

Seguimiento electroquímico del complejo de inclusión bilirrubina-ciclodextrina

María Ramírez de F.¹, Olga Pérez Márquez², Oscar M. Alarcón¹, Jairo Márquez², Pedro Navarro^{2} y Gladys Bastardo de C.¹*

¹Escuela de Nutrición y Dietética. Facultad de Medicina y ²Laboratorio de Electroquímica, Instituto Venezolano Andino de Investigación Química (IVAIQUIM). Facultad de Ciencias Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela.

Recibido: 06-09-02 Aceptado: 30-05-03

Resumen

La oxidación del complejo de inclusión bilirrubina indirecta (BI) con α y β -ciclodextrinas (CD) en solución acuosa, a pH 7,4 y a temperatura de 37°C se estudió por voltametría de pulso normal (VPN) y voltametría de pulso diferencial (VPD), utilizando como electrodo de trabajo carbono vítreo. Los resultados obtenidos demuestran que la adición de las ciclodextrinas, a concentraciones variables, determina un desplazamiento voltamétrico del potencial de media onda de la BI vs Ag/AgCl (KCl 0,1 M), lo cual indica la formación del correspondiente complejo de inclusión. El análisis de los datos, por medio de la ecuación de Lingane, da un valor estequiométrico de 1:1 para los complejos α y β -CD-BI y un valor de constante de formación, KF, de 1538 para el complejo α -CD-BI y de 2598 para el complejo β -CD, en las condiciones en las cuales se realizaron los experimentos. Se discuten los resultados obtenidos y se sugiere que la administración de la CD por vía rectal o intravenosa pudiera favorecer la depuración plasmática de la BI, una sustancia muy tóxica, que se elimina fundamentalmente por conjugación a nivel del hepatocito, la cual determina la aparición del kernicterus (ictericia nuclear) en recién nacidos prematuros o a término cuando ella se acumula en el plasma en gran cantidad.

Palabras clave: Bilirrubina; ciclodextrina; complejos; constantes de formación; voltametría.

Electrochemical monitoring of the inclusion complex bilirubin-cyclodextrin

Abstract

High levels of bilirubin (bi) in organism are toxic and the in situ complexation of this compound seems to be a route to diminish its toxicity and a way to increase its renal excretion. The inclusion complex bilirubin- α -cyclodextrin (α -cd) was formed in aqueous solution, pH = 7.4 and 37°C. the complexation was followed by normal pulse voltammetry and differential pulse voltammetry on a glassy carbon electrode. Analysis of data gave a 1:1 BI-(α)-CD stoichiometry and formation constants, KF = 1538 for BI-(α)-CD and KF = 2598 for BI-(β)-CD. Effectivity of (α)-CD for purposes as mentioned above must now be tested in living mammals.

Key words: Bilirubin; complexes; cyclodextrin; formation constants; voltammetry.

* Autor para la correspondencia. E-mail: pjnavarr@ula.ve

Introducción

La bilirrubina (BI) es un pigmento de color amarillento anaranjado brillante y muy tóxico, que representa, en los mamíferos, un producto muy importante en la degradación de la hemoglobina. Sus niveles séricos, en medicina clínica, son importantes en el diagnóstico de las ictericias. Este pigmento es un sustrato electroactivo involucrado en uno de los múltiples procesos "redox" que ocurren en el organismo y su producto de oxidación electroquímica es la biliverdina (1).

La BI interfiere funciones metabólicas vitales y es la responsable de la encefalopatía que se presenta en la severa hiperbilirrubinemia no conjugada de los recién nacidos. Su principal acción es inhibir la respiración y desacoplar la fosforilación oxidativa en la mitocondria (2, 3) a nivel de cerebro, corazón e hígado. Este efecto de la bilirrubina, para inducir el daño celular determinó la aparición de mecanismos fisiológicos muy eficientes que limitan su entrada a los tejidos y facilitan su eliminación por la bilis; a saber: a) unión con las proteínas plasmáticas, especialmente con la albúmina y b) conjugación, a nivel hepático, con compuestos orgánicos polares, especialmente con el ácido glucurónico.

Como una posibilidad para disminuir su toxicidad y sus niveles séricos en aquellas situaciones clínicas que se acompañan de una producción exagerada de BI (ictericias) se plantea el tratamiento con especies inocuas, como las ciclodextrinas, que pueden encapsularla y estimular su excreción.

