

**N-NITROSOPIPERIDINA Y N-NITROSODIBUTILAMINA (I):
FORMACIÓN, EXPOSICIÓN HUMANA Y METABOLISMO
N-NITROSOPIPERIDINE AND N-NITROSODIBUTYLAMINE (I):
FORMATION, HUMAN EXPOSURE AND METABOLISM**

García, A, Haza, AI y Morales, P*

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. UCM.

*Correspondencia el autor: pmorales@vet.ucm.es

RESUMEN

Los vegetales, el agua de bebida y los productos cárnicos son las principales fuentes de exposición de nitratos en humanos. La toxicidad de estos compuestos es resultado de su conversión en nitritos que actúan como agentes nitrosantes en la formación de las N-nitrosaminas. Las N-nitrosaminas son uno de los grupos de agentes carcinogénicos más estudiados y existe una gran preocupación debido a su presencia en nuestra vida diaria. Sin embargo, son muy escasos los estudios realizados con dos N-nitrosaminas, la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA). La NPIP se encuentra en productos cárnicos que incluyan especias en la formulación de sus mezclas y la NDBA en productos cárnicos envasados en goma y en chupetes y tetinas para biberones. Además, la NPIP y la NDBA son compuestos genotóxicos indirectos que necesitan una activación metabólica para dañar el DNA y ejercer su efecto carcinogénico. Este proceso es llevado a cabo por el citocromo P450, en concreto, por las isoformas enzimáticas CYP 2A6 y el CYP 1A1, respectivamente

Palabras clave: N-nitrosopiperidina, N-nitrosodibutilamina, dieta, reacción de nitrosación, citocromo P450.

ABSTRACT

Vegetables, drinking water and meat products are the main sources of exposure to nitrates in humans. The toxicity of these compounds is usually the result of the conversion of nitrates into nitrites, which act as nitrosating agents in the N-nitrosamine formation. N-nitrosamines are one of the most studied carcinogenic group and great concern exists due to its presence in our daily life. However, the performed studies with two N-nitrosamines, N-nitrosopiperidine (NPIP) and N-nitrosodibutylamine (NDBA), are very limited. NPIP is found in meat products with spices in their formulation and NDBA in meat products packed in rubber nettings and in pacifiers and nipples. Moreover, NPIP and NDBA are indirect genotoxic compounds that need a metabolic activation to damage DNA and exert their carcinogenic effect. This process is carried out by cytochrome P450, in particular, by enzymatic isoforms CYP 2A6 y el CYP 1A1, respectively.

Keywords: N-nitrosopiperidine, N-nitrosodibutylamine, diet, nitrosation reaction, cytochrome P450.

NITRATOS Y NITRITOS EN LOS ALIMENTOS

El nitrato está presente de forma natural en el medio ambiente como consecuencia del ciclo del nitrógeno, que puede estar alterado por diversas actividades humanas. Entre éstas cabe destacar la utilización de fertilizantes nitrogenados en la agricultura, los vertidos orgánicos de origen doméstico e industrial no sometidos a tratamientos adecuados de depuración y, el uso de aditivos alimentarios.

De esta forma el nitrato está ampliamente distribuido en los alimentos, siendo las principales fuentes de exposición los vegetales, el agua de bebida y los productos cárnicos (**Tabla 1**). Se ha calculado una ingesta media de nitrato de 50-140 mg/día en Europa y de 40-100 mg/día en Estados Unidos (Mensinga *et al.*, 2003), ambas muy por debajo de la ingesta diaria admisible (IDA) máxima establecida en 240 mg/día para una persona de 65 kg según el Comité Científico de Alimentación Humana (CCAH). Algunas especies vegetales tienen gran capacidad de acumulación de nitrato (los productos de hoja fundamentalmente), por lo que puede ser frecuente encontrar cantidades elevadas en este tipo de productos (desde 1000 mg/kg de peso fresco hasta 3000-4000 mg/kg). El grado de acumulación no sólo depende del

tipo y de la variedad genética, sino también de la temperatura, la luz solar, el nitrógeno disponible, o el modo de cultivo entre otros factores.

Tabla 1. Contribución de los alimentos a la ingesta de nitratos (%).

Alimentos	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Reino Unido (1997)	Instituto Federal para la Valoración del Riesgo. Alemania (2004)	Organización Mundial de la Salud. Europa (2003) *	Departamento de Sanidad del País Vasco (1997)
Verduras y hortalizas	36	60	<90	75
Patatas	33			12
Derivados cárnicos	4,2	14		5
Pan y cereales	3,7		<5	
Fruta	3,5		5	
Leche y productos lácteos	6			
Resto de alimentos	5,1			
Bebidas	8,5		-	
Agua	-	26	5	
Total	100%	100%	100%	100%

* Ingesta total de nitratos y nitritos

Por otro lado, aunque la presencia de nitrito en los alimentos es poco significativa (AIIC, 2006), el nitrato puede transformarse en nitrito por reducción bacteriana tanto en los alimentos (durante el procesado y el almacenamiento), como en el propio organismo (en la saliva y en el tracto gastrointestinal). Se estima que un 5% del nitrato ingerido se transforma en nitrito endógenamente, lo que supone la fracción mayoritaria de la exposición global a este compuesto.

Para alcanzar un nivel elevado de protección de la salud pública, la Unión Europea ha establecido las concentraciones máximas de nitrato en algunos vegetales, como la lechuga y las espinacas, a través del Reglamento nº 1881/2006. Otras medidas para la reducción de los nitratos y nitritos en vegetales de hoja verde son la implantación de programas de vigilancia, orientados a la reducción progresiva de los niveles en las especies con contenidos más elevados, la elaboración de códigos de buenas prácticas agrícolas dirigidos a la utilización adecuada de los fertilizantes, así como una selección de variedades que acumulen poco nitrato. En lo referente al agua de bebida, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1984) ha establecido 50 mg/l como límite máximo permitido de nitratos, pero aún así puede contribuir de forma importante a la ingesta total de nitrato en algunas zonas.

En productos como piezas curadas, embutidos fermentados y mezclas gelificadas cocidas, el empleo de nitratos y nitritos se hace indispensable para obtener productos de una calidad competitiva que abarca aspectos tales como su estabilidad microbiológica y la obtención de unas características sensoriales deseadas (Russell y Gould, 2003). El proceso de elaboración de productos cárnicos con un mayor empleo de nitratos y nitritos es el curado o salazón. Este procedimiento empleado desde la antigüedad para conservar la carne sigue siendo utilizado hoy en día, aunque con algunas diferencias respecto al método original. El curado consiste en la incorporación de sal junto con diversos aditivos, como los nitratos o/y nitritos, a los productos que serán sometidos a este proceso (Cameán y Repetto, 2007).

Aunque la adición de los nitritos y nitratos en la elaboración de productos cárnicos es necesaria por las funciones anteriormente mencionadas, desde 1945 existe una creciente preocupación por los efectos derivados de su consumo (Comly, 1945). El nitrato en sí mismo generalmente no es tóxico. La toxicidad es normalmente el resultado de la conversión de los nitratos en nitritos por bacterias reductoras. Los nitritos, sin embargo, pueden llegar a tener efectos adversos importantes (Honikel, 2004). La toxicidad de éstos puede ser directa, por su papel en la síntesis de la metahemoglobina o indirecta, al ser origen de agentes nitrosantes requeridos para la formación de las N-nitrosaminas, tal y como se representa en la **Figura 1**.

