



## ESTUDIO VOLTAMPEROMÉTRICO DE LA HEMOZOINA Y $\beta$ -HEMOZOINA EN PRESENCIA DE QUININA Y AMODIAQUINA.

J. L. Imbert Palafox<sup>1</sup>, V. E. Reyes-Cruz<sup>2\*</sup>, M.A. Veloz Rodríguez<sup>2</sup>, G. Urbano Reyes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área Académica de Medicina, ICESA, UAEH Carr. Pachuca-Actopan, Pachuca. Hidalgo.

<sup>2</sup>Área Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, ICBI, UAEH. Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Pachuca. Hidalgo, México, CP 42184.

\*Tel (771) 717200 ext 2276, [reyescruz16@yahoo.com](mailto:reyescruz16@yahoo.com)

### RESUMEN

Empleando voltamperometría cíclica y electrodos de pasta de carbono se determino la reactividad directa (procesos Oxido-Reducción) de la hemozoina y la  $\beta$ -hemozoina, obtenidas del triatoma *Meccus longipennis* combinadas con fármacos antimalariales (para este estudio quinina y amodiaquina). Los resultados indican que además de la hemozoina también la  $\beta$ -hemozoina se puede asociar con bicapas de fosfolipidos e interferir con la integridad física contribuyendo al rompimiento de membranas y a la hiper-oxidación de moléculas. Además indican que presencia de la amodiaquina genera un medio más oxidante que su ausencia en la hemozoina y la  $\beta$ -hemozoina; lo cual podría explicar la efectividad de esta como droga antimalarial y la causa por la cual debe prescribirse bajo vigilancia médica. Finalmente, los resultados indican que la procedencia de las substancias y la naturaleza del medio electrolítico son importantes en la reactividad la hemozoina y la  $\beta$ -hemozoina.

**Palabras Claves:** Antimalariales, Grupo hemo, Electrodos de pasta de carbón.



## 1. INTRODUCCIÓN

El grupo hemo (ferritoporfirina IX; Fe (II) protohaematoporphyrin) liberado de la digestión de la hemoglobina, encontrado en los eritrocitos infectados con parásitos de malaria [1,2], en el intestino del insecto *Haemiptero Rhodnius prolixus* [3,4] u otros organismos que chupan sangre como helminto parásito *Schistosoma manzoni* [5] se agrega en un material insoluble e inerte llamado pigmento de malaria conocido como hemozoina. La unión de 2 hemozoinas que se efectúa entre el primer ión férrico del primer hemo y el oxígeno del grupo lateral carboxilato del segundo, forman un producto más insoluble cuya redícula estructurada de dímeros de hemo denominado  $\beta$ -hemozoina, provee de una forma única de evitar la toxicidad asociada con el soluble grupo hemo [6]. El hemo libre al asociarse con bicapas de fosfolípidos, interfiere con la integridad física de muchas moléculas biológicas y que puede llevar al rompimiento de membranas. Se ha propuesto que la hemozoina es un agregado de hemos y hay una creencia general de que la formación de la  $\beta$ -Hz podría ser un mecanismo protector contra la toxicidad del hemo. Se ha demostrado que cuando se agrega, el hemo en la  $\beta$ -Hz exhibe menos efectos deletéreos que en su forma libre, y esto no es debido a una reducción en la reactividad del grupo hemo, sino que es dependiente del tamaño del cristal de  $\beta$ -Hz que se forma.

El mecanismo por el cual se inicia la formación o la destoxificación de la hemozoina no se comprende aún y tampoco cómo actúan las drogas antimalaricales como la quinina, cloroquina y amodiaquina [7]. En el trabajo que antecede a esta investigación se determinó la reactividad directa de la hemozoina y la  $\beta$ -hemozoina provenientes del *Triatoma Meccus longipennis* utilizando la técnica de voltamperometría cíclica [8]. En este trabajo, se determina nuevamente la respuesta de oxidación de estas moléculas en presencia de drogas como la quinina y la amodiaquina en un medio similar al biológico donde se encuentra el grupo hemo.

