

# La Bilirrubina como Anfolito

Por EUGENIO RIESZ

Facultad de Humanidades y Ciencias

(MONTEVIDEO)

En la comunicación científica a la Sociedad de Biología de Montevideo (1950) "La resonancia de la bilirrubina y las modalidades de la diazo-reacción", B. Mendioroz aplica la teoría de la resonancia electrónica para interpretar el fenómeno de existencia de una bilirrubina "directa" que da la diazo-reacción y una bilirrubina "indirecta", que no la da, a menos que se agregue alcohol o acetona. Este trabajo que está en vías de publicación, tiene sin duda el gran mérito de haber empleado por primera vez la teoría de la resonancia para interpretar los fenómenos mencionados y bien conocidos hace tiempo.

En esta ocasión el Prof. Dr. B. Varela-Fuentes, especialista en materia de la bilirrubina, tuvo la amabilidad de poner a mi disposición todos los antecedentes experimentales y teóricos del problema e invitarme a examinarlo y exponer mi propio punto de vista al respecto. Las conclusiones, a las cuales he llegado, algo distintas de las expuestas en el trabajo inicialmente mencionado, siguen a continuación.

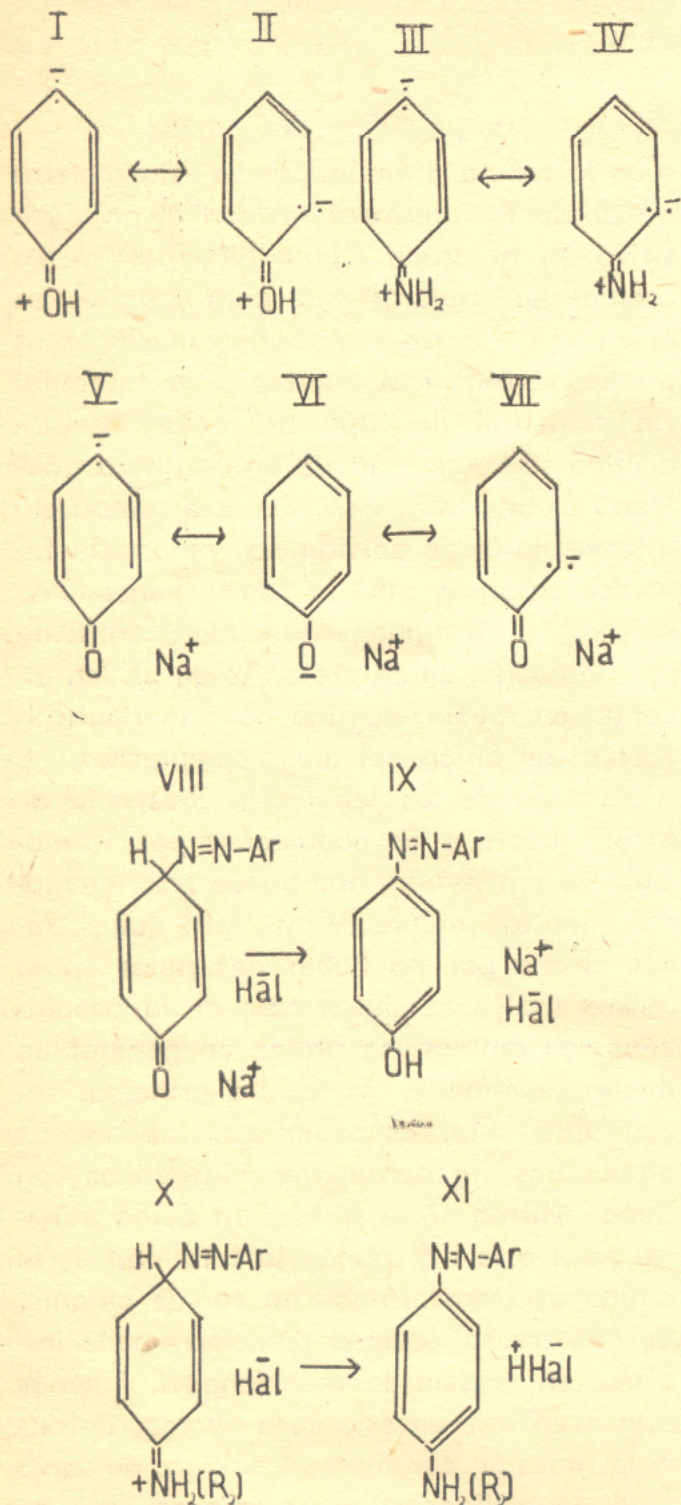
Las sales de diazonio pueden copular con los fenoles o con las aminas aromáticas, ya que ambos reaccionan según sus formas límites electrónicas (formas normales y formas polarizadas en posición orto o para I, II, III, IV). La copulación se efectúa según el siguiente esquema: adición del catión diazonio al polo negativo del fenol

