

ANÁLISIS DE LA HIDRÓLISIS DEL CIANOACRILATO DE N-BUTILO SOBRE LA PIEL MEDIANTE ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

María Elena Cañizares^{1*}, Guerlin Quintana², Manuel Alvarez²

1) Departamento de Fundamentos Químico-Biológicos, Facultad de Ingeniería Química, CUJAE. Cuba. Correo electrónico: mariecg@fq.cujae.edu.cu

2) Laboratorio LUCES, Instituto de Materiales, Universidad de la Habana, Cuba

Recibido: Junio 2012; Aceptado: Noviembre 2012

RESUMEN

El cianoacrilato de n-butilo (CAB) es un monómero acrílico ampliamente utilizado en adhesivos. Su toxicidad se asocia a la liberación de formaldehído en los tejidos. Recientemente se demostró en un ensayo "in vitro"; por métodos espectroscópicos, que en presencia de aminoácidos se hidrolizó a un tipo de acrilamida. Dicho compuesto es nuevo y de su estructura química se infiere alta toxicidad. También el formaldehído es tóxico, pero con propiedades químico físicas diferentes, por lo que es muy importante esclarecer cuál de ellos aparece al contactar la piel. El presente trabajo tuvo el objetivo de identificar el compuesto en el tejido biológico. En el experimento "*in vivo*" se utilizó como modelo animal el ratón NMRI. Se aplicó el CAB sobre la piel rasurada y se tomaron muestras de hipodermis de los animales tratados y sin tratar a las 48 horas. Se utilizó la espectroscopia infrarroja (IR) como método de análisis. Como resultado, se identificaron las bandas características de la nueva sustancia en los espectrogramas IR de las hipodermis tratadas. Se demostró que ocurre la hidrólisis y que se absorbe por la piel. El resultado sugiere que se revise el criterio actual de toxicidad del CAB y la nueva amida.

Palabras claves: cianoacrilato, hidrólisis, infrarrojo, espectroscopia, toxicidad

ABSTRACT

N-butyl cyanoacrylate (CAB) is an adhesive monomer highly used in the production of adhesives. The toxicity of this monomer is associated to the liberation of formaldehyde in tissues. Recently, it was demonstrated by spectroscopic methods that n-butyl cyanoacrylate in biological media is hydrolyzed to a new specific type of acrylamide never described before. Both are very toxic substances, but with different chemical-physic characteristics. The present test had the objective of verify if the same hydrolysis occurs in contact with biological tissues. NMRI mice were used as animal model on an "*in vivo*" experiment. Monomer was applied over shaved skin and hypodermis samples were taken 48 hours later. Infrared spectroscopy (IR) was used as method of analysis. As result, characteristics infrared bands of the new acrylamide were recognized over the hypodermis of treated animals, near the application area. It was demonstrated that the hydrolysis took place over the skin and the new product was absorbed to the hypodermis. This result suggests the revision of actual criteria about CAB toxicity.

Key words: cyanoacrylate, hydrolysis, infrared, spectroscopy, toxicity

INTRODUCCIÓN

El cianoacrilato de n-butilo (CAB), es un monómero acrílico ampliamente estudiado en cuanto a su aplicación práctica [1]. Es una molécula altamente conjugada que mantiene su estabilidad, sin polimerizar en un medio ácido fuerte [2]. Son monómeros de reconocida toxicidad, fundamentalmente se describen los casos de asma ocupacional debidos al contacto prolongado con el monómero [3–7]. En la actualidad la toxicidad de estos monómeros se asocia a la liberación de formaldehído en los tejidos [5,8,9] pero no se encontró ningún trabajo que identificara ese compuesto químico en el ambiente biológico.

