequent oxidation of the cell membrane and various other intracellular components.<sup>16–19</sup> Proteins have been shown to undergo structural modifications upon HOX-induced oxidation.<sup>20</sup> Considering all these facts, it seems

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: 34 981 167000. Fax: 34 981 167065. E-mail: (M.V.G.) vicky@udc.es, (M.C.L.) mcanle@udc.es.

(1) The neutrophils are circulating blood cells of humans and other mammals whose main function is defense against pathogens by phagocytosis. The neutrophils can destroy pathogens in different ways, including both oxygen-dependent and oxygen-independent reactions.

(2) Test, S. T.; Weiss, S. J. *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 1986, 2, 91.

(3) Foote, C. S.; Coyne, T. E.; Lehrer, R. I. *Nature* 1983, 301, 715.

(4) Agner, K. In *Structure and function of oxidation-reduction enzymes*; Akeson, A., Ehrenberg, A., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1972; pp 329–335.

(5) Flias, H. *Mol. Cell. Biochem.* 1988, 84, 177.

(6) Lampert, M. B.; Weiss, S. J. *Blood* 1983, 62, 645.

(7) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Chem. Soc. Rev.* 1998, 27, 463.

(8) Prütz, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996, 332, 110.

(9) Young, M. S. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 1755.

(10) Bernofsky, C.; Bandara, B. M. R.; Hinojosa, O.; Strauss, S. L. *Free Rad. Res. Commun.* 1990, 9, 303.

(11) Albrich, J. M.; McCarthy, C. A.; Hurst, J. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981, 78, 210.

(12) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Gazz. Chim. Ital.* 1994, 124, 519.

(13) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 608.

(14) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1993, 49, 275.

(15) Armesto, X. L.; Canle, M.; Fernández, M. I.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 2000, 56, 1103.

(16) Grisham, M. B.; Jefferson, M. M.; Melton, D. F.; Thomas, E. L. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 10404.

(17) Thomas, E. L.; Jefferson, M. M.; Grisham, M. B. *Biochemistry* 1982, 21, 6295.

(18) Weiss, S. J.; Lampert, M. B.; Test, S. T. *Science* 1983, 222, 625.

(19) Grisham, M. B.; Jefferson, M. M.; Thomas, E. L. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 6766.

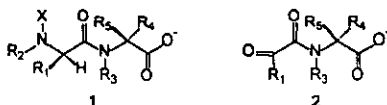
(20) Naskaleski, J. W. *Ann. Biol. Clin.* 1994, 52, 451.

## Intracellular Oxidation of Dipeptides

most relevant to clarify the mechanism of HOX-induced oxidation of proteins and, in a first approach, of peptides.

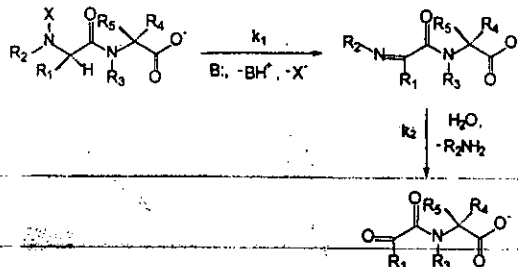
From an apparently different but still connected point of view,<sup>21</sup> the presence of organic nitrogenated compounds in natural waters, and among them peptides,<sup>21</sup> makes it necessary to pay attention to their aqueous chemistry. In this respect, the most widely used water-disinfection method is chlorination.<sup>22</sup> During this process, (*N*-Cl) compounds are formed<sup>13,14,23</sup> in a reaction entirely similar to the one taking place *in vivo* (see above). The benefits and risks of halogen-based water disinfection are well-known.<sup>22,24</sup> Among other products, aldehydes, nitriles, haloforms and cyanogen halides have been detected upon water halogenation.<sup>25</sup> Consequently, correlations have been established between water halogenation and carcinogenicity or mutagenicity to human cells.<sup>26</sup> The chemistry of (*N*-X) compounds is radically different from that of their parent N compounds.<sup>7</sup> Among the biochemical relevant differences, it is worth noting that the change in the *pK<sub>a</sub>* of the amino group by the introduction of a halogen is ca. 8–9 units,<sup>27</sup> with a consequent change in the nucleophilicity of the amino group.

We have previously analyzed, both from the experimental<sup>7,12,14,15,23,27–33</sup> and theoretical<sup>34</sup> point of view, the mechanisms of some of the processes suffered by different N compounds. Upon contact with aqueous halogens, dipeptides undergo a very fast halogenation reaction to yield (*N*-X)-dipeptides (1)<sup>32</sup> that can then undergo decomposition to yield ammonia, halide ions, and the corresponding 2-[*N*-alkyl-*N*-(2-oxo-2-alkylethanoil)-amino]-2,2-dialkyl-ethanoic acid (2).<sup>35</sup>



In a preliminary paper<sup>32</sup> the existence of two consecutive processes was proposed for the base-promoted decomposition of (*N*-X)-Ala-Gly,<sup>36</sup> the fairly unstable intermediate [(2-iminoethanoil)amino]ethanoic acid being formed in the first, according to Scheme 1. This behavior

Scheme 1



contrasts with that of (*N*-X)-amino acids<sup>29</sup> and (*N*-X)-primary<sup>37</sup> and secondary<sup>38,39</sup> aliphatic amines, for which the reaction products agree with the mechanism in Scheme 1, but the intermediate imine is not observed ( $k_1 \ll k_2$ ).

Several studies have been carried out on the decomposition of (*N*-X)-alkylbenzylamines promoted by NaOMe and secondary aliphatic amines, using MeOH and CH<sub>3</sub>CN as solvents.<sup>40,41</sup> Contrary to the aqueous behavior, under such conditions the intermediate imines are stable and could be isolated in relatively high yields. The formation of such imines takes place in a concerted process, with an important steric effect resulting from the repulsive interaction between the *N*-alkyl group and the reacting base in the TS.<sup>41a,b</sup> The inductive effects of the  $\beta$ -carbon substituents ( $R = \text{Me, H, Ph}$ ) and the base-strength effects on the reaction rates can be satisfactorily predicted from the approximate description of the structure of the TS.<sup>42</sup>

In view of all the previous statements in this paper, we aim to establish a detailed mechanism for the base-promoted elimination taking place during the decomposition of 1 in aqueous solution, leading to intermediate 2-[*N*-alkyl-*N*-(2-*N*-alkylimino-2-alkylethanoil)amino]-2,2-dialkylethanoic acid. In addition to the already mentioned biochemical and environmental interest of such process, an understanding of this mechanism may open interesting synthetic routes.<sup>43</sup>

## Results and Discussion

**Rate Equation and Mechanism.** Experiments using Cl<sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-selective electrodes to monitor the decom-

- (21) Kotiaho, T.; Wood, J. M.; Wick, P. L.; Dejarme, L. E.; Rahsinghe, A.; Cooks, R. G. *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26, 302.  
 (22) Miller, S. *Environ. Sci. Technol.* 1993, 27, 2292.  
 (23) Abia, L.; Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1998, 54, 521.  
 (24) Henschler, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 1920.  
 (25) Amaral, O. C.; Otero, R.; Grimalt, J. O.; Albaiges, J. *Wat. Res.* 1996, 30, 1876.  
 (26) Frazén, R.; Kronberg, L. *Environ. Sci. Technol.* 1994, 28, 2222.  
 (27) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Gamper, A. M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1994, 50, 10509.  
 (28) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Org. Chem.* 1994, 59, 4659.  
 (29) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* 1996, 9, 552.  
 (30) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Can. J. Chem.* 1999, 77, 997.  
 (31) Armesto, X. L.; Canle L., M.; Carretero, P.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1997, 53, 2565.  
 (32) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Santaballa, J. A. *Tetrahedron* 1997, 53, 12615.  
 (33) Canle L., M.; Santaballa, J. A.; Steenken, S. *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 1192.  
 (34) (a) Andrés, J.; Queralt, J. J.; Safont, V. S.; Canle L., M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 3561. (b) Andrés, J.; Queralt, J. J.; Safont, V. S.; Canle, M.; Santaballa, J. A. *J. Phys. Org. Chem.* 1996, 9, 371. (c) Queralt, J. J.; Safont, V. S.; Moliner, V.; Andrés, J. *Chem. Phys. Lett.* 1996, 263, 294.  
 (35) Heinecke, J. W.; Li, W.; Mueller, D. M.; Bohrer, A.; Turk, J. *Biochemistry* 1994, 33, 10127.

- (36) (a) IUPAC-IUB Joint Commission Biochemical Nomenclature (JCBN), *Eur. J. Biochem.* 1984, 138, 9. (b) IUPAC-IUB Joint Commission Biochemical Nomenclature (JCBN), *Pure Appl. Chem.* 1984, 56, 595. (c) The IUPAC three-letter system has been used to design  $\alpha$ -amino acids. Dipeptides are named following the names of the corresponding parent amino acids (Aa) as Aa<sub>1</sub>Aa<sub>2</sub>, for example, Gly-Ala is H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>(CO)N(H)CH(CH<sub>3</sub>)COOH.  
 (37) Antelo, J. M.; Arce, F.; Franco, J.; Rodríguez, P.; Varela, A. *Tetrahedron* 1989, 65, 3905–3966.  
 (38) Abia, L. Ph.D. Thesis, Universidade de A Coruña, 1993.  
 (39) Armesto, X. L.; Canle L., M.; García, M. V.; Fernández, I.; Rodríguez, S.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Chimia* 1997, 51, 498.  
 (40) (a) Bartsch, R. A.; Cho, B. R. *J. Org. Chem.* 1979, 44, 145. (b) Bartsch, R. A.; Cho, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 3587. (c) Cho, B. R.; Yoon, J. C.; Bartsch, R. A. *J. Org. Chem.* 1985, 50, 4943. (d) Cho, B. R.; Namgong, S. R.; Bartsch, R. A. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 1320.  
 (41) (a) Cho, B. R.; Maeng, J. H.; Yoon, J. C.; Kim, T. R. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 4752. (b) Cho, B. R.; Suh, Y. W. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 2855. (c) Cho, B. R.; Pyun, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 3920.  
 (42) (a) Hoffman, R. V.; Bartsch, R. A.; Cho, B. R. *Acc. Chem. Res.* 1989, 22, 211. (b) Albery, W. J. *Prog. React. Kinet.* 1967, 4, 353. (c) Jencks, W. P. *Chem. Rev.* 1970, 35, 705.  
 (43) Dai, L.-X.; Lin, Y.-R.; Hou, X.-L.; Zhou, Y.-G. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 1033.



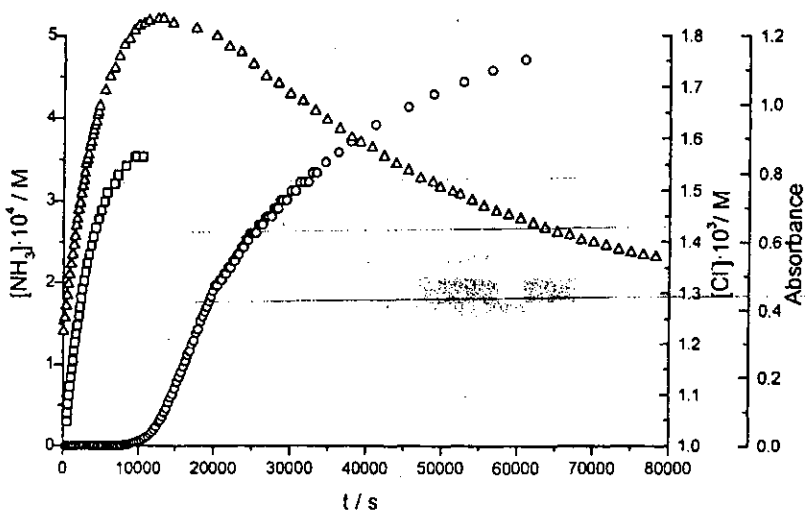


Figure 1. Reaction profiles for the decomposition of *N*-Cl-dipeptides as followed using (O) ammonia electrode, (□) chloride electrode, and (Δ) spectrophotometrical detection.  $T = 298.0 \text{ K}$ ,  $[(N\text{-Cl})\text{-Ala-Gly}] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $[\text{NaOH}] = 2 \text{ mM}$ .