o de la amina, formándose de esta manera un producto intermediario con el polo positivo en el grupo OH o NH<sub>2</sub> del núcleo aromático copulante y el polo negativo en el anión del diazo-compuesto anterior. (Los productos alifáticos sujetos a la tautomería ceto-enol del tipo del ácido acetilacético se comportan de una manera análoga.) Siendo muy inestable este compuesto intermediario de adición, la resonancia favorece entonces más la forma bencenoida normal, la cual puede aparecer fácilmente por liberación de un proton (o de un ion alcalino en medio alcalino para la neutralización del anión del diazo-compuesto).

En caso de los fenoles la presencia de álcali favorece la copulación por formación del ión fenato, que puede resonar mucho más fácilmente (V, VI, VII) que el fenol mismo por no haber dos polos en la misma molécula. En el caso de la copulación con aminas, se utiliza en general un medio débilmente ácido. La principal razón para esto, es solubilizar las aminas aromáticas, generalmente insolubles en agua. Mismo si se utiliza un ácido mineral para este fin, nunca la totalidad de la amina es transformada en sal de amonio, de manera tal, que la reacción puede iniciarse en el sentido mencionado. Además es conveniente en este caso agregar durante la reacción carbonato o acetato de sodio para neutralizar el ácido mineral que se

forma por la copulación, a fin que éste no esté en exceso.

En caso de copulación con aminas primarias o secundarias es posible que se formen primero compuestos diazaminados, en los cuales el hidrógeno del grupo triazénico, (siempre cuando un hidrógeno esté presente allí) no es solamente tautómero, pero hasta ácido (formación de sales metálicas). El ácido mineral servirá en este



caso para el desdoblamiento del diazoamino y su transposición en aminoazo, sin dar lugar a una salificación del resto imino del núcleo copulante, siendo los tres nitrógenos del grupo triazénico igualmente ácidos y no atrayendo protones.

Las fórmulas VIII, IX, X y XI representan las frases intermediarias y finales del proceso de copulación en posición para, de fenoles y aminas primarias.

En cambio si un hidrógeno del grupo amino está substituído por un grupo acilo (acetil o benzoil), la resonancia del grupo -NH-CO- que se forma por la acilación, impide la resonancia del grupo -NH- con el anillo bencénico y así la copulación. Según las tres formas límites de resonancia del grupo -CO-NH- (XII, XIII, XIV), en dos de ellas (XIII y XIV) el nitrógeno de este grupo no puede más ceder electrones al anillo bencénico, en la forma XIII por ya haber cedido un electrón al carbono del grupo -CO-, y en la forma XIV por formarse con dificultad un polo positivo en el nitrógeno vecino a un carbono positivo (XIVa). Parece que la contribución de las formas XIII y XIV (especialmente de la XIII) es relativamente grande en el sistema de resonancia y como se trata aquí no de un equilibrio, pero de una "superposición" de formas límites (mesomería) la nube electrónica nunca podrá adoptar una disposición lo suficientemente similar a la de la forma XIIa y por esta razón no copula.

Por otra parte las sales alcalinas de las sulfanilidas copulan con sales de diazonio lo que se comprende perfectamente según sus dos formas de resonancia posibles (XV y XVI).