En un trabajo previo se demostró por primera vez que el CAB, en contacto con aminoácidos

se hidrolizó a un tipo específico de acrilamida antes de polimerizar [10]. El resultado no coincidió con la aparición de formaldehído en ese momento, propuesto por otros autores con anterioridad [5, 8,9]. Ahora es importante verificar si se observa igual comportamiento en matrices biológicas más complejas, específicamente en la piel, que es la fundamental vía de riesgo por la manipulación de estos monómeros. Esto se debe a que la nueva estructura identificada evidencia una elevada toxicidad al contactar el ambiente biológico si se efectúa el análisis desde un punto de vista químico [11]

Con los datos que se recopilaron en el ensayo anterior [10] es posible reconocer la posición de las bandas de los grupos funcionales de la nueva amida mediante espectroscopia infrarroja (IR) en cualquier otro sustrato. En el análisis actual se seleccionó la piel de ratones NMRI por la importancia práctica de este tejido.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos. El cianoacrilato de n-butilo se produjo en *BIOMAT, Universidad de la Habana (Cuba)*, de pureza entre el 97 y el 99%, inhibido con hidroquinona entre 0,1 y 0,3% y estabilizado con ácido p-toluensulfónico entre 0,1 y 0,3%.

Para desarrollar los experimentos “*in vivo*” se tuvieron en cuenta las regulaciones éticas con relación al manejo de los animales de experimentación [12]. Se utilizaron 6 ratones NMRI hembras, adultas, sanas y nulíparas, de siete semanas de edad, de masa corporal entre $(23,9 \pm 1,8)$ g, procedentes del grupo de animales convencionales de *Cenpalab*, con su carta de control de calidad. La masa de cada animal se verificó en una balanza técnica *Sartorius*, modelo PT-1200.

Previo a comenzar el ensayo, los animales seleccionados se mantuvieron 7 días para la adaptación a las condiciones del laboratorio, en cajas de policarbonato (37,5 cm de largo·21,6 cm de ancho·14,7 cm de alto), sin encamado y bajo el control ambiental automático, temperatura (22 ± 2) °C, humedad (60–70%), y ciclo de luz/oscuridad (12/12 horas). El agua y los alimentos (*EMO 1002 ALYco*®, CENPALAB) se esterilizaron mediante autoclave, y se ofrecieron a libre demanda, excepto durante los períodos de manipulación. Al inicio del ensayo, los animales se pesaron de nuevo, y este valor se tomó como la masa corporal a tiempo cero. Se asignaron al azar entre dos grupos, tres controles negativos sin tratamiento y tres tratados con CAB fresco. Cada animal se identificó individualmente por dos dígitos en una de sus orejas, que representaron el tipo de tratamiento y el número del animal dentro del grupo. Se distribuyeron en dos cajas, una correspondiente a los animales controles y la otra a los animales bajo tratamiento. Posteriormente se identificó cada caja mediante tarjetas. A todos los animales se les rasuró, en la región dorsal, un área de 1 cm², veinticuatro horas previas al ensayo. El tratamiento consistió en colocar, con una

micropipeta, 20 μL de CAB fresco, que se distribuyó por el área rasurada en el grupo tratado. A las 48 horas se pesaron de nuevo y se practicó la eutanasia mediante la dislocación cervical. El ensayo culminó con 100% de supervivencia.

Durante la anatomía macroscópica se tomaron muestras finas de la hipodermis, próximas al área de aplicación de la muestra para cada animal. Estas muestras se utilizaron para buscar la presencia de la amida en la hipodermis de los animales tratados.

Para este fin se utilizó la espectroscopia IR, que se registró en un equipo *ATI Mattson (Genesis Series) FTIR spectrometer*, en el intervalo de frecuencia de $4.000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

Previo al análisis, se verificaron las condiciones técnicas del equipo por medio de un filme de poliestireno (patrón de frecuencia de absorción suministrado con el instrumento).

Cada filme de la hipodermis se colocó entre dos discos de bromuro de potasio, KBr, directamente en el paso óptico del equipo de FTIR para registrar las bandas de los grupos funcionales de cada muestra de la hipodermis mediante la técnica espectroscópica de transmisión. Primero se registraron las hipodermis de los animales sin tratamiento, de modo que los espectrogramas registrados sirvieran como control negativo del ensayo para identificar las bandas correspondientes a la hipodermis. Para interpretar los espectrogramas IR se utilizó la literatura clásica [13].

