

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca de la Convocatoria de Extranjero, 1975, individual. Departamento de QUIMICA.

Centro de trabajo: Sloan-Kettering Institute, New York, USA.

Fundación Juan March



FJM-Uni 84-Rep  
Nitrosación de aminas secundarias co  
Repollés Moliner, José.  
1031610



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

# Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental

José Repollés Moliner

FJM

Uni-  
84

Rep

84

Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental/José Repollés Moliner

84



Fundación Juan March

Serie Universitaria



84

# Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental

José Repollés Moliner



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55  
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

***La Fundación Juan March no se solidariza  
necesariamente con las opiniones de los  
autores cuyas obras publica.***

Depósito Legal: M - 6420 - 1979  
I.S.B.N. 84 - 7075 - 119 - 0.  
Ibérica, Tarragona, 34. - Madrid -

## INDICE

	Página
INTRODUCCION . . . . .	1
PROPOSITO DEL TRABAJO . . . . .	13
PARTE EXPERIMENTAL . . . . .	14
Síntesis de N-nitroso derivados	
3.1. Ritalin . . . . .	14
3.2. Librium . . . . .	15
3.3. Reserpina . . . . .	17
3.4. Imipramida . . . . .	18
3.5. N <sup>6</sup> – metilaminopurina . . . . .	20
3.6. 9 – β – D–ribofuranosil–N <sup>6</sup> –metilaminopurina . . . . .	21
INHIBICION DE N–NITROSO DERIVADOS CON ACIDO AS- CORBICO . . . . .	23
DEGRADACION DE N–NITROSO DERIVADOS . . . . .	30
ENSAYOS BIOLOGICOS . . . . .	34
CONCLUSIONES . . . . .	40
BIBLIOGRAFIA . . . . .	43



## 1.- INTRODUCCION.

El 90 % de todos los casos de cáncer humano son debidos, principalmente, a carcinógenos químicos, de origen endógeno y exógeno, que se encuentran en el medio ambiente <sup>1)</sup>.

En los últimos quince años, investigaciones sistemáticas han conducido a un progreso significativo en el campo de los carcinógenos químicos y la lista de las sustancias potencialmente peligrosas para el hombre ha crecido considerablemente. Las nitrosaminas son un ejemplo típico de ellas.

Desde el descubrimiento del efecto carcinogénico de la dimetilnitrosamina (DMN) por Magee y Barnes <sup>2)</sup>, el estudio de estos compuestos ha captado la atención de los investigadores desde el punto de vista químico y biológico. Y actualmente se considera a las nitrosaminas como los carcinógenos de tipo más universal.

La demostración directa de carcinogénesis -- por nitroso derivados todavía no ha sido posible

hacerla en el hombre. Sin embargo, sí lo ha sido en muchas especies animales <sup>3,4)</sup>, facilitando -- con ello la extrapolación al hombre.

Una característica notable de los compuestos N-nitrosados es su capacidad para inducir tumores, prácticamente en todos los órganos de los mamíferos ensayados. En un primer análisis, cabe deducirse que esta facilidad de formación de tumores se debe a la gran abundancia de los precursores de las nitrosaminas en el medio ambiente, es decir, los nitratos, los nitritos y las aminas.

Los nitratos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en plantas y forraje, y los nitritos se forman con gran facilidad a partir de ellos. Asimismo, los nitratos se encuentran en concentraciones apreciables en el agua.

Los nitritos pueden formarse por la reducción de nitratos en las plantas, o bien por las nitroreductasas presentes en numerosas bacterias parásitas y saprófagas <sup>5)</sup>. Grandes concentraciones de nitritos se hallan presentes en vegetales



almacenados, especialmente espinacas, apio y ensalada, como resultado de esta reducción bacteriana de los nitratos <sup>6)</sup>. Además, tanto nitritos como nitratos son ampliamente utilizados como preservativos en carnes y pescados.

El factor importante, entonces, en la formación de nitrosaminas parece ser la facilidad de nitrosación de las aminas secundarias. La información de que se dispone sobre su distribución en el medio ambiente es bastante escasa. Aunque, de todas formas, se sabe existen, principalmente en forma de dimetilamina y dietilamina en pescados <sup>7)</sup>, cereales y té <sup>8)</sup> y el el tabaco <sup>9)</sup>. Asimismo, estas sustancias están presentes en ciertos compuestos de uso frecuente, como son los pesticidas y ciertos medicamentos o drogas <sup>10)</sup>.

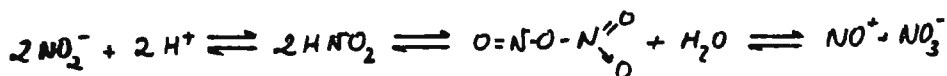
Recientemente, se ha puesto de manifiesto que las aminas terciarias son capaces de dar nitrosaminas en el medio adecuado <sup>11)</sup>. Y aminas terciarias se encuentran en muchos alcaloides y productos naturales, así como también en numerosas drogas de uso frecuente <sup>12)</sup>.

La primera etapa en el mecanismo de nitrosa-

ción de amino compuestos consiste en un ataque -electrofílico del agente nitrosante al par libre de electrones del átomo de nitrógeno (Esquema 1).

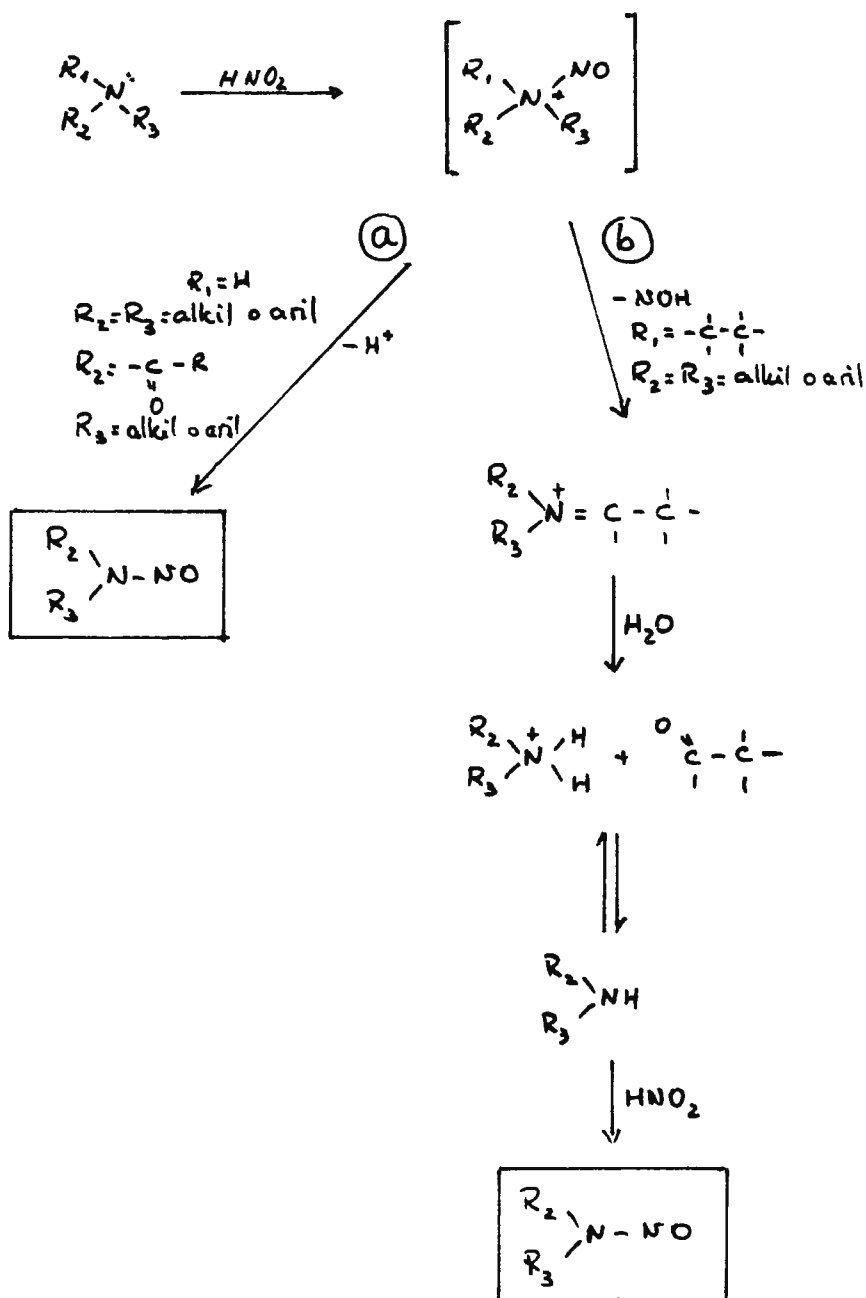
La nitrosación de aminas secundarias puede -ser representada por la sustitución del hidrógeno por NO (Esquema 1a). En la obtención de N-nitroso compuestos a partir de aminas terciarias uno de los grupos alquilo tiene que ser eliminado oxidativamente por el agente nitrosante <sup>13)</sup> - para dar una amina secundaria, la cual a su vez es nitrosada (Esquema 1b).