Según la forma XV un nitrógeno negativo se transformaría por resonancia con el anillo bencénico en nitrógeno neutro (fórmula XVa) mientras que según la forma XVI un nitrógeno neutro se transformaría en positivo (XVIa). Evidentemente la forma XVIa parece contribuir poco al sistema de resonancia por encontrarse en ella un

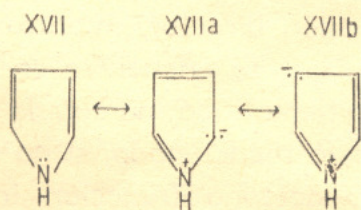
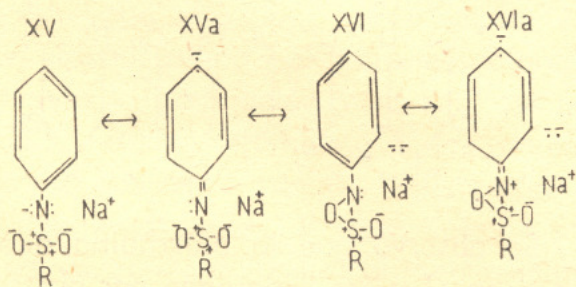
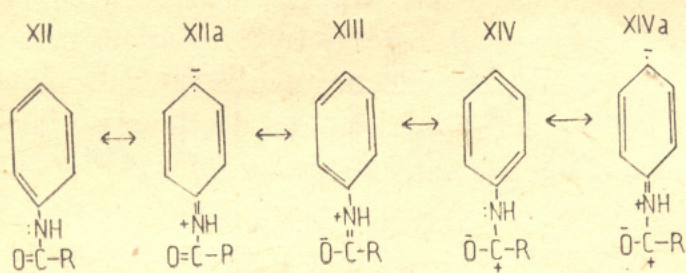
nitrógeno y un azufre, ambos con cargas positivas en vecindad. Por ruptura del puente de oxígeno es posible su pasaje a la forma XVa.

El pirrol (XVII) componente fundamental de la bilirrubina, es una sustancia aromática, que puede ser comparada al mismo tiempo con el fenol y con la anilina. Es sin embargo, una base débil, disolviéndose lentamente en ácidos diluídos y resinificándose rápidamente por ácidos concentrados. No se pueden aislar sus sales con ácidos diluídos, lo que solo es posible después de la introducción de grupos alcoholos en el núcleo (aumentando así su basicidad) o de grupos carboxílicos, que confieren al núcleo pirrólico mucho más resistencia. El pirrol puede copular con sales de diazonio, entrando este preferentemente en la posición alfa y si ésta está ocupada en la posición

copulación del pirrol se explica de una manera análoga a la de la anilina y del fenol, por la contribución de las formas límites de resonancia (XVIIa y XVIIb).

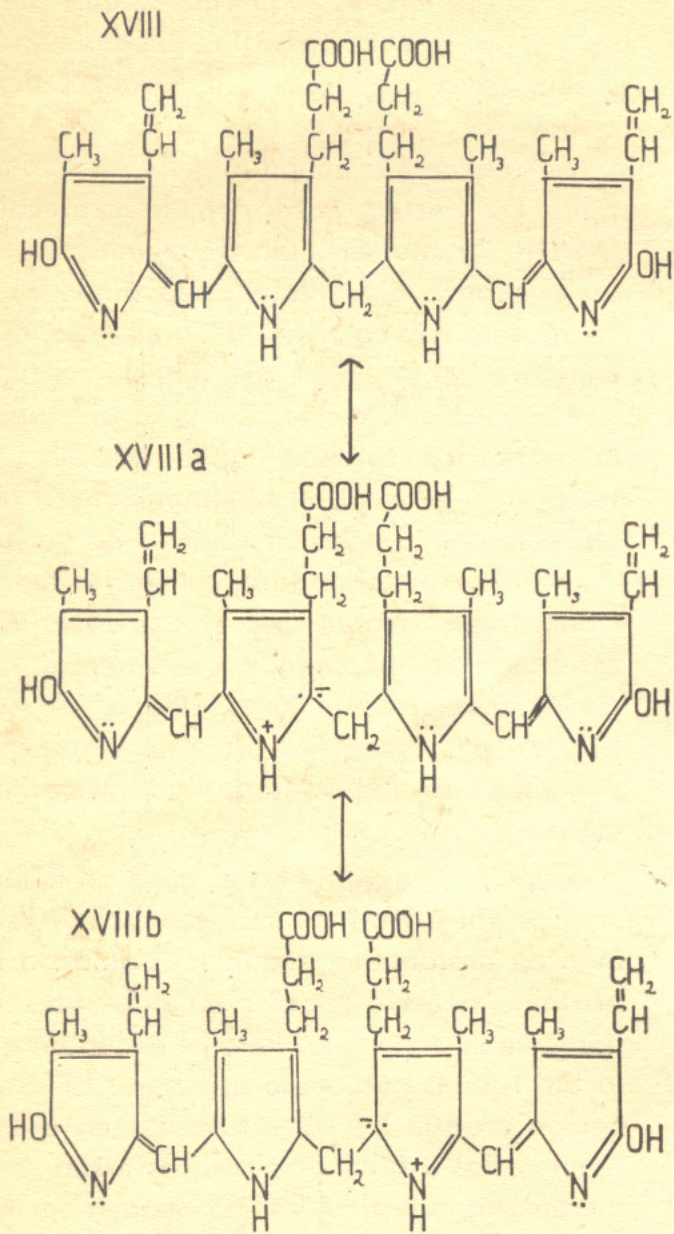
Si en los fenoles y aminas las posiciones orto y para, y en pirrol las posiciones alfa y beta están ocupadas, o no hay copulación o hay copulación con la eliminación del sustituyente que ocupa la posición en cuestión. Lo mismo pasa con la bilirrubina (XVIII), la cual en caso de copulación con un cloruro de diazonio es desdoblado en un compuesto azóico (XIX) y en el resto (XX) conteniendo el anion del diazo-compuesto (en este caso el cloro). Como la bilirrubina es asimétrica, estando ligadas sus dos partes por un grupo  $\text{CH}_2$  (distinguiéndose ambas solo por la posición relativa de un grupo metil y un grupo vinil en un núcleo pirrólico) es probable que el azo-compuesto resultante de la copulación, sea una mezcla de las dos partes de la bilirrubina por existir dos lugares equivalentes de copulación y ruptura a ambos lados del grupo  $\text{CH}_2$  central.