Las ciclodextrinas (CD) son macromoléculas de origen natural que pueden formar compuestos de inclusión y se componen de una familia de carbohidratos oligoméricos cíclicos constituidos por unidades de D(+)-glucopiranosas enlazadas por uniones α -1-4 glicosídicas (4,5). La relevancia e interés hacia estos compuestos de inclusión se relaciona primordialmente con el hecho de que ciertas propiedades físicas y químicas de las especies huéspedes, entre ellas: la

reactividad química, el pK, la solubilidad y la presión de vapor, pueden alterarse (6,7).

En el presente trabajo se estudia la formación del complejo de inclusión de la BI con las ciclodextrinas, ya que en los prematuros con ictericia a predominio de la BI es posible que la administración de la CD por vía rectal o por vía intravenosa de lugar a la formación de un complejo BI-CD que favorezca la eliminación del pigmento por vía renal y disminuya su toxicidad.

Experimental

Equipos

Todos los experimentos se realizaron en un Potenciostato de Bioanalytical Systems, Inc. BAS 100 B/W versión 2.

Los resultados fueron procesados en una PC Pentium 200 MMX.

Celda y electrodos utilizados

Se utilizó una celda de vidrio adiabática de 50 mL de capacidad, de un solo compartimento, provista de tres electrodos y conexiones para la entrada y salida de gas inerte, para la eliminación del oxígeno disuelto en el medio. Como electrodo de trabajo, ET, se utilizó un electrodo de carbón vítreo (Área geométrica 1,88 cm²); como electrodo de referencia, ER, Ag/AgCl 0,1 M (KCl 0,1M) y como electrodo secundario o contraelectrodo, CE, una placa de platino. Todos los potenciales están referidos a este electrodo de referencia. A fin de mantener el experimento a 37°C se utilizó un termostizador marca Haake D.C.3. Para el control diario de pH se utilizó un pH-Meter 691Ω Metrohm.

Preparación de las soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua de 18 MΩ y reactivos de alta pureza. La solución de bilirrubina (Sigma, 1x10⁻⁴ M a pH 7,4) se preparó disolviendo 2,9 mg del pigmento en 2,5 mL de NaOH 0,1 M y diluyendo a 50 mL con acetato de sodio 0,1 M.

La solución se mantuvo en ambiente oscuro, protegida de la luz, para evitar la foto-oxidación de la bilirrubina. Las soluciones de α y β -ciclodextrina se prepararon ambas a una concentración de 1×10^{-2} M. La experimentación se hizo a las condiciones de acidez (pH= 7,4) y de temperatura (37°C) normales para la sangre.

El medio electrolítico se preparó por mezcla de soluciones de NaOH 0,1 M y acetato de sodio 0,1 M, ajustándose el pH a 7,4, para realizar los barridos del blanco y para la preparación de las soluciones con la especie electroactiva.

Para la realización del experimento se agregó a una serie de 8 balones volumétricos de 50 mL un volumen constante de la solución de bilirrubina (0,5 mL) y volúmenes crecientes de la solución respectiva de ciclodextrina, enrasándose hasta 50 mL con la solución del electrolito soporte. Las concentraciones empleadas fueron: 0; 1×10^{-3} M; 5×10^{-3} M; 6×10^{-3} M; 7×10^{-3} M; 8×10^{-3} M; 9×10^{-3} M y 1×10^{-2} M.

Para el estudio de los complejos se utilizaron las técnicas electroquímicas de voltametría de pulso diferencial (VPD) y voltametría de pulso normal (VPN) según las indicaciones de Kissinger y Eineman (8), de Bard y Faulkner (9) y del Grupo de Electroquímica de Southampton (10).

Las condiciones óptimas de operación para la VPD fueron potencial inicial= -0,085V; potencial final= 0,795 V; velocidad de barrido= 3 mV s^{-1} y sensibilidad= 1 mA V^{-1} y para la VPN potencial inicial= 0,300 V; potencial final= 0,390 V; velocidad de barrido= 3 mV s^{-1} y sensibilidad= 1 mA V^{-1} .

Para la determinación de la estequiometría y la constante de formación del complejo se empleó la ecuación de Lingane (11-13).