El agente nitrosante en la reacción es el ca tión  $\text{NO}^+$  (Esquema 2) :



Esquema 2

Así pues, la nitrosación se efectúa por el cati ón  $\text{NO}^+$  durante la reacción con el par libre de electrones del grupo amino. De acuerdo con el Esquema 2 se requiere un pH ácido para la formación de este catión. El pH óptimo para la nitrosación oscila entre 3,0 y 3,4, el cual está --



Esquema 1.

próximo a la constante de disociación del ácido nitroso, que es  $3,37^{15)}$ .

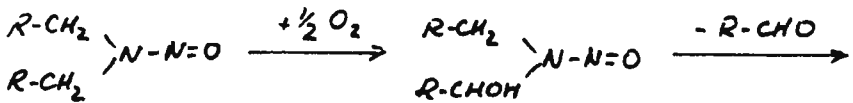
De acuerdo con estos datos, la formación de nitrosaminas es muy probable transcurra también en el estómago de los mamíferos donde el pH es predominantemente ácido. Actualmente existen numerosas evidencias de que estos compuestos pueden formarse en estas condiciones  $16)$ .

Sobre la carcinogenicidad de los nitroso de rivados se han publicado muchos artículos  $18,19)$ . Más de 120 N-nitroso derivados han sido investigados, y la gran mayoría de ellos han resultado ser carcinógenos. Una característica común es su capacidad para inducir tumores prácticamente en todos los órganos importantes de los mamíferos. La selección de uno u otro depende de la estruc tura química del N-nitroso derivado, de la dosis, del modo de administración y de la especie. Higa do, pulmones, estómago, esófago, cerebro y sis tema nervioso, riñones y vejiga son fácilmente accesibles a una tumorigénesis selectiva  $18,19)$ .

Es por ello, por lo que las nitrosaminas es tán reconocidas como las más potentes y más ver

sátiles de todos los carcinógenos químicos conocidos.

¿Y cuál es su mecanismo de acción? Actualmente se admite que el poder carcinógeno de las nitrosaminas resulta de su capacidad de alquilación después de diversos procesos metabólicos consistentes en una  $\beta$ -oxidación<sup>20)</sup>, seguida de una  $\alpha$ -oxidación y de la consiguiente transformación en diazoalcano<sup>21)</sup> (Esq. 3).



Esquema 3.

Es así como la dimetilnitrosamina (DMN) se comporta como un dador de metilo respecto a la guanina y la citosina, transformándolos en 7-metilguanina <sup>22)</sup> y en 3-metilcitosina <sup>23)</sup>.

Esta desviación metabólica entraña al nivel hepático una masiva incorporación de aminoácidos que se traduce en una disminución, aproximadamente de 50 %, en la biosíntesis protéica. La primera etapa en esta inactivación comporta la liberación de formol que provoca, al nivel celular, la vacuolización de las membranas ergastoplásmicas y la dispersión de los polisomas en ribosomas <sup>10)</sup>.

Las experiencias efectuadas con moléculas de dimetilnitrosamina(DMN), marcadas con carbono 14, han mostrado la aparición de radioactividad en el DNA y en el RNA de las células del hígado, de los riñones, del páncreas y del bazo. En el caso del DNA, se cree que la alquilación lleva a un cambio de la secuencia de los aminoácidos o bien la pérdida de uno o varios pares de bases <sup>24)</sup>.

Además, se ha constatado que los compuestos N-nitrosados son mutágenos y teratógenos <sup>24)</sup>.

Desde el momento en que se conocieron las -- propiedades carcinógenas de las nitrosaminas nuevos esfuerzos se encaminaron hacia la prevención del cáncer producido por estas sustancias. La -- posible peligrosidad para la salud humana podía ser reducida por la administración de la droga junto con una sustancia que preferentemente reaccionara o destruyera cualquier nitrito presente en el estómago. El ácido ascórbico puede ser utilizado para estos propósitos.

Investigaciones efectuadas por Edgar <sup>25)</sup> su- gieren que el ácido ascórbico puede inhibir la acción carcinogénica de las nitrosaminas y otros carcinógenos que actúan por alquilación, impi-- diendo la necrosis de hígado inducida por la dimedilnitrosamina (DMN). Resultados experimenta- les in vivo e in vitro <sup>26,27)</sup> sugieren la hipóte- sis de que el ácido ascórbico puede ser utiliza- do como un excelente inhibidor de nitrosaminas.

Dahn y col. <sup>28)</sup> estudian la cinética de reacción entre el ácido nitroso y el ácido ascórbico. Acido dehidroascórbico y óxido nítrico se forman en la reacción, reduciendo o eliminando práctica

mente la formación de N-nitroso compuestos a consecuencia de la reacción de nitritos y aminas secundarias y terciarias.

El mismo efecto ha sido observado con dife--rentes antioxidantes <sup>29,30)</sup> como el 3-tert-bu --toxi-4-metoxifenol (BHA) y el 2,6-ditert-butyl-p-cresol (BHT) y ácido gálico, entre otros.

El descubrimiento de que las nitrosaminas --son carcinógenos potenciales en animales ha motivado el estudio de un manejo más adecuado de estas sustancias, especialmente para los investigadores en este campo. Un problema particular es --el proceso de degradación de las nitrosaminas, --es decir, conversión de los productos de deshe--cho en material menos peligroso, bajo condicio--nes ambientales.

Considerando la importancia de la dimetilni-trosamina como un potente carcinógeno, y el posible significado de los productos de degradación cuando se comparan los metabolitos de los nitroso compuestos, se han examinado una serie de mé--todos, principalmente en cuanto se refiere a la degradación química y a la fotoquímica, para mi-



nimizar sus propiedades biológicas.

Referente a la degradación química se ha observado que, tanto en la reducción con aluminio <sup>31)</sup>, como en la reacción con ácido bromhídrico - <sup>32)</sup> y en la descomposición oxidativa <sup>33)</sup>, se obtienen subproductos que a su vez son carcinóge--nos y mutágenos, eliminando así, prácticamente, su interés para destruir las nitrosaminas.

La degradación fotoquímica puede considerarse como el método más sencillo, seguro y eficiente para destruir una cantidad significativa de ni trosaminas en solución acuosa <sup>34)</sup>. También se ha observado que la luz monocromática de 334 nm es mucho más efectiva que la luz solar en grupos ni troso <sup>35)</sup>, pero no por ello deja de ser interesante el efecto de la luz del sol sobre los N-ni troso derivados, ya que proporciona un método ba rato y sencillo de degradación.

En vista de todos los datos aquí expuestos - cabe preguntarse: ¿deberían ser eliminados los nitritos y las nitrosaminas?.

Es muy difícil de contestar. Pero, desde el

momento en que los nitritos están presentes en -  
la Naturaleza, especialmente en forma de nitra--  
tos (que no pueden ser eliminados) la respuesta  
es "no". La solución es reducir al máximo nues--  
tra exposición a los nitritos y a ciertas aminos  
secundarias y terciarias, particularmente en aliu  
mentos, así como a gran número de drogas de uso  
frecuente. Con todo ello será posible una dismi-  
nución en la incidencia del cáncer humano.

## 2.- PROPOSITO DEL TRABAJO.

Se propone el estudio del mecanismo de nitrosación de aminos sustituidas que existen en ba--ses modificadas de ácidos nucleícos, principalmente en alimentos, así como en sustancias con es--tructura similar que se encuentran en ciertas --drogas medicinales de uso frecuente.

En ambos casos se pueden producir nitrosaminas, que poseen propiedades carcinogénicas potentes, por la interacción en el estómago de los nitritos existentes en la saliva o en los alimen--tos y las aminos sustituidas mencionadas.

Con este estudio nos proponemos determinar la posibilidad de formación de nitrosaminas que aunque se produzcan en pequeñas proporciones, -dada la presencia frecuente de sus componentes, pueden considerarse como carcinógenos de tipo --universal que contribuye, con un período de la--tencia muy prolongado, al conjunto de causas involucradas en la inducción de cáncer en el hom--bre.