Se pueden admitir en el caso de la bilirrubina varias formas de resonancia y también de protomería, según las cuales la bilirrubina debería copular en diferentes lugares de su molécula. Pero el hecho de que la bilirrubina no copule así, tiene su explicación en que los sustituyentes en dichos lugares (los 4 núcleos pirrólicos están completamente substituídos) no pueden ser eliminados por la copulación. Únicamente el grupo metileno central está más débilmente ligado y por esta razón hay ruptura y copulación en este sitio. La causa, por la cual el grupo metileno está más débilmente ligado, parece ser el hecho, de que constituye una interrupción de un sistema conjugado, a modo de una barrera, impidiendo la vibración electrónica a través de toda la molécula (resonancia). Por esta interrupción hay en las dos partes de la molécula una vibración y resonancia independiente, determinando a ambos lados del grupo me-



beta con respecto al grupo imino. Son conocidos también compuestos pirrol-bis-azoicos, por copulación en posición alfa y beta. La

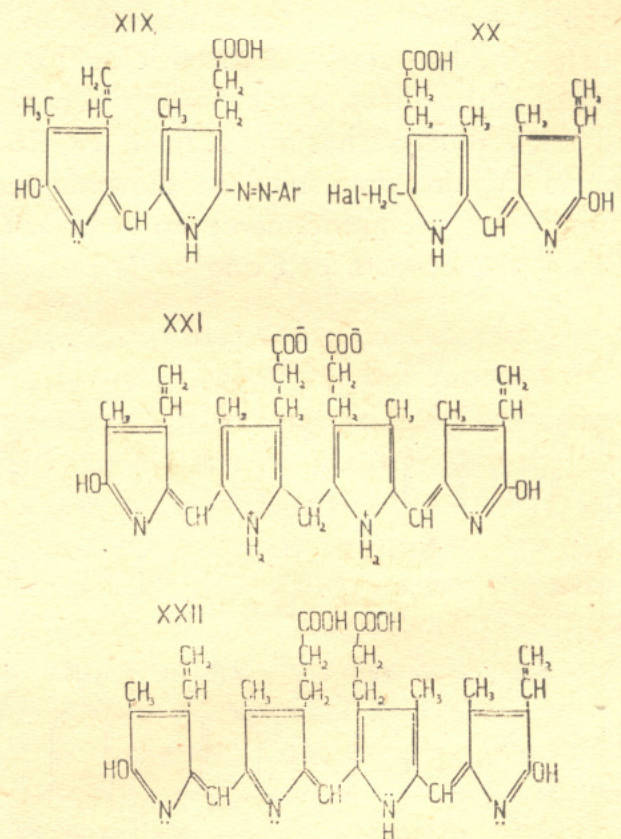
tileno una gran densidad electrónica, la cual permite la copulación y la ruptura (XVIIIa, XVIIIb). En la biliverdina (XXII) producto de oxidación de la bilirrubina, que



