

Estudio cinético de la desdiazooación en medio acuoso del tetrafluorborato de benzenodiazonio

The kinetic study of dediazonation in an aqueous medium of benzenediazonium tetrafluorborate

QUINTERO^{1*} B, CABEZA^{1*} M.C, MARTINEZ-PUENTEDURA¹ M.I, GUTIÉRREZ¹ P, MARTÍNEZ¹ P.J, LLOPIS² J, ZARZUELO³ A.

¹ Dpto. Química Física. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

² Dpto. Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

³ Dpto. Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada

* Autores a los que debe ser dirigida la correspondencia: B. Quintero. Tfno: 34-958-249071.

E-mail: bqosso@ugr.es. M. C. Cabeza. Tfno.: 34-958-243826. E-mail: mccabrera@ugr.es

Trabajo financiado por la Consejería de Educación y Ciencia. Junta de Andalucía
(Convocatoria de Acciones Coordinadas)

RESUMEN

Los análisis cinéticos realizados a diferentes temperaturas (20° C - 40° C) indican que el proceso de desdiazooación del ion benzenodiazonio (BZ) es de orden uno respecto a BZ siendo $A = 2,3 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ y $E_a = 112,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ en la ecuación de Arrhenius así como $\Delta H^\ddagger = 110,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $\Delta S^\ddagger = 40,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ para la ecuación de Eyring. Los resultados cromatográficos revelan que BZ se descompone por un proceso heterolítico mediado por el catión arilo. La presencia de sales Cu(I) o de Cu(II) y ácido ascórbico produce un cambio del mecanismo de reacción. Los compuestos intermedios originados en estas condiciones son especies estables que pueden ser transportadas en la sangre. El modelo estudiado sugiere una posible explicación para la localización descrita en la literatura para los tumores producidos por la administración de BZ a ratas.

PALABRAS CLAVES: Catión arilo. Cinética. Compuestos genotóxicos. Desdiazooación. HPLC. Ion benzenodiazonio. Mecanismos de desdiazooación.

ABSTRACT

The kinetic analyses carried out at different temperatures (20°C - 40°C) indicate that the dediazonation process of the benzenediazonium ion (BZ) is of the order of one, with BZ at $A = 2,3 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ and $E_a = 112,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for the Arrhenius equation, and $\Delta H^\ddagger = 110,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\ddagger = 40,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ for the Eyring equation. The chromatographic results reveal that BZ decomposes through a heterolytic process mediated by the aryl ion. The presence of Cu(I) or Cu(II) salts and ascorbic acid produce a change in the reaction mechanism. The intermediate compounds produced in these conditions are stable species that may be transported in the bloodstream. The model studied suggests a possible explanation for the localisation of tumours produced by the administration of BZ in rats.

KEY WORDS: Aryl cation. kinetics. Genotoxic compounds. Dediazonation. HPLC. Benzenediazonium ion. Dediazonation mechanism.

INTRODUCCIÓN

Es conocido que los iones arenodiazonios poseen capacidad mutagénica y carcinogénica¹⁻²⁰. Sin embargo, los mecanismos implicados en la genotoxicidad de los compuestos arenodiazonios se conocen sólo parcialmente y existen ciertas discrepancias acerca de cual es exactamente el agente causal. Así en los primeros estudios de la reacción entre nucleobases e iones arenodiazonios²¹⁻²² se sugirió la posible acción genotóxica directa de los propios iones arenodiazonios tomando como base la aparición de productos finales tales como C⁶-NH₂ y C²-NH₂ triacenos derivados de adenina, adenosina y guanosa 5'-monofosfato. Así mismo se han obtenido evidencias indirectas de la formación de aductos triacenos en restos adenina del ADN²³. En algún caso se ha indicado la posibilidad de que los daños observados en ADN en su reacción con iones arenodiazonios, pudieran estar originados por una acción simultánea de estos iones y del radical arilo derivado de ellos²⁴. De otro lado, la formación del aducto triacénico ha sido considerada como una etapa intermedia en la arilación de los restos adenina del ADN²⁵. Además, el efecto de los radicales arilos no parece limitado al ataque sobre las bases sino que también se les ha asociado a la fractura inespecífica de las cadenas de ADN²⁶⁻²⁹. Más recientemente se han aportado datos sobre la capacidad de los radicales centrados en el carbono formados a partir del ion *p*-metilbencenodiazonio, para provocar la activación de AP-1 y fosforilación de las proteínas ERK1, ERK2 y p38 al igual que lo hacen el anión superóxido y el radical hidroxilo³⁰.

Los principales efectos observados en la interacción entre iones arenodiazonios y nucleobases, nucleósidos y polinucleótidos sintéticos y naturales, han sido atribuidos a los radicales arilos dada la facilidad con la que se produce *in vitro* la arilación de los citados sustratos³¹. Por otra parte, el hecho de que un número importante de los agentes reductores *in vitro* son también reductores en el ámbito celular hace que el proceso de aparición del radical arilo *in vivo* pueda suponerse que tiene también una alta posibilidad de producirse. Sin embargo, no se ha encontrado una evidencia definitiva de que los daños en el ADN que confieren capacidad carcinogénica a los iones arenodiazonios sean debidos al ataque directo de los radicales arilos procedentes de los citados iones.

INTRODUCTION

It is already well known that the arenediazonium ions possess mutagenic and carcinogenic capacity¹⁻²⁰. However, the mechanisms involved in the genotoxicity of the arenediazonium compounds are only partially known and certain discrepancies exist as to which of the agents is responsible. Therefore, in the first studies of the reaction between nucleobases and arenediazonium ions²¹⁻²², the possibility of a direct genotoxic action from the arenediazonium ions themselves was suggested on the basis of the appearance of final products, such as C⁶-NH₂ y C²-NH₂ triazines derived from adenine, adenosine and guanosine 5'-monophosphate. Additionally, indirect evidence of the formation of triazine adducts of adenine residues DNA²³ have been encountered. In some cases, the damage caused to the DNA, observed in the reaction with arenediazonium ions, indicates the possibility that this may be result of the simultaneous action of these ions and the resulting aryl radical derived from them. On the other hand, the formation of the triazine adduct has been considered as an intermediary stage in the arylation of adenine residues in DNA²⁵. Furthermore, the effect of radical aryls does not seem to be limited to an attack upon the bases, but has also been associated with the unspecific DNA strand breakage²⁶⁻²⁹. More recently further data has been provided on the capacity of the carbon centered radicals, formed from the *p*-methyl benzenediazonium ion, to bring about the activation of AP-1 and the phosphorylation of the proteins ERK1, ERK2 & p38k, just as is the case with the superoxide anion and hydroxyl radicals³⁰.

The main effects observed in the interaction between arenediazonium ions and nucleobases, nucleosides and synthetic and natural polynucleotides, have been attributed to the aryl radicals, given the ease with which the arylation of such substrates occur under *in vitro* conditions³¹. On the other hand, the fact that a high number of reducing agents *in vitro* are also present in a cellular context, may lead us to the suppose that there is a good possibility that the aryl radical may also appear under *in vivo* conditions. However, no definitive evidence has been found to suggest that the damage to the DNA, which confers the arenediazonium ions with their carcinogenic capacity, is to be attributed to a direct attack by the aryl radicals that are liberated from such ions.

En cualquier caso, parece bien establecido que la toxicidad de los iones arenodiazonios es el resultado de la aparición de compuestos muy reactivos en el proceso de desdiazooación. Se admite que las vías fundamentales de desdiazooación incluyen los procesos que transcurren a través de mecanismos heterolíticos y homolíticos³² donde son especies intermedias el catión arilo y el radical arilo respectivamente. Ambos mecanismos pueden presentarse de forma simultánea y competitiva dependiendo de las condiciones experimentales bajo las cuales tenga lugar la desdiazooación tal como ha sido sugerido por varios autores³³.

El presente estudio analiza la desdiazooación de BZ en medio acuoso adicionado de NaCl en la misma proporción que se ha mostrado tumorigénica en ratas¹⁹.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aparatos

El análisis elemental de BZ se realizó en un analizador elemental Fisons Carlo Erba EA 1108 del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Cintra 10 con termostatación por baño externo Frigomix (precisión $\pm 0,1$ °C). Las medidas de HPLC fueron realizadas en un cromatógrafo Merck-Hitachi, provisto de bomba L-7100 Lab-Chrom con aplicación para tratamiento de datos D-7000 HSM. Las fases acuosas fueron filtradas por un sistema Millipore con tamaño de poro 0,45 μm . Se empleó una columna Kromasil C18 (4,6 mm x 250 mm) con tamaño de partícula de 5 μm con una precolumna LiChrospher C18 100. Los disolventes se desgasificaron por sonicación. Las fases móviles empleadas fueron acetonitrilo: agua (30:70) y acetonitrilo:agua (70:30) con flujo isocrático de 1 mL.min⁻¹ en ambos casos. Las medidas de pH se efectuaron en un potenciómetro calibrado Crison GLP 22.

