

EFFECTO ANTIOXIDANTE DE LA SEROTONINA EN PRESENCIA DE VITAMINA B₂: UN ESTUDIO CINÉTICO Y MECANÍSTICO

Becario: Gutierrez, Lihuel Emiliano, lihuelo@yahoo.com

Director de la Beca: Dr. Ernesto S. Haggi, Docente Investigador, haggies@infovia.com.ar

Ambos pertenecientes a la UNPA

UNPA-UARG Departamento de Ciencias Exactas y Naturales
Rio Gallegos Santa Cruz, 20 de diciembre de 2012

RESUMEN

La absorción de luz natural por parte de soluciones sensibilizadas produce la degradación de sustratos que son de importancia biológica, muchos de estos procesos ocurren de manera endógena. La vitamina B₂ o Riboflavina (Rf) es un sensibilizador típico en sistemas biológicos debido a que está presente en mucho de ellos, tanto dentro de los organismos vivos como en su entorno. La irradiación de Rf con luz visible forma el triplete activado (³Rf*) que es capaz de reaccionar con el oxígeno disuelto generando las llamadas especies reactivas del oxígeno (ROS), de las cuales es de especial interés el oxígeno singlete [O₂ (¹Δ_g)]. El sustrato en estudio, la serotonina (Sero), se fotodegrada en presencia de la Rf siguiendo distintas vías, puede encontrarse directamente con ³Rf* y por medio de una transferencia de carga formar las especies como la riboflavina anión radical (Rf⁻) o la Serotonina catión radical (Sero⁺), o puede encontrarse con las ROS fotogeneradas para dar lugar a una serie de procesos. De estos procesos el de mayor interés para este trabajo, es la desactivación física del oxígeno singlete. Esto último es una propiedad deseable en antioxidantes, ya que se desactiva a la especie oxidante sin dejar productos secundarios. Si bien ya es conocido que la serotonina y otros compuestos indólicos relacionados presentan esta clase de comportamiento fotoquímico, no se han hecho estudios que hayan determinado el mecanismo ni los parámetros cinéticos de la reacción, por este motivo el presente trabajo se enfoca en estos aspectos.

Palabras clave: Serotonina, Riboflavina, antioxidante, fotoquímica

INTRODUCCIÓN

La fotoquímica es un campo de estudio dinámico cuyos hallazgos, son de importancia en la biología, farmacología, medicina, etc. Muchos de los procesos de oxidación que dañan a las células de los mamíferos, entre estos los seres humanos, son causadas por ROS, generadas fotoquímicamente dentro del organismo por receptores de luz endógenos^{1,2}. Conocer los aspectos cinéticos y mecanísticos de estos procesos fotoquímicos ayudar a comprender el llamado “estrés oxidativo”. La serotonina ha sido extensamente estudiada, y sus funciones químicas y biológicas son bien conocidas. Sin embargo, su comportamiento fotoquímico ha recibido menor atención. Se conoce que la serotonina solo absorbe en el UV, pero puede foto-oxidarse bajo la irradiación de luz visible en presencia de un sensibilizador, es decir, una sustancia que tras absorber luz de cierta longitud de onda pasa a un estado excitado más reactivo³. Aun así, no se han realizado estudios en los que se trate la cinética o el mecanismo de estos procesos.

El estudio del sustrato, en este caso Sero, se llevó a cabo en soluciones acuosas amortiguadas a pH 7,0 con Rf como sensibilizador, haciendo uso de instrumental específico, como espectrofotómetros, espectrofluorómetros, electrodos selectivos y otros, siguiendo las concentraciones de las especies involucradas en función del tiempo, para determinar los parámetros cinéticos de las reacciones ocurridas. Además, para completar esta información se realizó una prueba de “quenching dinámico” en la Universidad Nacional de Rio Cuarto. Algunas de las pruebas mencionadas se realizaron también con Rosa de Bengala (RB) como sensibilizador, ya que es un generador específico de $[O_2 (^1\Delta_g)]$ y facilita el estudio de su participación en el proceso.

