

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DESDE UNA ÓPTICA QUÍMICA

María Elena Cañizares

Departamento de Química Macromolecular, Centro de Biomateriales, Universidad de La Habana, Ave. Universidad entre Ronda y G, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba, Correo electrónico: mari@fq.uh.cu

Recibido: Septiembre de 2009; Aceptado: Enero de 2010

RESUMEN

En trabajos anteriores se pudo demostrar que el 2-cianoacrilato de n-butilo (CAB), monómeros acrílicos de amplio uso en el mercado como adhesivos quirúrgicos, se hidroliza al contactar material biológico a un tipo específico de acrilamida. Para efectuar un análisis de la relación entre la estructura química y la actividad biológica de este derivado, y comprender las afectaciones que pudiera provocar en los organismos vivos, es sin lugar a dudas la acrilamida común el análogo químico de mayor similitud estructural. En el presente trabajo se estableció un paralelo entre ambas estructuras para demostrar desde una óptica química las consecuencias biológicas que se esperan por la analogía y diferencia entre ambas estructuras. Este análisis es de utilidad para canalizar la evaluación biológica desde una base científica que contribuya a la disminución en el uso de los animales de experimentación, y cumplimentar con la política de las tres R.

Palabras claves: cianoacrilatos, acrilamidas, hidrólisis, estructura, actividad

ABSTRACT

In a previous work it was possible to demonstrate that 2,n-butyl cyanoacrylate (CAB), acrylic monomer of a wide use in marketing as chirurgic adhesive, is been hydrolyzed when keep in contact with biological material to a specific type of acryl amide. In order to effectuate the analysis between chemical structure and biological activity of the product, and understand the affectation that it could provoke in life organism, is without any doubt common acryl amide the chemical analogous of high structural similarities. In the present work it was established a parallel between both structures in order to demonstrated since a chemical point of view biological consequences that could be expected by analogy and differences between both structures. This analysis is useful in order to canalize biological evaluation since a scientific base which contributes to decrease the number of test's animals and carry out with three R policies.

Key words: cyanoacrylates, acrylamide, hydrolysis, structure, activity

INTRODUCCIÓN

El análisis de la relación entre la estructura y la actividad de un compuesto (SAR, del inglés), es una alternativa para identificar los riesgos químicos potenciales y permite establecer un nivel de prioridad a la industria y a los gobiernos en la evaluación de los compuestos. El hecho está dado porque las evaluaciones toxicológicas requieren el empleo de numerosos recursos gastables, lo que las hace extremadamente costosas. En la evaluación de la salud ambiental y ocupacional el SAR se utiliza para predecir la dispersión de los compuestos en los ambientes químico-físicos y en la evaluación de materiales novedosos. En varios trabajos anteriores se ha puesto de manifiesto la hidrólisis que experimentan los 2-cianoacrilatos de alquilo, y en particular el CAB al contactar material biológico o disoluciones fuertemente básicas a un tipo específico de acrilamida, que es novedosa [1-5]. El cambio estructural está precedido de la formación de un aducto entre el grupo

carbonilo del monómero y grupos amino cuaternarios de las biomoléculas. La formación de este aducto ya se había descrito con anterioridad por otros autores [6,7]. Este resultado ya es preocupante con relación a la predicción de la actividad biológica del derivado. Autores de reconocido prestigio dentro del campo de la toxicología han planteado la potencialidad carcinogénica debida a este tipo de interacción [8-10]. El hecho es de muy fácil comprensión. Toda aquella proteína que involucre su grupo amino cuaternario en una relación de aducto, queda inmovilizada y pierde su función biológica inherente. Son precisamente los grupos amino y carboxilos los grupos funcionales preferidos por la naturaleza para actuar como centros activos en las proteínas. Este hecho trae como consecuencia que aquellas personas que queden expuestas de forma reiterada a monómeros de cianoacrilatos, como por ejemplo los trabajadores que elaboran estos monómeros, los que los utilizan en fabricas de equipos electrónicos o ensambladoras de autos, o las enfermeras que los utilizan como adhesivos quirúrgico, están perdiendo paulatinamente alguna función biológica, que al rebasar el umbral que garantiza la homeostasis del organismo, se manifiesta en la práctica como un cáncer. A pesar de todas estas consideraciones, no se encontraron en la literatura precedente estudios dirigidos al análisis de las estructuras de aductos.