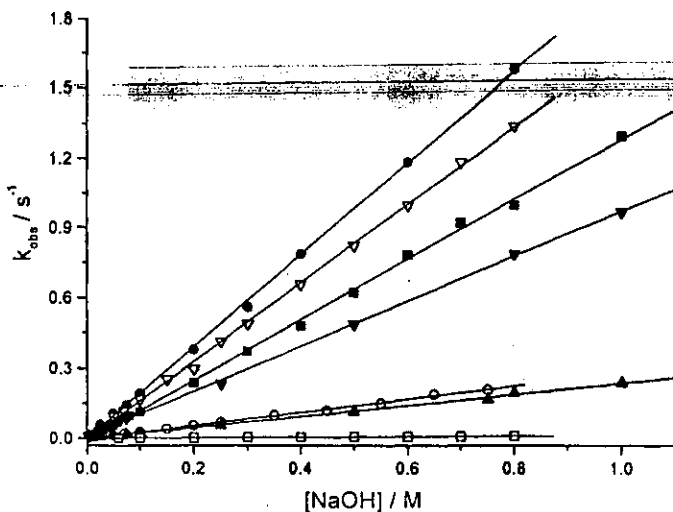


Figure 2. Effect of  $[\text{NaOH}]$  for different 1: (●)  $(N\text{-Cl})\text{-Gly-Sar}$ , (▼)  $(N\text{-Cl})\text{-Gly-Pro}$ , (■)  $(N\text{-Cl})\text{-Gly-Gly}$ , (▽)  $(N\text{-Cl})\text{-Gly-Ala}$ , (○)  $(N\text{-Cl})\text{-Pro-Gly}$ , (▲)  $(N\text{-Cl})\text{-Ala-Gly}$ , (□)  $(N\text{-Cl})\text{-Val-Gly}$ .  $T = 298.0 \text{ K}$ ,  $[1] = 0.5 \text{ mM}$ ,  $I(\text{NaClO}_4) = 1.0 \text{ M}$ .

position of *N*-Cl-dipeptides have confirmed the occurrence of two well-separated consecutive processes. Figure 1 shows how the absorbance reaches a maximum and then decreases, suggesting the formation and subsequent decomposition of an intermediate. The more basic the medium, the higher the maximum absorbance. (*N*-Br)-dipeptides reach the absorbance maximum faster than (*N*-Cl)-dipeptides. An exception to this behavior is (*N*-X)-Pro-Gly, for which the absorbance continuously increases with time, leveling off at a certain value independent of the basicity of the medium.

In what follows, unless stated, we will only refer to the first of the above-mentioned consecutive steps, i.e., the formation of the intermediate species. This process is first order in the concentration of (*N*-X)-dipeptide:

$$\text{rate} = k_{\text{obs}} \cdot [1] \quad (1)$$

where  $k_{\text{obs}}$  is the pseudo-first-order rate constant. No influence of the concentration of dipeptide or ionic strength was observed on  $k_{\text{obs}}$ . Under the conditions of acidity used in this work, dipeptides are mainly present as zwitterions, but 1 are present as the corresponding carboxylate anions, due to the acidifying effect of the halogen on the amino group.<sup>27</sup>

A linear dependence of  $k_{\text{obs}}$  with the concentration of base ( $[B]$ ) has been observed in all cases, as shown in Figure 2. Thus, eq 1 can be rewritten as:

$$\text{rate} = (k_{\text{H}_2\text{O}} + \sum_{i=1}^l k_{\text{B}} \cdot [B]_i) \cdot [1] \quad (2)$$



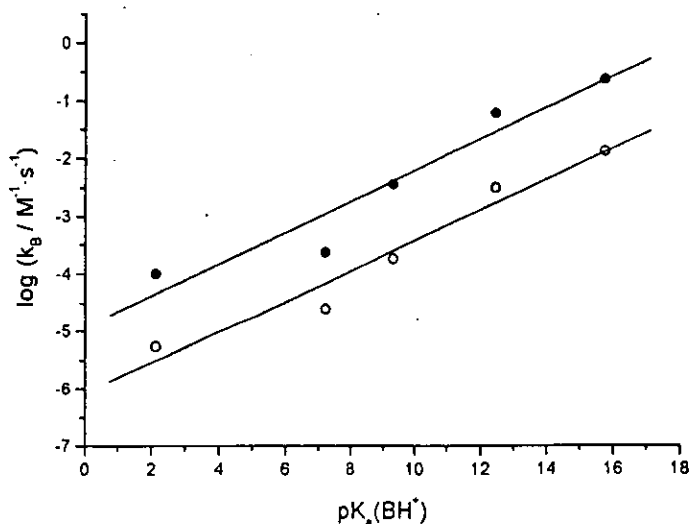


Figure 3. Brønsted plots for (N-Cl)-Val-Gly (●) and (N-Cl)-Ala-Gly (○).

Table 2. Brønsted  $\beta$  and  $\beta_{lg}$  Parameters and Degree of Imbalance for the Base-Promoted Decomposition of **1** in Aqueous Solution ( $T = 298.0\text{ K}$ ,  $I = 1.0\text{ M}$ ).

1	$\beta^a$	$k_{N-Br}/k_{N-Cl}^b$	$k_{N-Br}/k_{N-Cl}^c$	IB = 100( $\beta_{lg} - \beta$ ) <sup>d,e</sup>
(N-X)-Gly-Gly	0.31 ± 0.07	2.5	3.2	-11 (-6)
(N-X)-Gly-Ala	0.26 ± 0.02	2.8		-4
(N-X)-Gly-Val	0.3 ± 0.1	2.6		-9
(N-X)-Gly-Ile	0.31 ± 0.03	2.5		3
(N-X)-Gly-Leu	0.28 ± 0.01	2.9		-5
(N-X)-Gly-Sar	0.28 ± 0.01	2.5	4.6	-6 (-5)
(N-X)-Gly-Pro	0.3 ± 0.1	2.8		-5
(N-X)-Ala-Gly	0.27 ± 0.05	4.6	4.2	6 (4)
(N-X)-Ala-Ala	0.28 ± 0.05	5.2		9
(N-X)-Ala-Val	0.31 ± 0.06	6.0		8
(N-X)-Ala-Pro	0.27 ± 0.07	15.0		32
(N-X)-Val-Gly	0.26 ± 0.03	4.6		7
(N-X)-Val-Val	0.29 ± 0.12	5.8	7.6	9 (15)
(N-X)-Leu-Ala	0.28 ± 0.01	10.0		22
(N-X)-Leu-Leu	0.29 ± 0.05	10.5		22
(N-X)-Pro-Gly	0.29 ± 0.02	4.8	3.8	5 (0)

<sup>a</sup> These  $\beta$  values are for (N-Cl)-dipeptides. <sup>b</sup> Base = OH<sup>-</sup>. <sup>c</sup> Base = TFE<sup>-</sup>. <sup>d</sup> The significance of  $\beta_{lg}$  is limited as indicated in the text. <sup>e</sup> The degree of imbalance estimated when B = TFE<sup>-</sup> is shown in parentheses.

the same (*vide supra*), the changes observed in the rate constants (Table 1) must be attributed to different degrees of the N-X bond breaking at the TS. Data in Table 1 imply the bulkier substituent on C<sub>α</sub>, the greater the extent of N-X bond cleavage. The previous statement is reinforced by examination of the ratios  $k_{N-Br}/k_{N-Cl}$  (Table 2), the increase of  $k_{N-Br}/k_{N-Cl}$  as the alkyl substituent on C<sub>α</sub> gets bulkier parallels the extent of the N-X bond cleavage.<sup>50</sup> A similar conclusion could be reached in terms of the  $\beta_{lg}$  parameter,<sup>51</sup> which is frequently used in the quantitative description of the degree of nucleofuge bond breaking in elimination reactions. Although we shall use it in what follows, strictly speaking  $\beta_{lg}$  should be used for closely related leaving groups. Due to the nature of the reaction under study, a fairly good estimation of  $\beta_{lg}$  would be obtained by comparing the

corresponding data for N-Cl and N-Br-dipeptides, although its limited significance should be always kept in mind.

The values obtained for  $\beta$  and  $k_{N-Br}/k_{N-Cl}$  are in good agreement with a concerted asynchronous A<sub>cb</sub>D<sub>H</sub>D<sub>N</sub><sup>±</sup> mechanism.

**Steric Effects.** Comparing the rates of elimination obtained for analogous (N-X)-amines [ $k_{OH^-}((N-Cl)-EtNH) = 0.15 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]<sup>37</sup> and (N-X)- $\alpha$ -amino acids [ $k_{OH^-}((N-Cl)-Gly) = 44 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]<sup>29</sup> with those obtained in this work for **1** [ $k_{OH^-}((N-Cl)-Gly-Gly) = 1.29 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ], it seems clear that the electron-withdrawing effect of the peptide group is responsible for the observed rate enhancement. From these values it also follows that **3** is more stable from compounds such as **1**,<sup>52</sup> the activation energy for the process leading to **3** being lowered compared with reactions of (N-X)-amines and (N-X)- $\alpha$ -amino acids.<sup>53</sup> As a result,  $k_1$  in Scheme 1 increases, while  $k_2$  decreases, allowing detection of **3**.

As shown in Table 1,  $k_B$  decreases when alkyl substituents are present on the C<sub>α</sub> to the amino group. If the electron-donating inductive effect of the alkyl groups is taken into account, this would not be expected for a process in which partial negative charge is developed at a position next to the reaction site in the TS. In fact, a Taft plot using  $\sigma^+$  shows no evidence of inductive effects.<sup>54</sup>

The different  $\beta_{lg}$  values obtained suggest the existence of a steric effect. This can be analyzed by using the expression

(52) The mechanism of decomposition of the intermediate **3** (the second process in Scheme 1), will be analysed in a forthcoming paper. However, it is relevant at this point to say that  $k_2 (= k_{OH^-}[OH^-])$  value for (N-Cl)-Gly-Gly is  $29 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , with  $[OH^-] = 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , which is lower than the corresponding value for (N-Cl)-Gly, for which  $k_2$  is ca.  $44 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  for the same  $[OH^-]$  concentration.

(53) Although for (N-X)-amines and (N-X)- $\alpha$ -amino acids  $k_{OH^-}$  is the rate constant for the overall process, the fact **3** is not detected in such cases means that  $k_2 \gg k_1$ , so  $k_{OH^-}$  values really give kinetic information about the formation of the imine, being possible to compare them with the  $k_{OH^-}$  values obtained in this work for (N-X)-dipeptides.

(54) Hansch, C.; Leo, A. *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*; Wiley-Interscience: New York, 1979.

## Intracellular Oxidation of Dipeptides

$$\log k = \Psi v' + c \quad (3)$$

where  $v'$  is Charton's steric parameter and  $c$  is a constant.<sup>54,55</sup> The results thus obtained are summarized in Table 3.

Good linear correlations are obtained when  $v'$  is used for the substituents  $R_1$  in **1**. The fact that, in general,  $\psi < 0$  indicates that the reaction slows down as the alkyl substituent  $R_1$  in **1** gets bulkier.