En la década de los años 60, y debido al descubrimiento de la formación de la N-nitrosodimetilamina (NDMA) y de sus efectos cancerígenos (Magee y Barnes, 1956), se abrió un nuevo campo de investigación sobre la actividad biológica de un gran número de compuestos N-nitroso. La controversia que suscitó el tema en los productos cárnicos desencadenó en 1970 que el Instituto Americano de la Carne (AMI) planteara el problema a la Administración de Drogas y Alimentos (ADA) y, al Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Por otra parte, la preocupación por el uso de nitratos y nitritos como aditivos alimentarios en productos cárnicos, dio lugar a que se celebrara en Europa el primer Simposio Internacional sobre Nitritos en los Productos Cárnicos. Las conclusiones de este simposio fueron que los nitritos eran inhibidores de *Clostridium botulinum* y que existía una clara evidencia de que las N-nitrosaminas podían estar presentes, en cantidades trazas, en los productos cárnicos.

Así, aunque la concentración de N-nitrosaminas en los alimentos sea en cantidades extremadamente pequeñas, las consecuencias de su presencia en los mismos no deben ser ignoradas por dos razones principales. En primer lugar, porque las N-nitrosaminas poseen un

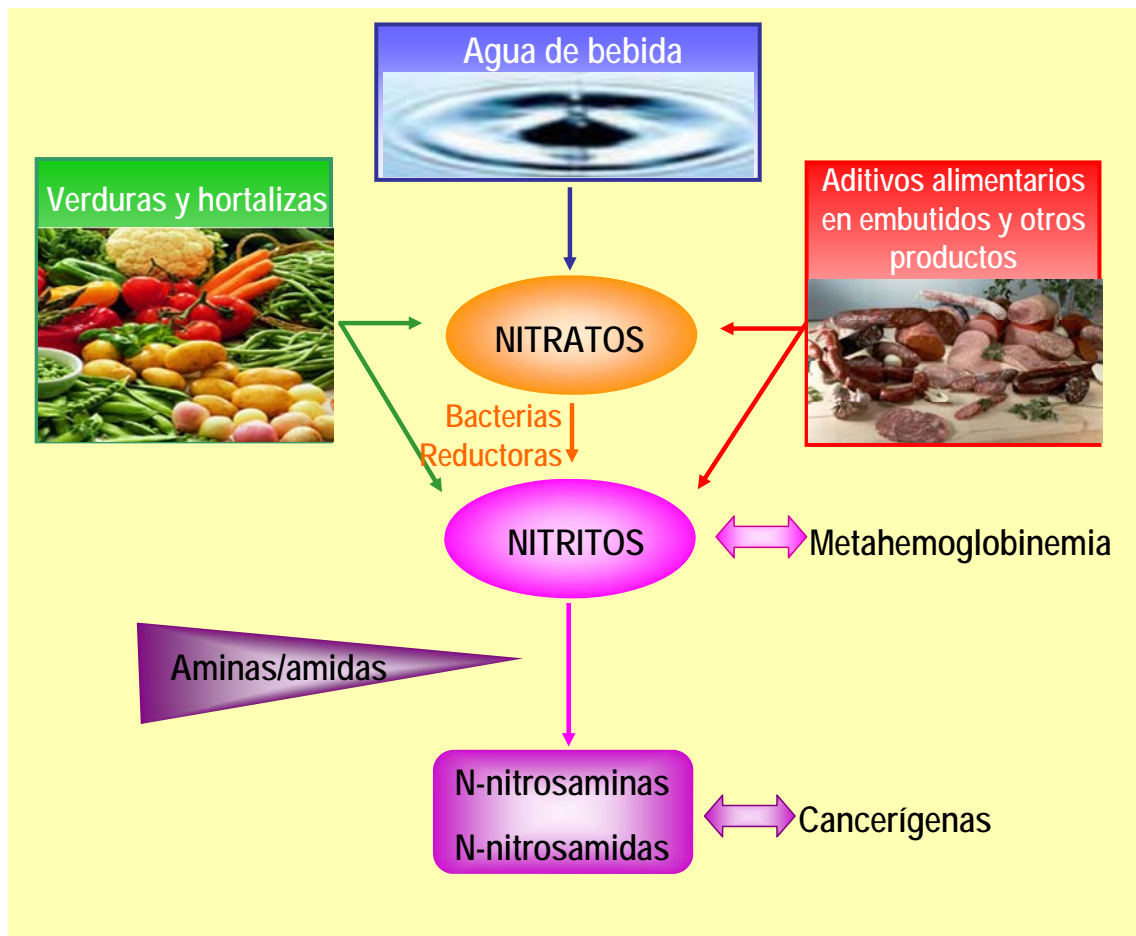


Figura 1. Vías de ingestión de los nitratos y nitritos y sus posibles efectos tóxicos.

gran potencial carcinogénico y en segundo lugar, porque éste podría ser mayor en los seres humanos (cuando se administran de forma continuada) que en los animales de experimentación. Esto se desprende de un estudio llevado a cabo por Hoffmann y Hecht (1985) en el cual observaron que las ratas eran más sensibles a los efectos carcinogénicos de las N-nitrosaminas que otras especies inferiores en la escala evolutiva como los ratones o los hamsters. Al mismo tiempo, aún cuando se conoce el riesgo de la presencia de N-nitrosaminas, la prevención de un peligro mayor como el botulismo, hace que no se pueda prescindir de estos aditivos conservadores en un futuro próximo. De acuerdo con esto, se aconsejó reducir la cantidad de nitrito, adicionado y residual en los productos cárnicos, pero siempre que no fuera en detrimento de su carácter inhibidor de *Cl. botulinum*.

La posibilidad de formación de N-nitrosaminas cancerígenas en los productos cárnicos, así como la posible formación endógena de las mismas a partir de precursores presentes en este tipo de productos, ha llevado a las autoridades sanitarias a cuestionarse los

límites establecidos. El Real Decreto 142/2002 incorpora a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2006/52/CE y está modificado por los R.D. 257/2004, R.D. 2196/2004, R.D. 698/2007 y R.D. 1118/2007, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Esta legislación ha tenido especial incidencia en la utilización de los nitratos y nitritos, sobre todo en la elaboración de productos curados. En la **Tabla 2** se muestran los límites de concentración establecidos para los nitratos y nitritos. La legislación establece como dosis máximas añadidas para los nitritos (E-249 y E-250) 150 mg/kg en los productos cárnicos no tratados por el calor, mientras que en los productos cárnicos esterilizados se limita a 100 mg/kg. Respecto a los nitratos (E-251 y E-252) pueden adicionarse en productos cárnicos no tratados por el calor a una dosis máxima de 150 mg/kg, excepto en el salchichón, chorizo y otros embutidos similares con un mínimo de 30 días de curación, que puede llegar a 250 mg/kg (si no se adicionan nitritos). Desaparece su uso en productos cocidos y conservas. Por último, en el caso de los productos tradicionales curados en seco como jamón y paleta curada, lomo embuchado y cecina, únicamente se establecen las dosis residuales máximas de estos aditivos.