posee un sistema conjugado no interrumpido, la resonancia y la tautomería no están limitadas a una parte de la molécula, no hay aumento de la densidad electrónica en un lugar determinado y por esta razón no copula (XXIIa, XXIIb). Que la bilirrubina se comporta como un bis-dipirrilmeteno, y la biliverdina como un tetrapirrilmeteno, se observa también al estudiar el espectro de absorción de ambas sustancias. En efecto, las curvas de absorción de ambas sustancias son muy distintas: la bili-

rrubina presenta un máximo de absorción a los 4500 A°, y la biliverdina un máximo a 6750 A° y otra a 3840 A°. (1)

Se sabe que la bilirrubina tiene además la propiedad de requerir condiciones bastante específicas para que de la reacción de copulación con ácido sulfanílico diazotado (reacción de Hymans van den Bergh [2]) dependiendo dichas condiciones del medio en el cual se encuentra. La importancia del medio ya fué destacada al hablar de los fenoles y de las aminas aromáticas.



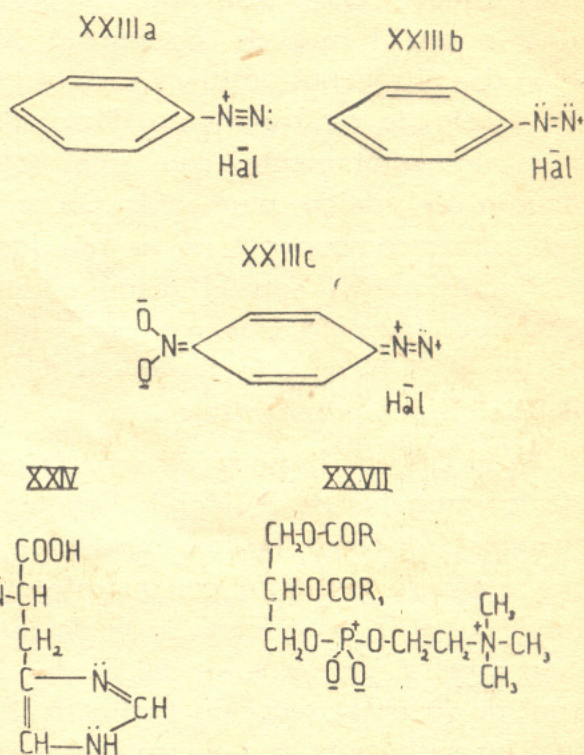
Se observó que la bilirrubina que aparece en el suero sanguíneo por obstrucción de las vías biliares, copula en este medio con el diazo-compuesto del ácido sulfanílico (reacción directa), mientras que la bilirrubina, que se encuentra en un suero por ictericia hemolítica, no copula con el diazo-compuesto mencionado, si no se agrega alcohol o acetona (reacción indirecta). M. Polonowski y A. Gajdos (3) demostraron que la bilirrubina cristalizada adicionada a una solución de suero-albúmina da la diazo-reacción directa, mientras que adicionada a

una solución de globina precipitada y redisuelta solamente da la diazo-reacción indirecta.

La propiedad de la bilirrubina de no copular directamente en algunos medios acuosos con el ácido sulfanílico diazotado, parece ser debida a contener ella dos grupos imino básicos, cuya basicidad está aumentada por los diferentes grupos alcoholos, que substituyen los núcleos pirrólicos, y dos grupos propiónicos ácidos, tal como en los amino-ácidos. Se sabe que estos últimos forman en solución acuosa los llamados "Zwitterionen" (sales internas), en las cuales el protón del grupo carboxílico se ha fijado en el grupo amino, respectivamente imino, básico (libre o substituído). En dichos grupos se forma pues un polo positivo, localizándose el polo negativo en un oxígeno del grupo carboxilo. La razón por la cual estas sales internas son estables en solución acuosa se explica por la alta constante dieléctrica del agua (81 a temperatura ambiente) la cual mantiene los dos polos aislados y por lo tanto no se pueden titular amino-ácidos en solución acuosa. Pero en solución alcohólica o acetónica predomina la forma no ionizada dado que tanto el alcohol como la acetona tienen una constante dieléctrica mucho más baja que el agua (25 para el alcohol etílico y 21 para la acetona), impidiendo la disociación y la salificación interna. Este comportamiento de los amino-ácidos fué utilizado por R. Willstaetter y E. Waldschmidt-Leitz (4) para valorar soluciones de amino-ácidos alcalimétricamente por adición de alcohol.

