

Comunicación corta

Adsorción de bilirrubina sobre principio activo zeolítico

Maritza Gener*, Juan E. Tacoronte**, Gerardo Rodríguez*, María A. Serrano***, Aracelis Cendan****, Deisy Haedo**** y Ricardo Pérez****

* Laboratorio de Ingeniería de Zeolitas, Instituto de Materiales y Reactivos, Universidad de La Habana, CP 10 400, Cuba, ** Laboratorio de Productos Naturales, Universidad de La Habana, Facultad de Química CP 10 400, Ciudad de La Habana, Cuba, *** Laboratorio de Análisis, Instituto de Materiales y Reactivos, Universidad de La Habana, CP 10 400, Cuba, **** Instituto de Gastroenterología, Hospital Calixto García, CP 10 400, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 25 de agosto de 1999

Aceptado: 21 de enero del 2000

Palabras clave: Zeolita, clinoptilolita, bilis humana, adsorción, bilirrubina, ácidos biliares.

Key words: Zeolite, clinoptilolite, human bile, adsorption, bilirrubine, bile acids.

RESUMEN. El desarrollo de nuevos fármacos hipocolesterolémicos es una línea fundamental de investigación. El principio activo zeolítico (PAZ) CZ ha sido utilizado satisfactoriamente en la disminución significativa de niveles séricos de colesterol. En la presente comunicación se establece la capacidad de adsorción de bilirrubina por este principio activo, demostrándose una vía hipotética de adsorción de ácidos biliares.

ABSTRACT. The synthesis of new hypocholesterolemic drugs is an important academic/applied research in many prestigious worldwide institutions. The active zeolitic principle PAZ/CZ have been used satisfactorily for decreasing the cholesterol levels in serum fluids. In the present communication is established the adsorption capacity of this active principle CZ obtained from naturally occurring clinoptilolite, modified through hydrothermal treatment. The pharmacological action of it, hypothetically, takes place through the zeolite modified interaction with bile acids or their conjugates with bilirrubine.

por especies aniónicas, pero se conoce que modificaciones realizadas en estos materiales con moléculas surfactantes catiónicas de gran tamaño, tales como: sales cuaternarias de amonio, han transformado su química superficial confiriéndoles propiedades hidrofóbicas y de intercambio aniónico.^{10, 11}

Partiendo de estas consideraciones, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la interacción del producto activo CZ con la bilis humana, teniendo en cuenta las condiciones existentes en fluidos intestinales.

INTRODUCCION

Actualmente, la búsqueda de medicamentos con propiedades hipocolesterolémicas constituye un interés investigativo fundamental y se aplica en muchos laboratorios farmacéuticos.^{1, 2} Diferentes modificaciones mediante intercambio iónico en condiciones hidrotermales de la zeolita natural (Cli-Heu) del yacimiento Tasajeras, Cuba, han permitido la obtención de un conjunto de materiales zeolíticos con propiedades terapéuticas.³ En particular, el principio activo zeolítico (CZ) (clinoptilolita cálcica) resultó el más efectivo en la captación de ácidos biliares presentes en bilis humana, cuyo estudio *in vitro* reportó una disminución de un 40 % en comparación con un 27 % de la clinoptilolita natural (NZ).⁴ La acción hipocolesterolémica de este material, denominado Colestina, ha sido de-

mostrada con la disminución significativa de los niveles de colesterol total en sangre, lograda en varias especies de animales de experimentación, normocolesterolémicos y también alimentados con dietas enriquecidas en colesterol.^{5, 6}

El mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado, pero de los resultados de un estudio comparativo con la Colestiramina,⁷ resina de intercambio aniónico de eficacia hipocolesterolémica reconocida,^{8, 9} se encontró que tiene un efecto similar. Todo lo cual permite proponer un mecanismo tentativo basado en el intercambio iónico y/o adsorción de los aniones de las sales biliares conjugadas a través de intermediarios presentes en el lumen intestinal.

La mayoría de las zeolitas poseen una carga estructural neta negativa, debido a lo cual no presentan afinidad

PARTE EXPERIMENTAL

El PAZ-CZ objeto de estudio, se obtiene a partir de la zeolita natural (clinoptilolita-heulandita), procedente del yacimiento Tasajeras, Villa Clara, Cuba, la cual se lleva a un tamaño de partícula entre 50-160 micras y mediante una transformación hidrotermal se enriquece en calcio,¹² proceso que cumple con los requerimientos establecidos para materia prima de la industria farmacéutica.¹³ La caracterización físico-química se realizó utilizando las técnicas de DRX, FTIR y análisis químico.¹⁴

Elección de las muestras biológicas

Se obtuvieron durante varios días pool de bilis humana (mezcla de bilis, tipos A, B y C) estimuladas con sorbitol y procedentes de diferentes pacientes voluntarios. Las muestras se centrifugan y diluyen apropiadamente.

Metódica del experimento

Previamente el PAZ es tratado con solución salina (NaCl, 0.9 %) y ácido clorhídrico (pH = 1,41). Seguidamente 500 mg de CZ se ponen en contacto con 5 mL del pool acondicionado (2h en agitación mecánica) en tubos de centrifuga que se protegen de la luz. Posteriormente se centrifuga (3 000 r/min, durante 10 min).

Detección de bilirrubina y ácidos biliares

La cuantificación de la bilirrubina presente en la bilis se hizo espectrofotométricamente a una $\lambda = 546$ nm contra blanco muestra, utilizando una curva de calibración realizada a partir de soluciones patrones preparadas con bilirrubina comercial (BDH), en el intervalo de concentraciones entre 1,71–13,7 $\mu\text{mol/L}$.¹⁵ De la diferencia obtenida entre las concentraciones de bilirrubina se pudo evaluar la retención alcanzada.