Tabla 2. Límites de concentración para los nitritos y nitratos establecidos en el RD 1118/2007.

Productos alimenticios			Cantidad máxima durante la fabricación ¹		Dosis residual máxima ¹	
			E-249 y E-250	E-251 y E-252	E-249 y E-250	E-251 y E-252
Productos cárnicos no tratados por el calor			150	150		
			Salchichón, chorizo y similares > 30 días de curación		250	
Productos cárnicos esterilizados			100			
Productos con denominación española	Productos cárnicos tradicionales curados en seco	Jamón y paleta curada, lomo embuchado y cecina			100	250

¹ Expresado en mg/kg como NaNO₂ o NaNO₃

E-249: Nitrito potásico E-250: Nitrito sódico

E-251: Nitrato sódico E-252: Nitrato potásico

No obstante, Dinamarca ha sido el único país de la Unión Europea que se ha negado a trasponer dicha directiva a su Derecho nacional en lo referente a la adición de nitritos a los productos cárnicos. Las autoridades danesas alegaron que las cantidades máximas añadidas

que establece la Directiva 2006/52/CE son demasiado elevadas desde un punto de vista sanitario y que no se ha documentado la necesidad tecnológica de tales valores. Un dato importante a tener en cuenta es que en Dinamarca aproximadamente el 90% de la ingesta de productos cárnicos consiste en productos a los que se aplica una cantidad máxima de 60 mg/kg de nitritos añadidos, por lo que, la trasposición de la Directiva 2006/52/CE y la introducción del límite general de 150 mg/kg podría multiplicar por 2,3 a 2,4 la ingesta de nitritos, es decir, esto supondría un incremento equivalente en la ingesta de N-nitrosaminas. Así, en mayo de 2008 la Comisión Europea aprobó la Decisión 2008/448/CE, por la que permite mantener a Dinamarca una legislación (Orden N° 22 de 11 de enero de 2005 sobre aditivos alimentarios) más restrictiva que la indicada en la Directiva 2006/52/CE, con respecto al contenido de nitritos en productos cárnicos.

Los consumidores reclaman cada vez más alimentos naturales mínimamente procesados que sean seguros, sin emplear tecnologías agresivas como serían los tratamientos térmicos (esterilización, pasteurización) o los conservantes químicos tradicionales (nitratos o/y nitritos). En consecuencia, existe un interés creciente en el empleo de tecnologías no-térmicas de procesado y aditivos antimicrobianos naturales (Roller, 2003) que prolonguen la vida útil de los alimentos en condiciones óptimas de calidad, sin comprometer ni la seguridad ni las propiedades sensoriales. Actualmente, se tiende al uso simultáneo o combinado de varios factores de conservación para reforzar la eficacia de cada factor individual, siendo conocido este proceso como “tecnología de barreras” (Leistner, 2000).

N-NITROSAMINAS VOLÁTILES EN LA DIETA

La reacción química de nitrosación o de formación de las N-nitrosaminas puede producirse *in vivo* o de forma exógena (Jakszyn *et al.*, 2006), en aquellos productos que contienen agentes nitrosantes. La principal vía de formación de estos compuestos es mediante la reacción de aminas secundarias y especies nitrosantes, como el ácido nitroso. Además, las N-nitrosaminas también pueden formarse a partir de aminas primarias, terciarias y de los compuestos de amonio cuaternarios.

La síntesis *in vivo* de N-nitrosaminas se produce principalmente en el estómago o en otros órganos diana después de distribuirse a través de la circulación sistémica. Estudios realizados por Dallinga *et al.* (1998) han encontrado la NPIP y la NDBA a concentraciones de 0,20 y 0,06 nmol/l, respectivamente, en el jugo gástrico de pacientes con diferentes dolencias

gastrointestinales. Se han identificado dos mecanismos de nitrosación endógena (**Figura 2**), la primera es una nitrosación química que se produce a bajo pH y la segunda es una nitrosación microbiológica, principalmente a través de bacterias denitrificadoras, a partir de productos derivados del óxido nítrico (ON^*) bajo condiciones en las que el pH es demasiado elevado para que se dé la nitrosación química (de Kok y van Maanen, 2000).

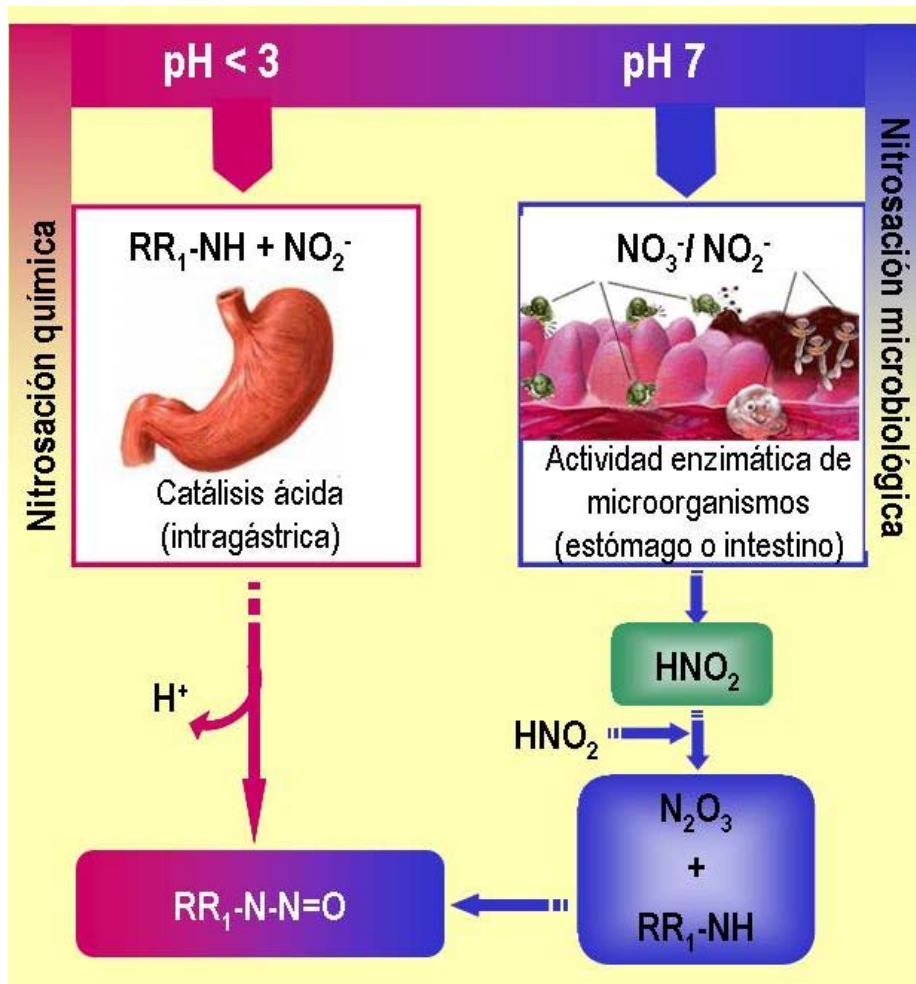


Figura 2. Vías de formación *in vivo* de las N-nitrosaminas.