## 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Se utilizó una celda típica de tres electrodos a temperatura ambiente y acondicionada para mantener una atmósfera inerte con nitrógeno. El contra- electrodo emplea una barra sólida de grafito y como electrodo de referencia se utilizó un electrodo saturado de sulfatos (SSE)  $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4(\text{s})/\text{K}_2\text{SO}_4(\text{sat})$  [ $E = 615 \text{ mV vs SHE}$ ], inmerso en un capilar de Luggin. Todos los valores de potencial fueron convertidos a la escala del electrodo estándar de hidrógeno (SHE,

sumando 0.615 Volts). Los electrodos de trabajo (CPE) se prepararon mezclando cuidadosamente 0.5 g de grafito y 0.5 g de muestra (Hemozoina o  $\beta$ -Hemozoina proveniente de *Meccus longipennis* así como las empleadas como control provenientes de Beckton & Dickinson®) con 0.2 ml de aceite de silicón, hasta homogeneizar en un mortero de ágata. Para los CPE con Amodiaquina y Quinina se mezclaron en la siguiente proporción 0.5 g de grafito, 0.25 g de droga y 0.25 g de muestra.

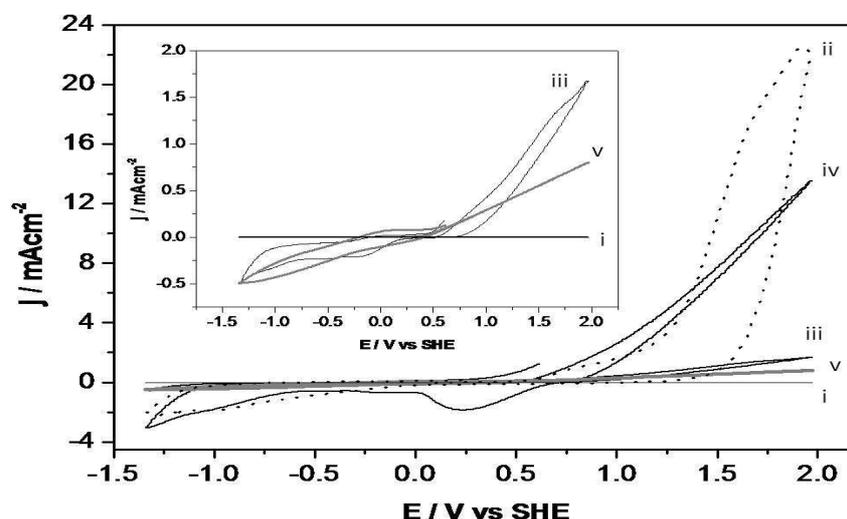
La solución utilizada fue: 0.15 M NaCl a pH 6.65. Para lo cual se utilizó agua desionizada con una resistencia específica de  $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ , los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El electrolito fue burbujeado previamente y mantenido con atmósfera de nitrógeno durante todos los experimentos. Los estudios electroquímicos se realizaron con un equipo potenciostato-galvanostato de la marca PAR, modelo 263A conectado a una PC. El manejo de las técnicas se realiza mediante el software proporcionado por la misma compañía. Las densidades de corriente fueron calculadas dividiendo la corriente entre el área de la sección transversal ( $0.0314 \text{ cm}^2$ ) de la superficie del electrodo de trabajo, con la que se está en contacto con el electrolito.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las figuras 1 y 2 se muestran las respuestas voltamperométricas en el medio de NaCl del grupo Hemo sin Fe (protoporfirina IX, curva i), la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina del control Beckton & Dickinson® (curvas ii) y del *Triatoma Meccus longipennis* (curvas iii). Así como también la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina proveniente del *Triatoma Meccus longipennis* en presencia de Amodiaquina (curvas iv) y en presencia de Quinina (curvas v). El estudio voltamperométrico del grupo hemo del control Beckton & Dickinson® (curvas ii) en NaCl se presenta confines comparativos

En la figura 1, (curva i) se observa que en la respuesta voltamperométrica del CPE-Hemozoina sin Fe no se detectan procesos de oxidación ni de reducción en la ventana de potencial donde se tiene los procesos de oxidación y reducción de la Hemozoina proveniente tanto de control Beckton & Dickinson® como del *Triatoma Meccus longipennis* (curvas ii y iii). Estos resultados indican que los procesos redox observados son debidos a la oxidación y reducción del átomo de hierro en el grupo hemo que poseen el control y el *Triatoma Meccus*