Paralelamente se determina la presencia de ácidos biliares totales según el método de Fausa.¹⁶ Las lecturas fueron hechas a una $\lambda = 340$ nm contra blanco reactivo. También de la diferencia obtenida entre las concentraciones de ácidos biliares, se pudo evaluar si hubo retención de los mismos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

La curva de calibración obtenida corrobora la ley de Lambert-Beer en todo el intervalo de concentraciones estudiado, con un coeficiente de regresión lineal satisfactorio ($r = 0,99964$).

En la Tabla 1 se exponen los resultados obtenidos: concentraciones de bilirrubina, obtenidas antes y después del contacto de la bilis con CZ, así como los por cientos de retención obtenidos.

La aplicación del test estadístico Q ($\alpha = 0,05$) a los valores de concentración de bilirrubina, antes del contacto,

Tabla 1. Concentraciones de bilirrubina obtenidas antes y después del contacto de la bilis con CZ y por cientos de retención

| Muestras | C _A (bil.) | C _D (bil.) | μmol_A | μmol_D | ADS (%) |
|----------|-----------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|---------|
| 1 | 26,25 | 6,56 | 0,1312 | 0,0328 | 75 |
| 2 | 11,71 | 0,13 | 0,0585 | 0,0007 | 99 |
| 3 | 9,78 | 1,96 | 0,0489 | 0,0098 | 80 |
| 4 | 16,13 | 0.10 | 0,0806 | 0,0005 | 99 |
| 5 | 15,02 | 1.00 | 0,0751 | 0,0050 | 93 |
| 6 | 24,41 | 4.72 | 0,1220 | 0,0236 | 81 |

demonstró que todos esos valores son permisibles ($\bar{X} = 17, \Delta\bar{X} = \pm 3, DE = 7$) y están en concordancia con lo reportado en la literatura.¹⁷

Los por cientos de retención de bilirrubina conjugada que se alcanzan son satisfactorios (% de retención medio es 88 %, DE = 11), quedando constatado que efectivamente hay retención de la bilirrubina por parte de CZ. Las diferencias existentes entre los por cientos de retención de cada muestra pueden deberse a que el trabajo se realiza con muestras biológicas tomadas durante diferentes días y además provenientes de diferentes pacientes, por tanto los valores obtenidos están en dependencia de la concentración de bilis tomada.

Con respecto a la detección de los ácidos biliares se constata perfectamente su presencia en las muestras analizadas, estando sus concentraciones y data de retención dentro del rango reportado en la literatura.^{4, 17}

BIBLIOGRAFIA

1. Simonian A.B. et al. *Zh. Farmsevt. Khim.*, 2, 37, 213, 1991.
2. Menéndez R. et al. Efectos del policosanol sobre la biosíntesis del colesterol y el catabolismo de las LDL. *Revista CENIC*, 26, Número especial, 1995.
3. Rodríguez-Fuentes G., et al. Pharmacological action of modified natural clinoptilolite. Zeolite'97. 5th International Conference on the Occurrence, Properties & Utilization of Natural Zeolites. Sept. 21-29, Naples, Italy. 258-260, 1997.
4. Simón R., et al. Valor como hipocolestiremiante de la colestina. II Conf. Nacional sobre zeolitas naturales, La Habana, 1993.

5. Simón R., et al. Acción hipocolesterolemica de la colestina en conejos normocolesterolemicos. *Cub. Invest. Biomed.*, 14, 111, 1995.
6. Simón R., et al. Influencia de la colestina sobre los niveles séricos de colesterol en perros Beagles. *Cub. Invest. Biomed.*, 14, 116, 1995.
7. Simón R., et al. Comparación del efecto hipocolesterolemico de la colestina con la colestiramina. *Cub. Invest. Biomed.*, 16, 30, 1997.
8. Johns W.H. and Bates T.R. Quantification of the binding tendencies of cholestyramine I: Effect of structure and added electrolytes on the binding of unconjugated and conjugated bile-salt anions (*J. of Pharm. Sciences*, 58, 179, 1969).
9. Johns W.H. and Bates T.R. Quantification of the binding tendencies of cholestyramine II: Mechanics of interaction with bile salt and fatty salt anions (*J. of Pharm. Sciences*, 59, 329, 1970).
10. Haggerty G.M. and Bowman R.S. *Environmental Science & Technology*, 28, 452, 1994.
11. Bowman R.S. et al. Conf. Environmental Engineering, Proceedings Joint CSCE-ASCE, 1993.
12. Rodríguez G., Tesis PhD. "Propiedades físico-químicas y aplicaciones industriales de la clinoptilolita natural". CNIC, 1-230, 1987.
13. NRIB 1152. Zeolita natural para la industria farmacéutica. Especificidades de Calidad, 1992.
14. Picazo O. Tesis de Técnico Medio, IMRE-Laboratorio de Ingeniería de Zeolitas, 1993.
15. Hyman J. and Zimmerman M.D. *Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. 13th Ed, W.B.Saunders, Philadelphia, chapter 40, 521-557, 1962.
16. Fausa O. and Skälhegg B.A. Quantitative determination of bile acids and their conjugates using TLC. *Scand. J. Gastroent.*, 9, 249, 1974.
17. Rose R. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. t.2., chapter 11, Raven Press Editor, New York, 1 021-1 033, 1981.