Mientras que para la mayoría de los amino-ácidos esta diferencia entre sal interna y forma no disociada solamente se observa en caso de titulación, en la bilirrubina esta diferencia se observa también en la copulación con diazocompuestos. La sal interna con el nitrógeno como polo positivo (tetraordinado) (XXI) ya no puede ceder electrones y resonar con los carbonos del núcleo pirrólico, condición esencial para la

copulación. Por dicho motivo la bilirrubina bajo forma de sal interna durante un apreciable período no copula con el ácido sulfanílico diazotado en forma observable. Pero en solución alcohólica o acetónica, en las cuales la bilirrubina no forma una sal interna, la copulación se efectúa normalmente. En presencia de álcali se forma un bilirrubinato, el cual evidentemente copula, por encontrarse en él el grupo imino con nitrógeno trivalente, siempre que se evite, como en todas las copulaciones, un gran exceso de ácido mineral.



También el ácido p. aminobenzóico copula, como se puede observar, en solución acuosa diluída con el ácido sulfanílico diazotado en forma sumamente lenta, mientras que en solución alcohólica (a igual concentración) copula mucho más rápidamente, y aún más en solución acetónica, lo que se debe a la presencia de la sal interna en la solución acuosa. En esta última se observa solamente después de algunas horas una copulación apreciable. La adición de acetato de sodio acelera en los tres casos la copulación. La velocidad de la copulación depende además no solamente del estado de la componente copulante y del pH

del medio, pero también de la naturaleza química del diazo-compuesto. Cada diazo-compuesto resuena entre dos formas (XXIIIa y XXIIIb) de las cuales solamente la forma XXIIIb es capaz de copular, para dar un azo-compuesto. Cada substituyente del anillo bencénico de la amina aromática a diazotar, que provoque un aumento en la contribución de la forma XXIIIb con el nitrógeno final no saturado y por esta razón positiva, favorecerá por lo tanto la copulación. Los derivados nitrados en posición orto o para del ion benceno-diazonio son muy eficaces en este sentido, por presentar una nueva forma de resonancia XXIIIc [con dos nitrógenos positivos vecinos (?) (5)]. En efecto, la p.nitro-anilina diazotada copula inmediatamente con una solución acuosa del ácido p.amino-benzoico. Con esta diazo-componente no es tan fácil de distinguir, como con el ácido sulfanílico diazotado (diazocomponente más debil), entre la sal interna y la forma no disociada del ácido p. aminobenzoico.

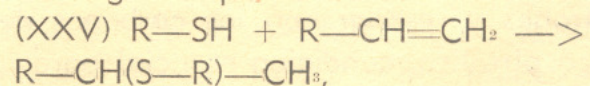
En el caso de la bilirrubina se desprende de los trabajos de B. Varela-Fuentes y P. Recarte (6) como hecho importante, que no se puede extraerla con cloroformo del medio (suero), en el cual da la diazo-reacción directa, pero que si, del medio, en el cual da la diazo-reacción indirecta. La sal interna sería pues soluble en cloroformo y la forma no disociada insoluble en este solvente.

Por el hecho de que la bilirrubina se comporta en solución alcohólica o acetónica de una manera análoga como en una solución de sero-albúmina, es decir copula directamente con el ácido sulfanílico diazotado, podemos suponer que en los dos casos los grupos imino de la bilirrubina han quedado en su forma normal con nitrógeno trivalente y libre para resonar. Pero mientras que en caso de la solución alcohólica o acetónica el grupo imino de la bilirrubina queda libre por no disociación del grupo propiónico, parece que en el caso de la solu-

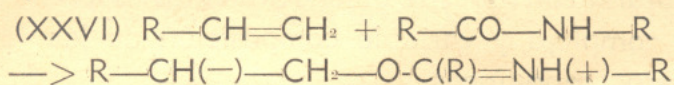
ción que contiene sero-albúmina, esta última inhibe al grupo propiónico de la bilirrubina de formar la sal interna, por capturar su proton. En efecto, la sero-albúmina contiene abundantes grupos básicos exógenos, que pueden capturar el protón del grupo propiónico, uniéndose así la bilirrubina y la sero-albúmina por fuerzas polares, lo que coincide con el hecho observado por Peterson y Walderstroem (7) y Stenhagen y Theorell (8), de que la sero-albúmina lleva consigo durante la electroferesis la totalidad de la bilirrubina en un suero.