Although Br is bigger than Cl,  $\psi$  is higher (less negative) for (N-Br)-dipeptides. This can be interpreted in terms of a higher degree of N-Br bond breaking at the TS, compared to the corresponding N-Cl bond. As the N-Br bond is weaker than the N-Cl bond,<sup>56</sup> the cleavage of the former starts earlier, which implies less steric hindrance at the TS.

Higher (less negative) values of  $\psi$  were found for (N-X)- $\alpha$ -amino acids (-2.59)<sup>29,57</sup> than for **1** (-3.23). The increase of  $\psi$  for **1** is a consequence of the extra contribution of the carboxy-terminal amino acid residue.

Although the carboxy-terminal residue (Aa<sub>2</sub>) should have a steric effect, no correlation is observed when  $v'$  is used for the alkyl substituents  $R_4$  and  $R_5$  in **1**, which means the steric effect of the carboxy-terminal residue (Aa<sub>2</sub>) does not depend on the nature of  $R_4$  and  $R_5$ .

No steric effect was observed due to the change of the reacting base, contrary to the results reported for the decomposition of (N-X)-alkylbenzylamines, where an appreciable steric effect was found (*vide supra*).<sup>41</sup>

The presence of bulky groups on the C<sub>α</sub> may hinder the achievement of antiperiplanarity of H and X due to the presence of those groups and the carboxy-terminal amino acid residue. Such antiperiplanarity is needed for the overlapping of the appropriate atomic orbitals and the subsequent generation of a  $\pi$ -bond in **3**. This is illustrated in Scheme 3.

To get a deeper insight into the origin of the steric effect, appropriate crossed-interaction coefficients can be estimated. Such parameters quantitatively describe the effect of the substituents on the structure of the TS.<sup>58</sup> To take into account the steric effect, the following parameters have been defined:<sup>29</sup>

$$p_{xy}' = \frac{-\partial\beta_{lg}}{\partial v'} = \frac{-\partial\Psi}{\partial pK_a(lg)} \quad (4)$$

$$p_{xy}'' = \frac{\partial\beta}{\partial v'} = \frac{\partial\Psi}{\partial pK_a(BH^+)} \quad (5)$$

The crossed-interaction coefficient  $p_{xy}'$  reflects the interaction between the substituents  $R_1$  in **1** and the reacting base. We found  $p_{xy}' = 0$ , in agreement with the lack of steric effect of  $R_1$  discussed above.

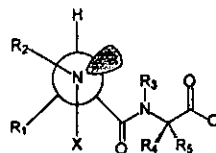
Similarly, the interaction between the leaving group and the substituents  $R_1$  in **1** is measured by the crossed-interaction coefficient  $p_{xy}''$ . Using the Charton  $\psi$  values

Table 3. Values of Charton's  $\psi$  for the Base-Promoted Elimination of **1** ( $T = 298.0\text{ K}$ )<sup>a,b</sup>

(N-X)-Aa <sub>1</sub> -Aa <sub>2</sub>		base	X	$\psi$
Aa <sub>1</sub>	Aa <sub>2</sub>			
(Gly, Ala, Val)	Gly	OH <sup>-</sup>	Cl	-3.2
(Gly, Ala, Leu)	Ala	OH <sup>-</sup>	Cl	-3.3
(Gly, Ala, Val)	Val	OH <sup>-</sup>	Cl	-3.2
(Gly, Ala, Val)	Gly	TFE <sup>-</sup>	Cl	-3.2
(Gly, Ala, Leu)	Ala	TFE <sup>-</sup>	Cl	-3.3
(Gly, Ala, Val)	Gly	HFIP <sup>-</sup>	Cl	-2.9
(Gly, Ala, Leu)	Ala	HFIP <sup>-</sup>	Cl	-3.5
(Gly, Ala, Val)	Val	HFIP <sup>-</sup>	Cl	-3.3
(Gly, Ala, Val)	Gly	OH <sup>-</sup>	Br	-2.7
(Gly, Ala, Leu)	Ala	OH <sup>-</sup>	Br	-2.4
(Gly, Ala, Val)	Val	OH <sup>-</sup>	Br	-2.7

<sup>a</sup> Each row shows the **1** involved in the analysis; for example, in the first row the values of  $k_{OH^-}$  for (N-Cl)-Gly-Gly, (N-Cl)-Ala-Gly, and (N-Cl)-Val-Gly were used. <sup>b</sup> In all cases  $r > 0.9$ .

Scheme 3



obtained here and the  $pK_a$ 's of the leaving groups, a value  $p_{xy}' = 0.31$  can be estimated. A plot of  $\beta_{lg}$  vs.  $v'$  for  $R_1$  also shows a reasonably good linear correlation, with  $p_{xy}' = 0.36 \pm 0.07$  ( $r = 0.86$ ). Therefore, both values of  $p_{xy}'$ , obtained by independent methods, are in good agreement.<sup>59</sup> The fact that  $p_{xy}' \neq 0$  reflects the importance of the steric interaction between the  $R_1$  substituents and the leaving group. A similar value has been found for  $p_{xy}'$  in the base-promoted decomposition of (N-X)-amino acids.<sup>29</sup>

Thus, the results obtained seem to indicate that the observed steric effect arises as a result of the interaction between the  $R_1$  groups on C<sub>α</sub> and the nucleofuge, which supports the hypothesis of the elimination taking place in the *anti*, and not in the *syn* conformation.

From Table 1 it follows that  $k_B$  for (N-Cl)-Ala-Gly and (N-Cl)-Pro-Gly are similar, so either alkyl substitution on the terminal amino group has a small inductive effect or, due to the presence of the ring, the steric effect is smaller. While alkyl substituents on the N slow the reaction in the case of (N-X)-amines and (N-X)-amino acids,<sup>37,38</sup> a rate enhancement is observed for (N-X)-Pro, for which the steric hindrance is smaller.<sup>29</sup> Most likely, a similar effect is responsible of the effect observed for (N-X)-Pro-Gly.

**Characterization of the Transition State (TS).** All the experimental observations agree with a base-promoted A<sub>ab</sub>N<sub>H</sub>D<sub>N</sub> elimination mechanism. As B approaches **1**, the C<sub>α</sub>-H bond-cleavage starts, with potential development of a partial negative charge on the C<sub>α</sub>. The N-X bond starts breaking with potential development of a partial positive charge on the N. The formation of the C<sub>α</sub>=N bond to form **3** is the driving force for the process (see below). The main events taking place at the TS are depicted in Scheme 2.

(59) This correlation is reasonable, especially taking into account that  $p_{xy}'$  values are obtained as a result of double differentiation.

(55) (a) Charton, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 1552. (b) Charton, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 3691. (c) Charton, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 3694. (d) Charton, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97(21), 6159.

(56) *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data*, 80th ed.; Lide, D. R., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1999.

(57) Losada Cabanas, M. Ph.D. Thesis, Universidade da Coruña, 1993.

(58) (a) Lee, I. *Chem. Soc. Rev.* 1990, 19, 317. (b) Keun Oh, H.; Bong K., Y.; Lee, I. *J. Phys. Org. Chem.* 1993, 6, 357.

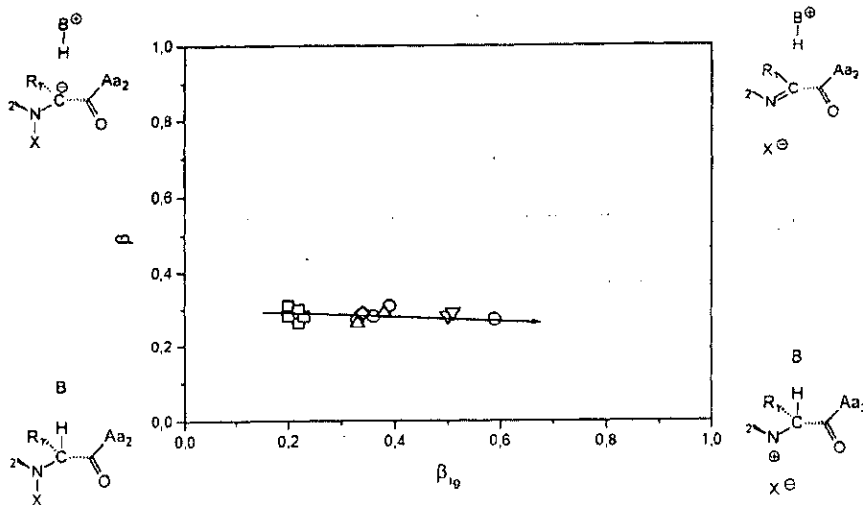


Figure 4. More O'Ferrall-Albery-Jencks plot for the elimination from 1 to 3: (□) (N-X)-Gly-Aa<sub>2</sub>, (○) (N-X)-Ala-Aa<sub>2</sub>, (Δ) (N-X)-Val-Aa<sub>2</sub>, (▽) (N-X)-Leu-Aa<sub>2</sub>, (◇) (N-X)-Pro-Aa<sub>2</sub>.

The progress of the C<sub>α</sub>-H bond-cleavage at the TS has been estimated using the Brønsted β and the degree of N-X bond breaking has been estimated by means of the β<sub>1g</sub><sup>51</sup> (Table 2).

An estimation of the progress of the C=N bond formation at the TS is not straightforward. The degree of C=N double bond formation can be roughly estimated by assuming that the potential developing negative charge on the C<sub>α</sub> balances the potential developing electron deficiency on the N. Thus, the degree of the C=N bond at the TS ranges between 20% and 30%.

Although at least four main molecular events are involved in the base-promoted decomposition of 1, some of them are interdependent, so the process can be described in a simplified manner in terms of two reaction coordinates: the C<sub>α</sub>-H and the N-X bond-cleavage processes. In a rough approach, the TS for the elimination process leading from 1 of 3 can be located on a classical More O'Ferrall-Albery-Jencks' bidimensional reaction coordinate diagram (Figure 4).<sup>60</sup>

Figure 4 shows the change in the timing of C<sub>α</sub>-H and N-X bond-breaking processes at the TS. Despite the fact that the base-promoted elimination of 1 is concerted, both events do not take place in a synchronous manner at the TS. On the contrary, the bulkier the substituents R<sup>1</sup>, the higher the degree of N-X bond breaking. Thus, a range of structures is observed for the TS, changing in the direction of the arrow, from a reactant-like TS to a more nitrenium-like TS as the steric hindrance of R<sup>1</sup> increases.

The changes on the location of the TS shown in the Figure 4 are in good agreement with those that would be predicted on the basis of the Hammond postulate and Thornton rules.<sup>60</sup> Such rules also adequately address the changes in location of the TS when X or the reacting base are changed (see Table 2).

The degree of asynchronicity or imbalance<sup>61</sup> can be expressed simply as  $IB = 100(\beta_{1g} - \beta)$ , and the corresponding values are compiled in Table 2. The estimated IB values show that the N-X bond breaking begins after the H transfer begins (IB < 0) for small R<sup>1</sup> substituents, while it runs ahead (IB > 0) in the case of the bulky ones.

**Semiempirical Calculations.** Although more detailed and extensive calculations to characterize the PES of this process are in progress, simple semiempirical calculations are presented here showing the good agreement with the experimental results.

AM1 and PM3 semiempirical methods were used. Both methods use MO-LCAO HF combined with the NDDO approximation, differing in the method of parametrization.<sup>62</sup> Since the results obtained are essentially the same in both cases, we will present only those obtained using the PM3 method.