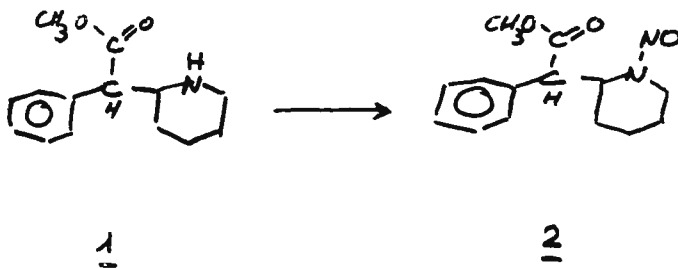
Los resultados de estos estudios demostrarán la necesidad de ciertas medidas preventivas para

conseguir una profilaxis general del cáncer humano.

### 3.- PARTE EXPERIMENTAL.

#### SINTESIS DE N-NITROSO DERIVADOS.

##### 3.1.- Ester metílico del ácido $\alpha$ -fenil-2-piperidin acético (Ritalin).



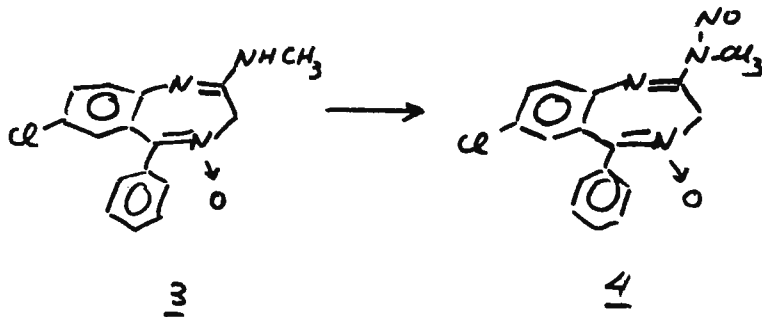
5,85 de clorhidrato del éster metílico del ácido  $\alpha$ -fenil-2-piperidin acético (1) en 40 ml. de agua y 60 ml de ácido acético, se añaden lentamente y con agitación a una solución fría de 14 gr. de nitrito sódico en 40 ml. de agua. El precipitado formado se filtra, se lava con agua

y se seca, obteniéndose 5,75 gr. del nitroso derivado (2), que se recristaliza de etanol/agua.

Los datos analíticos y espectroscópicos de 2 son los siguientes :

- p.f. : 104-105° C
- UV.: 235,365 nm
- Prueba de  $\text{FeCl}_3$  para  $-\text{NO}$ : positiva
- (CHN): Cal. C: 64,35 H: 6,56 N:10,72 %  
Hall.C: 64,31 H: 6,54 N:10,78 %
- RMN: 1,42/a (6)  $3^a, 4^a, 5^a$ -H; 3,48/a (3)  $-\text{OCH}_3$   
3,81/t (2) 6-H; 4,46/d (1) J=11 7-H  
5,00/m (1) 2-H; 7,46/m (5) H-fenilo

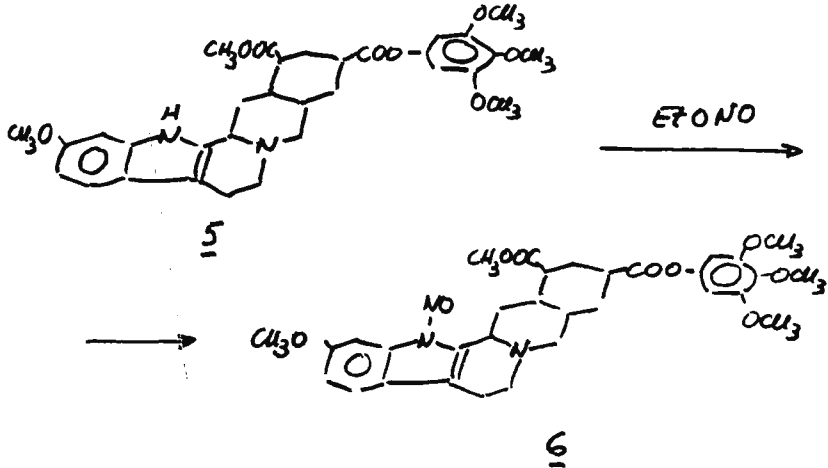
3.2.- 7-cloro-5-fenil-2-metilamino-4-óxido-3H,4-benzodiazepina (Librium).



150 mg de clorhidrato de clorodiazepóxido -- (3) disueltos en ácido clorhídrico 2 N se añaden lentamente y con agitación a una solución acuosa de 138 mg de nitrito sódico. Un precipitado amarillo aparece casi inmediatamente. Después de -- dos horas a temperatura ambiente se filtra, se lava con agua y se seca, obteniéndose 100 mg -- (60%) del derivado nitroso (4).

Tras recristalización en agua/metanol se obtienen los siguientes datos analíticos y espectroscópicos:

- p.f.: 156-7° C
- Prueba de Liebermann <sup>36)</sup>: positiva.
- UV: 244, 288 nm
- RMN: 3,41/s (3) CH<sub>3</sub>; 5,37/sa (2) 8-CH<sub>2</sub>;  
7,02/d (1) J=3 1-H; 7,52/m (7)  
2+3-H+H-fenilo.
- (CHN): Calculado para C<sub>16</sub> H<sub>13</sub> N<sub>4</sub> O<sub>2</sub> Cl:  
Cal. C: 58,46 H: 3,98 N 17,04 Cl:  
10,8 %  
Hall. C: 58,28 H: 3,92 N: 16,94  
Cl: 10,8 %

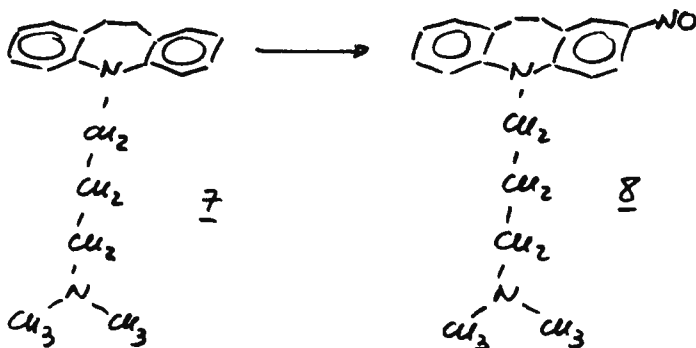
3.3.- Reserpina.

200 mg de reserpina (5) se suspenden en 0,5 ml de agua y 0,5 ml de etanol. 6 ml de nitrito de etilo, previamente neutralizado con una solución saturada de acetato sódico, se añaden lentamente y la mezcla de reacción se agita a 5° C, durante 3 horas. Después se deja 12 horas en reposo. El precipitado formado se filtra, se lava con etanol y se seca, obteniéndose 89 mg (43%) del derivado nitroso 6.

Los datos analíticos y espectroscópicos son los siguientes :

- p.f.: 237° C (d)
- Prueba de Liebermann <sup>36)</sup>: positiva.
- IR: 2580,1730,1620,1580,1500,1250,1000.
- UV: 295 nm.
- RMN: Espectro concordante con la estructura propuesta.
- CHN para  $C_{33}H_{39}N_3O \cdot H_2O$ :  
 Cal. C: 60,69 H: 6,31 N: 5,94 %  
 Hall. C: 60,44 H: 6,29 N: 6,41 %

3.4.- 10,11-dihidro-3-(3-dimetilaminopropil)-5H-dibenz-(b,f)azepina (Imipramina).



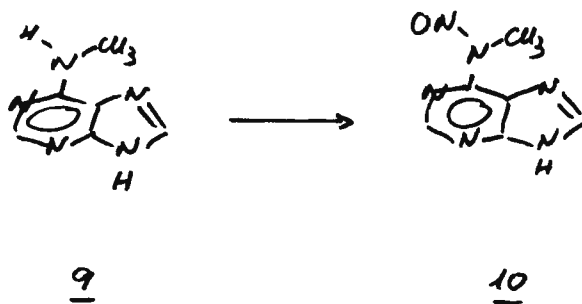
317 mg de clorhidrato de imipramina (7) se disuelven en la mínima cantidad de agua. Se añade ácido clorhídrico 2 N, justo hasta obtener pH



ácido. La mezcla de reacción se mantiene a 5° C. 138 mg de nitrito sódico se disuelven en la mínima cantidad de agua y se añaden lentamente a la solución ácida de la droga. Después de tres horas a temperatura ambiente se filtra el precipitado obtenido, se lava con agua fría y se seca.

La identificación de este compuesto como 2-nitroso-3-(dimetilaminopropil)-iminodibenzil (8) se lleva a cabo en base a los datos analíticos y espectroscópicos siguientes:

- p.f.: 142-5° C
- UV: 257,400 mm
- IR: 2825,2775,2730,1630,1500,1580,1500.
- NMR: 1,88/m (2) H-13; 1,03/s (3) CH<sub>3</sub>-17;  
 2,96/m (4) H-10+11; 3,14/s (3) --  
 CH<sub>3</sub>-16; 3,86/m (4) H-12+H-14; 7,20/m  
 (4) H-6+7+8+9; 7,96/m (3) H-1 +3+4.