La nitrosación endógena puede darse también en otras localizaciones del tracto gastrointestinal diferentes al estómago (Proulx *et al.*, 2007). Esta nitrosación intestinal podría explicar la asociación entre el consumo de carnes rojas y el aumento del riesgo de padecer cáncer colorrectal, puesto que el grupo hemo puede actuar como agente nitrosante. La tercera y última vía de formación endógena de las N-nitrosaminas es mediante la activación de macrófagos y otros tipos de células, como los hepatocitos, en infecciones o inflamaciones

crónicas (de Kok *et al.*, 2005). Estas células liberan ON^\bullet , el cual puede conducir a la nitrosación de las aminas.

La exposición humana a las N-nitrosaminas preformadas exógenamente puede tener diversas procedencias, como son la dieta, el tabaco, los cosméticos, los productos farmacéuticos, los compuestos químicos utilizados en la agricultura, o ciertas ocupaciones laborales (industria del cuero, del metal o de la goma) (Straif *et al.*, 2000).

La formación de las N-nitrosaminas en los alimentos puede tener lugar durante su almacenamiento y maduración, o en el transcurso de algunos procesos clave en su elaboración, como el tratamiento térmico (López *et al.*, 2002). Su formación se debe a la presencia de los precursores en los alimentos (nitratos y nitritos), junto con la existencia de unas condiciones idóneas de pH, humedad, etc., necesarias para producirse la reacción de nitrosación. Los agentes nitrosantes, en concreto el ON^\bullet , formados a partir de las sales nitrificantes reaccionan con sustratos nitrosables, constituidos esencialmente por aminas presentes en los alimentos. Estas aminas pueden ser constituyentes del alimento, como ciertos aminoácidos y aminas biógenas, mientras que otras derivan de la adición de especias, como es el caso de la piperidina (Shenoy *et al.*, 1992) o incluso pueden proceder de los materiales empleados para el embalaje de dichos productos (Sen *et al.*, 1989). En el caso de los productos cárnicos curados la reacción tiene lugar entre los nitritos, añadidos como conservantes, y los compuestos aminados constituyentes del músculo, como la creatina, prolina o lisina (Ellis *et al.*, 1998). Las N-nitrosaminas más frecuentemente identificadas en los alimentos son la NDMA, la N-nitrosopirrolidina (NPYR), la N-nitrosopiperidina (NPIP) y la N-nitrosodibutilamina (NDBA). La presencia de la NDMA es la más generalizada (productos cárnicos, pescado, bebidas, quesos, etc.), mientras que la NPYR se halla sobre todo en beicon, carne, cacao y café. Por último, la NPIP y la NDBA se han detectado en un menor número de muestras (productos cárnicos crudos curados que incluyen especias en sus formulaciones o en productos cárnicos envasados en goma).

EXPOSICIÓN HUMANA A LA N-NITROSOPIPERIDINA Y A LA N-NITROSODIBUTILAMINA

La NPIP se forma a partir de las reacciones entre los agentes nitrosantes derivados de las sales de curado y de los compuestos procedentes de la pimienta y el pimentón, como la piperidina y la piperina o sus precursores (Shenoy *et al.*, 1992). De esta forma, podríamos

encontrar la NPIP en productos cárnicos crudos curados, como chorizos, salchichones, jamones y lomos, que incluyen especias en la formulación de las mezclas y en los que los tiempos de curación son prolongados. Esto favorecería el contacto entre los agentes nitrosantes de las sales de curado y los precursores presentes en las especias empleadas.

La presencia de NPIP se ha descrito en varios productos cárnicos curados cocinados. Glória *et al.* (1997) estudiaron los niveles de N-nitrosaminas existentes tanto en el beicon de cerdo como en los productos derivados del beicon sometidos a un proceso de fritura, y fabricados y comercializados en Estados Unidos. La NPIP fue detectada en el 11% de las muestras de beicon de cerdo. Todas estas muestras tenían en común el contener pimienta como ingrediente. Domanska y Kowalski (2003) describen que los niveles de NPIP en productos cárnicos constituidos por piezas cárnicas enteras, tipo jamón de york, son inferiores a los existentes en productos cárnicos donde la matriz cárnica es menos uniforme, tipo salchichas. En estos últimos es más fácil la difusión de las especias que contienen los precursores de esta N-nitrosamina, y por tanto el contacto con posibles agentes presentes en la misma. Estos autores también atribuyen la formación de la NPIP a la utilización de especias. Así, trabajos realizados en Canadá con salchichón (Lindner, 1995) han puesto de manifiesto la presencia de NPIP (hasta 0,06 ppm). Muy recientemente, Yurchenko y Mölder (2007) comprobaron también que el contenido de NPIP en productos cárnicos especiados a la parrilla (entre 11,34 y 14,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) duplicaba al hallado en los correspondientes productos cárnicos sin especias (entre 6,53 y 8,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

En cambio, la NDBA se origina en productos cárnicos como consecuencia de la interacción del nitrito presente en la carne con las aminas empleadas como aditivos de la industria de la goma (Sen *et al.*, 1987). Dichos aditivos pueden nitrosarse para formar la NDBA que posteriormente migra, aunque lentamente, al producto. También se ha descrito la posibilidad de que dichos aditivos migren y reaccionen con los nitritos en el propio producto cárnico. Así, en productos cárnicos similares embalados con otros materiales, como el algodón o el plástico, no se detectó esta N-nitrosamina, por lo que se dedujo que su presencia se debía a la utilización de la goma en los envases (Spiegelhalder y Preussman, 1983).

La primera indicación sobre la presencia de N-nitrosaminas en los componentes de la goma procede de un estudio realizado por Fajen *et al.* (1979), en el cual se detectaron cantidades traza de N-nitrosaminas en el aire de varias industrias de la goma. Más tarde,

Ireland *et al.* (1980) y otros autores (Spiegelhalder y Preussmann, 1983; Eisenbrand *et al.*, 1996) detectaron N-nitrosaminas en los componentes de la goma que habitualmente entran en contacto con las personas, entre los que pueden citarse chupetes infantiles, guantes, preservativos, tetinas para biberones, juguetes y globos. La N-nitrosamina que se encuentra más frecuentemente en estos productos es la NDBA (Spiegelhalder y Preussman, 1983). De esta forma, los chupetes y las tetinas para biberones que se emplean para el cuidado y la alimentación de bebés podrían multiplicar la exposición de la población infantil a esta N-nitrosamina por 100, con respecto a un individuo adulto (Westin, 1990). Además, en un trabajo llevado a cabo por Biaudet *et al.* (1997) se han detectado hasta 15.600 ng/g de compuestos nitrosables en preservativos, siendo la N-nitrosamina mayoritaria la NDBA (entre 7,3 y 31 ng/g), y en menor grado la NDMA (entre 3,8 y 4,2 ng/g) y la N-nitrosodietilamina (NDEA) (3,4 y 3,7 ng/g). Por tanto, la migración de la NDBA procedente de los preservativos a través de las secreciones genitales podría ser bastante significativa.