The atoms of the different compounds 1 are numbered as shown in Figure 5. The molecular geometry was optimized with the PM3 method for the L-isomer, with starting values of 90° for φ, ψ, ω torsion angles.<sup>63</sup> Starting from the optimized geometry, the energy barrier profile in Figure 6 was calculated as a series of single-point calculations changing only the dihedral angle formed by X, N, C<sub>α</sub>, and H (atoms 5, 3, 1, and 4). Similar results were obtained using different φ, ψ, ω values and the AM1 method.

Inspection of the results show that while (N-X)-Gly can easily reach the antiperiplanar conformation, as the R<sup>1</sup> substituent on the C<sub>α</sub> gets bulkier, the antiperiplanar conformation is no longer the most stable one; i.e., certain energy is required to achieve the antiperiplanarity needed for the elimination reaction to proceed.

(61) Bernasconi, C. F. *Adv. Phys. Chem.* 1992, 27, 119.

(62) (a) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 107, 3902. (b) Pople, J. A.; Beveridge, D. L.; Dobosh, P. A. *J. Chem. Phys.* 1967, 47, 2026.

(63) φ is the dihedral angle between atoms C(2), N(8), C(10), and C(13). ψ is the dihedral angle involving atoms between atoms N(3), C(1), C(2), and N(8). ω is the dihedral angle between atoms O(7), C(2), N(8), and H(9).

(60) (a) Hammond, G. S. *J. Am. Chem. Soc.* 1955, 77, 334. (b) Thornton, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 89, 2915. (c) O'Ferrall, R. A. *M. J. Chem. Soc. B* 1970, 274.

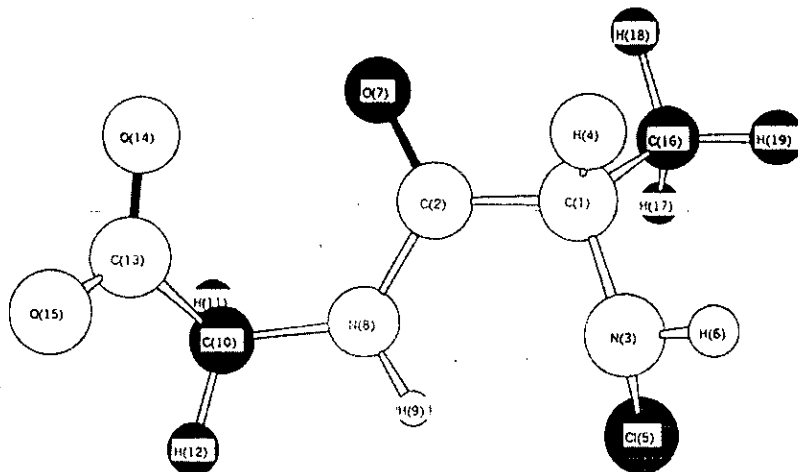


Figure 5. Numbering of the atoms used for the semiempirical calculations with (N-Cl)-Ala-Gly.

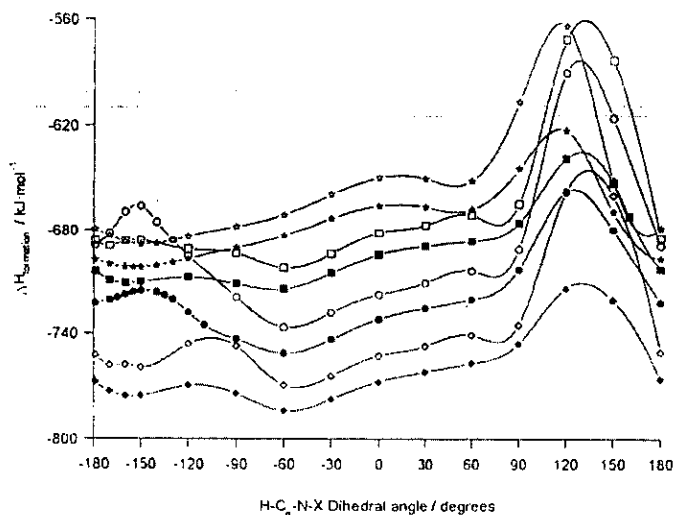


Figure 6. Torsional barrier about the  $C_{\alpha}$ -N bond: (★) (N-Cl)-Gly-Gly, (☆) (N-Br)-Gly-Gly, (■) (N-Cl)-Ala-Gly, (□) (N-Br)-Ala-Gly, (●) (N-Cl)-Val-Gly, (○) (N-Br)-Val-Gly, (◆) (N-Cl)-Leu-Gly, (◇) (N-Br)-Leu-Gly.

A plot of  $(\log k_B)$  vs the energy difference between the optimized structure and the structure in antiperiplanar conformation shows a rather good correlation. This finding supports the requirement of antiperiplanarity between the  $C_{\alpha}$ -H and the N-X bonds. Although the energy required to achieve the antiperiplanar conformation is higher in the case of (N-Br)-dipeptides, the slope obtained from the previous plot for them ( $-0.19 \pm 0.01$ ,  $r = 0.99$ ) is lower than for (N-Cl)-dipeptides ( $-0.33 \pm 0.03$ ,  $r = 0.99$ ).

This is in agreement with the previous statement that the lower energy of the N-Br bond allows this bond to break more readily so, when the two TS are reached the Br atom is further away from the  $R_1$  substituent than the Cl atom is, which explains the lower steric interaction for N-Br-dipeptides in their TS.

### Conclusions

We have shown that the mechanism of base-promoted decomposition of **1** takes place in two consecutive steps (Scheme 1), the first one being a concerted elimination to yield an imine **3** and the second one the subsequent hydrolysis of **3**.

In contrast, for (N-X)-amino acids and (N-X)-amines the rate of elimination coincides with the rate of formation of the products of hydrolysis of the imine, i.e.:  $k_1 (\cong k_2[B]) \ll k_3$ . The presence of the peptide linkage introduces two main changes in the decomposition process: (i) The activation energy to form the imine decreases, leading to an increase of  $k_1$ ; as a consequence, the elimination to yield the imine becomes faster than in the case of (N-X)-amino acids and (N-X)-amines,  $k_1 (\cong k_2[B]) \gg k_2$ . (ii) The imine is more stable; thus  $k_2$  is slowed. As

a result of such changes it becomes possible in this case to detect **3** in aqueous solution.

The formation of **3** takes place through a concerted asynchronous  $A_{\text{N}}D_{\text{H}}D_{\text{N}}$  elimination. It appears that the reaction can start from conformations other than the antiperiplanar one. As a consequence, the bulkier the  $R_1$  substituents, the more advanced is the N-X bond-breaking process relative to the C-H bond breaking, which allows the antiperiplanar conformation to be reached at less energy cost. As the N-Br bond is weaker than the N-Cl bond, the N-Br is more readily broken and the reaction is faster for (N-Br)-dipeptides.<sup>64</sup>

At the TS the degree of proton transfer is ca. 28%, with a degree of C=N formation of 20–30%, and a N-X bond breaking ranging from 20 to 50% depending on the nature of **1**.

The results presented in this paper show that **1** and presumably (N-X)-polypeptides and (N-X)-proteins lose their oxidizing power faster than the analogous (N-X)-amino acids and (N-X)-amines. In other words, **1** may play an important role in controlling intracellular halogen-based oxidative stress. In what regard water treatment, within their lifetime **1** would contribute to the total amount of combined chlorine in solution.<sup>65,66</sup>

### Experimental Section

**Materials and Reagents.** The dipeptides used were all purchased from Sigma. Aqueous chlorine solutions were prepared every 3–4 days by bubbling  $\text{Cl}_2(\text{g})$  through  $\text{NaOH}(\text{aq})$  and spectrophotometrically titrated daily ( $\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O}) = 292 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  when  $\text{pH} > 12$ ).<sup>67</sup> Aqueous bromine solutions were prepared daily by dissolving  $\text{Br}_2(\text{l})$  in  $\text{NaOH}(\text{aq})$  and spectrophotometrically titrated ( $\lambda_{\text{max}}(\text{H}_2\text{O}) = 331 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 326 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  when  $\text{pH} > 12$ ).<sup>68</sup> All other chemicals were of the best quality available and used without further purification. All solutions were made up with twice-distilled water.

$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{HFIP}/\text{HFIP}^-$ , and  $\text{TPE}/\text{TPE}^-$  were used as buffer solutions, and  $\text{NaOH}(\text{aq})$  was used to generate alkaline media. In general,  $\text{NaClO}_4$  was used to maintain constant the ionic strength at  $I = 1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , except with  $\text{TPE}/\text{TPE}^-$  and  $\text{HFIP}/\text{HFIP}^-$ , where we used  $\text{KCl}$ , and with  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , where we used  $\text{NaCl}$ .

**pH Measurements.** All were carried out with properly calibrated combined glass electrodes. When buffer solutions

of  $\text{HFIP}/\text{HFIP}^-$  and  $\text{TPE}/\text{TPE}^-$  were used, the pH meter was calibrated using standardized  $\text{KOH}$  solutions to avoid  $\text{Na}^+$  errors, and  $\text{KCl}$  was used as electrolyte for the reference electrode. Due to the slow response of the electrode in  $\text{KOH}$  solutions,<sup>69</sup> a fixed interval of ca. 5 min was allowed to elapse before measurements were taken.

**Kinetics.** Reaction mixtures were prepared as described elsewhere.<sup>70</sup> Equimolar concentrations of both reagents, or with, at most, 1–2% excess of dipeptide, were used. The solution to achieve the basic conditions was added only after halogenation had taken place. There was no evidence of simultaneous or partial halogenation on the N of the peptide bond.<sup>71</sup> All reactions were carried out at constant temperature ( $298.0 \pm 0.1 \text{ K}$ ).

The reactions were followed at the absorption maxima of the different compounds **1** (ca. 235–240 nm). The first-order rate equation was fitted to the absorbance-time data using the DSC<sup>72</sup> or Marquardt<sup>73</sup> nonlinear optimization algorithms. All reported rate constants are averages from different runs, and their reproducibility is within 5%.

Conventional UV-Vis spectrophotometers, single- and multi-mixing stopped-flow spectrophotometers and  $\text{Cl}^-$  and  $\text{NH}_4^+$ -selective electrodes were used to monitor the progress of the reactions.

**Reaction Products.** The products of decomposition of **1** were in all cases the corresponding 2-[N-alkyl-N-(2-N-alkyl-imino-2-alkylethanoylethylamino)-2,2-dialkylethanoic acids, ammonia, and primary amines, proof of which has been given elsewhere.<sup>74,75</sup> Chlorine loss in reactions was monitored using a chloride selective electrode and ammonia formation was followed using an ammonia selective electrode.

The product of elimination of (N-Cl)-Pro-Gly is [(2-Iminoethanoylethylamino)ethanoic acid:  $^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C)  $\delta$  3.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.97 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); MS (70 eV, EI) (*m/e*) 125.1 (73) [ $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$ ], 97.1 (100) [ $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$ ], 68.1 (75) [ $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}$ ].

**Acknowledgments.** We thank the autonomous government of the Xunta de Galicia (Spain) for financial support (project PGIDT99PX110302B). M.I.F., M.V.G., and S.R. also thank the Xunta de Galicia for a PhD fellowship. We also acknowledge Dr. Howard Maskill for productive discussion and proof-reading, and an anonymous reviewer for helpful suggestions.

JO001336U

(69) Gandler, J. R.; Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 1937.

(70) Armesto, X. L.; Cante L. M.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Int. J. Chem. Kinet.* 1993, 25, 331.

(71) (a) Ayotte, R. C.; Gray, T. *Water Chlorination* 1973, 5, 797. (b) Hurecki, L.; Croué, J. P.; Legube, B. *Wat. Res.* 1994, 28, 2521.