3.5.- N<sup>6</sup>-metilaminopurina 17).

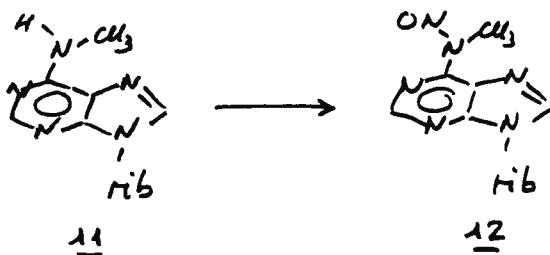
A 1,39 gr de 9 en 120 ml de ácido acético 5N se añaden lentamente 9,2 gr de nitrito sódico, - disueltos en la mínima cantidad de agua. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a -- temperatura ambiente y luego se lleva a 5º C por espacio de varias horas.

El precipitado formado se filtra, se lava -- con agua fría y se seca obteniéndose 1,53 gr de 10.

Tras recristalización de tetrahidrofurano/-- agua (1:1), el nitroso derivado se identifica en base a los siguientes datos analíticos y espec-- troscópicos :

- p.f.: 235-250° C
- Ensayo de Liebermann <sup>36)</sup>: positivo.
- IR: 18,75, 1780,1610,1560,1250  $\text{cm}^{-1}$
- UV: 216, 162, 300 nm.
- RMN: 13,1/a (1) N-H<sub>9</sub>; 8,90/s (1) 2-H;  
8,03/s (1) 8-H; 3,59/s (3)-CH<sub>3</sub>.  
Tras adición de agua pesada desaparece la señal ancha a 13,1 ppm.
- CHN para C<sub>6</sub> H<sub>6</sub> N<sub>6</sub> O:  
Cal. C: 40,48 H: 3,40 N 47,22 %  
Hall. C: 40,75 H: 3,43 N: 46,84 %

3.6.- 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina <sup>17)</sup>



5,5 gr de nitrito sódico disueltos en agua - se añaden lentamente sobre 4,7 gr de 11 en 15 ml de ácido acético al 50 %. Después de dos horas - aparece un precipitado en forma de gel. 100 ml de una solución etanólica al 30 % se añaden con

cuidado y la mezcla de reacción se agita varias horas a 13-5° C.

El precipitado formado se filtra, se lava -- con agua fría y se seca, obteniéndose 3,5 gr (65%) -- del derivado nitroso 12 el cual se indentifica en base a los siguientes datos analíticos y - espectroscópicos:

- p.f.: 113-5° C
- Prueba de Liebermann <sup>36)</sup>: positiva.
- IR: 3500,1875,1780,1610,1560,1250cm<sup>-1</sup>
- UV: 216,262,300 nm
- RMN: 8,93/s (1) 2-H; 8,90/s (1) 8-H;  
6,15/d (1) J=51 -H; 5,63/d (1)  
J=5 2' -OH; 5,28/d (1) J=5 3' -OH;  
4,68/m (1) 2' -H; 4,24/m (1) 3' -H;  
4,04/m (1) 4' -H; 3,64/m (2) -CH<sub>2</sub>-;  
3,60/s (3) -CH<sub>3</sub>. Tras adición de -  
agua pesada el espectro se simpli-  
fica notablemente.

#### 4.- INHIBICION DE N-NITROSO DERIVADOS CON ACIDO ASCORBICO.

##### 4.1.- En N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimetilaminopurina.

N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimetilaminopurina y ácido ascórbico (en las proporciones indicadas en la siguiente tabla) se disuelven en 25 ml de una solución buffer de pH 2,8. 100 mg de nitrito sódico, disueltos en la mínima cantidad de agua, se añaden lentamente y con agitación magnética. La reacción se mantiene a 37° C, durante 3 horas.

10 ml de esta solución se extraen con cloruro de metileno (2x20). La fase orgánica se extrae con ácido clorhídrico 5 N y la solución se evapora hasta casi sequedad en un baño de agua, a 50° C y bajo corriente de nitrógeno. Al residuo se le añaden 5 ml de ácido acético glacial y se enrasan hasta 10 ml con una solución al 3 % de ácido bromhídrico, en ácido acético. 2 ml de esta solución se diluyen hasta 5 ml con reactivo colorante y, después de calentarla a 50° C durante 3 minutos y enfriarla rápidamente, se lee la absorción a 550 nm.

Los resultados obtenidos se describen a continuación:

<u>mg 6-DNAP</u>	<u>equiv.</u> <u>ác. ascórb.</u>	<u>Absorc.</u>	<u>ppm</u>
26.05	0.1	.030	1440
25.00	0.3	.063	3120
25.10	0.5	.071	3610
26.00	0.7	.097	4690
25.55	1.0	.027	1270
25.60	-	.059	2780

Los resultados obtenidos en estas experiencias no permiten establecer ningún tipo de correlación, ya que los valores no son significativos. Modificando la composición del buffer es posible obtener una correlación significativa.

4.2.- En 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetilamino purina.

9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimetilaminopurina y ácido ascórbico, en las proporciones indicadas en la siguiente tabla, se disuelven en 25 ml de una solución buffer de pH 2,8. 100 mg de nitrito sódico se añaden lentamente y con agita

ción. Después de tres horas, a 37° C, se procede a la extracción, tal como se ha indicado anteriormente. La inhibición de dimetilnitrosamina (DMN) se determina midiendo la absorción a 550 nm.

Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

<u>mg 6-DMAPR</u>	<u>equiv.</u> <u>ác. ascórb.</u>	<u>Absorc.</u>	<u>ppm</u>
26.25	0.1	.061	2740
26.35	0.3	.076	3700
25.10	0.5	.056	2090
26.00	0.7	.046	2160
25.40	1.0	.032	1470
25.70	-	.051	2480

En este caso, los resultados obtenidos tampoco dan información suficiente como para establecer alguna correlación, por lo que se cree conveniente modificar la composición del buffer.

#### 4.3.- N<sup>6</sup>-metilaminopurina.

178 mg de N<sup>6</sup>-metilaminopurina (9) y ácido --ascórbico, en las proporciones indicadas a continuación, se disuelven en 15 ml de ácido acético

5 N. 1,8 gr de nitrito sódico, disueltos en la -- mínima cantidad de agua, se añaden gota a gota, con agitación magnética. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se - lleva a 5º C por espacio de 3 horas.

La formación de nitroso derivado (10) se con trola por espectroscopía ultravioleta, identifi cándose el precipitado obtenido por comparación con muestra independiente.

Acido ascórbico: nitrito sódico (mmols)	Acido ascórbico (mmols)	Observacion.
2,00:1,00	34,36	Inhib.tot. <u>10</u>
1,75:1,00	30,06	" " "
1,50:1,00	25,77	" " "
1,25:1,00	21,47	" " "
1,00:1,00	17,18	" " "
0,75:1,00	12,88	" " "
0,50:1,00	8,59	Form. <u>10</u> (UV), pero no de - precipitado.
0,38:1,00	6,44	<u>10</u> (48%)
0,25:1,00	4,29	<u>10</u> (67%)
0,10:1,00	1,71	<u>10</u> (86%)



A la vista de estos resultados puede deducirse que el ácido ascórbico bloquea totalmente la formación de N<sup>6</sup>-nitroso-N<sup>6</sup>-metilaminopurina cuando la relación de ácido ascórbico:nitrito sódico es superior a 0,50:1,00.

#### 4.4.- 9-β-D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina.

134,5 mg de 9-β-D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina (11) y ácido ascórbico en la relación indicada en la siguiente tabla, se disuelven en 7,6 ml de ácido acético 5 N. 0,52 gr de nitrito sódico, disueltos en la mínima cantidad de agua, se añaden gota a gota, con agitación magnética. La mezcla de reacción se lleva 30 minutos a temperatura ambiente y a 5° C durante tres horas.

La formación del nitroso derivado (12) se controla por espectroscopía ultravioleta.

<u>Acido ascórbico nitrito sódico (mmols)</u>	<u>Acido ascórbico (mmols)</u>	<u>Observaciones</u>
1,50:1,00	12,88	Inhib.Nitr.der.12
1,00:1,00	8,59	" " "

Cont.