Por otra parte el hecho de que la bilirrubina en una solución de globina da solamente la diazoreacción indirecta, parece estar relacionado a la formación de una bilirrubina-globina, postulada por M. Polonowski y A. Gaydos (3). Estos autores, sin embargo no dan ninguna indicación sobre la forma, en que la bilirrubina y la globina pueden asociarse reversiblemente. Dicha unión debe ser sin embargo distinta a la que se produce entre la bilirrubina y la sero-albúmina, como se puede concluir del distinto comportamiento frente al diazo-reactivo, a pesar de contener la globina más grupos básicos que la sero-albúmina. Estando caracterizada la globina por un muy alto contenido en histidina (11 %) (XXIV), se puede suponer, como también lo hacen Hill y Holden (9), que el núcleo imidazólico está involucrado en esta asociación. Si el núcleo imidazólico pentagonal, el cual puede también ser copulado con diazo-compuestos, puede influir sobre el núcleo pirrólico también pentagonal, por fuerzas polares, es seguramente un problema interesante a dilucidar.

Según Haurowitz (10) y también Theorell los grupos tiólicos de la globina serían responsables de la asociación. Según Theorell, el grupo -SH se puede adicionar a los grupos vinílicos de compuestos tetrapirrólicos según esquema XXV.



(bajo condición que esta unión no sea demasiado estable). También pueden asociarse a los grupos vinílicos polarizados los grupos -CO-NH- proteicos, en forma polarizada, u otros grupos en este estado (esquema XXVI).



Si la unión de la globina con la bilirrubina no influye sobre los grupos imino y carboxílico de esta última, la formación de la sal interna de la bilirrubina no está impedida (diazoreacción indirecta).

Queda todavía el problema por qué un suero sanguíneo conteniendo bilirrubina y proveniente de una ictericia por obstrucción de las vías biliares, da la diazoreacción directa, y un suero con bilirrubina proveniente de una ictericia extrahepática (hemolítica), da solamente la diazoreacción indirecta, a pesar de contener ambos sueros sero-albúminas. El suero sanguíneo normal tiene 5 fracciones proteicas, caracterizadas por su movilidad electroforética, más o menos 53 % de sero-albúmina con la más grande movilidad, alfa, beta y gamma globulina (total 36 %) y 11 % de fibronógeno, todos ellos con menos movilidad. Además pueden ser clasificadas las globulinas según su solubilidad o insolubilidad en agua en euglobulinas y pseudoglobulinas. Las relaciones entre estas diversas fracciones proteicas, especialmente entre sero-albúminas y seroglobulinas (con peso molecular mucho más alto y netamente ácidas), presentan en estado de normalidad fisiológica un valor bien determinado que depende del mecanismo regulador que tiende a mantener la presión coloido-osmótica del suero dentro de ciertos límites. Esta relación puede variar por alteraciones múltiples en caso de estados patológicos, que no solamente pueden ser de orden cuantitativo pero posiblemente también de orden cualitativo. Estas alteraciones están caracterizadas en una gran cantidad de casos y especialmente en casos de ictericias (hepática o extrahepática) por un

aumento de las seroglobulinas y una disminución de las sero-albúminas con relación a las primeras. Ahora parece bastante probable que las diferentes fracciones proteicas del suero, con cargas eléctricas diferentes, no forman una simple mezcla, pero están asociadas entre sí de cierta manera, formando agregados lábiles llamados según Soerensen "Sistemas reversiblemente disociables", según Willstaetter "Simplexos" o según Macheboef "cenapses", teoría a la cual también R. J. Block, D. C. Darrow y M. K. Cary (11) se han adherido. Es bastante probable que dichas asociaciones se hagan por fuerzas polares con intervención de la seroalbúmina, con sus grupos básicos (grupos amino y guanidino libres), y de las seroglobulinas con sus grupos ácidos.