El hecho está dado porque a pesar de ser un tema de interés netamente toxicológico, es absolutamente necesario abordar el tema desde una óptica netamente química, haciendo uso de métodos de análisis químicos combinados. Al poner en práctica esa estrategia de trabajo, el estudio culminó con la identificación de la nueva acrilamida [5].

En el presente trabajo queremos enfatizar en las consecuencias biológicas que representa la formación de un aducto y hacer notar otras características que posee esta nueva molécula que la convierte potencialmente en un compuesto más peligroso que la acrilamida común, molécula que sí ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista toxicológico, y a la que se reconoce como neurotóxico, axonotóxico, carcinógeno y patrón de genotoxicidad en los ensayos de aberración cromosómica en la cabeza del espermatozoide [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Han sido descritos en detalle en los trabajos precedentes, cuando se obtuvo el hidrolizado del CAB, que se denominó como CABH. Este derivado se aisló frente a la glicina, y se identificó su presencia al contactar la piel de conejos, los glóbulos rojos humanos lavados o la globina humana [2,3,5]. Para la identificación del compuesto se emplearon los métodos espectroscópicos combinados clásicos del análisis químico de estructuras orgánicas: FTIR para lo que se utilizó un equipo *ATI Masson* en la zona comprendida entre 4.000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , RMN en un

espectrofotómetro *Bruker AC 250F* de pulsos y transformada de *Fourier*, a la frecuencia de 250 MHz para el ^1H y a la frecuencia de 62,8 MHz para el ^{13}C , y UV, que se registró en un espectrómetro de la *Pharmacia LKB ULTRAPECT III*, entre 100 y 1.000 λ , con lámpara de helio – neón. Se usaron los conceptos teóricos de química orgánica con relación a la hidrólisis de ese grupo funcional, así como la cromatografía plana de capa delgada ascendente, y se usó como fase móvil cloroformo–acetona 4:1, ó papel, para el que se utilizó como fase móvil ascendente fenol agua 4:1. Como en la práctica se pudo identificar que el grupo funcional del carbonilo del éster se corre de 1.740 cm^{-1} en el monómero a 1.749 cm^{-1} en el hidrolizado, fue suficiente la espectroscopia FTIR para identificar al derivado sobre la piel o en presencia de los componentes de la sangre. En estos experimentos se observó con claridad la señal carbonílica a 1.749 cm^{-1} , separada de la señal correspondiente a los grupos carbonilos correspondientes a la piel, los glóbulos o la globina. En todos los experimentos se evidenció la pérdida del grupo nitrilo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 2–cianoacrilatos de alquilo son líquidos incoloros de olor penetrante, densidad similar a la del agua y de volatilidad que se considera como intermedia, menor que 0,2 kPa, a 25°C [11]. Este aspecto ya convierte a los monómeros en compuestos más peligrosos que la acrilamida común, porque se dificulta el control de la contaminación. Una vez que el monómero contacta los tejidos biológicos por vía inhalatoria o dérmica, puede establecer una relación de aducto que facilita la hidrólisis del grupo nitrilo a amida [1-5].

La interacción de compuestos químicos con las proteínas provoca en determinadas ocasiones lesiones graves en las estructuras celulares o a las proteínas circulantes del organismo, elementos formes de la sangre, enzimas y hormonas. Todas las proteínas del organismo poseen algún grupo amino cuaternario que queda expuesto en la conformación tridimensional de su estructura nativa y le es factible establecer la relación de aducto con el grupo carbonilo del monómero de cianoacrilato de alquilo original. Ahora la molécula incorpora un grupo amino y un grupo carbonilo, que sustituyen al nitrilo de la molécula original. El cambio de grupos funcionales también pudiera propiciar la formación de aductos con los componentes biológicos. Estos tres aductos además de inutilizar la función biológica de cada proteína unida, convierten a una pequeña molécula orgánica sintética en una macromolécula que puede viajar libremente por todo el torrente sanguíneo, que pudiera encontrar obstáculos en algún pequeño vaso capilar y provocar un trombo distal o inducir reacciones inmunomediadas.