<u>Acido ascórbico nitrito sódico (mmols)</u>	<u>Ac. Ascórb. (mmols)</u>	<u>Observaciones.</u>
0,50:1,00	4,29	Inhib.nitr.der.( <u>12</u> )
0,40:1,00	3,43	Form.nitr.deriv.
0,30:1,00	2,57	" "
0,20:1,00	1,71	" "
0,10:1,00	0,86	" "

De estos resultados puede deducirse que el umbral de inhibición del nitroso derivado de 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina (12) está situado entre las relaciones 0,40 y 0,50: 1,00 mmols de ácido ascórbico: nitrito sódico.

#### 4.5.- Ester metílico del ácido $\alpha$ -fenil-2-piperidinacético.

116 mg de 1 y ácido ascórbico, en la proporción indicada en la siguiente tabla, se disuelven en 8 ml de ácido acético 5 N. 0,52 gr de nitrito sódico se añaden lentamente, con agitación magnética. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lleva a 5° C por espacio de 3 horas.

El precipitado formado se filtra, se lava -- con agua fría y se seca, identificándose por comparación con muestra independiente como el derivado nitroso 2.

<u>Acido ascórbico nitrito sódico (mmols)</u>	<u>Ac. ascórbico (mmols)</u>	<u>Observaciones.</u>
1,50:1,00	12,87	Inhib.tot.de <u>2</u>
1,00:1,00	8,59	" "
0,90:1,00	7,73	" "
0,80:1,00	6,87	" "
0,70:1,00	6,01	" "
0,60:1,00	5,15	" "
0,50:1,00	4,28	<u>2</u> (28%)
0,40:1,00	3,42	<u>2</u> (43%)
0,25:1,00	2,13	<u>2</u> (76%)
0,00:1,00	0,00	<u>2</u> (100%)

De los resultados obtenidos puede deducirse que el ácido ascórbico es un compuesto eficaz -- para la inhibición del correspondiente derivado nitroso. El umbral de inhibición se encuentra en tre la relación 0,5 y 0,6 mmols de ácido ascórbico respecto a 1 mmol de nitrito sódico.

5.- DEGRADACION DE N-NITROSO DERIVADOS.5.1.- N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosoaminopurina.

20,8 mg en 100 ml de agua se protegen de la luz. Transcurridos 30 días el producto permanece inalterado. Sin embargo, expuesto a la acción de la luz solar y controlando la solución por espectroscopía ultravioleta se obtienen los siguientes resultados:

<u>Tiempo</u> <u>min.</u>	<u>(300nm)</u> <u>% transmisión</u>	<u>(263nm)</u>
15	69	41
30	32	75
70	10	86
120	2	98

La representación gráfica de estos valores - puede verse en la figura 1.