Expresión para el cálculo

A partir de la ecuación electroquímica:



BR: bilirrubina; BRR: bilirrubina reducida; CD: ciclodextrina



$$E = E_o^\circ - (0,059/an) \log(K_d / K_o) - (0,059/an) \log(BRR / BR) \quad [1]$$

En función de la corriente i:

$$E = E_o^\circ - (0,059/an) \log(K_d / k_o) + (0,059/an) \log(i_d - i / i) \quad [2]$$

α , k_o : Ctes cinéticas

donde:

$$E_{1/2} = E_o^\circ - (0,059/an) \log(k_d / k_o) \quad [3]$$

Reducción del sistema complejo:



$$E = E_1^\circ - (0,059/an) \log(K_d / k_o) - (0,059/an) \log\left(\frac{[BRR][CD]^p}{[(CD)_p BR]}\right) \quad [4]$$

En función de la corriente i:

$$E = E_1^\circ - (0,059/an) \log(K_d / K_o) - (0,059/an) \log(i_{dc} - i / i)$$

Igualando (1) y (4):

$$E_1^\circ = E_o^\circ + (0,059/an) \log K_{DC}$$

K_{DC} = Cte de disociación del complejo

$$(E_{1/2})_c = E_o - (0,059/an) \log(K_d/k_o) + (0,059/an) \log K_{DC} - p(0,059/an) \log(CD)$$

$$DE_{1/2} = (E_{1/2})_c - E_{1/2} = (0,059/an) \log K_{DC} - p(0,059/an) \log(CD) \quad [5]$$

Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra la respuesta voltamétrica del medio electrolítico en el intervalo de potenciales -0,085 a 0,795 V. Se observa en esta figura una región amplia de potenciales con ausencia de picos y de ondas de corriente y con valores bajos de corriente de fondo, lo cual permite la evaluación voltamétrica de la especie electroactiva (bilirrubina) y del agente complejante (ciclodextrina) en esa región.

El voltamograma de pulso diferencial para la bilirrubina a una concentración 1×10^{-4} M en dirección anódica se representa en la Figura 2. Se observan tres picos de corriente, cuyos potenciales de pico, E_p , son 0,110, 0,355 y 0,650 para la primera, segunda y tercera señal, respectivamente. Esto concuerda con investigaciones previas que han reportado estos picos para la oxidación electroquímica de la bilirrubina en sistemas no acuosos sobre electrodo de platino (3, 14, 15). Estos podrían atribuirse tanto a reacciones de oxidación de la bilirrubina en tres etapas o, simplemente, a señales de los tres isómeros de la misma y serán motivo de investigaciones ulteriores por nuestro equipo de investigación.

Los resultados de la voltametría de pulso normal en las distintas ondas voltamétricas de la bilirrubina nos permitió la selección de la región de potenciales 0,300 a 0,400 para la experimentación posterior. La Figura 3 muestra el voltamograma de pulso normal para la bilirrubina a concentración 1×10^{-4} M; esta señal fue más sensible a variaciones en la concentración de esta especie.

Para el análisis de la reversibilidad del proceso se empleó la ecuación siguiente:

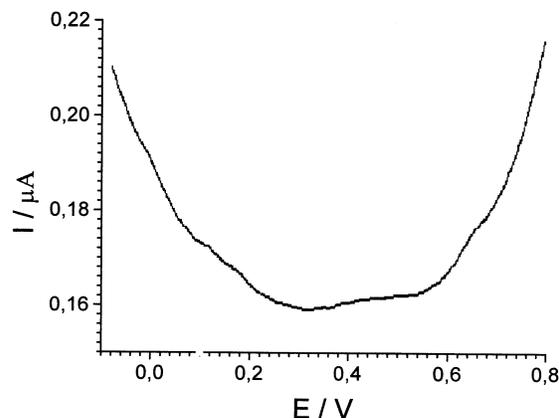


Figura 1. Respuesta VPD de una solución NaOH / NaOAc(0,1M); pH = 7,40; T=37°C. E_T = Carbón Vítreo (CV). $v = 3 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

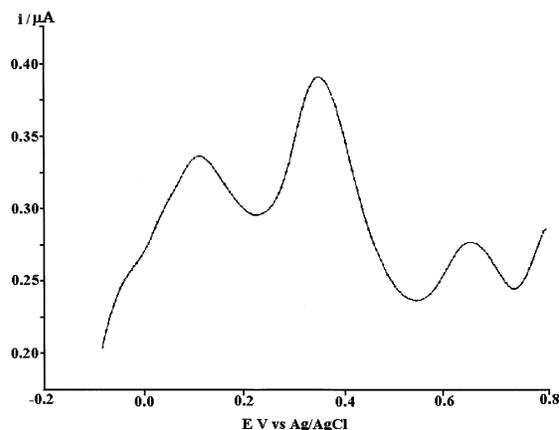


Figura 2. Experimento VPD de bilirrubina 1×10^{-4} M en el medio y condiciones de la figura 1.