Reactivos

Se ha obtenido la sal tetrafluorborato de BZ de acuerdo con el método descrito por Canning y col.³⁴. El análisis elemental del compuesto

In any case, it does seem to be well established that the toxicity of the arenediazonium ions is the result of the appearance of very reactive compounds in the dediazonation process. It has been accepted that the fundamental dediazonation pathways include the processes that occur through the heterolytic and homolytic mechanisms³², where the aryl cation and the aryl radical are the respective intermediate species. As suggested by several authors³³, both mechanisms may appear simultaneously or competitively, depending on the experimental conditions under which dediazonation takes place.

The present study analyses the dediazonation of BZ in aqueous medium with added NaCl in the same proportion that has previously been shown to be tumorigenic in rats¹⁹.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus

Elemental BZ analysis was carried out in an elemental Fisons Carlo Erba EA 1108 analyser from the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada. The spectrophotometric measurements were carried out in an Cintra 10 spectrophotometer with thermostatic control being made through an external Frigomix bath (precision ± 0.1 °C). The HPLC measurements were carried out in a Merck-Hitachi chromatograph with a LaChrom L-7100 HPLC pump. All computations were performed using the Merck D-7000 HSM data system. The aqueous phases were filtered with a Millipore system with a pore size of 0.45 μm . A Kromasil C18 Column (4.6 mm x 250 mm) with a particle size of 5 μm and a LiChrospher C18 100 precolumn was used and the solvents were degassed through sonification. The mobile phases used were acetonitrile: water (30:70) and acetonitrile:water (70:30) with an isocratic flow of 1 mL.min⁻¹ in both cases. pH measurements were performed in a Crison GLP 22 calibrated potentiometer.

Reactives

The BZ tetrafluorborate salt was obtained in accordance with the method described by Canning y col.³⁴. The elemental analysis of the com-

obtenido dio los siguientes resultados Calc.: C(37,54%); N(14,60%); H(2,63%) Encontrado: C(37,29%); N(14,49%); H(2,98%). En la preparación de las disoluciones se utilizó agua bidestilada. Los reactivos y disolventes empleados fueron de un alto grado de pureza y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Para las medidas cromatográficas se emplearon disolventes de grado HPLC.

Medidas cinéticas

Las medidas cinéticas se efectuaron utilizando disoluciones acuosas de BZ (conc = 1.10^{-4} M) en presencia de un 0,9 % de NaCl (pH = 6,01). Las medidas espectrofotométricas se efectuaron en el intervalo de 220 nm a 500 nm con las muestras termostatadas en la cubeta del espectrofotómetro. Los datos espectrofotométricos fueron tomados a intervalos regulares de tiempo ajustando el funcionamiento del aparato mediante un programa diseñado a tal efecto. Las medidas se realizaron hasta que se completó más del 70% de la descomposición de BZ en todas aquellas pruebas en las que ello fue posible (temperatura > 30 °C). Para las pruebas realizadas en presencia de ion Cu(I) se preparó una disolución 1.10^{-4} M de CuCl en disolución acuosa de NaCl al 0,9 %.

Medidas cromatográficas

En algunos experimentos se emplearon disoluciones acuosas de BZ ($9,52.10^{-3}$ M) adicionadas de NaCl 0,9% mantenidas a 37 °C durante 90 min.. Al cabo de ese tiempo se inyectaron 20 µL de la muestra previamente filtrada y se obtuvieron los cromatogramas en un margen de tiempo de 30 minutos. Otras experiencias se realizaron utilizando disoluciones tamponadas (tampón fosfato 0,2 M; pH 7,5) de BZ ($2,60.10^{-3}$ M) adicionadas de NaCl 0,9 % en presencia y ausencia de ácido ascórbico 0,003 M y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($4,62.10^{-5}$ M) que se mantuvieron a temperatura constante de 37 °C. La identificación de las principales señales cromatográficas se realizó por comparación con las obtenidas en los cromatogramas de los compuestos puros registrados en las mismas condiciones experimentales.

pound obtained gave the following results: Calculated: C(37.54%); N(14.60%); H(2.63%) Found: C(37.29%); N(14.49%); H(2.98%). In the preparation of the solutions Doubly distilled water from a Millipore system was used. The reactives and solvents used were of a high degree of purity and were used without further purification. HPLC grade solvents were used for the chromatographic measurements.

Kinetic measurements

The kinetic measurements were performed using aqueous solutions of BZ (con. = 1.10^{-4} M) containing NaCl (0.9%) (pH = 6.01). The spectrophotometric measurements were performed at the interval of 220 to 500 nm by placing the samples directly into the thermostated spectrophotometric cell. The spectrophotometric data were taken at regular intervals of time by using a program designed for such a purpose. The measurements were carried out until over 70% of BZ had been decomposed in all of the kinetic experiments, where such a possibility existed (temperature > 30 °C). With regard to the tests carried out in the presence of the Cu(I) ion, a solution of CuCl 1.10^{-4} M in an aqueous solution of NaCl (0.9 %) was prepared.

Chromatographic measurements

In some experiments aqueous solutions kept at 37°C during 90 min. of BZ ($9,52.10^{-3}$ M) with added NaCl (0.9%) were used. 20µL of previously filtered sample was subsequently injected and the chromatograms were attained within a time period of 30 minutes. In other cases, buffered solutions (buffer phosphate 0.2M; pH 7.5) of BZ ($2,60.10^{-3}$ M) with added NaCl (0.9%) were used in the presence or absence of ascorbic acid (0.003 M) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($4,62.10^{-5}$ M). The solutions were kept in all cases at a constant temperature of 37°C. The identification of the main chromatographic signals was carried out through comparison with the chromatograms obtained from the pure compounds that were registered under the same experimental conditions.

RESULTADOS

En pruebas previas se ha comprobado que las disoluciones acuosas de BZ son estables tanto a la irradiación ambiental como a la irradiación de los aparatos de medida. Muestras irradiadas a la luz del laboratorio o por la fuente luminosa del espectrofotómetro presentaron los mismos espectros de absorción que muestras alícuotas mantenidas en oscuridad.

La absorción de BZ en medio acuoso se caracteriza por la presencia de una banda de absorción con un máximo a 262 nm ($\epsilon = 12011 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y un hombro situado hacia 294 nm. La descomposición de BZ en medio acuoso adicionado de NaCl provoca la disminución de la intensidad de la banda de absorción. En la Figura 1 se muestran los espectros de absorción registrados a distintos tiempos con muestras de BZ disueltas en agua en presencia de NaCl 0,9 % a 37 °C. Se puede apreciar, en efecto, una disminución de absorbancia en la banda con máximo a 262 nm sin cambios significativos en su perfil. Se puede apreciar igualmente la aparición de un punto isobéptico hacia 225 nm lo que sugiere la transformación de BZ en un único producto.

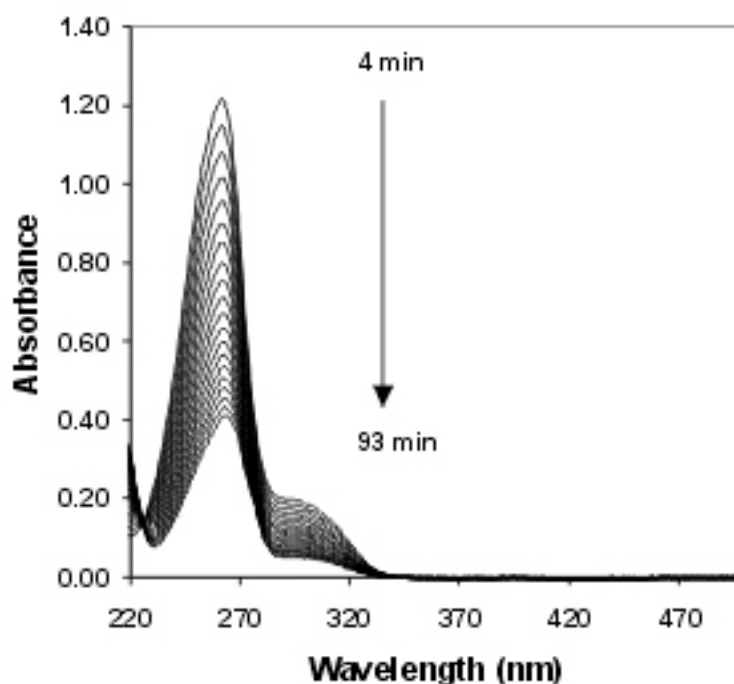
RESULTS

In previous tests, the aqueous BZ solutions were seen to be stable, being neither susceptible to environmental irradiation or the irradiation given off by the apparatus used for taking the measurements. In fact, the samples irradiated from exposure to laboratory light or to the light from the spectrophotometer, presented the same absorption spectra as the aliquot samples kept in darkness.