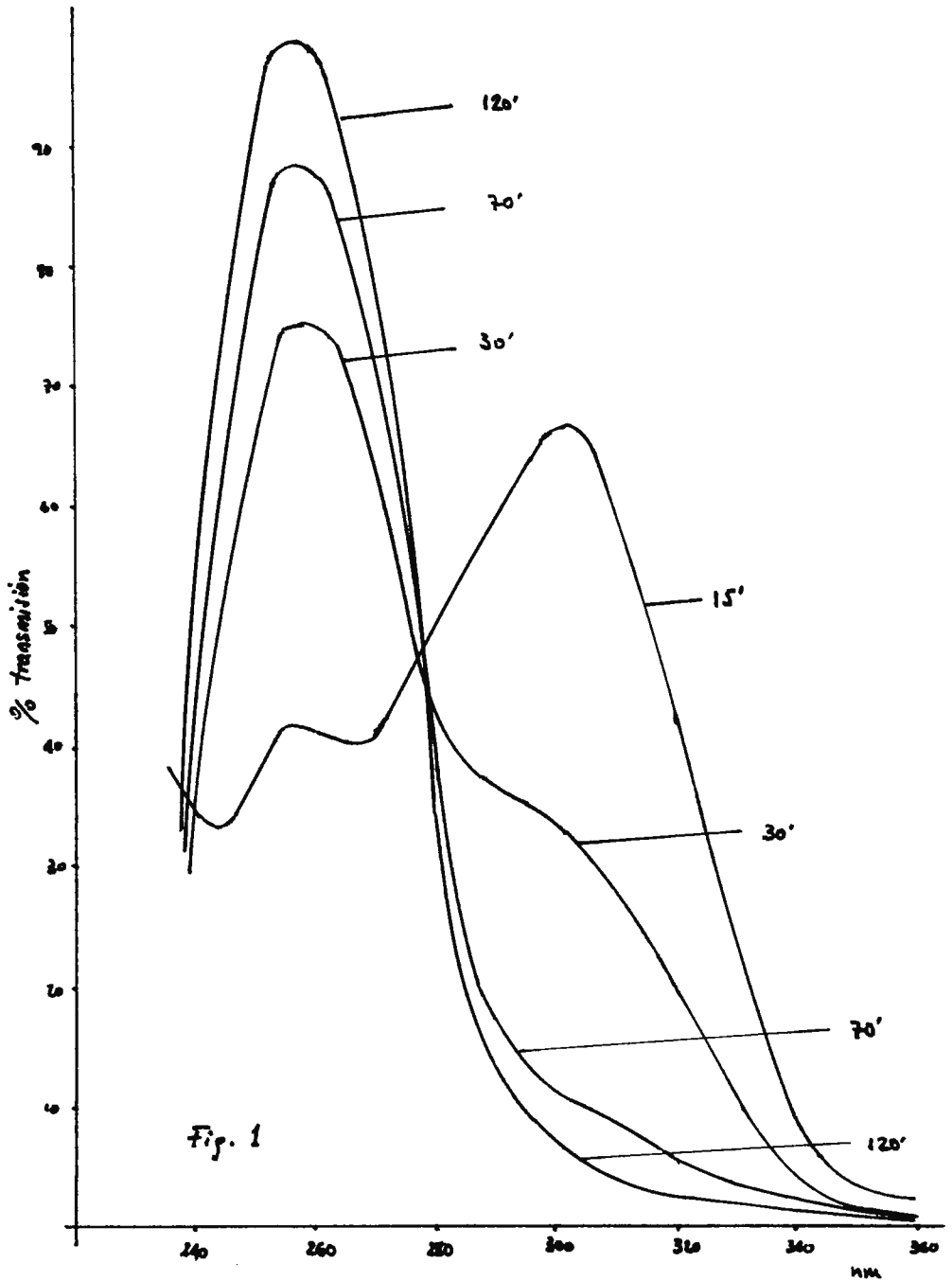


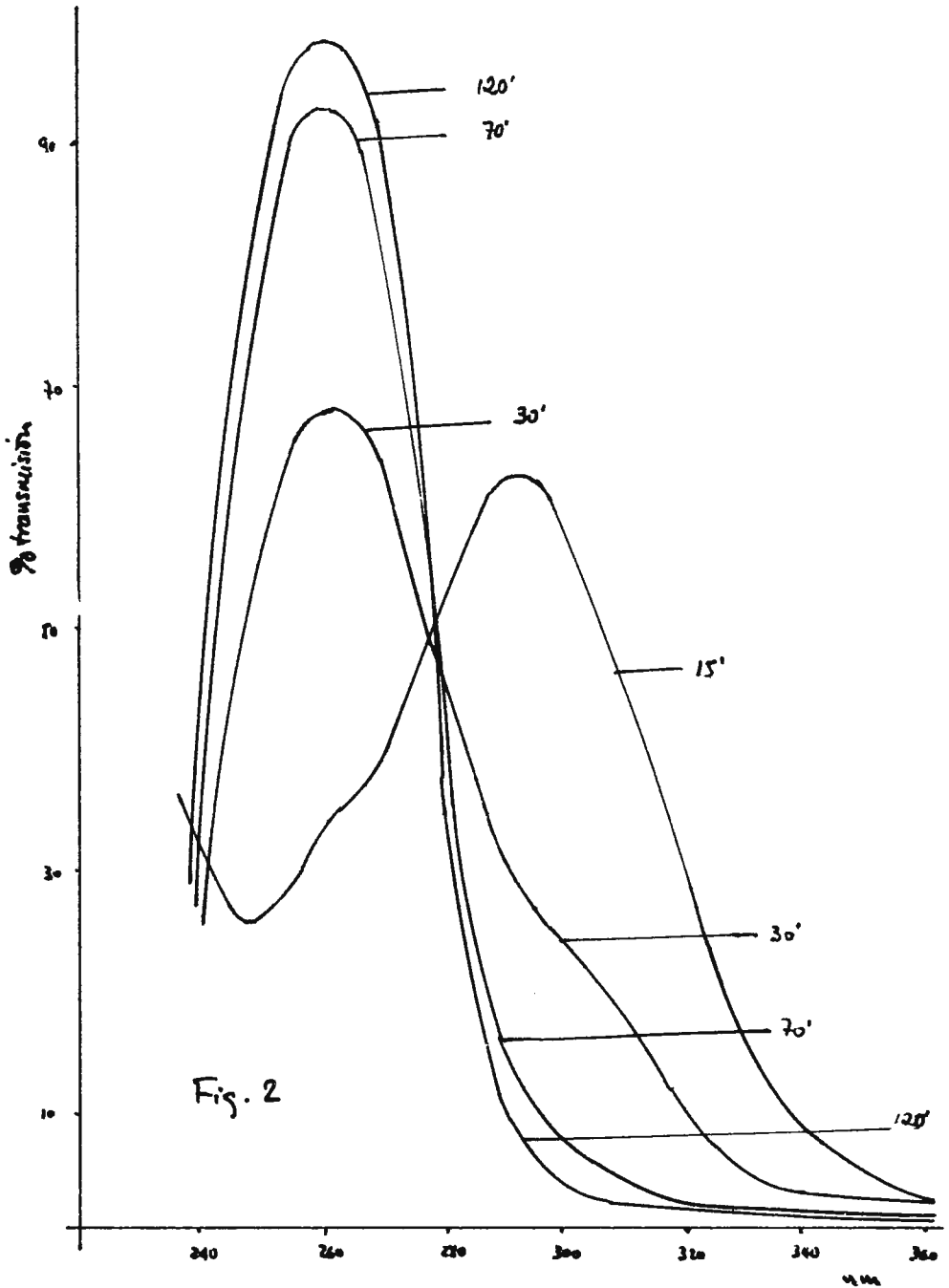
Fig. 1

5.2.- 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosoaminopurina.

29,9 ml disueltos en 100 ml de agua se mantienen inalterados después de 30 días en ausencia de luz. Sin embargo, bajo la acción de la luz solar, se obtienen los siguientes datos espectroscópicos :

<u>Tiempo</u> <u>min.</u>	<u>(296 nm)</u> <u>% transmisión</u>	<u>(268 nm)</u>
15	62	33
30	20	66
70	8	88
120	2	96

La representación gráfica de las curvas de absorción se da en la figura 2.



### 5.3.- Ester metílico del ácido $\alpha$ -fenil-N-nitroso-2-piperidin-acético.

23 mg del éster metílico del ácido  $\alpha$ -fenil-N-nitroso-2-piperidin-acético, disueltos en 100 ml de agua, se someten a la acción de la luz solar, controlándose la solución por espectroscopía de ultravioleta.

La influencia de la luz solar sobre este compuesto, en función del tiempo, se muestra en la figura 3.

### 6.- ENSAYOS BIOLÓGICOS.

Cáncer es un fenómeno biológico que puede considerarse como el resultado de la acción de muchos factores. Es por ello por lo que la etiología de esta enfermedad es extremadamente complicada y en el presente momento algunos aspectos son todavía desconocidos.

Desde el momento en que los resultados obtenidos in vitro conducen a la síntesis de nitrosaminas cabe esperar su formación en el cuerpo de



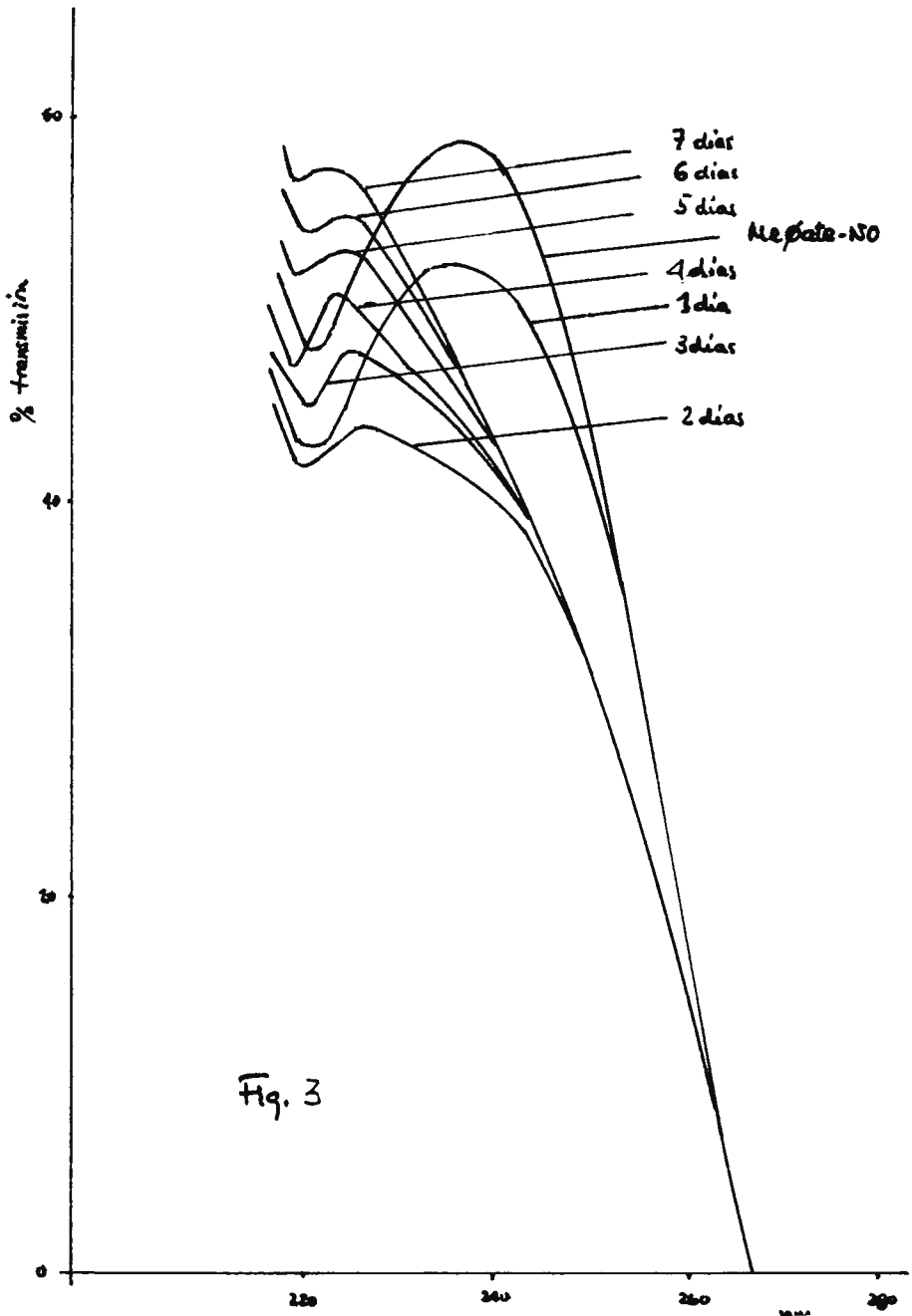


Fig. 3

los mamíferos. De hecho, alimentando a animales de laboratorio con ciertas aminos y nitrito, al mismo tiempo, conduce al desarrollo de tumores<sup>37)</sup>.

Casi toda la información que se posee sobre la carcinogenicidad de nitroso derivados ha sido obtenida en roedores, no por conveniencia, sino porque estos animales son muy susceptibles a la acción de los compuestos nitrosados.

Observaciones efectuadas en animales<sup>38)</sup> han llevado a la conclusión de que no existen órganos o células tipo en las ratas que no sean susceptibles a la formación de tumores por uno o más compuestos N-nitroso.

Asimismo, los nitroso derivados actúan sistemáticamente, induciendo tumores en ciertos órganos "blanco" cualquiera que sea el medio de administración. También son mucho más efectivos en pequeñas dosis, pero continuas (especialmente -- por vía oral), que en una o pocas dosis grandes.

Teniendo en cuenta estos datos se ha ensayado la posible carcinogenicidad en animales de dos componentes de RNA, N<sup>6</sup>-metilaminopurina y su

ribósido correspondiente, y tres drogas de uso frecuente como son Librium, Ritalin e Imipramina con nitrito sódico en condiciones parecidas a las del estómago.

6.1.- 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosaminopurina (6-MNAPR) y N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosaminopurina (6-MNAP)

En un primer ensayo del efecto de carcinogenicidad, 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosometilaminopurina y su correspondiente base, N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosoaminopurina, se han administrado como una solución de 1 mol. en el agua de beber a ratones Swiss CD-1, durante dos días consecutivos cada semana.

Después de ocho meses de tratamiento, los ratones sobrevivientes fueron sacrificados para efectuar una completa necropsia. Todas las secciones de los pulmones fueron separadas, fijadas en solución de Bouin, y examinadas dos veces, por lo menos, por adenomas. Tumores representativos y todas las lesiones posibles fueron examinadas en secciones histológicas.