(72) Casado, J.; Mosquera, M.; Rivas, A.; Rodríguez Prieto, M. F.; Santaballa, J. A. *Comput. Chem.* 1983, 7, 209.

(73) Marquardt, D. W. *J. Soc. Ind. Math.* 1963, 11, 431.

(74) Abia, L.; Armesto, X. L.; Cante L. M.; García, M. V.; Losada, M.; Santaballa, J. A. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 1996, 105, 349.

(75) Stelmazyńska, T.; Zgliczynski, J. *Eur. J. Biochem.* 1978, 92, 301.

(64) (a) Henshaw, S. W. *J. Chem. Educ.* 1965, 42, 502. (b) Pauling, L. *The Nature of the Chemical Bond*; Cornell University Press: New York, 1960. (c) Kerr, J. A. *Chem. Rev.* 1966, 66, 465.

(65) The amount of combined chlorine expresses the amount of chlorine bound to organic matter that is capable of oxidizing other substrates.

(66) Gordon, G.; Pacey, G. *Am. Water Works Assoc.* 1987, 15–20, 1005.

(67) Morris, J. C. *J. Phys. Chem.* 1966, 70, 3798.

(68) Cheek, C. H.; Linnenbom, V. J. *J. Phys. Chem.* 1963, 67, 1856.

**On the kinetics and energetics of one-electron oxidation of (1,3,5)-triazines**

M.Emília D.G. Azenha,<sup>a</sup> Hugh D. Burrows,<sup>a</sup> Moisés Canle L.,<sup>b</sup> Rita Coimbra,<sup>a</sup> M. Isabel Fernández,<sup>b</sup> M.Victoria García,<sup>b</sup> Ana María M. Rego,<sup>c</sup> Agathe E. Rodrigues,<sup>a</sup> J.Arturo Santaballa<sup>b</sup> and Steen Steenken<sup>d</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química. Universidade de Coimbra. 3004-535 Coimbra, Portugal.*

<sup>b</sup> *Departamento de Química Física e Enxeñería Química I. Universidade da Coruña. Rúa Alejandro de la Sota, 1. E-15008 A Coruña, Galicia, Spain.*

<sup>c</sup> *Instituto Superior Técnico, Av.Rovisco País, 1049-001 Lisboa, Portugal.*

<sup>d</sup> *Max-Planck Institut für Strahlenchemie, D-45413 Mülheim an der Ruhr, Germany.*

**Summary** One-electron oxidation of 1,3,5-triazines is observed with both  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  radical anion and excited uranyl ion in aqueous solution, indicating that their standard reduction potentials are in the range  $2.4 < E^\circ < 2.6$  V, consistent with data determined for ionisation potentials from photoelectron spectroscopy and semiempirical theoretical calculations; these data suggest that if triazines inhibit electron transfer during photosynthesis, they would need to act on the reductive part of the electron transport chain.

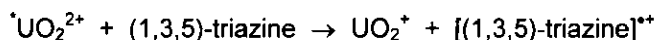
(1,3,5)-Triazines are among the most commonly used herbicides.<sup>1</sup> They are also widely used as polymer photostabilisers.<sup>2</sup> However, these compounds are highly toxic, stable for long periods under typical environmental conditions, and their persistence in natural waters, and specially groundwaters, is a matter of considerable concern.<sup>3</sup> There is an urgent need for reliable methods for removing these compounds from drinking water resources. Advanced oxidation processes (AOPs) provide a potentially important route for mineralisation of these compounds, and photocatalysed oxidation<sup>4</sup> is one of the most valuable of these methods. The s-triazines absorb at wavelengths  $<270$  nm, and generally only undergo direct photolysis on excitation with UVC light.<sup>5</sup> However, they do degrade in the presence of various photosensitisers,<sup>5</sup> and there is great interest in the development of new readily accesible processes for their photodegradation.



One-electron oxidation would seem to be a particularly attractive route. However, although a number of studies have been carried out on the oxidative degradation of *s*-triazines, one important parameter, the standard reduction potential of their oxidized form in aqueous solutions, is not known. Cyclic voltammetry studies on 2,4-diamino-1,3,5-triazine in acetonitrile appear to show only a two-electron oxidation ( $E_{1/2} = + 1.4$  V relative to SCE, + 1.7 V relative to NHE).<sup>6</sup> To rectify this omission, we report a study using laser flash and steady-state photolysis, pulse radiolysis<sup>7</sup> and luminescence of the reactions of a series of (1,3,5)-triazines (Figure 1) with strong one-electron oxidants produced radiolytically and photochemically. Thallium (II), produced at  $\text{pH} \leq 3$  by pulse radiolysis of nitrous oxide saturated aqueous solutions of thallium (I), does not react with the triazines, providing a lower limit to their redox potentials ( $E^\circ (\text{Tl}^{2+} / \text{Tl}^+) = 2.22\text{V}$ ).<sup>8</sup> With the  $\text{OH}^\bullet$  radical, produced by radiolysis of nitrous oxide saturated aqueous solutions, the reaction proceeds almost quantitatively (97%) *via* addition to the aromatic ring to form the hydroxyl radical adduct, rather than one- $e^-$  oxidation (3 %), as proved by pulse radiolysis experiments carried out with conductance detection (the increase in the concentration of  $\text{OH}^\bullet$  would lead to an increase of the conductance of the medium). In contrast, one-electron oxidation was observed with both  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  radical anion ( $E^\circ (\text{SO}_4^{\bullet-} / \text{SO}_4^{2-}) = 2.43$  V)<sup>8</sup> produced by photolysis or radiolysis of argon saturated aqueous solutions of  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  in the presence of the hydroxyl radical scavenger *t*-butanol, or excited uranyl ( $^1\text{UO}_2^{2+}$ ) ion ( $E^\circ (^1\text{UO}_2^{2+} / \text{UO}_2^+) = 2.65$  V)<sup>9</sup> produced by photolysis.

The reaction with excited uranyl ion has been studied in more detail. Prolonged photolysis of aqueous solutions of uranyl ion (0.01 M, pH 1.4) in the presence of 1,3,5-triazine and its derivatives atrazine, hydroxyatrazine, atraton, ametryn and 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine led to a decrease in the uranyl concentration, as seen by a reduction in intensity of its emission spectrum. In the case of *s*-triazine it was possible to detect formation of uranium(IV) by its absorption spectrum, confirming the photooxidation. After controlled photolysis, as monitored by HPLC, 2-hydroxyatrazine was the main organic product observed with atrazine, atraton and ametryn. The kinetics of the primary electron-transfer processes were studied both by steady-state quenching of uranyl luminescence and by monitoring the decay of excited uranyl ion absorption at 570 nm following

355 or 266 nm excitation (where only uranyl ion absorbs) using laser flash photolysis. In both cases, good linear dependences of the quenching on triazine concentrations were observed, showing second-order kinetics. Steady-state data were analysed using Stern-Volmer plots, and rate constants (estimated errors  $\pm 10\%$ ) determined from the slopes ( $K_{sv}$ ) using the measured lifetime of excited uranyl ion ( $k_0$ ) under these conditions. Identical values for the rate constants for reaction between  ${}^1\text{UO}_2^{2+}$  and triazines (Table 1) were found in steady state ( $k_{SQ}$ ) and dynamic ( $k_{DQ}$ ) studies. This indicates that there is no static quenching, and that only a dynamic reaction between uranyl excited state and the triazine (tz) is involved. This is attributed to the process



$[(1,3,5)\text{-triazine}]^{**}$  is likely to be very short-lived, and our attempts to observe it using ps studies have not detected any transient absorption above 250 nm on timescales greater than 500 ps, limiting the lifetime of  $[(1,3,5)\text{-triazine}]^{**}$  to an upper value of 2 ns. The observation of the above reaction suggests that the triazines have reduction potentials close to, but lower than, excited uranyl ion. By comparison of these results with those of one- $e^-$  oxidation of triazines by  $\text{SO}_4^{\bullet-}$  radical anion ( $k_{\text{SO}_4^{\bullet-}}$ , Table 1) their reduction potentials can be limited to  $2.4 < E^\circ < 2.6$  V vs. NHE. The high value observed for  $E^\circ([(1,3,5)\text{-triazine}]^{**} / (1,3,5)\text{-triazine})$  has important implications for the mechanism of action of these compounds as herbicides. They are suggested to act by inhibiting electron transport in photosynthesis.<sup>10,11</sup> However, from the estimated  $E^\circ$  value, this is only feasible if they affect the reductive part of the electron transport chain.

Additional information on the one-electron oxidation of the 1,3,5-triazines comes from their ionisation potentials. From photolysis experiments, the photoionisation threshold can be estimated to be between 266 and 254 nm (4.67 - 4.88 eV). Taking the hydration energies of the products of photoionization as 3.5 eV,<sup>12</sup> gives an aqueous ionisation limit around 8.4 eV. Photoelectron spectra were measured for the (1,3,5)-triazines, and their vertical ionisation potentials are given in Table 1.

Theoretical values of the of HOMO energies for the different (1,3,5)-triazines used were also obtained by semiempirical calculations at the PM3 level, using methods similar to those reported by Danovich and Apeloig.<sup>13</sup> Values are

compared with the experimentally determined vertical ionisation potentials (VIPs) in Table 1. Comparison of ionisation potentials with standard reduction potentials is not straightforward, since both hydration energies and the absolute value of the reference potential  $E^\circ(\text{H}^+ / \frac{1}{2}\text{H}_2)$  are involved. However, these can be linearly correlated as  $E^\circ = (-3.8 \pm 0.4) + (0.73 \pm 0.05) \cdot \text{VIP}$ ,  $r=0.97$ ,<sup>14</sup> and from the experimental ionisation limit reported above, a value of  $E^\circ([\text{(1,3,5)-triazine}]^{**} / \text{(1,3,5)-triazine}) = 2.3 \text{ V}$  can be estimated. In addition, from the calculated HOMO energies, the value of  $E^\circ([\text{(1,3,5)-triazine}]^{**} / \text{(1,3,5)-triazine}) = 2.6 \text{ V}$  can be estimated. Both values are in excellent agreement with the limits obtained from the kinetic data.

### Acknowledgements.

We thank the the EU for supporting series of visits to the Paterson Institute for Cancer Research Free Radical Research Facility (Manchester, UK) within the TMR Access to Large Scale Facilities programme, and for a Marie Curie grant to MCL to work in the MPI. We are also grateful to the *Ministerio de Educación y Cultura* (Spain), *Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas* (Portugal) and *Deutscher Akademischer Austauschdienst* (Germany) for financial support through two *Acciones ntegradadas* bilateral programmes.

### References.

1. R.Whitehead, ed. The UK Pesticide Guide 2000, CABI Publishing, Wallingford, 2000.
2. F. Elbe, J. Keck, A.P. Fluegge, H.E.A. P. Fischer, P. Hayoz, D. Leppard, G. Rytz, W. Kaim and M. Ketterle, *J.Phys.Chem.A*, 2000, **104**, 8296.
3. R. Spear, in: Handbook of Pesticide Toxicology, W.J. Hayes, E.R. Laws, eds., vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, 1991, Chapter 6.
4. O Legrini, E. Oliveros and A.M. Braun, *Chem.Rev.*, 1993, **93**, 671.
5. See, for example, H.D. Burrows, M. Canle L., J.A. Santaballa and S. Steenken, *J.Photochem.Photobiol.B*, submitted for publication.
6. S. Schmidt, J. Mattusch and G. Werner, *Z.Chem.*, 1989, **29**, 241.
7. Full details of the fast reaction methodology used are given in M. Canle L., J.A. Santaballa and S. Steenken, *Chem.Eur.J.*, 1999, **5**, 1192.
8.  $E^\circ$  values are relative to the normal hydrogen electrode (NHE), using data from P. Wardman, *J.Phys.Chem.Ref.Data*, 1989, **18**, 1637.