$$E = E_{1/2} - \frac{0,054}{an} \log \frac{\hat{E} i}{\hat{E} i_d - i_0}$$

donde E es el potencial aplicado, $E_{1/2}$ es el potencial de media onda, n es el número de electrones transferidos y α es el coeficiente de transferencia de carga. La representación gráfica de la ecuación anterior, Figura 4, ge-

nera una línea recta cuya pendiente es igual a 0,047, la cual correspondería a un sistema irreversible y considerando α cercano a 0,5 el número de electrones n sería 2. Jianjun y col. (16) previamente demostraron la irreversibilidad del proceso de oxidación de la bilirrubina, por voltametría cíclica, en medio electrolítico de dimetilformamida, a pH 9 y temperatura ambiente.

Las Figuras 5 y 6 corresponden al voltamograma de pulso normal para la electro-oxidación de la bilirrubina con cantidades crecientes de α y β -ciclodextrina, respectivamente. Se observa que en presencia de cualquiera de los agentes complejantes el potencial de media onda se desplaza en dirección anódica, debido a la formación del complejo de inclusión BI-ciclodextrina.

La formación de estos complejos de inclusión con las ciclodextrinas determina cambios en el potencial de media onda, $E_{1/2}$, de las moléculas orgánicas. A partir de este fenómeno se pueden determinar los parámetros de formación del complejo y la cinética de las interacciones huésped-molécula (16, 17).

Estudio de la estequiometría del complejo formado entre la bilirrubina y la α -y la β -ciclodextrinas

Utilizando la ecuación de Lingane (11-13) podemos obtener la estequiometría del complejo.

$$DE_{1/2} = \frac{RT}{anF} \log K_d - p \frac{RT}{anF} \log(L)$$

Graficando los cambios observados en el potencial de media onda en función del logaritmo de la concentración de la α -CD (Figura 7) se obtiene una recta cuya pendiente es igual a 0,057. Considerando $\alpha = 0,5$ y $n=2$, el valor de p es 1 y corresponde con una estequiometría 1:1 molécula-ligando, dentro del intervalo de concentración en que se trabajó.

De igual manera se procedió con la β -CD, Figura 8, y se obtiene una recta cuya

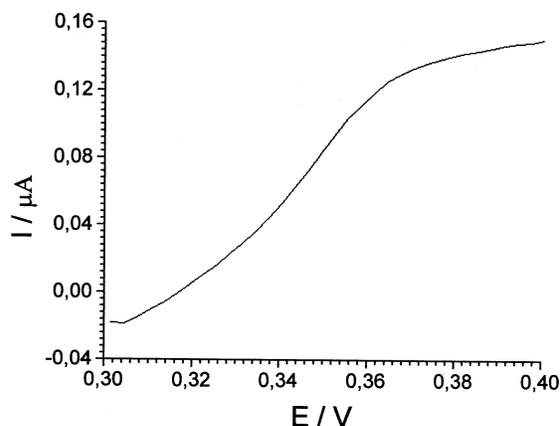


Figura 3. Experimento VPN de bilirrubina 1×10^{-4} M en el medio y condiciones de la figura 1. Se ha reducido el intervalo de potencial.

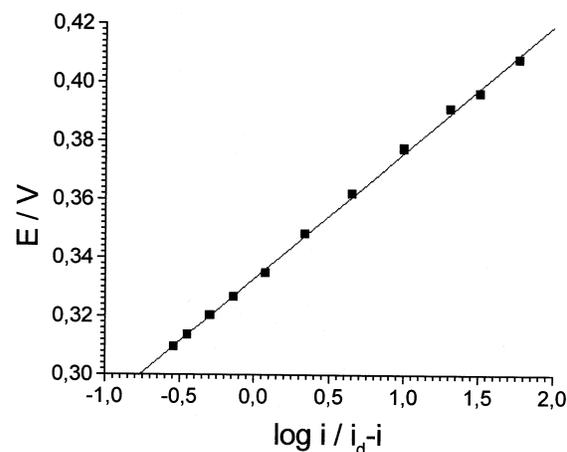


Figura 4. Gráfico diagnóstico para el estudio de la reversibilidad de la bilirrubina.

pendiente es igual a 0,049 y corresponde con una estequiometría 1:1 molécula-ligando, dentro del intervalo de concentración utilizado.