RESULTADOS

En los espectrogramas de la hipodermis de los animales que se tomaron como control negativo se observó una banda centrada en 3.357 cm^{-1} , correspondiente a la superposición de la vibración de valencia del estrechamiento de los grupos amino cuaternario terminales de las proteínas que componen la hipodermis, con los grupos hidroxilo de los ácidos carboxílicos también presentes en las proteínas de la hipodermis. Como las proteínas son polímeros estos grupos funcionales se repiten varias veces, y las bandas que se obtienen en estos casos son anchas y de baja intensidad, como es típico que se presenten en las estructuras poliméricas.

Otra banda importante que se observó dentro del espectrograma IR de la hipodermis fue la vibración de valencia correspondiente al estrechamiento debido al grupo carbonilo de los ácidos

Las bandas correspondientes a la nueva amida se identificaron en el experimento anterior [10]. Son fundamentales la correspondiente al grupo carbonilo, que es característica del compuesto y aparece a 1.749 cm^{-1} , así como la banda a 900 cm^{-1} que también es característica del compuesto y se debe a la formación de amino-complejos entre el monómero y los aminoácidos.

Se pudo comprobar que dichas bandas no se superponen con las de la hipodermis, por lo que hay información suficiente para aplicar el método analítico a la hipodermis que se obtuvo de los

animales tratados.

En la Figura 1, se pueden apreciar los resultados con relación a las bandas correspondientes a los grupos funcionales de la hipodermis de los controles negativos (espectrograma IR en gris) descrito previamente. Estas bandas se distinguen en los espectrogramas de la hipodermis de los animales tratados (espectrograma IR en negro), de las bandas de la nueva amida.

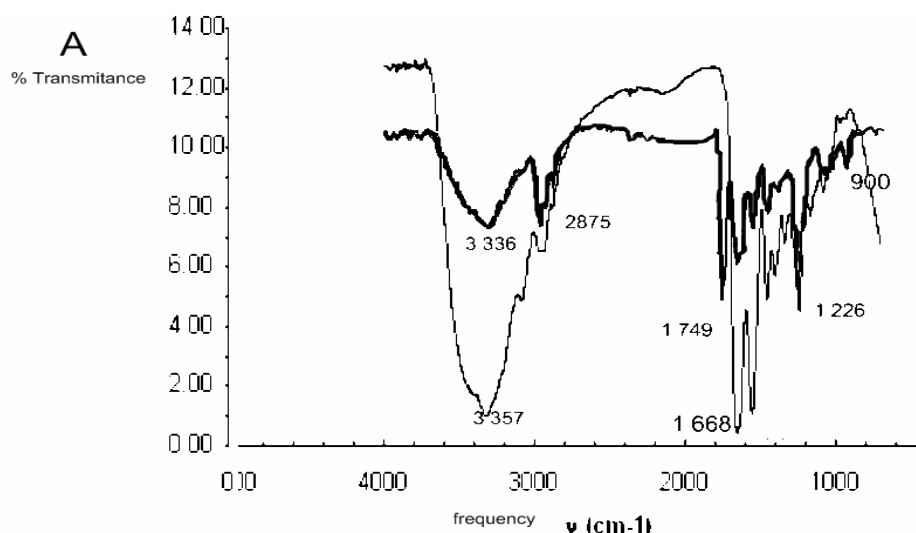


Figura 1. Espectrograma FTIR de la hipodermis de los ratones NMRI controles negativos (en gris) y de la hipodermis de los animales tratados con CAB sobre la piel (en negro).

