

# REACCION DE LA HEMOGLOBINA CON EL OZONO

R. Ramos, J. Fernández Bertrán y M. Lorenzo

Dirección de Química, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 4 de marzo de 1987

Recibido: 28 de abril de 1987

**ABSTRACT.** An investigation about ozone-hemoglobin interaction was performed, which proved the change of oxihemoglobin into meta-hemoglobin during, the process, as the result of the ozone attack to the iron atom of hemo group. It was also noticed the reaction of ozone with the porphirin conjugated system.

**RESUMEN.** Se realizó el estudio de la interacción de la hemoglobina con el ozono constatándose la transformación de la oxihemoglobina en metahemoglobina lo que evidencia el ataque del ozono al hierro del grupo hemo. También se apreció la reacción del ozono con el sistema conjugado de las porfirinas.

## INTRODUCCION

Las células rojas de la sangre han sido estudiadas intensamente, tanto como fuente de radicales libres, como objeto de daño oxidativo. Es conocido que muchos medicamentos y xenobióticos pueden causarle daños significativos a estas células, lo que provoca en ocasiones anemia hemolítica. En relación con las reacciones REDOX de la hemoglobina, tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>1</sup> existe una bibliografía extensa. Los trabajos en este campo se han visto reforzados por el empleo de la superóxido dismutasa como medio de demostración de la participación en estas reacciones del ion superóxido, así como, por el de la poderosa técnica de la resonancia paramagnética electrónica para el estudio de las reacciones radicalicas.

En los últimos años, el ozono se ha utilizado como agente terapéutico en el tratamiento de diferentes enfermedades virales<sup>2</sup> y de otras provocadas por deficiencias circulatorias.<sup>3</sup>

Para el tratamiento de algunas de estas enfermedades, se recomienda el empleo de la autohemoterapia, que consiste en hacer interactuar el ozono con la sangre del paciente y su reintroducción posterior por vías intramuscular o intravenosa.<sup>4</sup> Toda vez que uno de los principales constituyentes de la sangre es la hemoglobina, la cual alcanza un contenido en los eritrocitos de alrededor del 34 %, es de interés conocer las transformaciones que ésta sufre al ponerse en contacto con el ozono.

Es conocido que la estructura de la hemoglobina, establecida definitivamente por Perutz,<sup>5</sup> incluye en su constitución cuatro porfirínicos, en cuyo centro el átomo de hierro está unido por varios tipos de ligandos, lo cual define su estructura.

Antes de precisar la interacción del ozono con la hemoglobina, es necesario definir algunos términos estructurales de ella. El grupo hemo de la oxihemoglobina posee un átomo de hierro ferroso con coordinación octaédrica. Cuatro de los enlaces son átomos de nitrógeno pirrólicos del anillo porfirínico. El quinto enlace es el grupo imidazol que une al hierro con la parte proteica y el sexto enlace el que lo une con la molécula de oxígeno. Este último enlace es lábil y el oxígeno puede ser sustituido por anhídrido carbónico en el proceso respiratorio.

La unión con grupos CN<sup>-</sup> o CO es muy fuerte e inhibe la absorción reversible del oxígeno y del anhídrido carbónico en el proceso respiratorio.

En el organismo, en presencia del oxígeno, la oxihemoglobina puede oxidarse pasando el Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> según la reacción:<sup>6</sup>



obteniéndose de esta forma la hemoglobina férrica o así llamada metahemoglobina, en cuya estructura el cuarto enlace interactúa con los iones -OH del agua. De la misma forma, el hierro puede pasar a Fe<sup>4+</sup> en presencia por ejemplo, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como producto intermedio de la reacción con la oxihemoglobina<sup>7</sup> según:



prácticamente toda la ferrihemoglobina formada reacciona para dar lugar a la metahemoglobina.

En la literatura<sup>5,8</sup> se describe con claridad el comportamiento de la hemoglobina en la cadena respiratoria y su relación con el oxígeno. Sin embargo, no ocurre lo mismo con la interacción del ozono, el cual puede actuar de diferentes formas con la molécula, ya sea por la transformación del Fe<sup>2+</sup> hemo, destrucción de la conjugación del sistema de las porfirinas por ataque a los dobles enlaces del sistema o también por reacción con la cadena polipeptídica de la hemoglobina. El estudio de este comportamiento se trata de esclarecer en este trabajo.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización del trabajo se utilizaron dos tipos diferentes de hemoglobina, en un caso se empleó en los espectros y las reacciones con el ozono, la hemoglobina humana reactivo (Hemoglobin Human Powder, Koch Light Laboratories Ltd, England) y en otro, la obtenida a partir de glóbulos de sangre humana separados por los métodos convencionales y su lisis correspondiente mediante la adición de agua y filtración para eliminar los restos de membranas y otras partes de las células.