MARCO HISTÓRICO

Los primeros hallazgos científicos sobre la influencia de la luz en reacciones químicas datan de la primera mitad del siglo XVII, cuando en el año 1616, Sala descubrió que la exposición a la luz solar ennegrecía cristales de nitrato de plata, un siglo y medio más adelante Sheele descubre que la luz violeta del espectro es más activa en la descomposición del nitrato de plata. En el año 1801 Ritter descubre la radiación ultravioleta y unos años más tarde Gay Lussac demuestra que ésta puede ser usada para producir ácido clorhídrico a partir del hidrógeno y el cloro. Durante la primera mitad del siglo XX los estudios de Plank, Einstein y Bohr develan el comportamiento corpuscular de la radiación electromagnética, que es capaz de cambiar el estado energético de los electrones de átomos y compuestos. En 1928 Lewis llamó fotones a las partículas componentes de la luz⁴.

MARCO CONCEPTUAL⁵

La palabra “luz” tiene una interpretación bastante amplia en la fotoquímica, ya que en principio se utiliza el término para referirse a toda radiación electromagnética, que sea capaz de promover un cambio químico. En la realización de este trabajo se empleó la región UV-visible del espectro electromagnético. La parte del espectro denominada “visible” se refiere al conjunto de longitudes

de onda que abarca desde los 400 nm hasta los 700 nm, mientras que UV se usa para referirse a la radiación que se encuentra entre los 190 y los 400 nm.

Una molécula puede pasar a un estado excitado electrónicamente tras absorber luz de determinada longitud de onda. Esta especie excitada, cuya energía es mayor que en el estado basal, puede interactuar de distintas formas con el medio:

- Puede transferir la energía extra a otra molécula formando así, otra especie en estado excitado.
- Puede disociarse
- Puede transferir un electrón a otra especie, ionizándose
- Puede reaccionar directamente con otra especie.
- Puede emitir luminiscencia
- Incluso puede perder esta energía sin reaccionar (quenching físico)

En muchas ocasiones la irradiación directa del sustrato, no provoca que este reaccione, sin embargo, un sensibilizador puede, por medio de alguno de los procesos mencionados, reaccionar con el sustrato o generar especies intermediarias que sean capaces de reaccionar con él.

Sero, el sustrato de interés en este trabajo, es un neurotransmisor que se acumula en las vesículas sinápticas permitiendo la propagación del potencial de acción, además de presentar actividad fotoquímica en presencia de un sensibilizador. La Riboflavina, es un sensibilizador hidrosoluble y ubicuo. La irradiación de ésta, con luz visible, forma el triplete activado ($^3\text{Rf}^*$), que es capaz de reaccionar con el oxígeno disuelto, generando las llamadas ROS que son las especies intermediarias responsables del estrés oxidativo, de las cuales es de especial interés el oxígeno singlete molecular [$\text{O}_2 (^1\Delta_g)$].

MARCO TEORICO

En la realización del presente trabajo se utilizaron técnicas experimentales y equipos basados en la espectroscopia, tanto UV-visible como de fluorescencia, para obtener información sobre la cinética y el mecanismo de los procesos químicos involucrados en la fotólisis de Sero.

Espectrometría UV-visible⁶

Cuando una muestra es irradiada con un espectro continuo de longitudes de onda, algunas de estas son en parte absorbidas generando así un “espectro de absorción”. Para cada longitud de onda λ , $P_{\lambda 0}$ es la irradiancia lumínica emitida por la fuente y P_{λ} es la irradiancia no absorbida por la muestra. Se define transmitancia (T) a la siguiente relación.

$$T = \frac{P_{\lambda}}{P_{\lambda 0}}$$

Cuando un haz de luz pasa a través de una capa de una disolución de espesor dx , una parte de ella, es absorbida haciendo que la irradiancia varíe en una cantidad dP_{λ} que es proporcional a: P_{λ} , a la concentración y al espesor de la capa.

$$dP_{\lambda} = -\beta P_{\lambda} dx$$

Donde β es una constante de proporcionalidad.