Algunos países han establecido ciertos límites en relación a los niveles de N-nitrosaminas en alimentos y bebidas. En Estados Unidos, la Administración de Drogas y Alimentos (ADA) ha establecido el límite máximo de 10 µg/kg de NPYR para poder introducir productos alimenticios al mercado (Glória *et al.*, 1997). Por otra parte, en Rusia y Estonia la suma de la NDMA y la NDEA en productos cárnicos y en pescado no debe superar el nivel máximo establecido de 2,0-4,0 µg/kg (Decisión del Gobierno de la República de Estonia, 2000; Domanska y Kowalski, 2003). Sin embargo, hasta el momento la concentración de las N-nitrosaminas en alimentos no ha sido regulada por la legislación de la Unión Europea. Únicamente se ha limitado la liberación de compuestos nitrosables en tetinas y chupetes a 100 ng/g (Biaudet *et al.*, 1997). Por tanto, la tendencia actual de la Unión Europea es la de rebajar las cantidades de nitratos y nitritos añadidas a los productos cárnicos y a otros alimentos, ya que de este modo se conseguiría evitar no sólo la formación de N-nitrosaminas en los alimentos, sino también la formación de las mismas en el interior del organismo.

METABOLISMO DE LA N-NITROSOPIPERIDINA Y DE LA N-NITROSODIBUTILAMINA: PAPEL DEL CITOCROMO P450 COMO MARCADOR BIOLÓGICO

Los compuestos químicos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano, pero que son capaces de acceder a su interior se conocen con el nombre genérico de xenobióticos (Top y Springael, 2003). Se trata de compuestos de naturaleza química muy variada, algunos de los cuales son de origen natural, entre los que destacan las micotoxinas o los alcaloides, si bien la inmensa mayoría son productos originados por la propia actividad humana, como los fármacos, los cosméticos, los aditivos alimentarios (nitros y nitritos), los pesticidas, los productos de uso doméstico, los derivados de la combustión de carburantes, los residuos procedentes de la industria química, etc.

Ante esta situación, los organismos vivos han desarrollado sistemas metabólicos específicos no integrados en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo y cuyos sustratos son los xenobióticos. Su función es la de convertir los xenobióticos en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables. A este conjunto de reacciones a los que se ven sometidos los xenobióticos en el organismo se les conoce como reacciones de biotransformación o de metabolización (Guengerich, 2001) (**Figura 3**).

Tradicionalmente estos procesos se han agrupado en dos fases o etapas:

- **Fase I:** los xenobióticos son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles debido a la aparición de nuevos grupos funcionales de carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). El citocromo P450 (CYP450) es el principal responsable dentro de las enzimas de la Fase I del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. No se trata de un único enzima, sino que en realidad es una familia de hemoproteínas localizadas en el retículo endoplasmático de numerosas especies, desde bacterias a mamíferos, y de las que ya se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Donato, 2006). Algunos CYP450s son comunes a varias especies (p.e. el CYP 2E1 y el CYP 1A1 están presentes en la especie humana, rata, ratón, hamster y otros mamíferos (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001; Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004) y otros son

característicos de una especie en particular (p.e. el CYP 2A6 es exclusivo de la especie humana) (Pelkonen *et al.*, 2000).

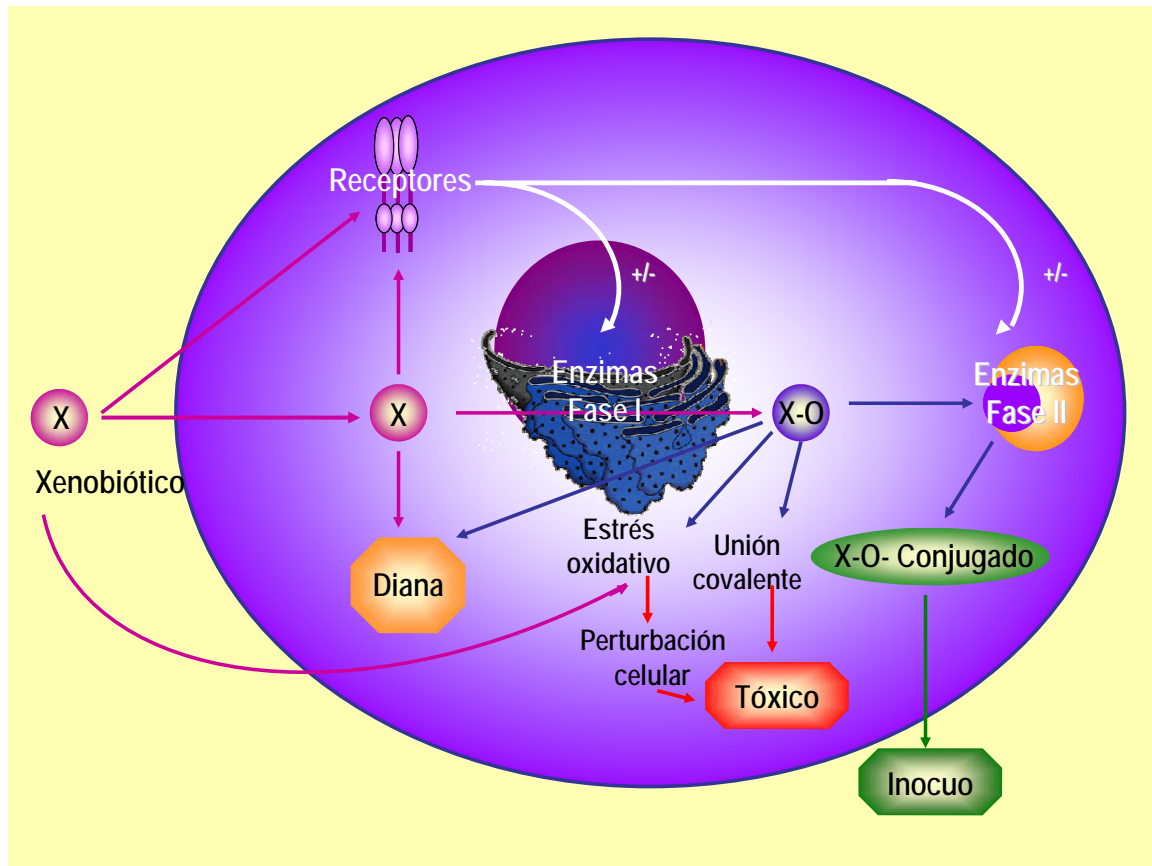


Figura 3. Metabolismo de los xenobióticos (Santiago *et al.*, 2002).

- **Fase II:** los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la Fase I se conjugan con moléculas endógenas de carácter polar, tales como el ácido glucurónico, el glutatión (GSH), el sulfato o los aminoácidos que son rápidamente excretados a través de la orina o la bilis. En este grupo se incluyen las glutatión-S-transferasas (GST), las N-acetil-transferasas (NAT), las sulfottransferasas (SULT), las NAD(P)-quinona oxidoreductasas (NQO) y las UDP-glucuronil-transferasas (UDP-GT). Estas últimas son las únicas localizadas en el retículo endoplasmático, a diferencia del resto de las enzimas de la Fase II que se localizan en el citosol (Ritter, 2000).