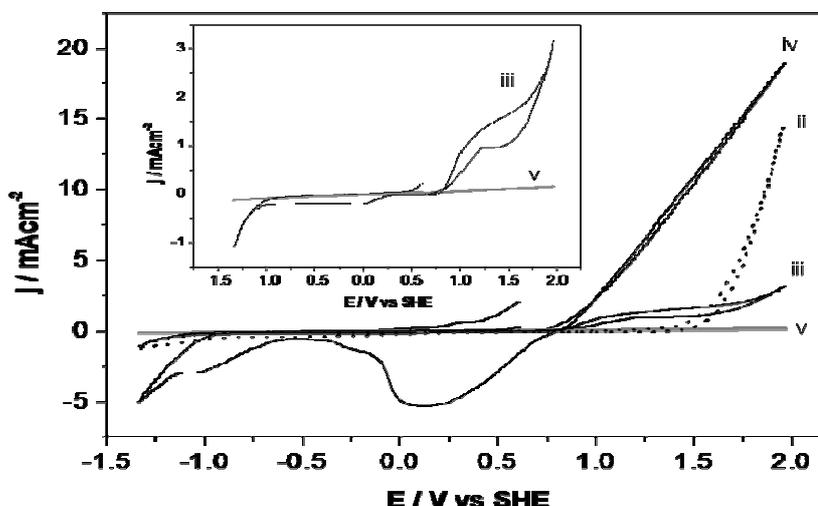
*longipennis*, y que el Fe es el que confiere el poder oxidante y reductor así como es responsable de la transferencia electrónica directa.



**Figura 1.** Voltamperogramas obtenidos sobre: (i) CPE-sin Fe, (ii) CPE-Hemozoina de Beckton & Dickinson®, (iii) CPE-Hemozoina de *Triatoma Meccus longipennis*, (iv) CPE-Hemozoina-Amodiaquina y (v) CPE-Hemozoina-Quinina en 0.15 M NaCl a pH 6.65 ( $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ), cuando el barrido de potencial iniciado en dirección.

En la figura 1 también se observa que en el CPE-Hemozoina con Amodiaquina modifica los procesos de oxidación y reducción de la Hemozoina provenientes del *Triatoma Meccus longipennis* (curvas, iii y iv). Siendo más notorio el cambio en el proceso de oxidación; donde para un potencial de 1.95V la Hemozoina con Amodiaquina incrementan su densidad de corriente 8 veces mayor respecto a la Hemozoina sin droga. Además se aprecia que en el caso del CPE-Hemozoina con Quinina la presencia de esta ocasiona una disminución la densidad de corriente de oxidación de 2 veces menor respecto a la hemozoina sin quinina (ver ampliación, curvas iii y v).

En la figura 2 se observa que la presencia de Amodiaquina y Quinina en el CPE- $\beta$ -Hemozoina proveniente del *Triatoma Meccus longipennis* también modifican los procesos de oxidación y reducción de la  $\beta$ -Hemozoina. Presentando un incremento en la densidad de corriente de oxidación de 6 veces mayor respecto a la  $\beta$ -Hemozoina en ausencia de Amodiaquina (curvas iii y iv) para un potencial de 1.95V. Mientras que la presencia de Quinina presenta una disminución de la densidad de corriente de oxidación de 21 veces menor respecto a aquellas que no la tienen (curvas iii y v) para el mismo potencial (1.95V).



**Figura 2.** Voltamperogramas obtenidos sobre: (ii) CPE- $\beta$ -Hemozoina de Beckton & Dickinson®, (iii) CPE- $\beta$ -Hemozoina de *Triatoma Meccus longipennis*, (iv) CPE- $\beta$ -Hemozoina-Amodiaquina y (v) CPE- $\beta$ -Hemozoina-Quinina en 0.15 M NaCl a pH 6.65 ( $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ ), cuando el barrido de potencial iniciado en dirección.

Estos resultados indican que la Amodiaquina genera un medio más oxidante aun con la especie insoluble del grupo hemo ( $\beta$ -Hemozoina), lo cual podría explicar el uso de esta como droga antimalarial. Este ambiente oxidante puede provocar que se rompan las membranas del parásito de la malaria y también da lugar a que los grupos hemo se asocien con bicapas de fosfolípidos e interfiere con su integridad física y al rompimiento de membranas de los eritrocitos. Quizás por esta razón esta droga debe prescribirse bajo vigilancia médica, ya que se señalan efectos contraindicados como la producción de proliferación celular. Mientras que los resultados de la quinina indican que se tiene un medio oxidante menor para ambos grupos hemo, lo que podría ocasionar un menor daño tanto a las membranas del parásito como al eritrocito.