Los resultados muestran claramente que 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosaminopurina es un tumorigeno de pulmón. El tratamiento con este producto proporcionó 26 adenomas en 41 ratones, comparado con 2 en 18 animales de control. Los animales machos mostraron una mayor incidencia tumoral (17 tumores en 21 ratones) que los ratones hembras (9 en 20).

El tratamiento con N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosaminopurina proporciona, solamente, 1 adenoma de pulmón en 41 ratones; es decir, un número significativo más bajo que el encontrado en el grupo de animales tratados con el ribósido. La carencia de efecto carcinógeno de N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosaminopurina comparada con su ribósido, confirma la posibilidad de que este segundo compuesto, como un nucleósido de purina, pueda ser activado por la enzima adenosina deaminasa, con la liberación de un intermedio monometilnitrosamina, que en la base no tiene lugar.

Asimismo se han ensayado trasplacentalmente estos dos compuestos, para observar los efectos en los fetos de los ratones.

Ratones Swiss CD-1, a dosis de 40 mg/Kg, die--ron más denomas que los controles a los 8 meses de nacer. 37 ratones de 65 que fueron tratados, murieron entre las 12 y 20 semanas de tratamiento a causa de multiples timomas, cuando los controles no proporcionaron ninguna muerte.

Con estos resultados se pone de manifiesto - que el 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metil-N<sup>6</sup>-nitrosoaminopurina puede considerarse como la primera demostración de un compuesto que podría formar una nueva categoría en la lista de carcinógenos po--tenciales ambientales: las nitrosaminas deriva--das de nucleósidos de purinas hipermodificadas en RNA.

#### 6.2.- 10,11-dihidro-5-(3-dimetilaminopropil)-3H-dibenz (b,f) azepina (Imipramina).

Se han tratado crónicamente ratones con imipramina (100 mg/Kg), nitrito sódico (1gr/l) y dosis bajas de dimetilnitrosamina (0,1 ppm) para determinar los efectos producidos en los parámetros reproductivos, observando que la imipramina

causa una mortalidad perinatal doble de lo esperado.

Por otra parte la administración de imipramina conjuntamente con nitrito sódico no produce efectos significativos entre los animales, pero sí incrementa cierta infertilidad en algunas hembras.

## 7.- CONCLUSIONES.

1º. Varias drogas de uso frecuente, así como ciertos componentes del RNA, conteniendo grupos de amina secundaria reaccionan in vitro con nitrito sódico y medio ácido, para dar los N-nitroso derivados correspondientes. Concretamente, estos compuestos han sido :

- Ester metílico del ácido  $\alpha$ -fenil-2-piperidin acético (Ritalin).
- 7-cloro-5-fenil-2-metilamino-4-óxido-3H-1,4-benzodiazepina (Librium).
- Reserpina.
- 10,11-dihidro-5-(3-metilaminopropil)-5H-dibenz-(b,f) azepina (Imipramina).

- N<sup>6</sup>-metilaminopurina.
- 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina.

2º. Contrariamente a lo descrito para las -- aminas terciarias, la 10,11-dihidro-5-(3-dimetilaminopropil)-5H-dibenz (b,f) azepina, llamada -- imipramina, no conduce in vitro a la formación -- del N-nitroso derivado, en presencia de nitrito sódico. En su lugar se obtiene un C-nitroso, el 10,11-dihidro-5-(3-dimetilaminopropil)-2-nitroso-5H-dibenz (b,f) azepina, identificado en base a sus datos espectroscópicos y analíticos.

3º. El ácido ascórbico resulta ser un compues to eficaz para la inhibición de formación de los nitroso derivados. El umbral de inhibición se -- encuentra, aproximadamente, alrededor de la rela ción: 0,5 mol de ácido ascórbico respecto a 1 -- mol de nitrito sódico.

4º. La acción de la luz solar sobre los N-ni troso derivados produce una rápida y progresiva degradación. En ausencia de luz son muy estables. Con estas experiencias puede tenerse un método -- óptimo para la destrucción de N-nitrosaminas, o

bien de los materiales de deshecho.

5º. La interacción de 9- $\beta$ -D-ribofuranosil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina, un componente del RNA, con nitrito, bajo condiciones similares a las del estómago, proporciona la formación de nitroso derivado. Este compuesto induce adenomas de pulmón en ratones Swiss CD-1, mientras que su base, la N<sup>6</sup>-metilaminopurina, no es carcinógena en este tipo de animales.

6º. Estudios trasplacentales con el ribósido de la N<sup>6</sup>-metilaminopurina, indican la presencia de múltiples timomas en animales de 12 a 20 semanas de edad, cuando los controles no propor--cionan ningun caso.

7º. Se demuestra, por primera vez, que una -purina de origen vegetal, la 9- $\beta$ -D-ribofurano--sil-N<sup>6</sup>-metilaminopurina abre una nueva categoría de carcinógenos potenciales ambientales: las ni-trosaminas derivadas de nucleósidos de purinas -hipermodificadas en RNA.

8º. Experiencias in vivo efectuadas con una droga de uso frecuente como es la imipramina permiten comprobar ciertos efectos en los paráme--tros reproductivos.



8.- BIBLIOGRAFIA.

1. Boyland, E., Prog. Exp. Tumor Res., 11, 222,- (1969).
2. Magee, P.N., Barnes, J.M., Brit. J. Cancer, 10, 114, (1956).
3. IARC-Monographs of the evaluation of chemicals to man, I, Lyon (1972).
4. Schmahl, D., Oswald, H., Experientia (Basel), 23, 497, (1968).
5. Lam, Y., Nicholas, D.J.D., Biochem. Biophys. Acta, 178, 225, (1969).
6. Sinios, A., Wodsak, W., Deutsch. Med. Wschr., 90, 1881, (1965).
7. Wogan, G.N., Toxicol. Appl. Pharmacol., 31, 323, (1975).
8. Miyahara, S., Nippon Kagaku Zasshi, 81, 19, (1966).
9. Neurath, G., Krull, A., Pirmann, B., Wandrey, K., Beitr. Tabakforsch., 3, 571, (1966).
10. Chambon, P., Chambon R., Lyon Pharm., 27, 259 (1976).
11. Lijinsky, W., Singer, G.M., International -- Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 1974, pag. 111.
12. Hearing, H.R., (92 d Congress) Stock Number 5270-1144, 1971, pag. 8-167.

13. Smith, P.A., Loeppky, R.H., J.Am. Chem. Soc. 89, 1147, (1967).
14. Preussmann, R., "Special Topics in Carcinogenesis", Ed. E. Grudmann, Springer-Verlag, N.Y., 1974, pag. 9.
15. Mirvish, S.S. J. Nat. Cancer Inst., 44, 633, (1970).
16. Lijinsky, W., Conrad, E., Van der Bogart, R. Nature, 239, 165 (1972).
17. A. Giner-Sorolla. , J.Med.Chem. 16, 365, -- (1973).
18. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmähl, D., Z.Krebsforsch., 69, 103, (1967).
19. Magee, P.N., Barnes, J.M., Adv. Cancer Res., 10, 163, (1963).
20. Shank, R.C., Toxicol. Appl. Pharmacol., 31, 361, (1975).
21. Bergel, F., Proc. R. Soc. London, 185, 165, (1964).
22. Muller, E., Miller, J.A., Pharmacol. Rev., - 18, 805, (1965).
23. Magee, P.N., N. Zel. Med. J., 57, 59, (1968)
24. Low, H., Arch. Environ. Health, 29, 256, -- (1974).
25. Edgar, S.A., Nature, 248, 136, (1974).
26. Mirvish, S.S., Wallcabe, L., Eagen, M., Shu bic, P. Science, 177, 65, (1972).

27. Greenblatt, M., J. Nat. Cancer Inst., 50, - 1055, (1973).
28. Dahn, H., Loewe, L., Bunton, C.A. Helv. Chim. Acta., 43, 320, (1960).
29. Wattenberg, L.W., J. Nat. Cancer Inst., 54, 1005, (1975).
30. Walker, E.A., Pignatelli, B., Castegnaro, M., Nature, 258, 176, (1975).
31. Gangolli, S.D., Shilling, W.H., Lloyd, A.G., Food Cosmet. Toxicol., 12, 168, (1974).
32. Eisenbrand, G., Preussmann, R., Essig. Arzneim Forsch., 20, 1513, (1970).
33. Eisenbrand, G., Preussmann, R., "Topics in Chemical Carcinogenesis", Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1972, pag. 323.
34. Polo, J., Chow, Y.L.J., Nat. Cancer Inst., - 56, 997, (1976).
35. Preussmann, R., Daiber, D., Hengy, H., Nature, 201, 502, (1964).
36. Feigl, F., "Spots test in Organic Analysis", pag. 165, Ed. Elsevier, Amsterdam, (1960).
37. Sander, J., Arzneimittel-Forschung., 21, 1572 1707, 2034, (1971).
38. Lijinsky, W. "Chemical Mutagens", IV, Ed. - A. Hollaender, Plenum Press, N.Y., (1976), pag. 193.