Los dos tipos de hemoglobina fueron disueltos en una solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7,4 siendo obtenidos sus espectros en el rango de longitudes de onda de 500 a 900 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS de la firma Karl Zeiss Jena, M-40. La

representación de ambos espectros se muestran en la figura 1. Se puede apreciar que la estructura de las hemoglobinas de dos procedencias diferentes tienen espectros distintos, caracterizándose la obtenida a partir de las células rojas por unas bandas muy nítidas en 541 y 576 nm, propias de la oxihemoglobina, mientras que la calidad reactivo posee un espectro descendente hacia la zona de mayores longitudes de onda con un hombro en 540 nm y una banda de absorción en 635 nm, características de la metahemoglobina.

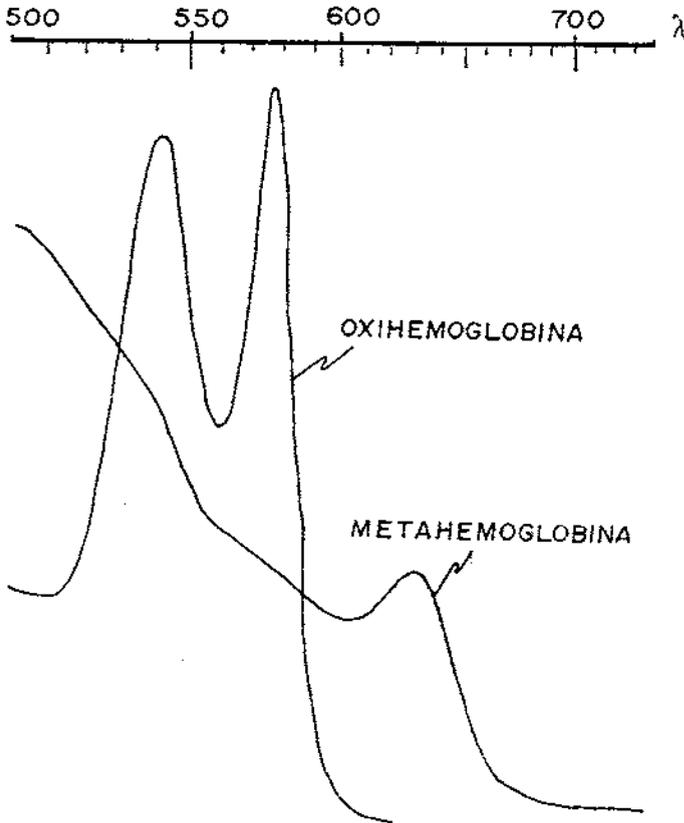


Fig. 1. Espectros en el rango UV visible de la oxihemoglobina y la metahemoglobina en solución amortiguadora de fosfato de potasio a pH 7,4

## DISCUSION DE RESULTADOS

Para realizar los experimentos de interacción del ozono se preparó una solución de oxihemoglobina en una solución amortiguadora a pH 7,4 de fosfato de potasio y se le hizo pasar un flujo de ozono producido en un ozonizador analítico construido al efecto y que asegura una concentración de ozono de  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L con un flujo de oxígeno de 0,8 L/s. En el transcurso de apenas 2 min del contacto de la oxihemoglobina con el ozono se observa una transformación de ella en metahemoglobina, lo cual se puede apreciar en la figura 2. Se observa una disminución de las bandas de 541 y 576 nm propias de la oxihemoglobina y el crecimiento de la banda de 635 nm de la metahemoglobina. Visualmente se pueden apreciar cambios sustanciales en la solución, como la transformación del color rojo a marrón y la formación de un precipitado debido probablemente a la precipitación de la hemoglobina que ha reaccionado. Esta variación en el espectro indica que el ozono ha interactuado con el  $Fe^{2+}$  del grupo hemo transformándose en  $Fe^{3+}$ , es decir, ocurre un ataque del ozono al átomo de hierro.