The absorption of BZ in aqueous medium is characterised by the presence of a maximum absorption located at 262 nm ($\epsilon = 12011 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) and a shoulder situated around 294 nm. The decomposition of BZ in aqueous medium with added NaCl caused a decrease in the intensity of the absorption. In Figure 1, the absorption spectra registered at different times, for BZ samples dissolved in water, in the presence of NaCl (0.9 %) at 37 °C, may be observed. It is noticeable a decrease in absorbance at 262 nm without significant changes in the spectrum shape. The appearance of an isobestic point at 225 nm can also be observed, which suggests the transformation of BZ into a single product.

FIGURA 1. Espectros de absorción medidos a diferentes tiempos con una disolución acuosa de BZ (1.10^{-4} M) adicionada de NaCl (0,9 %) (Temperatura = 37 °C).

FIGURE 1. Absorption spectra measured at different times with an aqueous solution of BZ (1.10^{-4} M) with added NaCl (0.9 %) (Temperature = 37°C).



El análisis cromatográfico por HPLC de una muestra de BZ mantenida a 37 °C durante 90 minutos en medio acuoso adicionado de NaCl (0,9 %) indica que BZ se descompone para dar fenol como principal producto. La señal cromatográfica con un tiempo de retención de 9,89 minutos ha sido asignada al fenol ya que el tiempo de retención y el espectro de absorción ($\lambda_{\max} = 271,6 \text{ nm}$) asociado a esta señal concuerda con el que aparece en el cromatograma registrado con fenol puro.

La Figura 2 muestra el descenso de la concentración de BZ como resultado del proceso de dediazonación a diferentes temperaturas. Los datos de concentración se han calculado de acuerdo con la expresión

$$[BZ] = \frac{A^{262} - [BZ]_o \epsilon_p^{262}}{\epsilon_{BZ}^{262} - \epsilon_p^{262}}$$

donde A^{262} representa la absorbancia medida a 262 nm; $[BZ]_o$ la concentración inicial de BZ; ϵ_{BZ}^{262} el coeficiente de extinción molar de BZ a 262 nm y ϵ_p^{262} el coeficiente de extinción molar del fenol a 262 nm ($1208 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Se ha admitido, por tanto, que la transformación de BZ en fenol da lugar a una absorbancia residual a 262 nm que es considerada en el cálculo de la concentración de BZ.

También se puede observar en la Figura 2 que se obtiene un buen ajuste a una cinética de orden 1 que se justifica admitiendo que

Chromatographic analyses of a BZ sample kept at 37°C for 90 minutes in aqueous medium with added NaCl (0.9 %), indicate that BZ decomposes and yields phenol as its main product. The chromatographic signal with a retention time of 9.89 minutes has been assigned to phenol, given that such a retention time and the absorption spectra ($\lambda_{\max} = 271.6 \text{ nm}$) associated with this signal, coincide with those registered for pure phenol.

Figure 2 shows the decrease in the concentration of BZ as a result of a process of dediazonation at different temperatures. The concentration data have been calculated in accordance with the following expression:

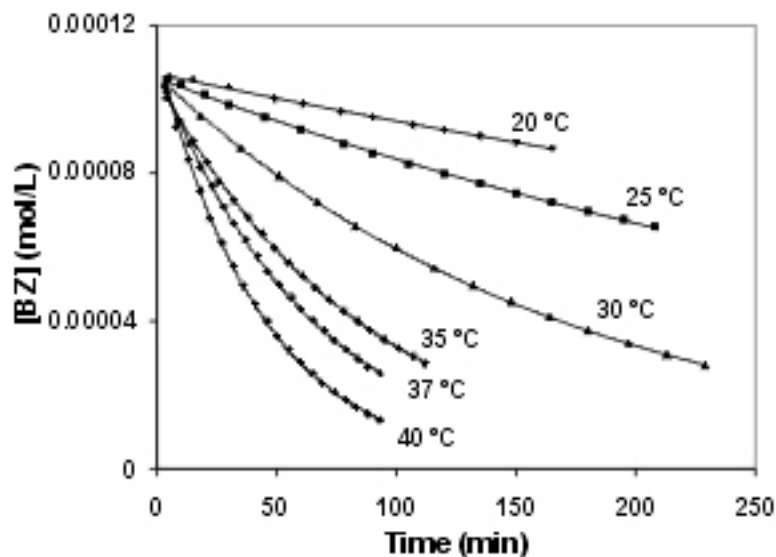
where A^{262} represents absorbance measured at 262 nm; $[BZ]_o$ the initial BZ concentration; ϵ_{BZ}^{262} the molar absorption coefficient for BZ at 262 nm and ϵ_p^{262} the molar absorption coefficient for phenol at 262 nm ($1208 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). It has therefore been accepted that the transformation of BZ into phenol gives rise to a residual absorbance at 262 nm, which has been considered in the calculation of the BZ concentration.

It can also be observed in Figure 2 that the calculation fits a kinetics of first order, which can be justified by accepting that the BZ dediazonation process occurs according to the following rate equation:

$$-\frac{d[BZ]}{dt} = k_{obs} [BZ]$$

FIGURA 2. Variación de la concentración de BZ en función del tiempo obtenida a partir de disoluciones acuosas de BZ (1.10^{-4} M) adicionadas de NaCl (0,9 %) a diferentes temperaturas.

FIGURE 2. Plots of BZ concentrations vs. time. Concentration data were calculated from the absorbance measured at 262 nm with aqueous solutions of BZ (1.10^{-4} M) with added NaCl (0,9 %) at different temperatures.



Los valores de k_{obs} a las diferentes temperaturas aparecen relacionados en la Tabla 1, junto a los coeficientes de regresión de las rectas ajustadas en cada caso. El valor obtenido a 25 °C, $38,3.10^{-6} s^{-1}$ es próximo a $35,1.10^{-6} s^{-1}$ encontrado por Maskill y McCrudden³⁴. Así mismo, el resultado hallado para k_{obs} a 35 °C ($1,9.10^{-4} s^{-1}$) coincide muy bien con el valor $2,0.10^{-4} s^{-1}$ recogido en la literatura³⁶.

The k_{obs} values calculated from the integrated rate equation for the dediazonation of BZ at the different temperatures are indicated in table I, together with the regression coefficients for the fitted lines in each case. The value obtained at 25°C, $38.3.10^{-6} s^{-1}$ is close to $35.1.10^{-6} s^{-1}$ found by Maskill and McCrudden³⁴. Similarly, the result found for k_{obs} at 35°C ($1.9.10^{-4} s^{-1}$) closely coincides with the value $2.0.10^{-4} s^{-1}$ reported elsewhere³⁶.

TABLA 1. Valores de k_{obs} obtenida en el análisis cinético de los datos experimentales obtenidos en la degradación de BZ en medio acuoso adicionado de NaCl (0,9 %) a diferentes temperaturas. Valores de los coeficientes de regresión de las rectas ajustadas (R^2).

TABLE 1. k_{obs} values obtained from kinetic analysis of the experimental data obtained in the dediazonation of BZ in an aqueous medium with added NaCl (0.9%) at different temperatures. Regression coefficient values of the fitted lines (R^2).