DISCUSIÓN

En el espectrograma FTIR de la hipodermis de los animales tratados con CAB sobre la piel (Figura 1, espectrograma en negro) se pudo observar con claridad la presencia del amino-complejo de la nueva acrilamida. El grupo carbonilo de la amida, cuya posición característica se encontró a 1.749 cm^{-1} con anterioridad [10], está presente, lo que no deja dudas de que ocurrió la hidrólisis. Esta banda fue observada perfectamente, separada del grupo carbonilo de las proteínas de la hipodermis, que aparece a 1.668 cm^{-1} , al igual que en los espectrogramas de FTIR de los controles negativos.

Otra evidencia importante se puede observar con claridad (en el espectrograma en negro) por la presencia de una señal a 900 cm^{-1} , característica de la vibración de la frecuencia fuera del plano, típica de los grupos -NH en los amino-complejos, banda que no aparece en los espectrogramas de la hipodermis de los animales tomados como control negativo. Esta banda verifica la formación del amino-complejo que se buscaba.

Por otra parte, se puede destacar que la intensidad de la banda a 2.875 cm^{-1} aumentó en los espectrogramas IR de la hipodermis tratada, si se compara con la misma banda en los espectrogramas de los controles negativos. Ahora esta banda corresponde al estrechamiento

simétrico de los grupos metilo de la hipodermis, pero también a los de la amida. Como la amida no es un polímero, la banda se muestra en esta ocasión intensa, aguda y bien definida.

Como es de esperar, no apareció ninguna banda en la región entre 2.222 y 2.225 cm^{-1} . Esta región pertenece a la frecuencia de la vibración de valencia del estrechamiento característica del grupo nitrilo.

Pudiera pensarse que la ausencia de esta banda sea una consecuencia de la pequeña cantidad de monómero que se aplicó sobre la piel de los animales tratados. En el propio espectrograma se puede verificar que este no es el caso.

Se pudo constatar que en el monómero (véase la Figura 2) la banda del grupo nitrilo a 2.225 cm^{-1} es de intensidad similar a la banda del estrechamiento simétrico del grupo metilo a 2.875 cm^{-1} , de modo que si el nitrilo estuviera presente en la hipodermis de los animales tratados, se tendría que observar la banda, tal y como ocurre con la banda con que se compara. Esta es otra evidencia de que el grupo funcional se hidrolizó.

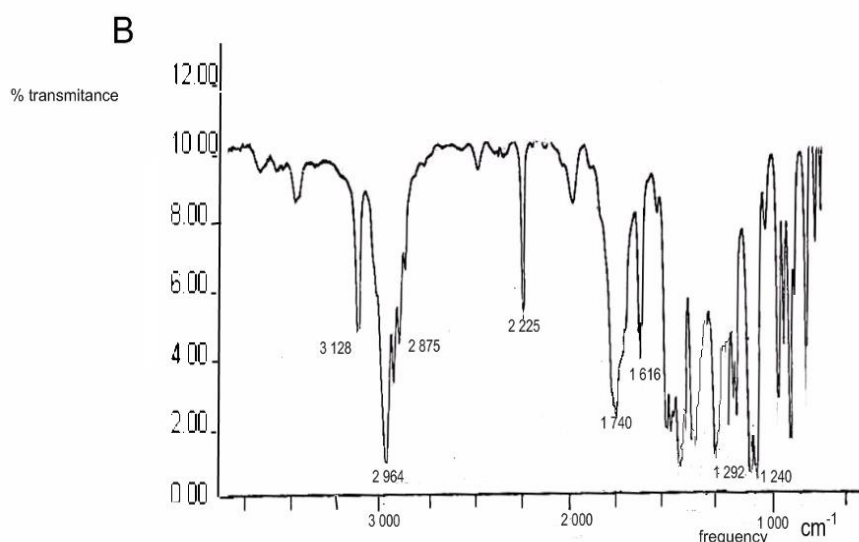


Figura 2. Espectrograma del monómero de cianoacrilato de n-butilo.