Veamos ahora que debemos esperar en cuanto a la degradación biológica de la nueva

estructura por la analogía estructural con la acrilamida común.

Ambas conservan el grupo vinilo. En la Figura 1 se esquematizó el mecanismo de biotransformación descrito para la acrilamida común.

De este grupo funcional en la acrilamida común se conoce que debido a la acción de las isoenzimas del complejo microsomal del Citocromo P₄₅₀, el enlace vinílico se epoxida, dando un compuesto que se conoce como glicidamida. Por esta posición la acrilamida común forma especies reactivas de oxígeno, y también puede establecer uniones covalentes con los grupos amino terminal de la hemoglobina, o inicia la cascada de la peroxidación lipídica de las membranas. También puede unirse al ADN y manifestarse como genotóxico, con intercambio de cromátidas hermanas, clastogénesis o formación de micronúcleos. Como única vía de detoxificación, puede establecer una unión suicida al glutatión, que se elimina por la orina como ácido mercaptoúrico, mientras esta vía no se sature, y entonces provoca la apoptosis celular por la pérdida de la capacidad de la célula para contrarrestar la acción de metabolitos oxidantes [12].

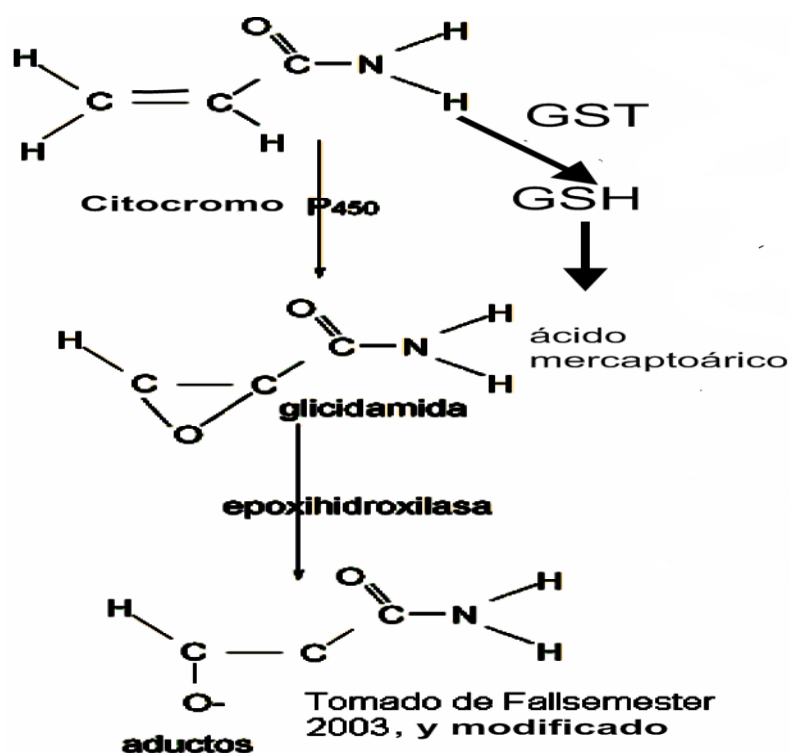


Figura 1. Esquema de la biotransformación de la acrilamida común, tomado de Fallsemester, 2003 y modificado [12].

Sin embargo, entre ambas estructuras químicas se distinguen diferencias muy importantes. En la Figura 2 se muestra la estructura de la nueva acrilamida (CABH).