T (°C)	k_{obs} (s^{-1})	R^2
20	$21.7.10^{-6}$	0.9980
25	$38.3.10^{-6}$	0.9995
30	$96.7.10^{-6}$	0.9999
35	$193.3.10^{-6}$	0.9999
37	$256.7.10^{-6}$	0.9996
40	$383.3.10^{-6}$	0.9997

Los valores de las constantes de velocidad observadas permiten determinar los valores de A y E_a en la ecuación de Arrhenius que resultaron ser $2,3 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ y $112,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente que se corresponden bastante bien con los valores recogidos en la literatura³⁶: $3,5 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ y $113 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Así mismo, utilizando los valores experimentales de k_{obs} es posible determinar los parámetros de la ecuación de Eyring. El buen ajuste encontrado para los datos, según se aprecia en la Figura 3, supone la confirmación de que, en el margen de temperatura analizado, la entropía y entalpía de activación son prácticamente independientes de la temperatura lo que permite calcular un valor de $110,0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para ΔH^\ddagger y de $40,7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ para ΔS^\ddagger . Estos valores son concordantes con los citados por Canning y col³⁴, quienes obtienen $109 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $37 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente para el proceso de desdiazación de BZ a 25°C . Los valores positivos encontrados para ΔS^\ddagger y el alto valor de ΔH^\ddagger son característicos de reacciones unimoleculares S_N1 en compuestos alifáticos³⁷ y son valores típicos encontrados en las reacciones de desdiazación heterolíticas de los iones arenodiazonios^{34,38} en presencia de nucleófilos débilmente básicos. Dichos procesos están mediados por el catión arilo cuya alta reactividad y escasa especificidad permiten su rápida reacción con los nucleófilos disponibles³², en este caso los iones hidroxilos del medio para dar fenol, según un proceso unimolecular S_N1

From the rate constants, the values for A and E_a in the Arrhenius equation, were calculated to be $2.3 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ and $112.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectively, coinciding closely with the values previously published³⁶: $3.5 \cdot 10^{15} \text{ s}^{-1}$ and $113 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Similarly, using the experimental values for k_{obs} it is possible to determine the parameters of the Eyring equation. As may be appreciated in Figure 3, the good fit found for this data, enables us to confirm that within the temperature range analysed, the entropy and enthalpy of activation are practically independent of temperature, thus enabling us to calculate a value of $110.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ for ΔH^\ddagger and $40.7 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ for ΔS^\ddagger . These values are consistent with those reported by Canning y col³⁴, who obtained $109 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $37 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectively, in the BZ dediazonation process at 25°C . The positive values found for ΔS^\ddagger and the high value for ΔH^\ddagger are characteristic of S_N1 unimolecular reactions in aliphatic compounds³⁷ and are typical values found in heterolytic dediazonation reactions of the arenediazonium ions^{34,38} in the presence of weakly basic nucleophiles. Such processes are mediated by the aryl cation whose high reactivity and low specificity permit its rapid reaction with the nucleophiles available³², in this case the hydroxyl ions, to give phenol, in accordance with a S_N1 unimolecular process.

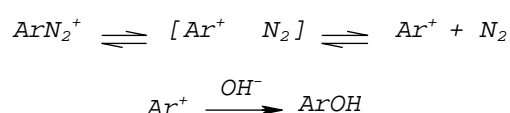
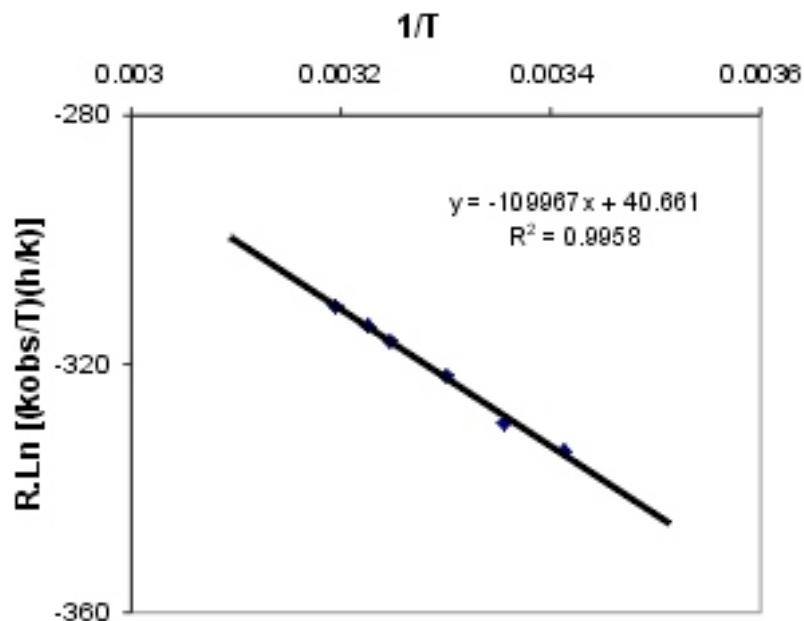


FIGURA 3. Representación de los datos experimentales y ajuste de los mismos a la ecuación de Eyring. Insertos aparecen los parámetros del ajuste.

FIGURE 3. Plot of the Eyring equation for the experimental data obtained in the decomposition of BZ at different temperatures.



Por otra parte, en presencia de CuCl la velocidad del proceso de descomposición de BZ se ve incrementada tal como se puede apreciar en la Figura 4 en donde se comparan las curvas obtenidas al representar los valores de absorbancia a 262 nm medidos con disoluciones de BZ termostatadas a 37 °C en ausencia de CuCl y en presencia de dos concentraciones de CuCl. El incremento de la velocidad del proceso en presencia del ión Cu(I) viene acompañado por la aparición de una absorción hacia 368 nm y la pérdida del punto isobéptico a 225 nm (Figura 5). Estas características no se observan en las pruebas realizadas en ausencia del citado ión. Se puede, además, comprobar que los espectros obtenidos tras 92 minutos de reacción en presencia de CuCl, son claramente diferentes del que se obtiene tras el mismo tiempo de reacción en ausencia de CuCl (Figura 6).

On the other hand, in the presence of CuCl, the rate of the process of decomposition of BZ is increased (Figure 4). In this figure it is possible to compare the curves obtained from the absorbance values measured at 262 nm and different times with solutions of BZ kept at 37°C, both in the absence of CuCl and in the presence of two CuCl concentrations. The increase in the rate of the process in the presence of Cu(I) ion is accompanied by the appearance of an absorption around 368 nm and the loss of the isosbetic point at 225 nm (Figure 5). These characteristics were not observed in the experiments carried out in the absence of Cu(I) ion. Furthermore, it can be seen that the spectra obtained after 92 minutes of reaction in the presence of CuCl, are clearly different from that which is obtained after the same reaction time in the absence of CuCl (Figure 6).

FIGURA 4. Variación de la absorbancia medida a 262 nm con disoluciones de BZ (1.10^{-4} M) adicionadas de NaCl (0,9 %) mantenidas a 37 °C en ausencia de Cu(I) (curva 1) y en presencia de Cu(I) (1.10^{-4} M) (curva 2). Para la obtención de los datos de la curva 3 se utilizó una disolución de BZ (1.10^{-4} M) preparada con una disolución saturada con CuCl ($1,73 \cdot 10^{-3}$ M) y previamente filtrada.

FIGURE 4. Variation in absorbance measured at 262 nm with BZ solutions (1.10^{-4} M) with added NaCl (0.9 %) maintained at 37°C in the absence of Cu(I) (curve 1) and in the presence of Cu(I) (1.10^{-4} M) (curve 2). In order to obtain the data for curve 3, a solution of BZ (1.10^{-4} M) prepared with a previously filtered saturated solution of CuCl ($1.73 \cdot 10^{-3}$ M) was used.

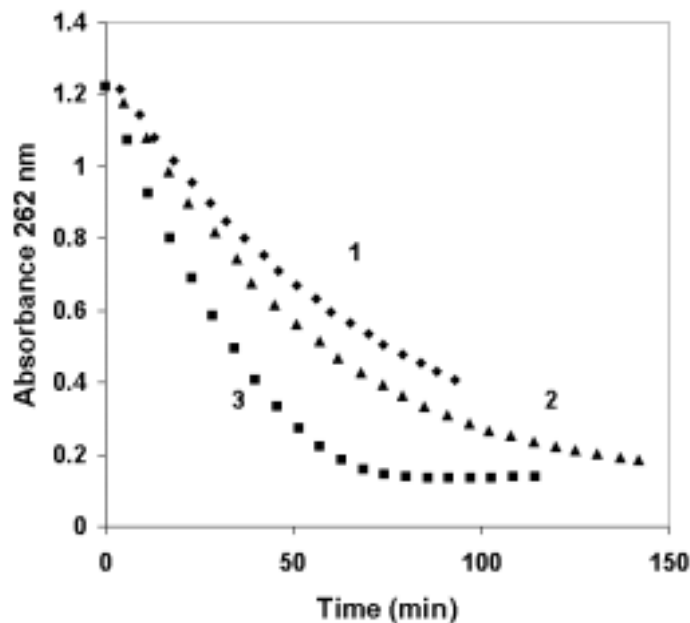


FIGURA 5. Espectros de absorción medidos a diferentes tiempos con una disolución acuosa de BZ (1.10^{-4} M) adicionada de NaCl (0,9 %) (Temperatura = 37 °C) preparada con una disolución saturada con CuCl ($1,73 \cdot 10^{-3}$ M) y previamente filtrada.