En los humanos, las diferentes isoformas enzimáticas de la Fase I y II están ampliamente distribuidas por todo el organismo, si bien el hígado es el órgano con mayor expresión de estas enzimas (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001). Su expresión está

regulada por factores genéticos (polimorfismos), fisiopatológicos (regulación hormonal, enfermedades) o ambientales (efectos inductores o inhibidores provocados por factores nutricionales o por la exposición a xenobióticos). Por esta causa, sus niveles hepáticos varían extraordinariamente entre diferentes individuos, lo que justifica las diferencias en la respuesta humana a las sustancias tóxicas (Koch *et al.*, 2002).

En algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, a este proceso se le denomina bioactivación y se produce durante las reacciones de la Fase I (Brown *et al.*, 2008). La producción de radicales libres y otros metabolitos electrofílicos son una fuente de daño para la célula, y la detoxificación de estos compuestos es por tanto esencial si se quiere prevenir la toxicidad. Así, un determinado tejido puede ser susceptible a la acción tóxica de un compuesto xenobiótico debido a la exposición a metabolitos electrofílicos con capacidad para reaccionar con el DNA, junto con una pobre detoxificación a nivel tisular y una ineficaz reparación del daño al DNA (Coles y Ketterer, 1990).

Este proceso de bioactivación también permite la transformación de procarcinógenos en carcinógenos. Diversos estudios sobre los mecanismos bioquímicos de acción de las N-nitrosaminas han llegado a la conclusión de que la carcinogenicidad, la citotoxicidad y la mutagenicidad producida por estos compuestos se debe a su conversión metabólica, a través del CYP450, en reactivos fuertemente electrofílicos (Godoy *et al.*, 2002). La activación metabólica de las N-nitrosaminas se inicia principalmente con la hidroxilación del átomo de carbono localizado en la posición α del grupo N-nitroso (Fujita y Kamataki, 2001). La **Figura 4** representa la bioactivación de la NPIIP, dando lugar a la formación de la α -hidroxiNPIIP.

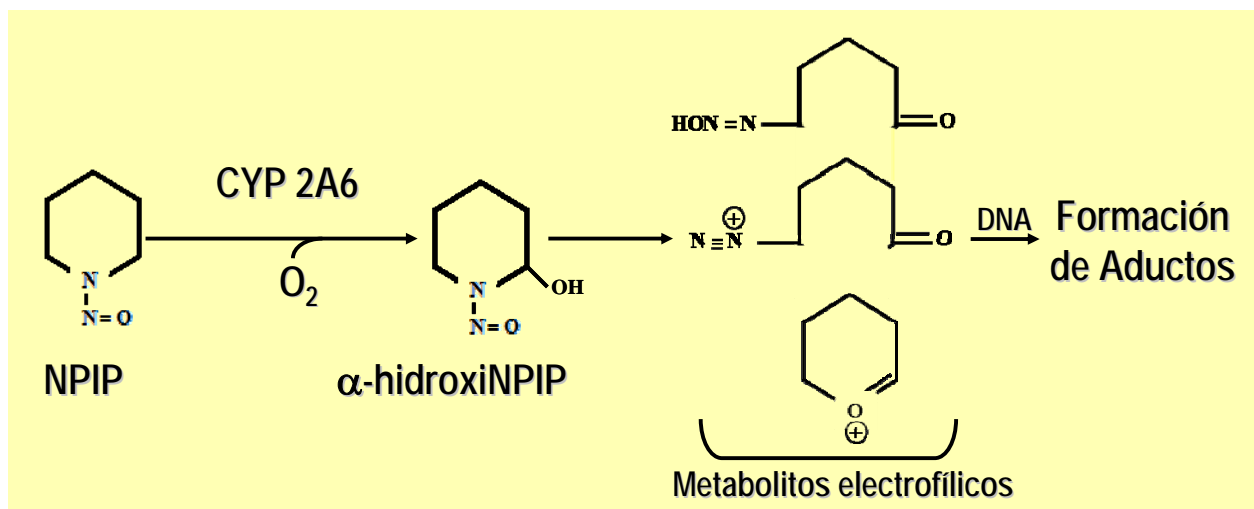


Figura 4. Activación metabólica de la N-nitrosopiperidina (NPIIP) (Wong *et al.*, 2003).

Esta molécula es muy inestable, descomponiéndose rápidamente en metabolitos electrofílicos, los cuales presentan una gran afinidad para unirse a las bases del DNA formando aductos.

No obstante, en la activación metabólica de la NDBA se ha podido observar también la hidroxilación del átomo de carbono situado en la posición β -, γ - y ω -1 del grupo N-nitroso, aunque la α y la ω -1-hidroxilación son las rutas más comúnmente implicadas en la bioactivación de esta N-nitrosamina (Suzuki *et al.*, 1983) (**Figura 5**). Otros estudios demuestran que no solo el CYP450 participa en la activación metabólica de la NDBA. Enzimas del citosol, como la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH), pueden estar involucradas en las últimas etapas del metabolismo de los derivados ω -hidroxi de la NDBA para producir los productos ω -carboxilados (Irving y Daniel, 1988). Además, Janzowski *et al.* (1994) demostraron que enzimas mitocondriales dependientes del adenosín trifosfato (ATP) implicadas en la degradación de ácidos grasos pueden también participar en la biotransformación de las ω -hidroxinitrosaminas en metabolitos β -oxopropil. Estos derivados β -oxopropil son a su vez buenos sustratos para las enzimas del CYP450.

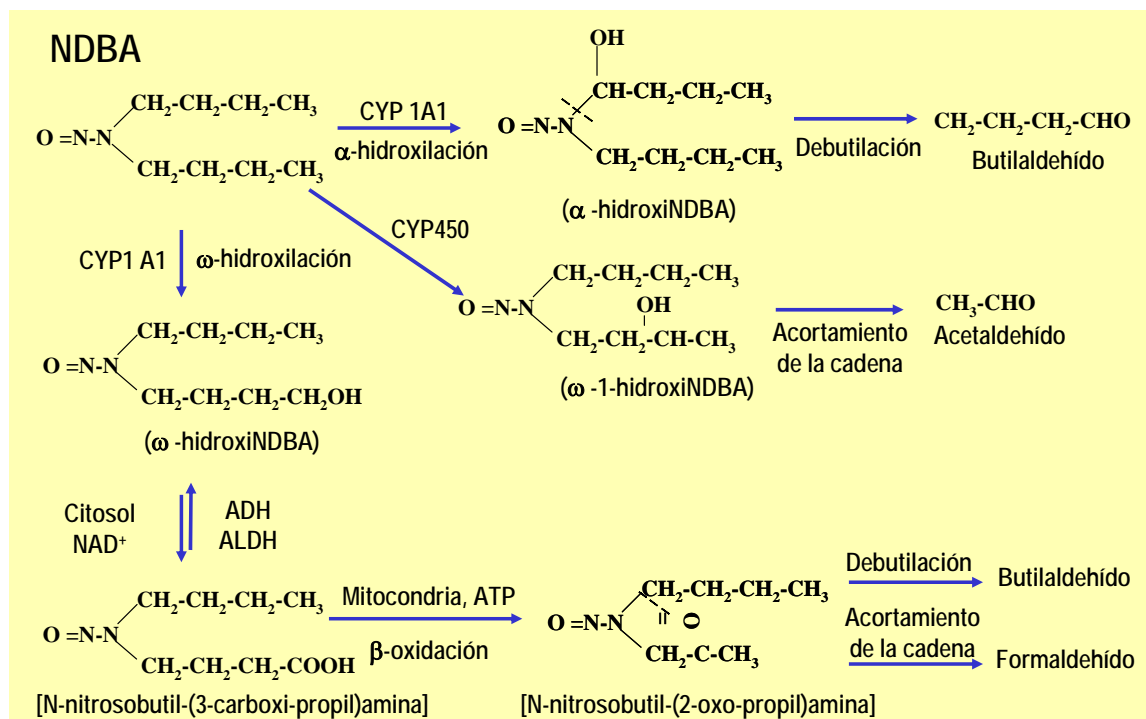


Figura 5. Activación metabólica de la N-nitrosodibutilamina (NDBA) (Shu y Hollenberg, 1996).