Reordenando la ecuación diferencial obtenemos la siguiente expresión

$$\frac{dP_{\lambda}}{P_{\lambda}} = -\beta c b dx$$

Integrando y remplazando la condición de borde

$$x=0, P_{\lambda} = P_{\lambda 0}$$

Se obtiene la siguiente expresión

$$\log \frac{P_{\lambda 0}}{P_{\lambda}} = \frac{\beta}{\ln(10)} bc = abc = -\log T$$

O bien

$$A = abc$$

Este resultado es conocido como la ley de Lambert-Beer, donde A es la absorbancia, la constante a es llamada absorptividad, que es una constante que depende de la naturaleza de la muestra y de λ , y b es el espesor total de la solución o camino óptico. Por último al usar el porcentaje de transmitancia en lugar de T obtenemos

$$2 - \log(\%T) = A = abc$$

Que es la expresión que se usa comúnmente.

Espectrometría de Fluorescencia⁷

La luminiscencia es un proceso por el cual una molécula en estado excitado, tras emitir un fotón vuelve al estado basal, si esta transferencia se da sin un cambio de spin en el electrón, el proceso es llamado fluorescencia.

La irradiancia del haz de fluorescencia es proporcional a la cantidad de radiación lumínica absorbida por la muestra

$$F = K'(P_0 - P)$$

Donde P_0 es la irradiancia del haz incidente sobre la disolución y P es su irradiancia después de atravesar una longitud b del medio. La constante K' depende de la eficiencia cuántica del proceso de fluorescencia. Para poder relacionar la magnitud de F con la concentración c de la muestra, es conveniente escribir la ley de Beer de la siguiente manera

$$\frac{P}{P_0} = 10^{abc}$$

Combinando ambas ecuaciones obtenemos

$$F = K'P_0(1 - 10^{abc})$$

El término exponencial puede desarrollarse como una serie de Maclaurin

$$F = K'P_0[2,303abc - \frac{(2,303abc)^2}{2!} + \frac{(2,303abc)^3}{3!} \dots]$$

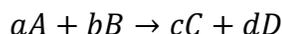
Para valores de concentración pequeños los términos de orden mayor que 2 son despreciables, lo que finalmente nos deja la expresión

$$F = K'P_02,303abc = Kc$$

Lo que indica que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración.

Cinética química

Durante el transcurso de una reacción química la concentración de los reactivos disminuye con el tiempo, mientras que la de los productos aumenta. Dada una reacción química genérica



La velocidad de reacción se define como la tasa de disminución de concentración respecto del tiempo de alguno de los reactantes dividido en su coeficiente estequiométrico o, análogamente, como la tasa de incremento de concentración de alguno de los productos dividido en su coeficiente estequiométrico.

$$v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \frac{1}{c} \frac{d[C]}{dt} = \frac{1}{d} \frac{d[D]}{dt}$$

La velocidad de reacción depende de la concentración de los reactivos y de las condiciones de presión y temperatura, lo cual puede observarse en las leyes empíricas de velocidad de reacción que por lo general responden a la siguiente ecuación

$$v = k_1[A]^\alpha[B]^\beta = k_2[C]^\gamma[D]^\delta$$

Los exponentes α , β , γ y δ se determinan experimentalmente y corresponden a los “órdenes de reacción” de cada componente, y la suma de éstos se denomina “orden global de la reacción”, k_1 y k_2 son constantes que dependen de la condiciones de reacción.

En el modelo tomado para este trabajo, las reacciones fotoquímicas estudiadas se consideran de primer orden respecto del sustrato, esto es

$$v = k[A]$$

Planteando la ecuación diferencial obtenemos

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]$$

Resolviendo se obtiene el siguiente resultado

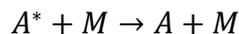
$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

Ecuación que nos permite hallar el valor de k tras obtener una curva de ajuste.

Cinética y fluorescencia, La ecuación de Stern-Volmer

La energía de excitación de una molécula puede perderse tras emitir luminiscencia, o tras colisionar con otras moléculas (quenching). El quenching es especialmente importante en la fase líquida ya que este estado las colisiones moleculares son frecuentes.