FIGURE 5. Absorption spectra measured at different times with an aqueous solution of BZ (1.10^{-4} M) with added NaCl (0.9 %) (Temperature = 37°C), prepared with a previously filtered saturated aqueous solution of CuCl ($1.73 \cdot 10^{-3}$ M).

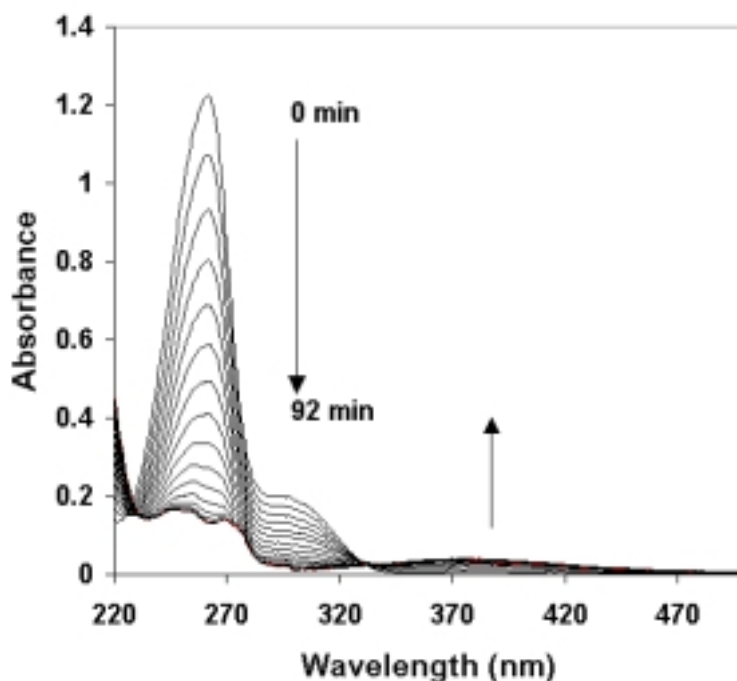
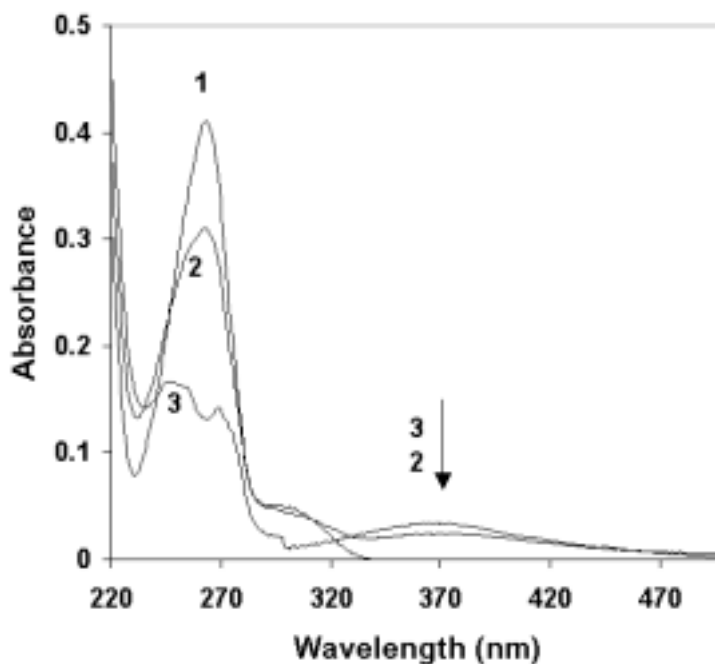


FIGURA 6. Comparación de los espectros de absorción registrados con disoluciones acuosas tamponadas (tampón fosfato 0,2M, pH=7,5) de BZ (1.10^{-4} M) adicionadas de NaCl (0,9%) mantenidas a 37 °C durante 92 minutos en ausencia de Cu(I) (espectro 1) y en presencia de Cu(I) (1.10^{-4} M) (espectro 2). El espectro 3 fue registrado con una disolución de BZ (1.10^{-4} M) preparada con una disolución saturada con CuCl ($1,73 \cdot 10^{-3}$ M) y previamente filtrada.

FIGURE 6. Comparison of the absorption spectra registered with buffered aqueous solutions (Phosphate buffer 0.2M, pH=7.5) of BZ (1.10^{-4} M) with added NaCl (0.9%) maintained at 37°C for 92 minutes in the absence of Cu(I) (spectrum 1) and in the presence of Cu(I) (1.10^{-4} M) (spectrum 2). Spectrum 3 was registered with a solution of BZ (1.10^{-4} M) prepared with a previously filtered saturated solution of CuCl ($1,73 \cdot 10^{-3}$ M).



Por otra parte, se ha realizado un análisis cromatográfico de la reducción de BZ a pH 7,5 en presencia de CuSO_4 utilizando ácido ascórbico como iniciador. Los resultados se muestran en la Figura 7. El cromatograma registrado inmediatamente después de preparar la disolución de BZ en medio tamponado y en ausencia del ion cobre y del ácido ascórbico (Figura 7.A) muestra una señal intensa que solapa otra señal más débil con tiempo de retención a 5,53 min. El espectro asociado a esta señal presenta una banda de absorción hacia 350 nm por lo que puede ser perfectamente diferenciada de la señal de BZ que no absorbe en esa zona. No se ha hecho ningún intento por identificar al producto que origina esta señal. Tras 60 minutos de termostatación a 37 °C, se registró de nuevo el cromatograma a esta muestra previa filtración ya que se había formado una cantidad importante de un precipitado oscuro. El cromatograma del filtrado (Figura 7.B) presenta una reducción significativa de la señal debida a BZ (tiempo de retención < 3 minutos). Se advierte igualmente

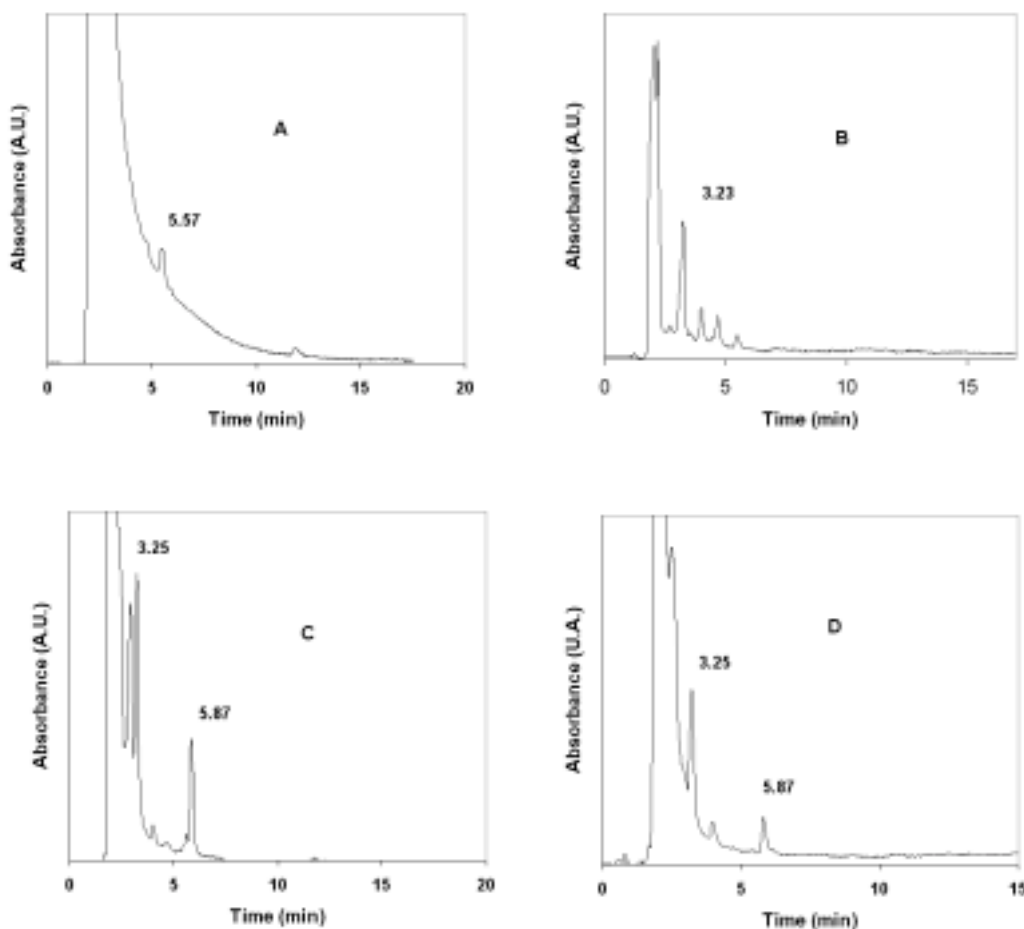
On the other hand, a chromatographic analysis of the reduction of BZ at pH 7.5 in the presence of CuSO_4 using ascorbic acid as initiator was carried out. The results are shown in Figure 7. The chromatogram registered immediately after preparing the BZ solution in buffered medium and in the absence of the copper ion and ascorbic acid (Figure 7A), shows an intense signal that overlaps another weaker signal with a retention time at 5.53 min. The spectrum associated with this signal presents an absorption wavelength around 350 nm, this being clearly differentiated from the BZ signal, which does not present absorption within this area. No attempt has been made to identify the species that produces this signal. After 60 minutes kept at 37°C, this sample was again analysed after a filtration to eliminate the dark precipitate formed. The chromatogram of the filtered sample (Figure 7B) presents a significant reduction in the signal corresponding to BZ (retention time < 3 minutes). The presence of a signal with a retention time of 3.23 minutes can also be observed. This retention time coin-