El CYP450 presenta una enorme versatilidad funcional que se refleja tanto en la gran variedad de procesos que puede catalizar, como en el elevado número de sustratos que es capaz de metabolizar (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001). Entre los sustratos del CYP450 se incluyen tanto moléculas de bajo peso molecular como otras mayores, aromáticas o lineales, planas o globulares, que contengan o no heteroátomos. Esta amplia especificidad de sustrato es debida a la existencia de múltiples isoformas de este enzima, cada una de las cuales se ha adaptado para el metabolismo de grupos de compuestos relacionados estructuralmente. Actualmente se cree que sólo tres familias de genes P450 (CYP 1, CYP 2 y CYP 3) de las 27 identificadas, son las responsables de la activación metabólica de la mayoría de los compuestos xenobióticos (Santiago *et al.*, 2002), mientras que el resto de familias incluyen isoformas CYP450s que intervienen en la biosíntesis y el metabolismo de compuestos endógenos (esteroides, ácidos grasos o vitaminas liposolubles).

En el caso concreto de las N-nitrosodialquilaminas, fueron Fujita y Kamataki (2001) quienes determinaron el papel de 11 isoformas enzimáticas del CYP450 en la activación metabólica de estos compuestos. Entre las conclusiones de este estudio, cabe destacar que el número de átomos de carbono presentes en la cadena unida al grupo N-nitroso de las N-nitrosaminas es el principal factor que determina cual será la isoforma enzimática del CYP450 que llevará a cabo la activación metabólica de dichos procarcinógenos.

La familia CYP 1 está formada por tres isoformas enzimáticas, el CYP 1A1, el CYP 1A2 y el CYP 1B1. De ellas, el CYP 1A1 constituye la mayor fracción del CYP450 extrahepático (Meyer *et al.*, 2002). Las tres isoformas son activas en la metabolización de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) a compuestos intermedios que pueden unirse al DNA (Shimada y Fujii-Kuriyama, 2004). Sin embargo, no existía información previa sobre el papel del CYP 1A1 en la activación mutagénica de las N-nitrosaminas, hasta que Fujita y Kamataki (2001) demostraron la participación del CYP 1A1 en la activación metabólica de N-nitrosodialquilnitrosaminas de cadena alquilo larga, como la NDBA.

La familia del CYP 2 es la que contiene un mayor número de miembros, los cuales están organizados en más de 20 subfamilias (Du *et al.*, 2004). Dentro de la subfamilia del CYP 2A, la isoforma enzimática más interesante es el CYP 2A6. Este citocromo se expresa en el hígado, donde constituye aproximadamente el 4% del total (Pelkonen *et al.*, 2000), aunque también se ha detectado en la mucosa nasal. Cataliza predominantemente la

hidroxilación de la cumarina, aunque también es responsable de la activación metabólica de un amplio espectro de N-nitrosaminas no relacionadas estructuralmente, como la NPIP, NPYR, NDMA, NDBA o la 4-(metil-nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) (Kushida *et al.*, 2000; Kamataki *et al.*, 2002). En la subfamilia CYP 2E se encuentra una isoforma enzimática con un papel importante en el metabolismo del etanol: el CYP 2E1. Éste representa un 10% del CYP450 total en el tejido hepático (Cozza y Armstrong, 2001). Además, el CYP 2E1 es el principal citocromo que cataliza el metabolismo de las N-nitrosodialquilaminas de cadena alquilo corta, como es el caso de la NDMA (Kushida *et al.*, 2000). No obstante, también participa, aunque en menor grado, en la bioactivación de la NPIP (Kushida *et al.*, 2000) y de la NDBA (Fujita y Kamataki, 2001).

BIBLIOGRAFÍA

- AIIC, International Agency for Research on Cancer. Ingested nitrates and nitrites. En: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. Vol 94, Lyon, 2006.
- Anzenbacher, P. y Anzenbacherová E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular Molecular Life Science* 58: 737-747.
- Biaudet, L., Mouillet, L. y Debry, G. 1997. Migration of nitrosamines from condoms to physiological secretion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 59: 847-853.
- Brown, C.M., Reisfeld, B. y Mayeno, A.N. 2008. Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metabolism Reviews* 40: 1-100.
- Cameán, A.M. y Repetto, R. *Toxicología Alimentaria*. Madrid, Díaz de Santos, 2007.
- Coles, B. y Ketterer, B. 1990. The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology* 25: 47-70.
- Comly, H.H. 1945. Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *The Journal of the American Medical Association* 129: 112-116.
- Cozza, K.L. y Armstrong, S.C. *The Cytochrome P450 System*. En: *Drug interaction principles for medical practice*. Washington, DC, American Psychiatric Publishing, 2001.
- Dallinga, J.W., Pachen, D.M.F.A., Lousberg, A.H.P., van Geel, J.A.M., Houben, G.M.P., Stockbrügger, R.W., van Maanen, J.M.S. y Kleinjans, J.C.S. 1998. Volatile N-nitrosamines in gastric juice of patients with various conditions of the gastrointestinal tract

- determined by gas chromatography-mass spectrometry and related to intragastric pH and nitrate and nitrite levels. *Cancer Letters* 124: 119-125.
- De Kok, T.M.C.M., Engels, L.G.J.B., Moonen, E.J. y Kleinjans, J.C.S. 2005. Inflammatory bowel disease stimulates formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Gut* 54: 727-734.
- De Kok, T.M.C.M. y van Maanen, J.M.S. 2000. Evaluation of fecal mutagenicity and colorrectal cancer risk. *Mutation Research* 463: 53-101.
- Decisión del Gobierno de la República de Estonia. The list of allowed contaminants in food and action of allowable concentration on food groups 12 January, No. 14, Appendix 4 (in Estonian), 2000.
- Domanska, K. y Kowalski, B. 2003. Occurrence of volatile N-nitrosamines in polish processed meat products. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 47: 507-514.
- Donato, M.T. Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P-450 y cómo funciona?. En: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV. Artículo 1, 2006, Pág. 29-62.*
- Du, L., Hoffman, S.M. y Keeney, D.S. 2004. Epidermal CYP2 family cytochromes P450. *Toxicology and Applied Pharmacology* 195: 278-287.
- Eisenbrand, G., Fuchs, A. y Koehl, W. 1996. N-nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *European Journal of Cancer Prevention* 5: 41-46.
- Ellis, G., Adatia, I., Yazdanpanah, M. y Makela, S. 1998. Nitrite and nitrate analysis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry* 31: 195-220.
- Fajen, J.M., Carson, G.A., Rounbehler, D.P., Fan, T.Y., Vita, R., Goff, U.E., Wolf, M.H., Edwards, G.S., Fine, D.H. y Reinhold, V.1979. N-Nitrosamines in the rubber and tire industry. *Science* 205: 1262-1264.
- Fujita, K. y Kamataki, T. 2001. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mutation Research* 483: 35-41.
- Glória, M.B.A., Barbour, J.F. y Scanlan, R.A. 1997. Volatile nitrosamines in fried bacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1816-1818.