El quenching es un proceso mediante el cual moléculas electrónicamente excitadas (A^*) pierden energía tras colisionar con otras. O de manera simbólica:



La molécula representada como M se denomina “quencher”.

Cuando A^* se encuentra con M también pueden reaccionar, es decir, que el proceso de quenching puede competir con una reacción química. Conociendo k_r , la constante cinética de la reacción, y k_q , la constante cinética del quenching, queda determinado cuál de estos procesos es el que predomina.

La ecuación de Stern-Volmer ofrece un parámetro que relaciona a la constante cinética de quenching (k_q) con la constante cinética del proceso de fluorescencia (k_f). Para obtenerla, es necesario realizar una curva de ajuste con los datos de intensidad de fluorescencia vs. concentración del quencher.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[M]$$

Donde K_{SV} relaciona a k_f y k_q de acuerdo a la siguiente expresión.

$$K_{SV} = k_q/k_f$$

Procesos Fotoquímicos de Rf en solución

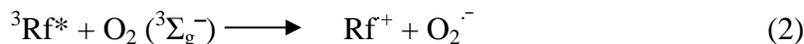
En el marco conceptual se realiza un resumen de los posibles caminos que puede tener una molécula en estado excitado.

Los procesos de interés para el sistema en estudio, se analizan en este apartado.

Cuando una molécula de Rf absorbe un fotón, forma el singlete excitado de Rf ($^1\text{Rf}^*$) que luego de un “entrecruzamiento entre sistemas” forma $^3\text{Rf}^*$.



La especie $^3\text{Rf}^*$ es más reactiva que la Rf en estado basal y al encontrarse con una molécula de O_2 ($^3\Sigma_g^-$) puede transferirle un electrón para generar un anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o realizar una transferencia de energía para formar la especie oxígeno singlete



Más adelante en el desarrollo del trabajo, se tratará el rol que desempeñan estas especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustancias Químicas

Serotonina, Triptamina, 5-hidroindol, L-Triptófano (trp), Riboflavina, Rosa de Bengala(RB), Azida Sódica (NaN_3), Catalasa (CAT) de hígado bovino, Superóxido Dismutasa (SOD) de eritrocitos bovinos y D-manitol, todos estos compuestos adquiridos en Sigma Chem. Co. El alcohol furfurílico adquirido de Riedel de Haën. Se utilizó agua triplemente destilada como solvente y fosfato diácido de potasio como regulador de pH.

Instrumental.

El espectro de absorción del estado basal fue registrado en un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett Packard 8452A. La fotólisis estacionaria de soluciones acuosas que contenían Sero de 0,1 a 0,5 mM y Rf 0,04 mM, se realizó en un tren de fotólisis con una lámpara de 150W de luz policromática y un filtro de corte a 400 nm, tomando el espectro de absorción de la muestra a intervalos regulares de tiempo. El consumo de oxígeno en soluciones sensibilizadas con riboflavina se llevó a cabo un electrodo específico (Orion97-08), tomando las pendientes hasta alcanzar una disminución de la concentración de oxígeno de 10-15%.

La constante de reacción k_r , para la reacción de O_2 ($^1\Delta_g$) con Sero sensibilizada con RB se determinó con el método especificado en la literatura⁸ usando la expresión:

$$\text{pendiente}/\text{pendiente}_R = k_r[\text{Sero}]/k_{rR}$$

Donde R es un compuesto de referencia cuya constante de reacción es conocida. Las pendientes son obtenidas con ambos compuestos en las mismas condiciones experimentales, suponiendo que las reacciones son de primer orden y de estequiometría 1:1 para el sustrato y oxígeno.

En la Universidad Nacional de Río Cuarto se realizaron los análisis de fotólisis de pulso, empleándose soluciones 0,04 mM de Rf saturadas con Argón. Para la excitación de la muestra se utilizó un sistema láser Nd:YAG (Spectron) con una longitud de onda de 355 nm y una lámpara de Xenón de 150 W como fuente. El sistema de detección empleado está comprendido por un monocromador PTI y un fotomultiplicador Hamamatsu R666.