la presencia de una señal con un tiempo de retención de 3,23 minutos que es el mismo tiempo de retención obtenido con fenol puro. Además, el espectro de absorción asociado a esta señal coincide con el que aparece asociado a la señal del cromatograma obtenido con fenol puro. Cuando la muestra de BZ se trata con CuSO_4 /ácido ascórbico el cromatograma registrado tras preparar la disolución (Figura 7.C) muestra señales a 3,25 y 5,87 minutos que han sido identificadas por los tiempos de retención y los espectros de absorción, como correspondientes al fenol y benceno respectivamente. Estos resultados se reproducen en el cromatograma de la misma muestra después de 60 minutos termostatada a 37 °C y previa filtración (Figura 7.D).

cides with that obtained with pure phenol. Additionally, the absorption spectra associated with this signal also coincides with the chromatographic signal obtained with pure phenol. When the BZ sample is treated with CuSO_4 /ascorbic acid the chromatogram registered with a recently prepared solution (Figure 7C) shows signals at 3.25 and 5.87 minutes. These retention times and the absorption spectra obtained correspond to phenol and benzene, respectively. These results are reproduced in the chromatogram of the same sample after 60 minutes kept at 37°C and previous filtration (Figure 7D).

FIGURA 7. Cromatogramas registrados con disoluciones de BZ ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) en disoluciones tamponadas (tampón fosfato 0,2 M pH=7,5) adicionadas de NaCl (0,9%) en ausencia (A,B) y en presencia (C,D) de Cu(II) ($4,62 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) y ácido ascórbico (0,003 M) con muestras recién preparadas (A,C) y tras ser mantenidas a 37 °C durante 60 minutos (B,D). Fase móvil: acetonitrilo:agua (70/30). Flujo: 1 mL.min⁻¹. Longitud de onda de análisis: 255 nm.

FIGURE 7. Chromatograms registered with solutions of BZ ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) in buffered solutions (phosphate buffer 0,2 M pH=7,5) with added NaCl (0,9%) in the absence of (A,B) and in the presence of (C,D) Cu(II) ($4,62 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) and ascorbic acid (0,003 M) with freshly prepared samples (A,C) and after having been maintained at 37°C for 60 minutes (B,D). Mobile phase: acetonitrile:water (70/30). Flow: 1 mL.min⁻¹. Wavelength: 255 nm.



DISCUSIÓN

Los resultados recogidos en el presente trabajo coinciden con los datos recogidos en la bibliografía y confirman que BZ se degrada con facilidad en medio acuoso adicionado de NaCl. Este medio ha sido utilizado en el análisis de la incidencia tumoral en ratas producida por la administración de BZ¹⁹. Administrados por vía subcutánea, los iones arenodiazonios dan lugar, en general, a la aparición de tumores subcutáneos probablemente como resultado de la alta reactividad de algunas de las especies derivadas de estos iones lo que lleva a que su acción tóxica se produzca en el mismo lugar donde se administran. Sin embargo, en algunos casos la aparición de tumores se produce en lugares alejados del punto de administración y se ha sugerido que ello es probablemente debido a la formación de compuestos intermedios, tales como triacenos, que estabilizan al ión arenodiazonio y permiten su transporte hasta el punto donde actúan³⁹. En concreto el ión benzenodiazonio (BZ) administrado subcutáneamente a ratas en dosis repetidas de 25 µg/g peso corporal durante 10 semanas, origina la aparición de tumores en el tejido subcutáneo en un porcentaje relativamente pequeño de los animales tratados (aprox. 8%). Por otra parte, en animales tratados con dosis repetidas de BZ por vía oral se produce una significativa incidencia de tumores en el pulmón (52-62 %) en tanto que la incidencia de tumores en el tracto gastrointestinal es estadísticamente irrelevante¹⁹.

La facilidad con la que se produce la transformación del ión en el catión arilo a 37 °C junto a la rápida y poco selectiva reacción de este ión con cualquier nucleófilo presente en el punto de administración de BZ podrían dar como resultado compuestos estables tales como fenol. No hay, que sepamos, descrito en la literatura efectos tóxicos que se manifiesten con la aparición de tumores en pulmón. Debe considerarse, en consecuencia, la posibilidad de que parte de BZ pase a la sangre donde pueden tener lugar los cambios en el mecanismo de desdiazoción.

En este sentido, es conocido que el cobre, si bien se encuentra en la sangre en una menor proporción que el hierro, resulta ser mejor reductor para los iones arenodiazonios⁴⁰. La cantidad total de cobre en sangre⁴¹ es de aproximadamente $5 \cdot 10^{-5}$ M. La absorción del cobre

DISCUSSION

The results found in this study coincide with the data encountered in the bibliography and confirm that BZ decomposes easily in an aqueous medium with added NaCl, the same medium used in the study of the incidence of tumours in rats produced by the administration of BZ¹⁹. In general, after subcutaneous administration, the arenediazonium ions give rise, to the appearance of subcutaneous tumours. These tumours probably occur as a result of the high reactivity of some of the dediazonation derived species which elicit their toxic action in the same place where they were administered. However, in some cases the appearance of tumours can occur in places that are further away from the point of administration. It has been suggested that this could come about as a result of the formation of intermediate compounds, such as triazenes, that stabilise the arenediazonium ion and permit its transportation to the point where its action takes place³⁹. Concretely, the benzenediazonium ion (BZ), administered subcutaneously to rats in repeated dosages of 25 µg/g of corporal weight for 10 weeks, causes the appearance of tumours in subcutaneous tissue in a relatively low percentage of animals treated (approx. 8%). Conversely, in animals treated with repeated oral dosages of BZ, a significant incidence of lung tumours was found (52-62%), while the incidence of tumours in the gastrointestinal tract was found to be statistically irrelevant¹⁹.

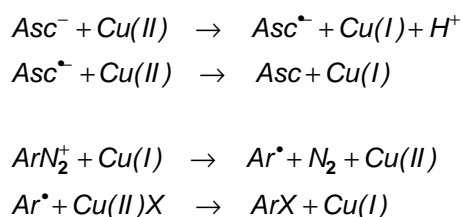
The ease with which the transformation of the ion in the aryl cation at 37°C takes place, together with the rapid and the relatively unselective nature of the reaction of this ion with any nucleophile present at the point of administration of BZ, could give rise to stable compounds, such as phenol. As far as we know, in current literature, no reference to the toxic effects that are manifest with the appearance of lung tumours have been made. As a consequence, the possibility should be considered that BZ partially passes through to the bloodstream, where changes in the dediazonation mechanism take place.

In this sense, it is already known that copper, despite being found in blood to lesser extent than iron, is a better reductant for arenediazonium ions⁴⁰. The total quantity of copper in blood⁴¹ is approximately $5 \cdot 10^{-5}$ M. The absorption of copper supplied in the diet occurs in the gastrointestinal

suministrado en la dieta se produce en el tracto gastrointestinal desde donde es transportado al hígado unido a la seroalbúmina. Aunque después es puesto nuevamente en circulación dentro del torrente sanguíneo unido a la proteína ceruloplasmina. Albúmina y ceruloplasmina junto con transcupreina, son las proteínas encargadas del transporte de Cu en el plasma^{42,43}. La alta afinidad del Cu por estas proteínas asegura el control de la actividad redox de este ion ya que como catión libre cataliza la formación de radicales libres a partir del oxígeno molecular dando lugar a efectos oxidativos en las células. Se reconoce, sin embargo, que algunas modificaciones en la proteína ofrecen la posibilidad de que el cobre unido a la albúmina actúe como agente reductor⁴⁴⁻⁴⁹.