- Godoy, W., Albano, R.M., Moraes, E.G., Pinho, P.A.R.A., Nunes, R.A., Saito, E.H., Higa, C., Filho, I.M., Kruehl, C.D.P. y Schirmer, C.C. 2002. CYP2A6/2A 7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and interindividual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis* 23: 611-616.
- Guengerich, F.P. 2001. Uncommon P450-catalyzed reactions. *Current Drug Metabolism* 2: 93-115.
- Hoffmann, D. y Hecht, S.S. 1985. Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Research* 45: 935-944.
- Honikel, K.O. 2004. Curing agents. En: *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK, Jensen WK, Devine C y Dikeman M (eds), Elsevier Ltd, 2004, Pág. 195-201.
- Ireland, C.B., Hytrek, F.P. y Lasoski, B.A. 1980. Aqueous extraction of N-nitrosamines from elastomers. *American Industrial Hygiene Association Journal* 41: 895-900.
- Irving, C.C. y Daniel, D.S. 1988. Inhibition of the oxidation of the urinary bladder carcinogen N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine by pyrazole and 4-substituted pyrazoles. *Biochemical Pharmacology* 37: 1642-1644.
- Jakszyn, P., Agudo, A., Berenguer, A., Ibáñez, R., Amiano, P., Pera, G., Ardanaz, E., Barricarte, A., Chirlague, M.D. y Dorronsoro, M. 2006. Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition* 9: 785-791.
- Janzowski, C., Landsiedel, R., Gölzer, P. y Eisenbrand, G. 1994. Mitochondrial formation of β -oxopropyl metabolites from bladder carcinogenic ω -carboxyalkylnitrosamines. *Chemico-biological Interactions* 90: 23-33.
- Kamataki, T., Fujita, K., Nakayama, K., Yamazaki, Y., Miyamoto, M. y Ariyoshi, N. 2002. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP. *Drug Metabolism Reviews* 34: 667-676.
- Koch, I., Weil, R., Wolbold, R., Brockmöller, J., Hustert, E., Burk, O., Nuessler, A., Neuhaus, P., Eichelbaum, M. y Zanger, U. 2002. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metabolism and Disposition* 30: 1108-1114.
- Kushida, H., Fujita, K.I., Suzuki, A., Yamada, M., Endo, T., Nohmi, T. y Kamataki, T. 2000. Metabolic activation of N-alkylnitrosamines in genetically engineered *Salmonella*

- typhimurium* expressing CYP2E1 or CYP2A6 together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Carcinogenesis* 21: 1227-1232.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55: 181-186.
- Lindner, E. *Toxicología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia SA, 1995.
- López, A., López-Munguía, A. y Quintero, R. Transformación y producción de alimentos. En: *Biocología alimentaria*. Editorial Limusa, 2002, Pág. 153-383.
- Magee, P.N. y Barnes, J.M. 1956. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer* 10:114-122.
- Mensinga, T.T., Speijers, G.J.A. y Meulenbelt, J. 2003. Health implications of exposure to environmental nitrogenous compounds. *Toxicological Reviews* 22: 41-51.
- Meyer, R.P., Podvinec, M. y Meyer, U.A. 2002. Cytochrome P450 CYP1A1 accumulates in the cytosol of kidney and brain and is activated by heme. *Molecular Pharmacology* 62: 1061-1067.
- OMS. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. En: *Recommendations*. Vol 1. Geneva: WHO, 1984.
- Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H. y Pasanen, M. 2000. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* 144: 139-147.
- Proksch, E. 2001. Toxicological evaluation of nitrosamines in condoms. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 204: 103-110.
- Proulx, L., Paré, G. y Bissonnette, E.Y. 2007. Alveolar macrophage cytotoxic activity is inhibited by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a carcinogenic component of cigarette smoke. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56: 831-838.
- Ritter, J.K. 2000. Roles of glucuronidation and UDPglucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chemico-biological Interactions* 129: 171-193.
- Roller, S. *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Cambridge: Roller S (ed), Woodhead Publishing Ltd, 2003.
- Russell, N.J. y Gould, G.W. *Food preservatives*. Alemania: Springer, 2003.
- Santiago, C., Bandrés, F. y Gómez-Gallego, F. 2002. Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo* 11: 130-140.

- Sen, N.P., Baddoo, P.A. y Seaman, S.W. 1987. Volatile nitrosamines in cured meat packaged in elastic rubber nettings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 346-350.
- Shenoy, N.R., Choughuley, A.S.U., Shetty, T.K. y Bhattacharya, R.K. 1992. Nitrosation of piperine using different nitrosating agents: characterization and mutagenicity of the products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2211-2215.
- Shimada, T. y Fuji-Kuriyama, Y. 2004. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 y 1B1. *Cancer Science* 95: 1-6.
- Shu, L. y Hollenberg, P. 1996. Identification of cytochrome P450 isozymes in the metabolism of N-nitrosodipropyl-, N-nitrosodibutyl- and N-nitroso-n-butyl-n-propylamine. *Carcinogenesis* 17: 839-848.
- Spiegelhalter, B. y Preussmann, R. 1983. Occupational nitrosamine exposure: Rubber and tyre industry. *Carcinogenesis* 4: 1147-1152.
- Straif, K., Keil, U., Taeger, D., Holthenrich, D., Sun, Y., Bungers, M. y Weiland, S.K. 2000. Exposure to N-nitrosamines, carbon black, asbestos, and talc and mortality from stomach, lung, and laryngeal cancer in a cohort of rubber workers. *American Journal of Epidemiology* 152: 297-306.
- Suzuki, E., Mochizuki, M., Wakabayashi, Y. y Okada, M. 1983. *In vitro* metabolic activation of N'-N-dibutyl nitrosamine in mutagenesis. *Gann* 74: 51-59.
- Top, E.M. y Springael, D. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 262-269.
- Westin, J.B. 1990. Ingestion of carcinogenic N-nitrosamines by infants and children. *Archives of Environmental Health* 45: 359-369.
- Wong, H.L., Murphy, S.E. y Hecht, S.S. 2003. Preferential metabolic activation of N-nitrosopiperidine as compared to its structural homologue N-nitrosopyrrolidine by rat mucosal microsomes. *Chemical Research in Toxicology* 16: 1298-1305.
- Yurchenko, S. y Mölder, U. 2007. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food Chemistry* 100: 1713-1721.