RESULTADOS

Fotólisis estacionaria

Al examinar el espectro de absorción de una solución a pH 7,0 de riboflavina 0,04 mM y Sero 0,1 mM se pudo observar un decaimiento progresivo en la intensidad de los máximos de absorción de ambas sustancias en función del tiempo de irradiación. Esta situación es típica cuando ambas sustancias sufren cambios químicos durante la irradiación.

Las soluciones de Rf y Sero que fueron almacenadas en la oscuridad, no sufrieron cambios aparentes en sus máximos.

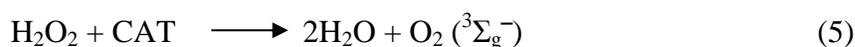
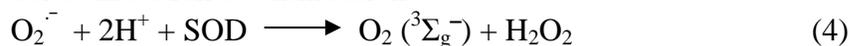
Cuando se irradia una muestra bajo las mismas condiciones y se mide la concentración de oxígeno disuelto con un electrodo específico, se puede observar que en este proceso hay consumo de oxígeno.

Al eliminarse el oxígeno del medio, por desplazamiento con nitrógeno, el proceso de fotólisis descrito en el primer párrafo de este apartado, provoca cambios menos abruptos en los espectros de absorción.

El examen de estos resultados cualitativos preliminares sugiere que se generan especies excitadas de Rf y ROS por irradiación, y éstas reaccionan con Sero.

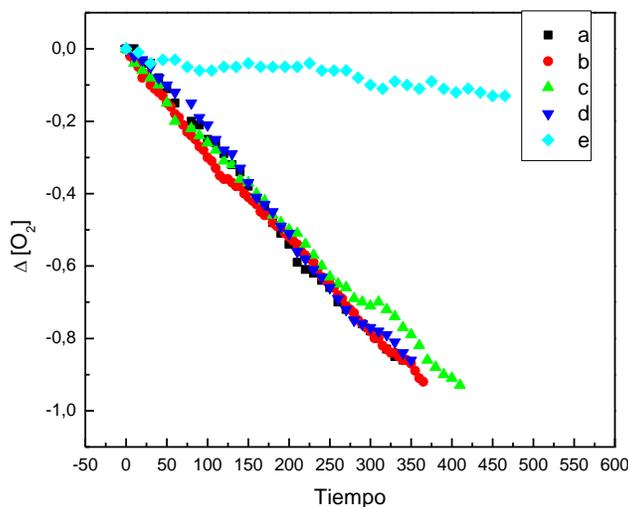
Interacción de Sero con las ROS fotogeneradas por la vitamina B2

El consumo de oxígeno se estudió en soluciones de Sero 0,5 mM y Rf 0,04mM a las que se les agregó inhibidores específicos de ROS: superóxido dismutasa (SOD) para el $O_2^{\cdot-}$ (4), catalasa para el $O_2^{\cdot-}$ (5), manitol para el $OH\cdot$ (6) y azida sódica para el $[O_2 (^1\Delta_g)]$ (7). La azida sódica fue el inhibidor que presentó la mayor actividad. Las reacciones de cada ROS con su respectivo inhibidor se muestran a continuación.



En la siguiente figura se observan curvas que grafican la caída de la concentración de oxígeno en función del tiempo.

Consumo de oxígeno de Sero en Rf Abs₄₄₅ = 0,51, en buffer pH=7,0
 con distintos inhibidores de ROS

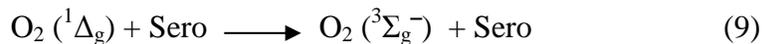


El conjunto de puntos (a) muestra el resultado de la experiencia sin inhibidores, (b) en presencia de catalasa 1µg/mL, (c) con manitol 10mM, (d) con SOD 1µg/mL y (e) con azida sódica. Estos resultados indican que el mecanismo dominante es por vía del oxígeno singlete, por lo que se presume que Sero desactiva al $O_2 (^1\Delta_g)$.