Parte II

9. H.D. Burrows, S.J. Formosinho, M. da G. Miguel and F. Pinto Coelho, *J.Chem.Soc., Faraday Trans.1*, 1976, **72**, 163 (to be checked).
10. R.J. Cremlyn, *Agrochemicals*, Wiley, Chichester, 1991, p.239.
11. L.G. Copping and H.G. Hewitt, *Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, p.23.
12. M. Braun, J.Y. Fan, W. Fuss, K.L. Kompa, G. Müller, W.E. Schmid, *Methods in Laser Spectroscopy*, eds. Z. Prior, A. Ben-Reuven, M. Rosenbluh, Plenum Press, New York, 1986.
13. D. Danovich and Y. Apeloig, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2*, 1991, 1865.
14. M. Canle L., unpublished observations.

**Table 1:** kinetic data for photophysical and photochemical processes, and theoretical and experimental ionisation potentials for different (1,3,5)-triazine derivatives.

Triazine	$E_{\text{HOMO}}$ eV <sup>a</sup>	V.I.P. eV <sup>b</sup>	$\Phi_{\text{PI}}$ <sup>c</sup>	$K_{\text{SV}}$ $\text{M}^{-1}$	$k_{\text{DQ}}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{SQ}}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{OH}^{\bullet}}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_{\text{SO}_4^{\bullet-}}$ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
sym-(1,3,5)-triazine	10.361	10.51 <sup>d</sup>	0.005	42	$2.2 \cdot 10^7$	$2.3 \cdot 10^7$ <sup>e</sup>	No reaction observed	No reaction observed
2-Cl-(4,6)-dimethoxy-(1,3,5)-triazine	10.806	—	—	$1.6 \cdot 10^2$	$9.1 \cdot 10^7$	$9.7 \cdot 10^7$ <sup>f</sup>	—	—
Atrazine	9.161	0.124	0.124	—	$\sim 5.0 \cdot 10^9$ <sup>g</sup>	$7.5 \cdot 10^9$ <sup>g</sup>	$2.2 \cdot 10^9$	$1.4 \cdot 10^9$
2-OH-atrazine	9.115	—	—	—	$1.7 \cdot 10^5$	**** <sup>h</sup>	—	—
Atraton	9.068	0.078	0.078	—	—	—	$3.8 \cdot 10^9$	$6.5 \cdot 10^8$
Ametryne	8.985	0.071	0.071	—	—	—	$4.3 \cdot 10^9$	$4.1 \cdot 10^9$

<sup>a</sup> Obtained from semiempirical calculations at PM3 level.

<sup>b</sup> Unless otherwise stated, obtained by photoelectron spectroscopy.<sup>o</sup>

<sup>c</sup>  $\Phi_{\text{PI}}$  obtained at 193 nm by comparison of the yield of  $e_{\text{aq}}^-$  in the laser flash photolysis of the different triazines with that of  $e_{\text{aq}}^-$  upon 193 nm laser flash photolysis of a Cl<sup>-</sup> solution with the same absorbance at 193 nm, for which  $\Phi_{\text{PI}} = 0.41 \pm 0.08$ , reported in A. Iwata, N. Nakashima, M. Kusaba, Y. Izawa, C. Yamanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 1993, 207, 137.

<sup>d</sup> Value reported in M. Shabaz, S. Urano, P.-R. LeBreton, M.A. Rossman, R.S. Hosnane, N.J. Leonard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 2805.

<sup>e</sup> Taking  $k_{\text{D}} = (4.9 \pm 0.5) \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  at  $\lambda_{\text{exc}} = 413 \text{ nm}$ , pH = 1.30,  $\tau = (1.83 \pm 0.01) \mu\text{s}$ , obtained from the decay of  $(\text{UO}_2^{2+})^{\bullet}$  in the absence of sym-(1,3,5)-triazine..

<sup>f</sup> Taking  $k_{\text{D}} = 6.2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  at  $\lambda_{\text{exc}} = 414 \text{ nm}$ , pH = 1.46, and using  $\tau_0 = 1.6 \mu\text{s}$ , obtained from the decay of  $(\text{UO}_2^{2+})^{\bullet}$  in the absence of 2-Cl-(4,6)-dimethoxy-1,3,5-triazine.

<sup>g</sup> Taking  $k_{\text{D}} = \text{***} \text{ s}^{-1}$  at  $\lambda_{\text{exc}} = \text{***} \text{ nm}$ , pH = \text{\*\*\*}, and using  $\tau_0 = \text{***} \mu\text{s}$ , obtained from the decay of  $(\text{UO}_2^{2+})^{\bullet}$  in the absence of atrazine.

<sup>h</sup> Taking  $k_{\text{D}} = \text{***} \text{ s}^{-1}$  at  $\lambda_{\text{exc}} = \text{***} \text{ nm}$ , pH = \text{\*\*\*}, and using  $\tau_0 = \text{***} \mu\text{s}$ , obtained from the decay of  $(\text{UO}_2^{2+})^{\bullet}$  in the absence of 2-OH-atrazine.

**Kinetic and mechanistic aspects of the direct photodegradation of atrazine, ametryn, atraton and hidroxiatrazina by UV light aqueous solution.**

M.Emília D.G. Azenha,<sup>a</sup> Hugh D. Burrows,<sup>a</sup> Moisés Canle L.,<sup>b</sup> Rita Coimbra,<sup>a</sup> M. Isabel Fernández,<sup>b</sup> and J.Arturo Santaballa<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química. Universidade de Coimbra. 3004-535 Coimbra, Portugal.*

<sup>b</sup> *Departamento de Química Física e Enxeñería Química I. Universidade da Coruña. Rúa Alejandro de la Sota, 1. E-15008 A Coruña, Galicia, Spain.*

En proceso de redacción

7th European Symposium  
on Organic Reactivity

ESOR

August 22nd - 27th, 1999  
Ulm / Germany



Book of Abstracts

University of Ulm

Gesellschaft Deutscher  
Chemiker



HOCl vs N-Cl-TAURINE CHLORINATION OF AMINOACIDS

*Arturo Santiballa, Isabel Fernández, Moisés Canite, M. Victoria García.*

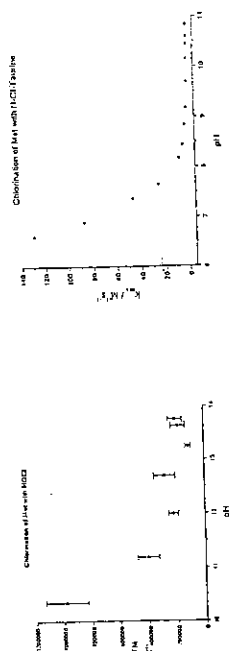
Dpto. Química Fundamental e Industrial. Facultad de Ciencias.

Universidad de Coruña. A Zapateira s/n. E-15071 A Coruña. España

It is well known that HOCl can react with aminoacids, peptides and amines and produces N-Cl-compounds<sup>[1]</sup> or S-Cl-compounds<sup>[2]</sup> depending on the functional groups in the molecule.

By the way, Taurine is one of the most abundant free amino acids in mammalian tissues and appears to act as a trap for HOCl, produced by the myeloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup> enzymatic system of leukocytes forming the oxidant taurine monochloramine.<sup>[3]</sup> Therefore N-Cl-Taurine can act as oxidant like HOCl, but is much less reactive and less toxic.

N-Cl-Taurine was formed by a not enzymatic reaction with HOCl, not decomposes at neutral pH and it can be used like HOCl for forming N-Cl- or S-Cl- compounds.



The processes of chlorination of aminoacids with both chlorinating agents are always bimolecular, the halogen atom being transferred from the HOCl or N-Cl-Taurine to a nucleophilic position (either a *N*- or *S*-containing group) of the amino acid. The reactions are followed by using a stopped-flow spectrophotometer, monitoring the absorbance decrease at 292 (maximum absorbance for HOCl) or 255 nm (maximum absorbance of N-Cl-Tau). The dependence of rate constant with the pH are in the following figures.

References:

- [1] X. L. Armesto, M. Canite L., M. V. García, J. A. Santiballa, Chem. Soc. Rev., 1998, 7, 453
- [2] X. L. Armesto, M. Canite L., M. I. Fernández, M. V. García, J. A. Santiballa, submitted for publication
- [3] Leah A. Marquez, H. Brian Dunford, J. Biol. Chem., 1994, 269, 7950

7th European Symposium  
on Organic Reactivity

ESOR

August 22nd - 27th, 1999  
Ulm / Germany

ESOR

Book of Abstracts

University of Ulm

Gesellschaft Deutscher  
Chemiker



P79

PHOTO- AND RADIATION CHEMICAL OXIDATION OF s-TRIAZINE-BASED HERBICIDES.

M. Conle L.,<sup>a,b</sup> M.I. Fernández,<sup>a,b</sup> J.A. Santaballa,<sup>a</sup> S. Steenken,<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Fundamental e Industrial. Universidade da Coruña.

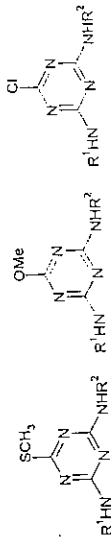
A Zapateira, s/n. E-15071 A Coruña, Spain.

<sup>b</sup> Max-Planck Institut für Strahlenchemie. Stüfstr., 34-36. D-45470 Mülheim-Ruhr, Germany.

E-mail: mcconle@udc.es, sabella@mail2.udc.es, arturo@udc.es

s-Triazine derivatives are extensively used as herbicides<sup>(1)</sup> since they are able to inhibit photosynthesis and interfere with other enzymic processes that are fundamental for plant metabolism. Their degradation takes place through dealkylation of the amino groups and hydroxylation in the sixth position. It seems that photodegradation processes may occur in a similar way.<sup>(2)</sup>

This work is focused on the study of the mechanism of photodegradation of s-triazine-based herbicides in aqueous solution, using the laser flash photolysis technique. The structures of the s-triazine-based herbicides used are shown below.



Photolysis experiments were carried out using exciting light of 193 and 248 nm. Low percentages of photoionization were observed in both cases. Photoionization at 193nm is a monophotonic process, and the corresponding quantum yield values have been determined. In turn, the optical density measured for the  $\epsilon_{248}$  when 248nm was used, was so low that the photoionization quantum yield could not be obtained.

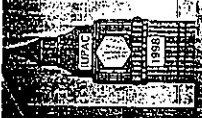
The results available so far are indicative that these triazine-based herbicides are not photodegraded to a reasonable extent by sunlight.