FUNDACION JUAN MARCH  
SERIE UNIVERSITARIA

**Títulos Publicados:**

1. — *Semántica del lenguaje religioso.* / A. Fierro  
(Teología. España, 1973)
2. — *Calculador en una operación de rectificación discontinua.* / A. Mulet  
(Química. Extranjero, 1974)
3. — *Skarns en el batolito de Santa Olalla.* / F. Velasco  
(Geología. España, 1974)
4. — *Combustión de compuestos oxigenados.* / J. M. Santiuste  
(Química. España, 1974)
5. — *Películas ferromagnéticas a baja temperatura.* / José Luis Vicent López  
(Física. España, 1974)
6. — *Flujo inestable de los polímeros fundidos.* / José Alemán Vega  
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
7. — *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.* /  
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
8. — *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.* / José Plá Carrera  
(Matemáticas. España, 1974)
9. — *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.* /  
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000  
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
10. — *El teatro español en Francia (1935–1973).* / F. Torres Monreal  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
11. — *Simulación electrónica del aparato vestibular.* / J. M. Drake Moyano  
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
12. — *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.* /  
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
13. — *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.* /  
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
14. — *La obra gramatical de Abraham Ibn <sup>c</sup> Ezra.* / Carlos del Valle Rodríguez  
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

15. — *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.* / Felipe Ruíz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
16. — *El significado teórico de los términos descriptivos.* / Carlos Solís Santos (Filosofía. España, 1973)
17. — *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica.* / Gumersindo Ruíz Bravo (Economía. España, 1971)
18. — *La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana).* / Pedro García Montalvo (Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
19. — *Estudios sobre la hormona Natriurética.* / Andrés Purroy Unanua (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
20. — *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.* / José Salvador Serrano Molina (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
21. — *El hombre y el diseño industrial.* / Miguel Durán-Lóriga (Artes Plásticas. España, 1974)
22. — *Algunos tópicos sobre teoría de la información.* / Antonio Pascual Acosta (Matemáticas. España, 1975)
23. — *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile.* / Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
24. — *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo. Teoría y realizaciones.* / Juan Manuel Martín Sánchez (Ingeniería. España, 1973)
25. — *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
26. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
27. — *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
28. — *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real.* / Vicente Zugasti Arbizu (Física. España, 1975)
29. — *Transferencia de carga en aleaciones binarias.* / Julio A. Alonso (Física. Extranjero, 1975)
30. — *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.* / José Luis Sebastián Franco (Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.*/ Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.*/ Eduardo Acosta Méndez. (Filosofía. España, 1973).
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.*/ Salvador Ordóñez Delgado. (Geología. España, 1975).
- 34.— *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados.*/Federico Durán López. (Derecho. España, 1975).
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.*/Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.*/ Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.*/Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos. Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.*/José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.*/José Luis Blasco Olcina. (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.*/M<sup>a</sup>. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología. España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.*/Francisco Sandoval Hernández. (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.*/José Antonio Pero-Sanz Elorz. (Ingeniería. España, 1974).
- 43.— *Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.*/Cándido Santiago-Alvarez. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
- 44.— *Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae alterados en la biosíntesis de proteínas.*/Lucas Sánchez Rodríguez. (Biología. España, 1976).

- 45.— *Sistema automático para la exploración del campo visual.* José Ignacio Acha Catalina. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
- 46.— *Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.* /Margarita Ruiz Altisent. (Ciencias Agrarias. España 1975).
- 47.— *El uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular en las células de Ehrlich y en escherichia coli.* /Francisco Javier García-Sancho Martín. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1974).
- 48.— *Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina en la neurona adrenérgica periférica.* /Antonio García García. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1975).
- 49.— *Introducción a los espacios métricos generalizados.* /Enrique Trillas y Claudi Alsina. (Matemáticas. España, 1974).
- 50.— *Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.* /Enrique Pando Ramos. (Química. España, 1975).
- 51.— *Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.* /Fernando Orozco y Carlos López-Fanjul. (Biología Genética. España, 1973).
- 52.— *Mecanismos neurales de adaptación visual a nivel de la capa plexiforme externa de la retina.* /Antonio Gallego Fernández. (Biología Neurobiología. España, 1975).
- 53.— *Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham.* /M<sup>a</sup>. Teresa Herrera Hernández. (Literatura y Filología. España, 1976).
- 54.— *Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago.* /Rafael Flaquer Montequi. (Historia. España, 1975).
- 55.— *Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.* /Manuel Castellet Solanas. (Matemáticas. Extranjero, 1974).
- 56.— *Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.* /Pedro Sánchez Lazo. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
- 57.— *Estudios sobre la expresión genética de virus animales.* /Luis Carrasco Llamas. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1975).
- 58.— *Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.* /Juan M. Serradilla Manrique. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1974).



59. – *Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.* / Carmen Nieves Afonso Rodríguez. (Física. España, 1975).
60. – *El sistema de Servet.* / Angel Alcalá Galve. (Filosofía. España, 1974).
61. – *Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea.* / David Mourão-Ferreira y Vergilio Ferreira. (Literatura y Filología, 1977).
62. – *Sistemas intermedios.* / María Manzano Arjona. (Filosofía. España, 1975).
63. – *A la escucha de los sonidos cerca de  $T_\lambda$  en el  $^4\text{He}$  líquido.* / Félix Vidal Costa. (Física. Extranjero, 1974).
64. – *Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.* José Ramón Farré Muntaner. (Ingeniería. España, 1976).
65. – *Desnaturalización de una proteína asociada a membrana y caracterización molecular de sus subunidades.* / José Manuel Andreu Morales. (Biología. España, 1976).
66. – *Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.* / Enrique Blázquez Fernández. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1976).
67. – *La teoría de los juegos semánticos. Una presentación.* / Juan José Acero Fernández. (Filosofía. Extranjero, 1974).
68. – *El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria.* / Margarita Ortega López. (Historia. España, 1976).
69. – *Razas vacunas autóctonas en vías de extinción. (Aportaciones al estudio genético).* / Miguel Vallejo Vicente. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1976).
70. – *Desviaciones del sistema y de la norma de la lengua en las construcciones pronominales españolas.* / María Antonia Martín Zorraquino. (Literatura y Filología. España, 1974).
71. – *Sociología del ejército español en el siglo XIX.* / Fernando Fernández Bastarreche. (Historia. España, 1977).
72. – *La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX.* / Juan Francisco García Casanova. (Filosofía. España, 1976).

73. – *Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán.* / Montserrat Meya Llopart. (Literatura y Filología. Extranjero, 1976).
74. – *La Constitución de 1931 y la autonomía regional.* / Adolfo Hernández Lafuente. (Ciencias Sociales. España, 1976).
75. – *El modelo constitucional español del siglo XIX.* / Miguel Artola Gallego. (Historia, 1979).
76. – *Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> policristalino, por el método de la constante dieléctrica.* / Rafael C. Martín Pérez. (Ciencias Físicas. España, 1970).
77. – *C-14 y Prehistoria de la Península Ibérica.* / M. Almagro-Gorbea, F. Bernaldo de Quirós, G. A. Clark, R. de Balbín-Behrmann, G. Delibes, J. J. Eiroa, U. Espinosa, M. Fernández-Miranda, M. D. Garralda, A. González, M. González, F. Gusi, P. López, B. Martí, C. Martín de Guzmán, A. Morales, A. Moure, C. Olaria, M. Sierra y L. G. Strauss. (Reunión celebrada en la Fundación Juan March el día 14 de abril de 1978).
78. – *Cultura en periodismo.* / Manuel Martín Serrano, Juan Ramón Masoliver, Rafael Conte Oroz, Carlos Luis Alvarez, Amando de Miguel, Manuel Seco, José Luis Abellán, André Fontaine. (Seminario de "Cultura en periodismo", celebrado en la Fundación Juan March, los días 26 y 27 de junio de 1978).
79. – *Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.* / Braulio M. Fraga González. (Ciencias Agrarias. Extranjero, 1976).
80. – *Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.* / María Dolores Guerra Suárez. (Química. España, 1976).
81. – *Sobre Arquitectura Solar.* / Guillermo Yáñez Parareda. (Arquitectura y Urbanismo. España, 1974).
82. – *Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.* / Luis Lamas de León. (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1977).
83. – *La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica.* / Carlos Díez Viejobueno. (Geología. España, 1976).