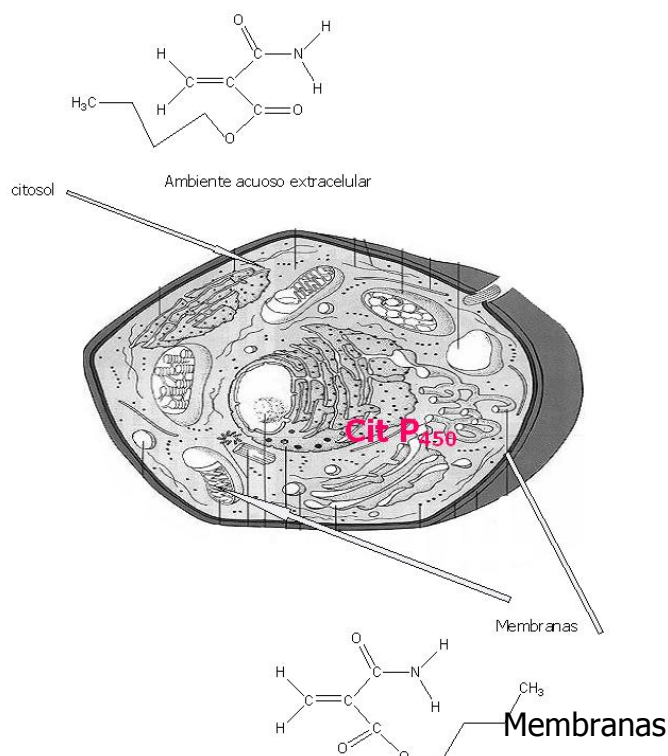


Figura 2. Estructura del CABH y la posible distribución espacial de sus grupos funcionales debida a las interacciones hidrófobas con el entorno acuoso.

En primer lugar, en la acrilamida común, el grupo vinilo está unido a tres hidrógenos, átomo de muy pequeño radio atómico, mientras que en la nueva estructura una de estas posiciones está sustituida por un éster muy voluminoso, lo que constituye un impedimento estérico a la entrada de la enzima para que comience el proceso de biotransformación.

Por otro lado, la presencia de una cadena alquílica de cuatro átomos de carbono en el CAB o en el CABH le confiere características altamente hidrófobas a esas moléculas. En el caso de las proteínas se conoce que las fuerzas hidrófobas son la causa del arrollamiento en su conformación nativa, lo que permite establecer algunas predicciones con relación a las zonas que deben esperarse hacia el interior o exterior de ese arrollamiento [13]. Aplicando igual razonamiento a la nueva estructura, debe esperarse que como consecuencia del ambiente acuoso extracelular o en el citosol de la célula la cadena se pliegue esquivando al agua. Si hubiese un conglomerado de estas moléculas se unirían y formarían micelas, pero lo normal es que debido a la exposición ambiental, estas moléculas llegan al organismo en muy pequeña cantidad, por lo que se encontraran aisladas, y la cadena solo podrá plegarse sobre la misma molécula (véase la Figura 2). La región de la amida es muy hidrófila, por lo que debe plegarse con preferencia hacia la región del grupo vinilo, lo que hace que éste quede ocluido en su interior, impidiendo la entrada de la enzima, pero exponiendo a los grupos carbonilos y amino, favoreciendo aún más la formación de los aductos. Este razonamiento está avalado por los resultados expuestos por otros autores que han detectado en estudios de

degradación *in vitro* en medio acuoso menor velocidad de degradación para los polímeros constituidos a partir de monómeros de cadenas más largas [14], y mayor concentración de formaldehído para los polímeros constituidos a partir de monómeros de menor talla [15], lo que es esperable debido a la mayor relación másica de grupos nitrilo con respecto a la masa total del monómero para estos últimos.

La misma distribución espacial de los sustituyentes hace que el compuesto, de masa molecular muy pequeña, inferior a los 500 uma, en los medios biológicos esté posibilitado teóricamente para atravesar las diferentes capas de tejido, burlando todas las barreras lipídicas del organismo. Su región hidrófoba, constituye una lanzadera al interior de las estructuras celulares, jugando con las dos zonas bien definidas dentro de la misma molécula, propiciaría su absorción a través de la piel y distribución a cualquier tejido del organismo.