As an alternative method of degradation, and as a tool to understand the laser flash photolysis results, we have also studied by pulse radiolysis the reactivity of these herbicides toward several oxidizing radicals:  $\text{SO}_3^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{O}^{\cdot-}$  and toward the  $\epsilon_{\text{aq}}$

References:

- [1] Tomlin, C. *The Pesticide Manual*, 10<sup>th</sup> ed. British Crop Protection Council, Surrey (U.K.) and The Royal Society of Chemistry, Cambridge (U.K.), 1994.
- [2] Burkhard, N. and Guth, J. A.; *Pestic. Sci.*, 1976, 7, 65





9th International Congress on Pesticide Chemistry

# 9th International Congress PESTICIDE CHEMISTRY The Food-Environment Challenge

## BOOK OF ABSTRACTS

VOLUME TWO

# TOPICS 5-8



Queen Elizabeth II Conference Centre, Westminster, London, UK  
August 1998

### PHOTODEGRADATION OF TRIAZINE-BASED PESTICIDES.

M. Canle L.,<sup>a,b</sup> M.I. Fernández,<sup>a,b</sup> J.A. Santaballa,<sup>a</sup> S. Stenken<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Química Fundamental e Industrial Universidad de Cantabria, A Zapatería-s/n E-15071 A Coruña, Galicia, SPAIN. E-mail: mcanle@qfnd.az*  
<sup>b</sup> *Max-Planck Institut für Strahlenchemie, Stiftstraße, 34-36, D-45470 Mülheim an der Ruhr, GERMANY.*

Due to the massive use of herbicides in agriculture, their concentrations in natural waters, and particularly in groundwaters has constantly-increased during the last few years. This problem is specially relevant in areas with very permeable soils, due to the high levels of contamination reached in the groundwater drinking resources.<sup>1,2</sup> There is growing concern about the possible effects of such pollutants on human health and on the environment.<sup>3,4</sup>

Between the different available herbicides, those that are triazine-based are widely used,<sup>5</sup> very little information being available on their photo-initiated radical degradation pathways under conditions similar to those found in the environment.

In the framework of a wider project aiming to clarify the mechanism of photodegradation of different pesticides in aqueous solution, we studied the 193 nm laser-flash photolysis of the triazine-based sulfur-containing herbicides Ametryn, Desmetryn, Prometryn and Terbutryn. (1,3,5)-Triazine was also studied as a model compound. Photoionization was observed in all cases, with very low quantum yields ( $\Phi_{PI}=0.07, 0.07, 0.13, 0.13$  and  $0.05$ , respectively, for the mentioned compounds). The process was in all cases monophotonic. No reaction was observed upon 248 nm laser-flash photolysis. This observation implies that sun-light is not able to photodegrade these substances.

Attempts to study the one-electron oxidation with  $SO_3^-$ , using pulse radiolysis failed in turn, we have found that the rate constant for reaction between the mentioned triazines and the electron some four times higher than for reaction between the electron and  $S_2O_8^{2-}$ .

#### References.

- Galassi, S., Guzzella, L. *Activa-Aria*, 1990, 3, 231.
- Hörmann, W.D., Tourmayré, H., Egl, H. *Pest. Monit. J.*, 1979, 13, 128.
- Hodgson, E., Leff, P.E. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104, 97.
- Drevesler, V., Fingler, S., Fröhé, Z. *Chemical Safety International Reference Manual*, pp. 297-310 (1994).
- Worthing, R.C. *The pesticide manual*, 9<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Surrey (U.K.), 1991.

## PHOTODEGRADATION OF PESTICIDES COMMONLY PRESENT IN NATURAL WATERS

M. Camba <sup>1,2</sup>, M.I. Fernández <sup>1,2</sup>, S. Rodríguez <sup>1,2</sup>, J.A. Sanaballa <sup>1</sup>, S. Steenken <sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Universidad de Coruña, A Coruña, Galicia, Spain*

<sup>2</sup> *Max-Planck Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, Germany*

The massive use of pesticides in agriculture over the last years has led to an increase of their abundance in natural waters and groundwaters<sup>1</sup>. This problem is especially relevant in areas with permeable soils, due to the contamination of groundwater drinking resources<sup>2</sup>. There is growing public concern about the effects of such pollutants on human health and on the environment<sup>3</sup>.

Despite the world-wide use of pesticides<sup>4</sup>, little information is available on their mechanisms of photodegradation under conditions similar to those typically found in the environment.

As part of a wider project aiming to clarify the photodegradation mechanisms of different pesticides in aqueous solution, we are studying the laser-flash photolysis (LFP) of different pesticides, namely: carbamates, ureas, triazines. In order to identify the short-lived transients generated upon LFP, we also study by pulse radiolysis (PR) their reactivity toward different oxidizing and reducing radical inorganic species: SO<sub>4</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>, O<sup>•-</sup>, Ti<sup>2+</sup>, Br<sub>2</sub><sup>•-</sup>, N<sub>3</sub><sup>•-</sup>, e<sub>aq</sub><sup>-</sup>, etc. Here, we report some of the results obtained so far.

### References

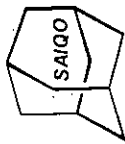
- <sup>1</sup> Spear, R.; Chap. 6 in: *Handbook of Pesticide Toxicology*; Hayes, W.J.; Laws, E.R. (Eds.), vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, 1991.
- <sup>2</sup> (a) Calassi, S.; Giocella, L. *Agua-Aria*, 1990, 3, 231. (b) Hornmann, W. D.; Younaye, H.; Egli, H. *Pest. Monit. J.*, 1979, 13, 138.
- <sup>3</sup> (a) Hodgson, R.; Leil, P.E. *Environment Health Perspectives*, 1996, 104, 97. (b) Dievschkar, V.; Fingler, S.; Froba, Z. *Chemical Safety International Reference Manual*, pp.297-310(1994).
- <sup>4</sup> Wooning, R. C. *The pesticide manual*, 9<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Surrey(U.K.), 1991.

Paterson Institute for Cancer Research  
*Free Radical Research Facility*

Second Annual User Meeting  
18-19 September 1998

### Acknowledgment

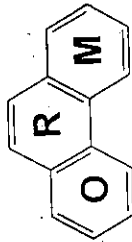
This meeting is supported by the European Commission through the Access to Large-Scale Facilities activity of the TMR Programme



(ICPOC-14) POST - CONFERENCE SYMPOSIUM

on

“Recent Advances in Organic  
Reaction Mechanisms”



Co-sponsored by  
Sociedad Argentina de Investigadores en Química Orgánica (SAIQO)

Puerto Iguazú, Misiones, ARGENTINA, August 23-24, 1998

AQUEOUS OXIDATION OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS

X.L. Armesto, M. Castejón, M.I. Fernández, M.V. García, J.A. Santaballa

Departamento de Química Fundamental e Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad de Córdoba,  
Zapatero, s/n. E-13071 A Córdoba, ESPAÑA. E-mail: mcastejon@quimica.usc.es

Aqueous halogens are world-wide used disinfectants, with controversial benefits and risks.<sup>1</sup> The correlation between halogen-based water disinfection and carcinogenicity/mutagenicity is well documented.<sup>2</sup> Different authors have reported S-based inactivation of such mutagens.<sup>3</sup> Besides, the *in vivo* halogenation<sup>3</sup> via the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> system, generates HOCl (HOBr if Br<sup>-</sup> is present), leading to processes similar to those occurring during water treatment.

We have studied the mechanism of aqueous chlorination of Cysteine and Methionine by HOCl and N-CI-Taurine (a common intracellular oxidant). Such S-amino acids show an extraordinary affinity toward aqueous chlorine. Met is quantitatively oxidized to the corresponding sulfoxide, while Cys is oxidized to Cystine. The reaction is a second-order process, the  $\gamma$  being transferred to the S of the amino acid. Sulfide amino acids (Met), react with HOCl one order of magnitude faster,  $k_{obs}(\text{Met}) = (8.7 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , than non-sulfur containing amino acids. Thiol amino acids (Cys) react two orders of magnitude faster,  $k_{obs}(\text{Cys}) = 1.2 \cdot 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , close to the diffusion-control limit. It has been found that thiol-type amino acids (Cys), can also react at a relatively high rate with ClO<sub>2</sub>,  $k_{obs}(\text{Cys}) = 1.9 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Therefore, S-groups are oxidized much readily than N-groups. The observation of mutagen inactivation by S-amino acids must be attributed to the products generated upon S-chlorination as compared to N-chlorination.

Acknowledgement: we thank F. Kanan, Erasmus student from Universidad de Padova, for collaboration

- (a) Miller, S.; *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2292. (b) Newman, A.; *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2296.
- (a) Franson, R.; Kromber, J.; *Environ. Sci. Technol.* **1994**, *28*, 2222. (b) Eder, E.; Weindlauer, E.; *Chemosphere*, **1994**, *29*, 2455.
- (a) Fritz, W.A.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *332*, 110. (b) Stevens, K.L.; Wilson, R.F.; Friedman, M.; *J. Agric. & Food Sci.* **1995**, *43*, 2424. (c) Lindvall, S.; Rydell, G.; *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, *97*, 51.

## HALOGENACIÓN DE AMINOÁCIDOS AZUFRADOS POR (N-Cl)-TAURINA

X.L. Armesto, M. Canle L., M.L. Fernández, M.V. García, J.A. Santaballa  
Departamento de Química Fundamental e Industrial,  
Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña  
A Zapateira, s/n, E-15071 A Coruña, España  
E-mail: mcanle@unica.udc.es, sebbela@mail2.udc.es, arturo@unica.udc.es

Los halogenante acuosos son muy utilizados como desinfectante, a pesar de que los compuestos que se forman durante el proceso de tratamiento<sup>1</sup> tienen propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Por este motivo sería importante entender con detalle el mecanismo de oxidación de compuestos de relevancia bioquímica, como aminoácidos. Además, estas reacciones pueden ocurrir *in vivo* en las células humanas, siendo iniciadas por el sistema enzimático mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>, el cual genera HOCl, dando lugar a procesos y productos similares a aquellos que tienen lugar durante el tratamiento del agua.<sup>1</sup>

Un aminoácido, presente en altas concentraciones en las células. Este aminoácido tiene diferentes funciones<sup>2</sup> en el cuerpo humano, antioxidante, neurotransmisor, etc, y reacciona con el HOCl<sup>4</sup> generado por el sistema enzimático mieloperoxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> en las células humanas. El producto de esta reacción es la (N-Cl)-Taurina, la cual a su vez puede oxidar diferentes grupos orgánicos.

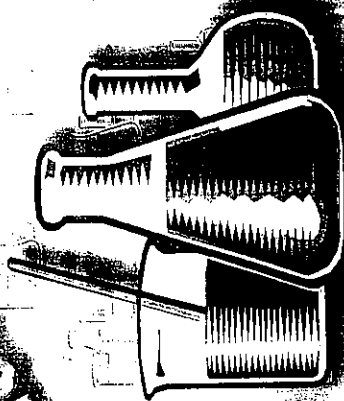
Nosotros presentamos un estudio del mecanismo de oxidación de aminoácidos azufrados por (N-Cl)-Taurina.

La reacción se ajusta a una ecuación de segundo orden, el Cl<sup>-</sup> es transferido al S del aminoácido. El proceso de oxidación es más lento que cuando se usa HOCl como agente halogenante.<sup>5</sup>

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R.L. Jolley, L.W. Condie, J.D. Johnson, S. Katz, R.A. Minear, J.S. Maitre and V.A. Jacobs, (Ed.), "Water Chlorination: Chemistry, Environmental and Health Effects", Lewis Publishers, Michigan, 1990, vols. 1-6.
2. L.A. Márquez, H.B. Dunford, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 7950.
3. (a) R.J. Huxtable, *Physiol. Rev.*, 72 (1992) 101-163. (b) H. Trachman, S. Futterweit, R.S. Bienkowski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191 (1993) 759-765.
4. E.L. Thomas, M.B. Grisham, M.M. Jefferson, *J. Clin. Invest.*, 72 (1983) 441
5. X.L. Armesto, M. Canle L., M. I. Fernández, M.V. García, J.A. Santaballa, pendiente de publicación.

XXVII REUNIÓN BIENAL DE LA R.S.E.Q.



XXVII REUNIÓN BIENAL DE LA R.S.E.Q.