Los resultados encontrados en la reducción de BZ por Cu(I) sugieren, en efecto, un cambio de mecanismo con respecto al proceso que tiene lugar en ausencia de Cu. Así mismo el proceso de reducción de BZ se produce por la acción del ácido ascórbico, un antioxidante natural presente en el plasma⁵⁰ en una concentración $2,55 \cdot 10^{-5}$ M, que inicia el proceso provocando la reducción de Cu(II) a Cu(I).

El proceso de reducción de BZ por Cu(I) o por Cu (II)-ascórbico da lugar a la aparición del radical arilo de acuerdo con el mecanismo de reacción de Sandmeyer. La reacción de Sandmeyer iniciada por el anión ascorbato ha sido estudiada cinéticamente por Hanson y col.⁵¹ y se puede esquematizar del siguiente modo



donde el anión ascorbato (Asc^-) reduce al Cu(II) que, a su vez, reduce al ion arenodiazonio (ArN_2^+) dando lugar al radical arilo (Ar) por el que compiten el anión cloruro ($\text{X}=\text{Cl}^-$) o el agua unida como ligando al Cu (II) ($\text{X}=\text{H}_2\text{O}$) originando respectivamente clorobenceno o fenol (ArX).

La aparición de la señal del benceno en el análisis cromatográfico de las muestras que contenían ácido ascórbico sugiere que la reducción de BZ por Cu(I) origina el radical arilo que abstrae un átomo de hidrógeno del anión ascorbato para formar benceno.

tract from where, whilst bonded to the serum albumin, it is transported to the liver. However, at a later stage, it subsequently enters into circulation within the blood stream, bonded to the protein ceruloplasmin. Albumin and ceruloplasmin together with transcuprein, are the proteins responsible for the transportation of Cu in the plasma^{42,43}. The high affinity of Cu to these proteins ensures the control of the redox activity of this ion, given that as a free cation, it catalyzes the formation of free radicals from molecular oxygen, which in turn gives rise to oxidation effects in the cells. However, it is recognised that some modifications in the protein offer the possibility that Cu bonded to albumin might act as a reducing agent⁴⁴⁻⁴⁹.

The results found in the reduction of BZ by Cu(I) suggest, in effect, a change in the mechanism with respect to the process that takes place in the absence of Cu. Similarly, the reduction process of BZ is produced by the action of ascorbic acid, a natural antioxidant present in the plasma⁵⁰ in a concentration of $2.55 \cdot 10^{-5}$ M, that initiates the process, causing the reduction of Cu(II) to Cu(I).

The reduction process of BZ by Cu(I), or by Cu (II)-ascorbic, gives rise to the appearance of the aryl radical, in accordance with the Sandmeyer reaction mechanism. The Sandmeyer reaction initiated by the ascorbate anion has been studied kinetically by Hanson and col.⁵¹ and can be expressed in the following way:

where the ascorbate anion (Asc^-) reduces Cu(II) which, at the same time, reduces the arenediazonium ion (ArN_2^+), giving rise to the aryl radical (Ar), for which the chloride anion, ($\text{X} = \text{Cl}^-$) or the water binding Cu(II) ($\text{X} = \text{H}_2\text{O}$), compete. The respective reactions result in the formation of either chlorobenzene or phenol (ArX).

In the case of BZ, the appearance of the benzene signal in the chromatographic analysis of the samples that contained ascorbic acid suggest that the reduction of BZ by Cu(I) gives rise to an aryl radical, which abstracts a hydrogen atom from the ascorbate anion to form benzene.

Aunque el modelo escogido en este trabajo es una sobresimplificación de posibles mecanismos que ocurren en el medio celular o tisular, la existencia de especies químicas con actividad reductoras en el plasma e, igualmente, la presencia de diversos antioxidantes hacen plausible la formación de benceno como especie final estable. Además, debe ser tenido en cuenta que el benceno que, una vez activado por el citocromo P450IIE1, posee una reconocida capacidad carcinogénica cuyos efectos han sido observados en pulmón⁵²⁻⁵⁴.

Los datos obtenidos en nuestro estudio apuntan a la posible justificación de la aparición de tumores pulmonares en animales tratados con BZ por vía gástrica debido al cambio de mecanismo de la desdiazooación de BZ al producirse la absorción de este compuesto y posterior reducción en sangre par dar lugar a radicales arilos. De estos radicales pueden derivar compuestos con actividad carcinogénica en pulmón como sería caso del benceno formado en un proceso de abstracción de un átomo de hidrógeno por el radical arilo a partir de un sustrato adecuado presente en la sangre.

Although the chosen model in this work is an over-simplification of the possible mechanisms that occur in a cellular or tissular environment, the existence of chemical species with redox activity in the plasma and equally, the presence of several antioxidants make the formation of benzene as final stable species plausible. Furthermore, it should be taken into account that benzene, once activated by the cytochrome P450IIE1, posses a recognised carcinogenic capacity, whose effects have been observed in lungs⁵²⁻⁵⁴.

The data obtained in our study leads us to the possible conclusion that the appearance of lung tumours in animals treated with BZ through gastric ingestion is to be attributed to a change in the BZ dediazonation mechanism, where the absorption of this compound and its posterior reduction in the blood stream gives rise to the appearance of aryl radicals. Carcinogenic activity in the lungs may be derived from these radical compounds. This would be the case with benzene formed in a process of abstraction of a hydrogen atom by the aryl radical from an appropriate substrate present in the bloodstream.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía Consejería de Educación y Ciencia (Acciones Coordinadas)

ACKNOWLEDGEMENTS

The present work was supported by the Regional Government of Andalucía (Junta de Andalucía Consejería de Educación y Ciencia (Acciones Coordinadas)).

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Friederich U, Fischer B., Lüthy J, Hann D, Schlatter C, Würgler FE. The mutagenic activity of agaritine- a constituent of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* - and its derivatives detected with the Salmonella/mammalian microsome assay (Ames Test). *Z Lebensm Unters Forsch* 1986; 183: 85-89.
2. Ames BN, Magaw R, Gold LS. Ranking possible carcinogenic hazards *Science* 1987; 236: 271-280.
3. Ohta T, Oribe H, Kameyama T, Goto Y, Takitani S. Formation of a diazoquinone-type mutagen from acetaminophen treated with nitrite under acidic conditions *Mut Res* 1988; 209: 95-98.
4. Kikugawa K, Kato T, Takeda Y. Formation of a highly mutagenic diazo compound from the bamethan-nitrite reaction *Mut Res* 1987; 172:35-43.
5. Kikugawa K, Kato T. Formation of a mutagenic diazoquinone by interaction of phenol with nitrite *Food Chem Toxicol* 1988; 26, 209-214.
6. Kikugawa K, Kato T, Takeda Y. Formation of a direct mutagen, diazo-N-nitrosoetilefrin, by interaction of etilefrin with nitrite *Chem. Pharm. Bull* 1989; 37:1600-1603.
7. Lawson T, Gannett PM, Yau WM, Dalal NS, Toth B. Different patterns of mutagenicity of arenediazonium ions in V79 cells and *Salmonella typhimurium* TA102: Evidence for different mechanisms of actions. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2627-2635.
8. Furihata C, Yamakoshi A, Matsushima T, Kato T, Kikugawa K. Possible tumour-initiating and -promoting activities of 3-diazo-N-nitrosobamethan in rat stomach mucosa *Mutagenesis* 1988; 3: 299-301.
9. Ohshima H, Furihata C, Matsushima T, Bartsch H. Formation of direct-acting genotoxic substances in nitrosated smoked fish and meat products: identification of simple phenolic precursors and phenyldiazonium ions as reactive products *Food Chem Toxicol* 1989; 27: 193-203.