Determinación de las constantes de los complejos

Los cálculos para determinar las constantes de equilibrio para los complejos de in-

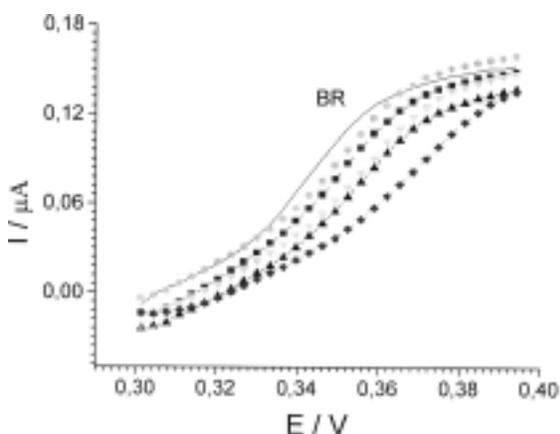


Figura 5. Experimento VPN del complejo de inclusión bilirrubina indirecta α -ciclodextrina. $[CD]/10^{-3}$ M: 0; 1; 5; 6; 7; 8; 9; 10. $E_T = CV$. $v = 3 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

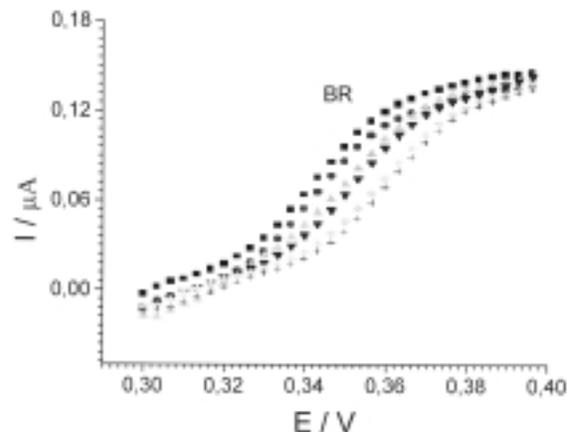


Figura 6. Experimento VPN del complejo de inclusión bilirrubina indirecta β -ciclodextrina. $[CD]/10^{-3}$ M: 0; 1; 5; 6; 7; 8; 9; 10. $E_T = CV$. $v = 3 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

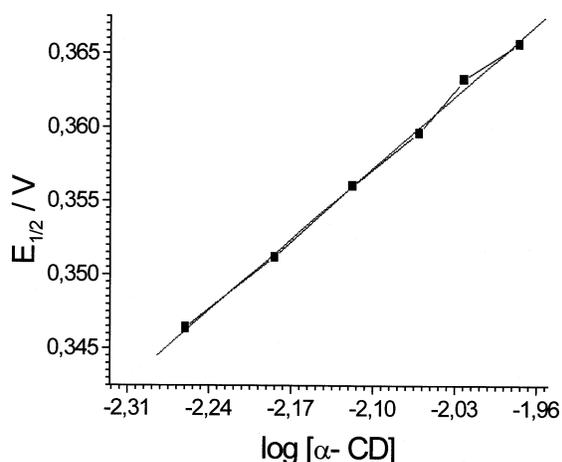


Figura 7. Determinación de la estequiometría y constante de equilibrio para el complejo bilirrubina indirecta- α -ciclodextrina. Datos tomados de la figura 5.

clusión se realizaron a partir del intercepto del gráfico de la ecuación anterior. Para α -CD, Figura 7, el intercepto es de 0,144 y corresponde con un valor de K_d de $6,50 \times 10^{-4}$ ($K_f = 1538 \pm 1$). Para β -CD, Figura 8, el inter-

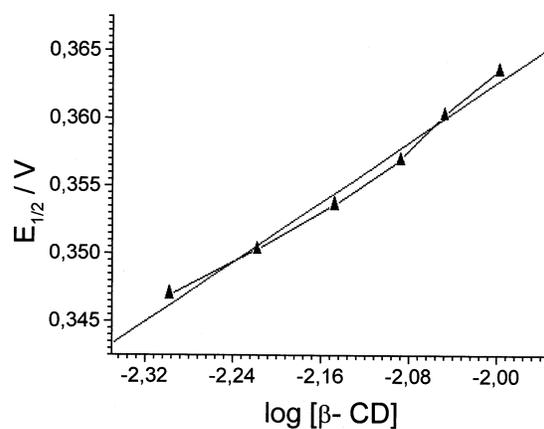


Figura 8. Determinación de la estequiometría y constante de equilibrio para el complejo bilirrubina indirecta β -ciclodextrina. Datos tomados de la figura 6.

cepto es 0,130 y corresponde con un valor de K_d de $3,85 \times 10^{-4}$ ($K_f = 2598 \pm 4$).