Otra evidencia importante que corroboró la hidrólisis consiste en que en el presente experimento, el producto no se aisló de la hipodermis. La banda que corresponde a los grupos amino cuaternarios de la amida quedaron sumergidos debajo de la banda correspondiente a las vibraciones de los grupos amino y e hidroxilo de las proteínas, que se encuentran en mayor cantidad en la muestra. Por esta razón, esta región debería ser muy intensa. Pero en la práctica lo que ocurre es que se atenúa la señal. Esto se puede verificar si se compara la intensidad de la banda que está centrada en 3.336 cm^{-1} con la banda que pertenece a la frecuencia de la vibración de valencia característica del grupo carbonilo en la hipodermis a 1.668 cm^{-1} dentro de cada espectrograma. Este

comportamiento es el esperado. Es una consecuencia de la participación de los grupos amino de las proteínas en la formación de amino-complejos con la nueva amida, que provoca que disminuya la intensidad de la banda correspondiente.

CONCLUSIONES

Con estos resultados fue posible demostrar que el CAB se hidrolizó sobre la piel, al igual que ocurrió en presencia de aminoácidos y que se absorbió a la hipodermis. El nuevo compuesto posee características químico-físicas diferentes al formaldehído. Por ser novedoso no posee estudios toxicológicos previos. Sería prudente que se realizaran antes de atribuirle cualquier uso por sus previsible consecuencias toxicológicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Couvreur P "Polyalkylcyanoacrilates as colloidal drug carrier", *Critical Review in Therapeutic Drug Carrier System*, **5**, 1 (1988)
- [2] Pepper DC "Ionic and zwitterinic polymerization of n-alkyl 2-cyanoacrylates", *Polymer Letter Editions*, **15**, 399 (1977)
- [3] Savonius B, Keskinen H, Tuppurainen M, Knerva L "Occupational respiratory disease caused by acrylates", *Clin. and experimental allergy*, **23**, 413 (1993)
- [4] Hanft JR, Kashuk KB, Toney ME, McDonald TD "Peripheral Neuropathy as a Result of Cyanoacrylate Toxicity", *Clinical Speaking*, **81(12)**, 653 (1991)
- [5] Lundberg P [On line] "Scientific Basis for Swedish Occupational Standards XVIII.d. Criteria Group for Occupational Standards National Institute for Working Life". ISBN 91-7945-447-7:25 (1997). Puede verse en: http://www.Ketsu.net/http/pm-valmit/syensa_krylnatit.htm/05/2007
- [6] Cary R [On line] "Methyl cyanoacrylate and ethyl cyanoacrylate". *Concise International Chemical Assessment Document* 36, (CICAD) WHO 2001, 36, United Nations Environment Program, International Labor Organization, and World Health Organization, Geneva. Puede verse en: www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad36.htm
- [7] Quirce S, Baeza M. L., Tornero P, Blasco A, Barranco R, Sastre J "Occupational asthma caused by exposure to cyanoacrylate", *Allergy*, **56(5)**, 446 (2001)
- [8] Leonard F, Kulkarni R, Brandes G, Nelson C "Synthesis and degradation of Poly(alkyl α -cyanoacrylate)", *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 259 (1966)
- [9] O'Sullivan C, Birkishav C "Hydrolysis of poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles using esterase". *Pol. Deg. Stability*, **78**, 7 (2002)
- [10] Cañizares ME, Mociole R, Riumont J [On line] "Nueva visión del proceso de iniciación de la polimerización de los 2-ciano-acrilatos de alquilo", *Rev. Iberoam. Polim.*, **11(1)**, 17 (2010). ISSN 1988-4206. Puede consultarse en www.ehu.es/reviberpol
- [11] Cañizares ME [On line] "Análisis de la relación estructura – actividad biológica desde una óptica química", *Rev. Iberoam. Polim.*, **11 (4)**, 200 (2010). Puede consultarse en www.ehu.es/reviberpol/
- [12] "Animal welfare requirements", [On line] (2006). Puede consultarse en: <http://www.iso.org/iso/home>
- [13] Silverstein RM, Bassler GC "Spectrometric Identification of Organic Compounds". John Wiley and Sons. Inc pp 71-143(2000)