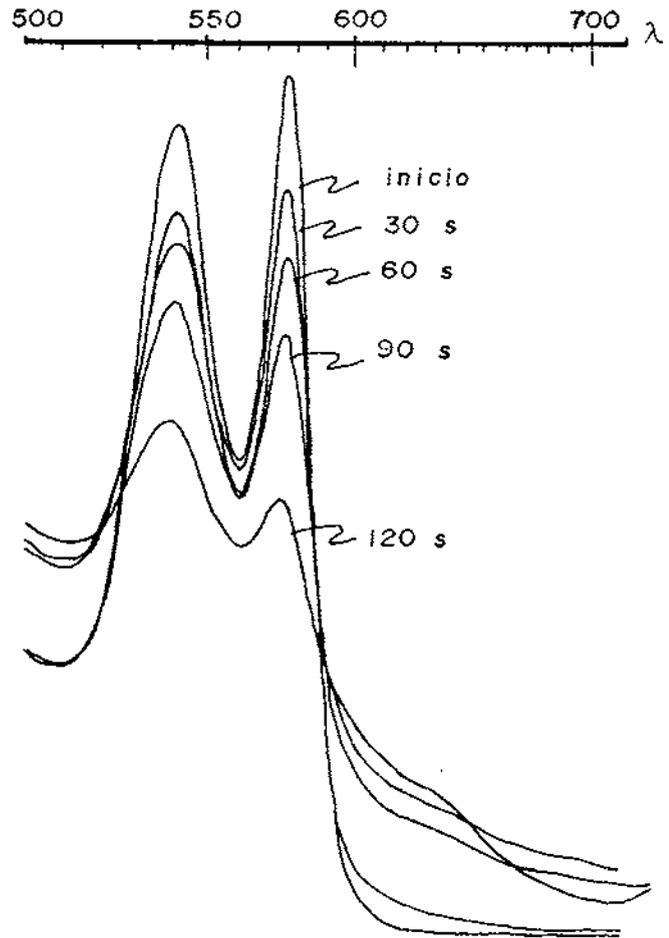


Fig. 2. Espectros de la oxihemoglobina en el rango UV visible tomados a diferentes tiempos de interacción con ozono a una concentración de  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L

En la figura 3 se pueden apreciar los cambios en la zona del espectro correspondiente al rango de 230 a 500 nm. La banda de 413 nm es típica de los sistemas conjugados de las porfirinas (banda de Sorét) y se puede ver que disminuye notablemente al intercambiar la oxihemoglobina con el ozono. Los espectros medidos a diferentes tiempos de tratamiento muestran también un corrimiento de la banda de 275 hasta 260 nm. Similarmente ocurre esta variación del espectro de la metahemoglobina.

Mediante el análisis de este rango del espectro se puede establecer que también el ozono ataca el sistema de enlaces conjugados de las porfirinas.

## CONCLUSIONES

De esta forma se puede concluir que el ozono reacciona con la hemoglobina provocando cambios sustanciales en el grupo hemo, siendo el ataque tanto al átomo de hierro del complejo, como al sistema de enlaces conjugados de sus ligandos.