Dentro de las membranas, la molécula alcanza nuevamente un ambiente lipídico, que le permite desplegarse y exponer al grupo vinilo.

Pero para alcanzar a las isoformas del P₄₅₀, debe llegar hasta la membrana del retículo endoplasmático liso, que es donde se encuentran estas enzimas. Entre tanto, puede formar los aductos con las diferentes proteínas de membrana, proteínas formadoras de canales, organelos intracelulares y ocasionar daños fatales, antes de ser biotransformada.

Una vez en el citosol, una parte podrá llegar al retículo, pero también tiene la posibilidad de atravesar la membrana del núcleo y alcanzar el material genético, siendo muy factible la unión a las histonas, proteínas altamente básicas, característica que fue previamente demostrada que favorece la formación del primer aducto cuando se trabajó con los aminoácidos [3].

Otra barrera química que le queda todavía a esta enzima para poder actuar y degradar a la nueva molécula está dada porque es una hemo-proteína, que logra su función oxidante porque juega con las formas ferroso-férrica del hierro para lograr transferir el oxígeno a las moléculas que biotransforma. Pero este grupo hemo con carga positiva, es un candidato ideal para formar los aductos con la nueva molécula, lo que conllevaría a la inhibición enzimática. Todo ello hace muy difícil la participación de esta enzima y por lo tanto la degradación del compuesto debe estar deprimida con relación a la acrilamida común.

Todo el análisis está soportado además por los datos que aparecen descritos en la literatura precedente. Se conoce que la acrilamida común posee una curva de eliminación bifásica. Una a las cinco horas de ingresar al organismo, debida a la acrilamida unida al glutatión sin previa transformación, y la otra entre ocho y diez días posteriores, que se cree debida a la degradación de los aductos que forma con la hemoglobina [16].

Para el caso de los 2-cianoacrilatos de alquilo, mediante el estudio de su degradación utilizando radioisótopos, se ha observado que la retención en el interior del organismo dura más tiempo. A los cinco días, el 4,2% del cianoacrilato de metilo se elimina por la orina y el 0,2% del CAB. A los 154 días se observa la retención del 91,7 del CAB y excreción de 2,3% en la orina [17]. Estos datos están indicando mayor retención para los compuestos provenientes de los cianoacrilatos que para la acrilamida común, pero incluso, mayor retención a medida que se incrementa el largo de la cadena dentro de la misma serie homóloga. Todo este análisis conduce a determinar que la evaluación de esta vía es de vital importancia, puesto que permite discriminar entre la bioacumulación por la formación de aductos o la excreción. El dato es de vital importancia para analizar las consecuencias a la exposición reiterada, lo que es fundamental para los trabajadores expuestos.

Por analogía con la acrilamida común, también es importante realizar el análisis del comportamiento del glutatión reducido y de la enzima glutatión-s-transferasa. Es ésta la única vía que se conoce para la destoxificación de la acrilamida común por el organismo.

El estudio de esta vía parece acertado para la nueva molécula si se tiene en cuenta que estos mismos autores detectaron mayor eliminación en la orina que en las heces [17 - 19]. Este comportamiento es similar en la acrilamida.

CONCLUSIONES

El compuesto químico que se obtiene en el sitio de contacto del ciano-acrilato de n-butilo con el material biológico promete una elevada toxicidad. El hecho está dado porque posee más grupos funcionales que la acrilamida común con posibilidad de formar aductos con las estructuras del organismo. Además, porque posee al menos tres razones químicas importantes que tienden a dificultar su biotransformación: impedimento estérico, oclusión del enlace vinílico e inmovilización enzimática de las isoformas del citocromo P₄₅₀, lo que limita la eliminación por la vía del glutatión. El análisis indica que estas moléculas deberían ser mejor investigada desde el punto de vista toxicológico antes de que sean utilizadas en cualquier composición comercial, como se ha venido haciendo hasta el presente.