10. Stiborova M, Hansikova H, Schmeiser HH, Frei E. An investigation of the metabolism of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosomethylaniline by horseradish peroxidase *in vitro* Gen Physiol Biophys 1997; 16: 285-297.
11. Toth B, Patil K, Jae H-S. Carcinogenesis of 4-(hydroxymethyl)benzene diazonium ion (Tetrafluoroborate) of *Agaricus bisporus* Cancer Res 1981; 41: 2444-2449.
12. Toth B, Nagel D, Ross A. Gastric tumorigenesis by a single dose of 4-(hydroxymethyl)benzenediazonium ion of *Agaricus bisporus* Br J Cancer 1982; 46: 417-422.
13. Toth B. Cancer induction by the sulfate form of 4-(hydroxymethyl) benzenediazonium ion of *Agaricus bisporus* In Vivo 1987; 1: 39-42.
14. Toth B, Taylor J, Mattson B, Gannett P. Tumor induction by 4-(methyl)benzenediazonium sulfate in mice. In Vivo 1989; 3: 17-22.
15. Toth B, Patil K, Taylor J, Stessman C, Gannett P. Cancer induction in mice by 4-hydroxybenzenediazonium sulfate of the *Agaricus xanthodermus* mushroom. In vivo 1989; 3: 301-306.
16. Toth B, Gannett P, Rogan E, Williamson J. Bacterial mutagenicity of extracts of the baked and raw *Agaricus bisporus* mushroom In Vivo 1992; 6: 487-490.
17. Toth B, Gannett P. *Agaricus bisporus*: An assessment of its carcinogenic potency. Mycopathologia. 1993; 124:73-77.
18. Toth B, Patil K, Erickson J, Gannett P. Carcinogenesis by benzenediazonium sulfate in mice In Vivo 1998; 12: 379-382.
19. Toth B, Patil K, Erickson J, Gannett P. Cancer induction using different administrations of benzenediazonium sulfate in mice In Vivo 1999; 13: 125-128.
20. Toth B. A review of the natural occurrence, synthetic production and use of carcinogenic hydrazines and related chemicals In Vivo 2000; 14: 299-319.
21. Chin A, Hung MH, Stock LM. Reactions of benzenediazonium ions with adenine and its derivatives J Org Chem 1981; 46: 2203-2207.
22. Hung M-H, Stock LM. Reactions of benzenediazonium ions with guanine and its derivatives. J Org Chem 1982; 47: 448-453.
23. Koepke SR, Kroeger-Koepke MB, Michejda CJ. Evidence for an unstable DNA adduct from N-nitroso-N-methylaniline Chem Res Toxicol 1990; 3: 17-20.
24. Lawson T, Gannett PM, Yau WM, Dalal NS, Toth B. Different patterns of mutagenicity of arenediazonium ions in V79 cells and *Salmonella typhimurium* TA102: Evidence for different mechanisms of actions. J Agric Food Chem 1995; 43: 2627-2635.
25. Gannett PM, Powell JH, Rao R, Shi X, Lawson T, Kolar C, et al. C8-Arylguanine and C8-aryladenine formation in calf thymus DNA from arenediazonium ions. Chem Res. Toxicol 1999; 12: 297-304.
26. Griffiths J, Murphy JA. Cleavage of DNA resulting from exposure to phenyl radicals. J Chem Soc Chem Commun 1992; 24-26.
27. Kato T, Kojima K, Hiramoto K, Kikugawa K. DNA strand breakage by hydroxyphenyl radicals generated from mutagenic diazoquinone compounds Mutation Res 1992; 268: 105-114.
28. Hazlewood C, Davies MJ, Gilbert BC, Packer JE. Electron paramagnetic resonance studies of the reaction of aryl radicals with nucleic acids and their components J Chem Soc Perkin Trans 2 1995; 2167-2174.
29. Hiramoto K, Kaku M, Kato T, Kikugawa K. DNA strand breaking by the carbon-centered radical generated from 4-(hydroxymethyl)benzene diazonium salt, a carcinogen in mushroom *Agaricus bisporus*. Chem Biol Interact 1995; 94: 21-36.
30. Gannett PM, Ye J, Ding M, Powell J, Zhang Y, Darian E, et al. Activation of AP-1 through the MAP kinase pathway: a potential mechanism of the carcinogenic effect of arenediazonium ions. Chem Res Toxicol 2000; 10: 1020-1027.
31. Berh JP. Photohydrolysis of DNA by polyaminobenzenediazonium salts. J Chem Soc ,Chem Commun 1989; 101-103.
32. Zollinger H. *Diazo Chemistry Vol.1: Aromatic and Heteroaromatic Compounds*; Wiley & Sons: New York, 1994.
33. Bravo Diaz C, González Romero E. Reactivity of arenediazonium ions in micellar and macromolecular systems Current Topics in Colloid & Interface Science 2001; 58-83 y referencias citadas allí.
34. Canning PSJ, McCrudden K, Maskill H, Sexton B. Mechanisms of the thermal solvolytic decomposition of arenediazonium ions J Chem Soc Perkin Trans 2 1999; 2735-2740.
35. Maskill H, McCrudden K. Croat Chem Acta 1992; 65: 567. Citado en la referencia 34.
36. Crossley ML, Kienhle RH, Benbrook CH. J Am Chem Soc 1940; 62: 1400. Citado en ref. 38.
37. Maskill H. *The physical basis of Organic Chemistry*. Oxford University Press. 1995. Oxford UK.
38. Pazo Llorente R, Sarabia Rodríguez, MJ, Bravo Diaz C, González Romero E. Hydroxy- and chloro-dediazoniation of 2- and 3-methylbenzenediazonium tetrafluoroborate in aqueous solution Int J Chem Kinet 1999; 31: 73-82.
39. Powell JH, Gannett PM. Mechanisms of carcinogenicity of aryl hydrazines, aryl hidrazides and arenediazonium ions J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2002; 21: 1-31.
40. Galli C. Radical reactions of arenediazonium ions: An easy entry into the chemistry of the aryl radical Chem Rev 1988; 88: 765-792.
41. Jiménez A, Planells E, Aranda P, Sánchez-Viñas M, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of copper caused by magnesium deficiency in rats J Agric Food Chem 1997; 45: 4023-4027.
42. Linder MC, Wooten P, Cerveza S, Cotton R, Shulze R, Lomeli N. Copper transport Am J Clin Nutr 1998; 67: 965S-971S.
43. Inagaki K, Mikuriya N, Morita H, Haraguchi Y, Nakahara M, Hattori M, Kinoshita T, Sayto H. Speciation of protein-binding zinc and copper in human blood serum by chelating resin pre-treatment and inductively coupled plasma mass spectrometry. Analyst 2000; 125: 197-203.

44. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in nutrition, health, and disease*. Oxford University Press. 1994 Oxford UK pp 36-37.
45. Majors AK, Sengupta S, Willard B, Kinter MT, Pyeritz RE, Jacobsen DW. Homocysteine binds to human plasma fibronectin and inhibits its interaction with fibrin *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1354-1359.
46. Sengupta S, Chen H, Togawa T, DiBello PM, Majors AK, Budy B, Katterer ME, Jacobsen DW. Albumin thiolate anion is an intermediate in the formation of albumin-S-S-homocysteine *J Biol Chem* 2001; 276: 30111-30117.
47. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin *FASEB J* 1999; 13: 233-244.
48. Eaton JW, Qian M. Interactions of copper with glycated proteins: possible involvement in the etiology of diabetic neuropathy *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235: 135-142.
49. Gryzunov YA, Arroyo A, Vigne JL, Zhao Q, Tyurin VA, Hubel CA, Gandley RE, Vladimirov YA, Taylor RN, Kagan VE. Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants *Arch Biochem Biophys* 2003; 413: 53-66.
50. Llopis J. (comunicación personal).
51. Hanson P., Jones JR, Gilbert BC, Timms A.W. Sansmeyer reactions. Part 1. A comparative study of the transfer of halide and water ligands from complexes of Cu(II) to aryl radicals *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1991; 1009-1017.
52. Malik S, Parmar VS, Kohli E, Tyagi YK, Rohil V, Dwarakanath BS, Adhikari JS, Bose M, Jain SC, Olsen CE. Chemoprevention of benzene-induced bone marrow and pulmonary genotoxicity. *J Teratogarcinog Mutagen* 2001; 21: 181-187.
53. Mullin AH, Nataraj D, Ren JJ, Mullin DA. Inhaled benzene increases the frequency and length of lacI deletion mutations in lung tissues of mice *J Carcinogenesis* 1998; 19: 1723-1733.
54. Huff JE, Haseman JK, DeMarini DM, Eustis S, Maronpot RR, Peters AC Persing RL, Chrisp CE, Jacobs AC. Multiple-site carcinogenicity of benzene in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *J Environ Health Perspect* 1989; 82: 125-163.