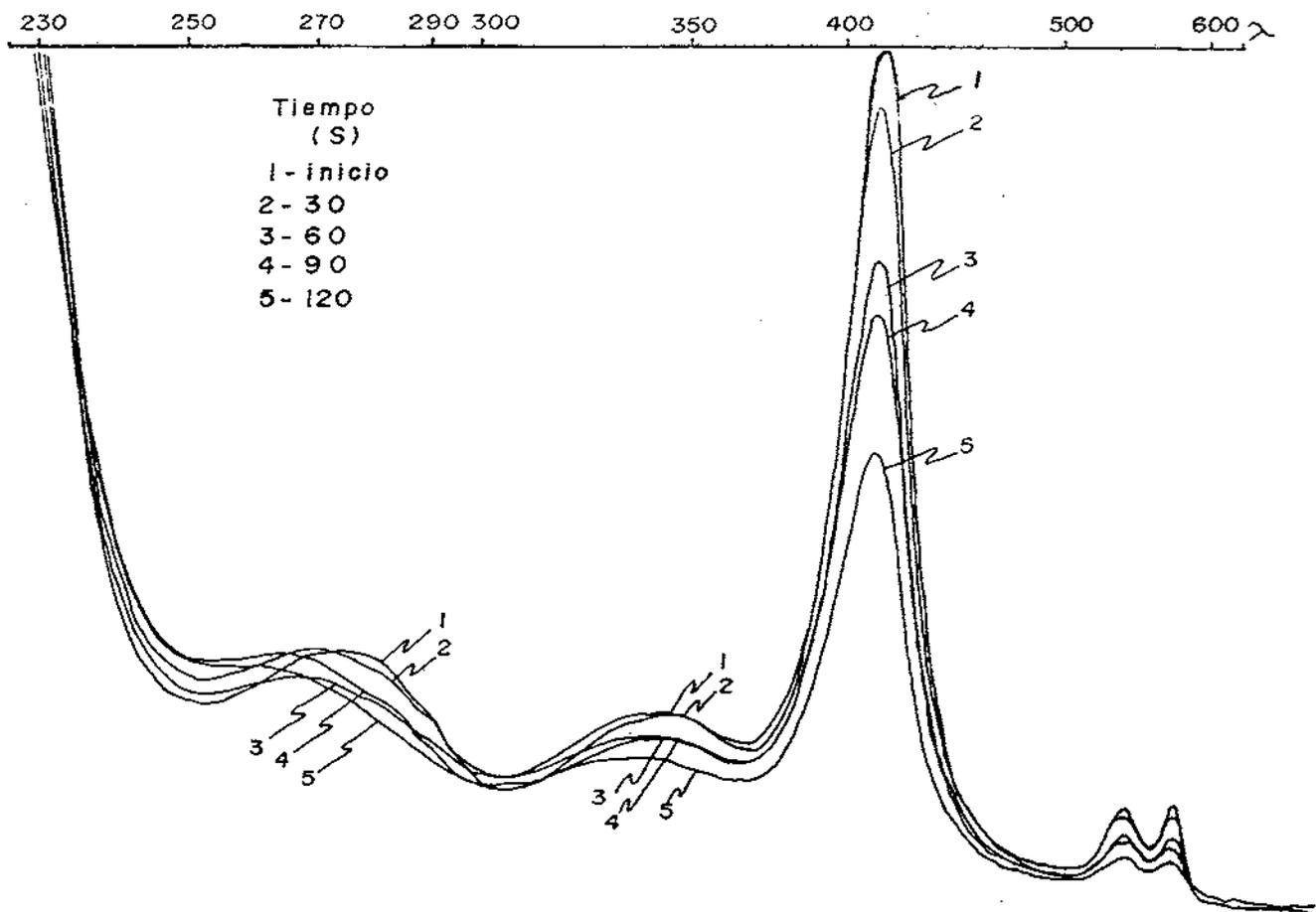


Fig. 3. Espectros de la oxihemoglobina en el rango UV visible tomados a diferentes tiempos de interacción con ozono a una concentración de  $1 \cdot 10^{-4}$  mol/L

### BIBLIOGRAFIA

1. Kiese M. *Metahemoglobinemia: A Comprehensive Treatise*, CRC Press, Cleveland, 1974.
2. Konrad H. *Proceedings 7th Ozone World Congress*, Tokyo, 215, 1985.
3. Rilling S. *OzoNachrichten*, 4, 7, 1985.

4. Balting H. *OzoNachrichten*, 2, 41, 1983.
5. Perutz M.F. *Br. Med. Bull.*, 32, 195, 1976.
6. Winterbourn C.C. *Environmental Health Perspectives*, 64, 321, 1985.
7. Whitburn K.D. *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, 447 Walter de Gruyter, Berlín, 1984.
8. Peritz M.F. *Br. Med. Bull.*, 32, 10, 1976.

*No pierda esta gran oportunidad que le brinda la Sociedad Ibero-latinoamericana del Ozono y el Centro Nacional de Investigaciones Científicas de participar en el*

## PRIMER CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APLICACIONES DEL OZONO

del 31 de octubre al 3 de noviembre de 1990

*con sede en las instalaciones de esta prestigiosa institución.*

*En el Congreso se abordarán temas relacionados con las aplicaciones del ozono en Medicina, Biología y en la industria, así como en el tratamiento de aguas y se presentarán las últimas novedades relacionadas con la construcción de equipos aplicados a este campo.*

*Solicite información e inscribese hoy mismo.*

*Dirija su correspondencia a:*

Dr. Manuel Gómez Moraleta

I CONGRESO IBEROLATINOAMERICANO DE APLICACIONES DEL OZONO

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Ave. 25 y calle 158, Cubanacán, Playa

Apatado Postal 6990

Ciudad de La Habana, Cuba

Télex: 51 1582 CNIC CU

FAX: 21 9446

(Más información en la página 49)