A pesar de que en ictericias, al aumentar el porcentaje de sero-globulinas, disminuye por esta razón el número de polos positivos libres en la seroalbúmina (debido a la "cenapse" entre ambas fracciones proteicas) dichos polos positivos libres existen aún en cantidad suficiente para hacer la unión con la bilirrubina (Diazo-reacción directa). Pero si además interviene la globina (ictericia hemolítica), la asociación bilirrubina-globina (si ella no existe ya previamente formada, como residuo de la lisis de la hemoglobina), se hará más rápida y específicamente (por la similitud del núcleo pirrólico e imidazólico), que la asociación bilirrubina-seroalbúmina. Una vez formada la bilirrubina-globina ya no podrá asociarse la seroalbúmina al grupo propiónico aún libre, por impedirlo la globina por razones espaciales evidentes (Diazo-reacción indirecta).

Finalmente, no olvidemos que en caso de ictericias por obstrucción de las vías biliares el suero sanguíneo contiene también una gran cantidad de sales biliares, las cuales poseen la propiedad de no solamente favorecer la formación de las llamadas "cenapses" lipoproteicas, pero también de descomponerlas por competición en ciertas condiciones, lo que se ha observado en el

suero sanguíneo de enfermos de ictericia hepática. Suponiendo que una "cenapse" lipoalbuminosa no es capaz, en razón sea del tamaño de la substancia lipóide, sea del lugar de fijación, de formar una asociación con la bilirrubina (consecuencia: diazo-reacción indirecta), la substitución de dicha "cenapse" por otra entre sero-albúmina y sales biliares podría permitir la unión bilirrubina-sero-albúmina (consecuencia: diazo-reacción directa), siendo muy distinto el tamaño de las sales biliares, y posiblemente también el lugar de su fijación en la seroalbúmina. Pero si en esta competencia entre sales biliares y lípidos respecto a la sero-albúmina, el equilibrio, por adición de la lecitina (producto polarizado y anfolito) (XXVII), es nuevamente desplazado hacia la "cenapse" lipo-albuminosa, la diazo-reacción indirecta puede ser la consecuencia. La adición de alcohol o acetona no solo puede influir sobre la constante dieléctrica del medio, pero también sobre la delipidación de las proteínas plasmáticas.

En resumen, la diazo-reacción directa o indirecta de la bilirrubina es debida a su condición de Anfolito, que puede reaccionar como sal interna o como producto no disociado, dependiendo esto del medio y en sueros sanguíneos de factores proteicos y otros.

La diazo-reacción de la bilirrubina, además de su evidente valor clínico y diagnóstico, tiene, de acuerdo con el criterio sustentado por el Prof. Dr. B. Varela Fuentes, un gran interés científico por permitirnos profundizar nuestros conocimientos sobre la compleja y variable composición de los sueros sanguíneos.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) "Advances in Enzymology" (Ed. Nord), Tomo VII, pág. 362-3.
- 2) Hymans van den Bergh, Presse Méd. p. 441 (1921).
- 3) M. Polonowski, N. Fiessinger y A. Gajdos, C. R. Soc. Biol. p. 714 (1942) y Bull. Soc. Chim. Biol. 24, pág. 221 (1942).
- 4) R. Willstaetter y E. Waldschmidt-Leitz Ber. D. Chem. Ges. 54, pág. 2988 (1921).
- 5) Ray A. Brewster, "Química Orgánica" T. II, pág. 668 (Ed. Castellana).
- 6) B. Varela Fuentes y P. Recarte C. R. Soc. Biol. 116, pág. 1193, (1934).
- 7) Petersen y Walderstroem, Nature 138, pág. 363 (1936), Biochem. Zeitschr. 245, pág. 152 (1937).
- 8) Stenhagen y Theorell, Nature 141, pág. 415 (1938).
- 9) Hill y Holden, Biochem. Journ. 20, pág. 1326 (1926).
- 10) F. Haurovitz, Z. Physiol. Chem. 232, pág. 125 y 146 (1935). Ver también J. Biol. Chem. 137, pág. 771 (1941).
- 11) R. J. Block, D. C. Darrow y M. C. Cary, J. Biol. Chem. 104, pág. 347 (1934).