Al comparar las respuestas de la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina provenientes del control Beckton & Dickinson® (Figuras 1 y 2, curvas ii), se tiene que las densidades de corriente de oxidación de la Hemozoina es 14 veces mayor respecto a la  $\beta$ -Hemozoina para un potencial de 1.5V. Mientras que en la comparación de las respuestas de la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina provenientes del *Triatoma Meccus longipennis* (Figuras 1 y 2 curvas iii) se tiene que la densidad de corriente de oxidación en la  $\beta$ -Hemozoina es 1.4 V veces mayor a la Hemozoina para el potencial de 1.8 V. Al igual que en trabajo previo los grupos más reactivos son Hemozoina proveniente del control y la  $\beta$ -Hemozoina proveniente del *Triatoma Meccus longipennis*. Estos

resultados confirman que la pureza de la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina, es un factor importante a considerar si se requiere evaluar la acción que tiene las drogas antimalarías.

Es importante mencionar que la densidad de corriente de oxidación de la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina provenientes de *Triatoma Meccus longipennis* en el medio biológico (NaCl) es del orden de 3 veces menor a la del medio de NaNO<sub>3</sub> que antecede a este trabajo [8]. La diferencia observada en la densidad de corriente de oxidación puede ser atribuida a la interacción del Cl con el Fe presente en la Hemozoina y la  $\beta$ -Hemozoina provenientes de *Triatoma Meccus longipennis* que probablemente disminuye la cantidad de Fe en la interface y por lo tanto su respuesta de oxidación. Estos resultados indican que el medio influye de manera importante en la oxidación de los grupos hemo.

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el medio y la procedencia la hemozoina y la  $\beta$ -hemozoina influyen de manera importante en la oxidación de los grupos hemo. En contando que los grupos más reactivos son Hemozoina proveniente del control y la  $\beta$ -Hemozoina proveniente del *Triatoma Meccus longipennis*.

Los resultados obtenidos también indican que la voltamperometría con electrodos de pasta de carbón puede ser utilizada para evaluar de forma rápida la estabilidad o las propiedades oxidantes de otras drogas que son por naturaleza insoluble, como los antimalarías.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores externan su gratitud al UAEH por las facilidades para desarrollar esta investigación.

#### 6. REFERENCIAS

- [1] A.F.G. Slater, W.J. Swiggard, B.R. Orton, W.D. Flitter, D.E. Goldberg, A. Cerami, and G.B. Henderson, Proc. Natl. Acad. Sci. **88**, pp. 325-329 (1991).
- [2] Kla Bendrat K, Berger, B.J. and A., Nature **378**, pp. 138 (1995).

- [3] M.F. Oliveira, J.R. Silva, M. Dansa-Petretski, W. de Souza, U. Lins, C.M.S. Braga, H. Masuda and P.L. Oliveira, *Nature* **400**, pp. 517–518 (1999).
- [4] M.F. Oliveira, J.R. Silva, M. Dansa-Petretski, W. de Souza, C.M.S. Braga, H. Masuda and P.L. Oliveira, *FEBS Letters* **477**, pp. 95-98 (2000).
- [5] M.F. Oliveira, J.C.P. d'Avila, C.R. Torres, P.L. Oliveira, A.J. Tempone, Rumjanek F.D., Braga C.M.S., Silva J.R., Petretski M.D., Oliveira M.A., W. de Souza and S.T. Ferreira, *Mol. Biochem. Parasitol* **111**, pp. 217-221 (2000).
- [6] S. Pagola, P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar and S.K. Madsen, *Nature* **404**, pp. 307-310 (2000).
- [7] R.G. Ridley, Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs, *Nature* **415**, pp. 686-693 (2002).
- [8] V.E. Reyes Cruz, G. Urbano Reyes, M. A. Veloz Rodríguez y J. L. Imbert Palafox, *Memorias en extenso del XXIII Congreso SMEQ*, Ensenada B.C.N., México (2008).