Agradecimientos. A la *Dra. Torres Alemán* por su colaboración con sus sugerencias y los cursos de postgrado.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cañizares ME, Ibarra E, González R, Bada N "Evaluación de métodos analíticos para la cuantificación de alquil - cianoacrilatos en el ambiente laboral", *Revista Cubana de Química*, **XVII** (1), 53 (2005)
- [2] Cañizares ME, Alvarez M, Quintana G, Torres MA "Transformación química del monómero de

cianoacrilato de n-butilo debido al contacto con muestras de material biológico". VI Congreso de la Sociedad de Bioingeniería, ISBN 9592121583. Artículo TO 89, <http://www.memsoctbio.sld.cu/habana2005/presentación.html>, 2005.

- [3] Cañizares ME "Nuevo enfoque de la polimerización cianoacrílica en medios biológicos." Descubrimiento científico otorgado por la OCPI # 03/2000. Boletín Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Año C # 157 p 380. Publicaciones de marcas y otros signos distintivos y modelos industriales CUISSN 1028 – 1452, 2000.
- [4] Cañizares ME "Evaluación crítica de la norma OSHA 125 – 56 para la medición ambiental de 2 -alquilcianoacrilato", Revista Argentina de Toxicología on line, Retel, Sección de Toxicología Analítica, No. 18 p 42 - 49, ISSN 1668-09IX, 10, 04-6, 2009. <http://www.sertox.com.ar/img/item-full/18003.pdf>.
- [5] Cañizares ME, Mocelo R, Riumont J "Nueva visión del paso de iniciación en la polimerización de los 2 ciano-acrilato de alquilo", *Rev. Iberoamer. Polímeros*, **00**, 00 (2009)
- [6] Couvreur P "Polyalkylcyanoacrylates as colloidal drug carriers", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carriers Systems*, **5**, 1 (1988)
- [7] Miñones J, Yedra-Pimentel E, Conde O, Iribarnegaray E, Casas Paradas "Interaction between Cyclosporin and Poly (isobutyl cyanoacrylate) nanoparticles in Monolayers", *Langmuir*, **10**(6), 1994
- [8] Reppeto M "Toxicología Fundamental, segunda edición". Editorial científico-médica. España, 1988
- [9] Casarett, Doull's "The Basic Science of Poisons". 334 - 353, 1991.
- [10] Hayes AW "Principles and methods of toxicology". 3ª edición. Nueva York, Raven Press, 1994
- [11] Cary R. Concise International Chemical Assessment Document, (CICAD) WHO, número 36, United Nations Environment Programme, International Labour Organization, and World Health Organization, Geneva, P 6, 2001.
- [12] FallSemester, 510315104 home Fall Semester PubH 5103:2003 Exposure to environmental hazards "Acrylamide"/05/2003
- [13] Kyte J, Doolittle RF, *J. Mol. Biol.*, **110**, 157 (1982)
- [14] Müller RH, Lherm C, Herbort J, Couvreur P "In vitro model for the degradation of alkylcyanoacrylate nanoparticles", *Biomaterials*, **11**, 590 (1990)
- [15] Tseng Y, Tabata Y, Hyon S, Ikada Y "In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method" *J. Biom. Mat. Res.*, **24**, 1355 (1990)
- [16] Fürh U, Melanie I, Boetkher M, Kinizing-Schippers A, Weyer A, Jetter A, Lazar D "Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingesting of defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity", *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, **15**(2), 266 (2006)
- [17] Cameron JL, Woodward SC, Pulaski EJ "The degradation of cyanoacrylate tissue adhesive", *Surgery*, **58**, 424 (1965)
- [18] Ousterhour DK, Gladieux GV, Leonard F "Cutaneous absorption of n-alkyl a-cyanoacrylate", *J. Biomed. Mater. Res.*, **2**, 157 (1968)
- [19] Pani KC, Gladieux G, Kulkarni RK, Leonard F "The degradation of n-butyl alpha cyanoacrylate tissue adhesive", *Surgery*, **63**, 481 (1968)