Usando el método estándar sugerido por la bibliografía⁸ para determinar la velocidad total de desaparición de $O_2 (^1\Delta_g)$ comparándolo con un compuesto de referencia y comportamiento conocido (alcohol furfurílico), se determinó la constante cinética para la reacción entre $O_2 (^1\Delta_g)$ y Sero (k_r).



Esta información más la obtenida por el tratamiento de Stern Volmer, se utilizó para determinar la constante cinética para el quenching físico, k_q .



El valor de k_r determinado fue de $0,49 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ mientras que el de k_q fue de $2,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. El valor de k_q es más de 500 veces mayor al de k_r , por lo que el quenching físico, predomina significativamente.

Interacciones de Serotonina con los estados excitados de Riboflavina

Las soluciones de Rf 0,04 mM no presentaron un decaimiento apreciable en la intensidad de fluorescencia en presencia de Sero 0,5 mM. Solo a una concentración 10 veces mayor, pudo observarse una pequeña desactivación, hecho que sugiere que $^1\text{Rf}^*$ no presenta una participación apreciable en las reacciones del sistema en estudio. Sin embargo, la débil acción de Sero como quen-

cher de $^1\text{Rf}^*$ puede explicarse debido a la formación oscura de un complejo entre la hormona y la vitamina, sostenido por fuerzas de dispersión e interacciones de transferencia de carga^{9, 10}.

La vida media de $^3\text{Rf}^*$ se ve claramente reducida en presencia de Sero, es decir, existe una interacción entre estas especies. Para poder determinar la naturaleza de esta interacción se examinó el espectro de absorción en estado transitorio de una mezcla de Rf 0,01mM y Sero 0,5mM, el cual mostró la formación temporal de los radicales RfH^\cdot y $\text{Sero}^{\cdot+}$.



CONCLUSIONES

La irradiación con luz natural de soluciones acuosas de Sero, sensibilizadas con Rf, conducen a la degradación del neurotransmisor por medio de un mecanismo en el que intervienen ROS. La especie $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$ es desactivada por Sero por medio de una vía principalmente física, es decir que durante el proceso no se degrada. Existe además una interacción entre Sero y estados excitados de Rf que deviene en productos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Quintero, M.A. Miranda, Mechanisms of photosensitization induced by drugs: a general survey, *Ars Pharm.* 41 (2000) 27–46.
- [2] E. Silva, R. Ugarte, A. Andrade, A.M. Edwards, Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan, *J. Photochem. Photobiol.*, B 23 (1994) 43–48.
- [3] Z. Matuszak, M.A. Bilska, K.J. Reszka, C.F. Chignell, P. Bilski, Interaction of singlet oxygen with melatonin and related indoles, *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 449–455.
- [4] Sergio Cabrera Silva, *Radiación Ultravioleta Y Salud*, Editorial Universitaria, 2005, 9561117908
- [5] Carol E. Wayne and Richard P. Wayne, *Photochemistry*, Oxford University Primers, 1996, ISBN 0198558864
- [6] Daniel C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo*, Editorial Reverté, 2007, ISBN 9788429172249
- [7] Douglas Skoog, Stanley Crouch, James Hooler, *Principios de Análisis Instrumental*, Cengage learning/Thompson Internacional, 2008, ISBN 9789706868299
- [8] P.G. Tratnyek, J. Hoigné, Oxidation of substituted phenols in the environment: A QSAR analysis of rate constants for reaction with singlet oxygen, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 1596–1604.
- [9] S. Miskoski, N.A. García, Dark and photoinduced interactions between riboflavin and indole auxins, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 56 (1991) 1838–1849.
- [10] Y. Barbieri, W.A. Massad, D.J. Díaz, J. Sanz, F. Amat-Guerri, N.A. García, Photodegradation of Bisphenol A and related compounds under natural-like conditions in the presence of riboflavin. Kinetics, mechanism and photoproducts, *Chemosphere* 73 (2008) 564–571.