La Laguna (Tenerife)  
19 al 23 de Julio 1999



PHOTO- AND RADIATION CHEMICAL DEGRADATION OF PESTICIDES  
COMMONLY OCCURRING IN NATURAL WATERS

M. Conle López,<sup>1,2</sup> M.I. Fernández,<sup>1,2</sup> S. Rodríguez,<sup>1,2</sup> J.A. Santaballa<sup>1</sup> and S. Steenköt<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Fundamental e Industria. Universidade da Coruña, A Zapateira, s/n., E-15071 A Coruña, Galicia, Spain

<sup>2</sup> Max-Planck Institut für Strahlenchemie, Stifstrasse 34-36, D-45470 Mülheim an der Ruhr, Germany

The world-wide implementation of intensive agriculture and the development of the agrochemical industry led to a fast increase in the variety of pesticides commonly occurring in natural waters.<sup>1</sup> Despite the public concern about the health- and environmental effects of such pollutants,<sup>2</sup> in most cases there are still few or no detailed mechanistic studies of their photo- and radiation chemically initiated degradation.

In the framework of a wider project aiming to clarify the degradation pathways of different types of water pollutants, we have studied by laser-flash photolysis and pulse radiolysis the early steps in the photo- and radiation chemical degradation of different pesticides, namely: carbamates, ureas and triazines.

The results obtained so far have shown rather low efficiencies of photodegradation for all the compounds under study ( $\Phi_{pr} < 0.10$ ). The photodegradation process is, in general, monophotonic when the excitation is performed at 193 nm and (in all cases) biphotonic when 248 or 266 nm light were used as exciting sources. In the case of carbamates and ureas, the main degradation pathway seems to be a Photo-Fries rearrangement, while in the case of triazines it seems to be OH-addition at the 4 position.

We have shown that the same radicals generated upon laser flash photolysis can be produced by one-electron oxidation with  $SO_4^{\cdot-}$ , using pulse radiolysis, and the corresponding oxidation rate constants were obtained. As possible alternative degradation methods, the rates of reaction of the pesticides with  $OH^{\cdot}$  and  $O^{\cdot-}$ , and the rate of one-electron reduction by  $e_{aq}^-$  were also obtained. In some cases linear free energy correlations between the reaction rate and structural parameters for the different substituents have been established.

The observations reported here imply that none of the many pesticides so far studied are able to undergo photodegradation in the environment, at least in a monophotonic fashion.

References

1. (a) Spear, R.; Chap. 6 in: *Handbook of Pesticide Toxicology*, Hayes, W.J.; Lavo, E.R. (Eds.), vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, 1991. (b) Galassi, S.; Cuvella, L.; *Acqua-Aria*, 1990, 3, 231. (c) Hormann, W. D.; Tourmyre, H.; Egli, H.; *Pest. Manag. J.* 1979, 13, 128.
2. (a) Hodgson, E.; Lefi, P.E.; *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104, 97. (b) Drevenkar, V.; Fingler, S.; *Frobe, Z. Chemical Safety International Reference Manual*, pp. 297-310 (1994).

Paterson Institute for Cancer Research

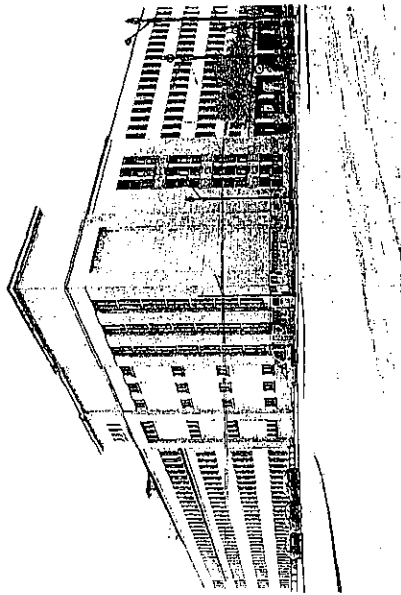
**Free Radical Research Facility**

Third Annual User Meeting  
17-18 September 1999

**Acknowledgment**

This meeting is supported by the European Commission through the  
Access to Large-Scale Facilities activity of the TMR Programme of the  
Fourth Framework

H. CONLE



Laser Flash Photolysis and Pulse Radiolysis of Pesticides Commonly Present in Natural Waters

M. Canle L.,<sup>a,b</sup> M.I. Fernández,<sup>a,b</sup> S. Rodríguez,<sup>a,b</sup> J.A. Santaballa,<sup>a</sup> S. Steenken<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Fundamental e Industrial Universidade da Coruña, A Zapateira, s/n, E-15071, A Coruña, Galicia, SPAIN. E-mail: mcanle@udc.es

<sup>b</sup> Max-Planck Institut für Strahlchemie, Söflingerstr. 34-36, D-51470, Mülheim an der Ruhr, GERMANY.

Pesticides are frequently found pollutants in aquatic ecosystems. Their extensive use in agriculture in order to increase and improve the crop production has led to a rapid rise of their presence into aquatic ecosystems, entering from agricultural runoff.<sup>1</sup> Despite the public concern about the health- and environmental effects of such pollutants,<sup>2</sup> few detailed mechanistic studies of their degradation are available.

Photodegradation is just one of many possible alterations that pesticides may suffer once dispersed in the environment. Such process may lead to harmless products or, in turn, to compounds that are as toxic or even more than the starting ones. In the framework of a project aiming to clarify the degradation pathways of different pollutants, we have studied by laser-flash photolysis and pulse radiolysis the early steps of the photo- and radiation chemical degradation of different pesticides.

The results obtained so far have shown rather low efficiencies of photodegradation for all the compounds under study ( $\Phi_{\text{H}} \leq 0.15$ ). The photodegradation process is, in general, monophotonic when the excitation is performed at 193 nm and (in all cases) biphotonic when 248 or 266 nm light were used as exciting sources.

We have shown that the same radicals generated upon laser flash photolysis can be produced by one-electron oxidation with  $\text{SO}_4^{\cdot-}$ , using pulse radiolysis, and the corresponding oxidation rate constants were obtained. As possible alternative degradation methods, the rates of reaction of the pesticides with  $\text{OH}^{\cdot}$  and  $\text{O}^{\cdot-}$ , and the rate of one-electron reduction by  $\text{e}_{\text{aq}}^{\cdot-}$  were also obtained. In some cases linear free energy correlations between the reaction rate and structural parameters for the different substituents have been established.

The observations reported here imply that none of the many pesticides so far studied are able to undergo photodegradation in the environment, at least in a monophotonic fashion.

References.

- 1 (a) Spear, R.; Chap. 6 in: *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W.J.; Laws, E.R. (Eds.), vol. 1, Academic Press, Inc., San Diego, 1991. (b) Galassi, S.; Gnesella, L. *Aqua-Aria*, 1990, 3, 231. (c) Ilomanni, W. D.; Tournayre, H.; Egli, H. *Pest. Monit. J.* 1979, 13, 128.
- 2 (a) Hodgson, E.; Lefi, P.E. *Environmental Health Perspectives*, 1996, 104, 97. (b) Drevenchik, V.; Fungler, S.; Frobo, Z. *Chemical Safety-International Reference Manual*, pp. 297-310 (1994).

# EUCMOS XXXV

XXXV EUROPEAN CONGRESS

MOLECULAR PHYSICS

## BOOK OF ABSTRACTS

Organization:  
Karl-Franz  
Eberhard

27 August - 1 September, 2000

Colmar - Portugal

Supported by the European Commission, Research DG (contract EV5V-CT93-20000)

### IDENTIFICATION AND SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF SHORT-LIVED INTERMEDIATES GENERATED UPON PHOTODEGRADATION OF PESTICIDES

P9-39

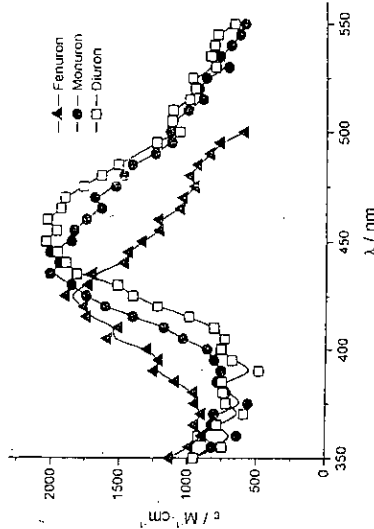
M. Canle L., M.I. Fernández, M.V. García, S. Rodríguez L.F. Rodríguez, J.A. Santaballa, S. Steenken

Departamento Química Física e Evolución Química J. Universidade da Coruña, A Zapateira s/n, E-15071 A Coruña, Spain. <sup>6</sup> Max-Planck Institut für Strahlenchemie, D-43470 Mülheim-Ruhr, Germany. mcanle@quimica.udc.es

As part of a project endeavouring to clarify the photodegradation of common pesticides, we studied by time-resolved laser-flash photolysis and pulse radiolysis, with spectroscopical detection, the mechanism of generation, and the spectral and thermodynamic properties of radicals derived from different commercially available pesticides.

In general, the photodegradation involves a photoionization process, the number of photons involved depends on the photon energy (wavelength) of the exciting light. The observed photoionization quantum yields were found to be very low for all the studied compounds. These observations imply that the different studied pesticides are not photodegraded by sunlight.

In this communication we report on the spectroscopic properties of the generated intermediates, and compare the experimental results with those theoretically obtained. The figure below shows the modifications observed in the spectrum of the short-lived intermediates generated upon photolysis of substituted *N*-phenyl-(*N*,*N*)-dimethylurea-based herbicides when zero, one or two Cl atoms are placed on the aromatic ring.







## 15<sup>th</sup> IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry

Göteborg, Sweden  
July 8-13, 2000

### *Programme and Abstracts*

Sponsored by:  
IUPAC, The Royal Swedish Academy of Sciences through its  
Nobel Institute for Chemistry, The Swedish National Committee  
for Chemistry, The Swedish Chemical Society,  
Organic Chemistry, Göteborg University

#### GENERATION AND REACTIVITY OF RADICALS DERIVED FROM *s*-TRIAZINE-BASED HERBICIDES

M. Conle L.,<sup>a,b</sup> M.L. Fernández,<sup>a,b</sup> J.A. Santaballa,<sup>a</sup> S. Sienkiewicz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Física e Ingeniería Química I, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

<sup>b</sup> Max-Planck Institut für Strahlenchemie, Stifstr., 34-36, D-45470 Mülheim/Ruhr, Germany

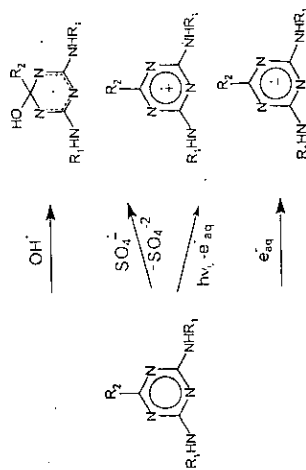
E-mail: mconle@ucl.es, ssi@mpi2.mpg.de

*s*-triazine derivatives are extensively used as herbicides. Their *in vivo* degradation takes place through dealkylation of the amino groups and hydroxylation in the sixth position. It seems that photodegradation processes may occur in a similar way.

We have studied the mechanism of photodegradation of *s*-triazine-based herbicides in aqueous solution using a combination of the pulse radiolysis and laser flash photolysis techniques.

The laser-flash photolysis studies were carried out using light of 193 and 248 nm. Very low photoionization quantum yields were observed in both cases, the 193 nm photoionization being monophotonic.

We have also studied by pulse radiolysis the addition of  $\text{OH}^\cdot$  to the aromatic ring of these *s*-triazines, as well as their one-e<sup>-</sup> oxidation by  $\text{SO}_4^{\cdot-}$  and one-e<sup>-</sup> reduction by direct reaction with e<sup>-</sup><sub>aq</sub>.



The available data allow us to establish structure-reactivity relationships, that will be shown.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
Servicio de Bibliotecas



1700744486