Estos valores demuestran que el complejo BI- β -CD es más estable que el complejo BI- α -CD. Las variaciones en la estabilidad

de los complejos con las diferentes ciclodextrinas, de acuerdo con Jianjun y colaboradores (16), se pudiera explicar tomando en consideración la diferencia en las cavidades de ambas ciclodextrinas. En este caso, la cavidad de la primera ciclodextrina es más grande que la de la segunda, de tal manera que la BI entra y penetra en la cavidad más fácil y más profundamente. Por esta razón, la distancia de los grupos $-\text{COO}^-$ de la BI y los OH de la ciclodextrina es menor, lo cual determina la formación adicional de puentes de hidrógeno más resistentes y un valor de K_f menor para el complejo BI- α -CD al comparar con la BI- β -CD. En estos complejos de estereo-inclusión, una parte de la BI penetra en la cavidad interna de la CD determinando un cambio en el medio interno electrónico y las variaciones obvias del potencial de media onda.

En conclusión, los resultados demuestran que la bilirrubina se oxida irreversiblemente a biliverdina o a otros productos de estructura química desconocida. La estequiometría indica que una molécula de BI se combina o forma un complejo de inclusión con una molécula de CD α ó β . La constante de equilibrio para la BI- β -CD demuestra que este complejo es más estable que el que se forma con la α -CD.

La relevancia y el interés hacia los compuestos de inclusión se debe, primordialmente, al hecho de que ciertas propiedades (la reactividad química y la solubilidad) de las especies huéspedes, en este caso la bilirrubina, pueden alterarse. Esto es muy interesante ya que en los prematuros con ictericia a predominio de la BI es posible que la administración de la ciclodextrina (CD), por vía rectal o por vía intravenosa ocasione la formación de un complejo BI-CD y de esta manera se puede favorecer la eliminación del pigmento por vía renal y disminuir su toxicidad.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHT-ULA y al CEP-ULA por el apoyo recibido.

Referencias

1. SLIFSTEIN S., ARIEL M. *J Electroanal. Chem* Interfacial Electrochem. 48: 477-463, 1973.
2. ZETTERSTROM R., ERNSTER L. *Nature* 178: 1335-1337, 1956.
3. PARADISI F., GRAZIANO L. *Experientia* 29: 1376-1377, 1973.
4. SZEJTTLI J. *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes*, Academial Kiado, Budapest (Hungary), pp. 200-220, 1982.
5. AGRIFOGLIO G., TERUEL H. *Rev Soc Ven Quím* 16: 3-7, 1993.
6. FUJIMURA K., VEDA T., ANDO T. *Anal Chem* 55: 446-450, 1983.
7. BRESLOW L.W., OVERMAN J., *J Am Chem Soc* 92: 1075-1077, 1970.
8. KISSINGER T.P., EINEMAN W.R. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker Inc, New York (USA), pp. 582-604, 1984.
9. BARD J., FAULKNER L.R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, John Willey, Inc. New York (USA), pp. 461-620, 1974.
10. GRUPO DE ELECTROQUÍMICA DE SOUTHAMPTON, *Instrumental Methods in Electrochemistry*. Ellis Horwood (England), pp. 179-235, 1990.
11. LINGANE J. *J Chem Rev* 29: 1-40, 1941
12. ANGELIS K., BREZINA M., KORITA J. *Electroanal Chem Interfac Electrochem* 45: 504-507, 1973.
13. TREMILLON B. *Electrochimie analytique et réactions en solution* Tome 2. Masson (Paris), pp. 248-273, 1993.

-
14. VAN NORMAN J.D. *Anal Chem* 45: 173-175, 1973.
 15. LÓPEZ G. **Determinación electroquímica de bilirrubina sobre electrodo de carbón vítreo** (Trabajo de Especialidad). Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), pp. 29-31, 1993.
 16. JIANJUN N., GUANGJIN C., SHAOJU D. *Electrochim Acta* 39: 2455-2460, 1994.
 17. BASTARDO G., CHOY M., ALARCON M., MARQUEZ J., MARQUEZ O. NAVARRO P., RAMIREZ M., **CIENCIA** 8(1), 93-99, 2000.