ROLUL COBALAMINEI ÎN PROCESELE DE AUTOPURIFICARE RADICALICĂ ÎN MEDIUL ACVATIC

THE ROLE OF COBALAMIN IN RADICAL SELF-PURIFICATION PROCESSES IN THE AQUATIC ENVIRONMENT

CZU: 577.164.1:574.5 **https://doi.org/10.59295/spd2024n.85**

Angela LIS,
ORCID: 0000-0003-1111-7485
e-mail: angela.lis@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova
Viorica GLADCHI,
ORCID: 0000-0002-5847-4466
e-mail: viorica.gladchi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova
Vladislav BLONSCHI,
ORCID: 0000-0001-8628-6756
e-mail: vlad.blonschi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova
Maxim CISTEACOV,
ORCID: 0000-0001-6486-616X
e-mail: maxim.cisteacov@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova
Elena BUNDUCHI,
ORCID: 0000-0003-2275-9918
e-mail: elena.bunduchi@usm.md
Universitatea de Stat din Moldova

Summary. *The main purpose of this research is to study the role of Cyanocobalamin (CNCbl) in aquatic ecosystems. The spectrophotometric method was used to determine the inhibition capacity and the concentration of OH radicals using PNDMA traps. As a result, it was found that, on the one hand, CNCbl is a reducing substance and leads to the consumption of oxidative equivalents, resulting in its oxidation. High inhibition capacity values and low OH radical values confirmed this. On the other hand, under irradiation, CNCbl can also act as a sensitizer. It actively absorbs photons in the UV and visible range, transitions to an excited state, and then transfers the electronic excitation energy to dissolved oxygen in water, forming active species such as singlet oxygen and superoxide radical anion. In the presence of protons, the superoxide radical anion is reduced to hydrogen peroxide, which generates OH radicals upon irradiation. From the obtained results, it can be seen that under the conditions of natural aquatic systems, CNCbl will not disturb the processes of radical self-purification.*

Keywords: *cyanocobalamin, aquatic systems, self-purification capacity, inhibition capacity.*
Cuvinte-cheie: *cianocobalamină, sisteme acvatice, capacitate de autopurificare, capacitate de inhibiție.*

INTRODUCERE

Cobalamina (Cbl), cunoscută și sub numele de vitamina B_{12}, este un nutrient esențial care joacă un rol important în diferite procese biologice, ca cofactor în compoziția a două enzime *metionin-sintaza* și *L-metilmalonil-CoA-mutaza* implicate în sinteza ADN-lui, precum și în metabolismul acizilor grași și al aminoacizilor [1]. Totodată, *Cbl* contribuie la creșterea biodisponibilității acidului folic (vitamina B_9) în măduva osoasă, strict necesar pentru sinteza globulelor roșii. Este cel mai abundent compus al cobaltului *in vivo* și corpul uman are nevoie de aproximativ 1-2 μg de Cbl pe zi [1-2].

Cbl este o moleculă organometalică complexă compusă dintr-un nucleu de corină cu un atom de cobalt central, liganzi axiali, coordinați, inferiori (*α*-) și superiori (*β*-) și o buclă de nucleotide care leagă ligandul axial inferior. În funcție de structura ligandului *β-axial* sunt cunoscute patru tipuri principale ale *Cbl*: *metilcobalamina (MeCbl)* și *deoxiadenozilcobalamina (AdoCbl)* sunt formele biologic active utilizate de către organismele vii în calitate de cofactori în procesele metabolice, iar *cianocobalamina (CNCbl)* și *hidroxocobalamina (OHCbl)* sunt analogi care se folosesc în calitate de suplimente alimentare.

Reieșind din importanța vitală a *Cbl* pentru biota acvatică este foarte important de monitorizat concentrațiile și de determinat mecanismele de transformare a acesteia în ape. Mai mulți factori de mediu influențează concentrația și disponibilitatea *Cbl* în apele naturale, precum: lumina, concentrațiile de oxigen, pH-ul și temperatura, activitatea biotei acvatice, aporturile fluviale, transparența apelor, etc. [3]. Principalele surse de Cbl în apele naturale sunt: producția microbiană, descompunerea materiei organice, apele de șiroire, precum și apele industriale și menajere [1]. Concentrațiile *Cbl* în apele naturale variază semnificativ în funcție de diferiți factori de mediu, sursele de Cbl și ecosistemul specific studiat. În general, în oceane, concentrațiile de *Cbl* sunt scăzute și se încadrează în intervalul 1-20 pg/L, iar în zonele de coastă acestea variază de la 10 la 200 pg/L. În lacuri și râuri concentrațiile de *Cbl* variază în limite mai largi și se încadrează în intervalul 10 - 1000 pg/L. Studiile anterioare au demonstrat că concentrațiile de *Cbl* tind să fie mai mari în apele bogate în nutrienți și mai mici în apele sărace în nutrienți [3].

Prezența, producția și degradarea Cbl sunt influențate de diverși factori de mediu, făcându-l un subiect important de studiu în domeniul ecologic. Deși s-au făcut numeroase studii cu implicarea *Cbl* în organismul uman (concentrații, absorbție, metabolism, etc.), foarte puține studii sunt axate pe transportul și transformările acesteia în ecosistemele acvatice [1-4].

Reieșind din cele expuse anterior, scopul acestei lucrări constă în evaluarea rolului *CNCbl* în procesele de autopurificare radicalică a sistemelor acvatice.

MATERIALE ȘI METODE

Reactivi și aparate

Substanțele utilizate în studiu au fost chimic pure. *Cianocobalamină* (*CNCbl*) în fiole (0,5 mg/mL) de la *Balkan Pharmaceuticals*; în calitate de catalizator s-a utilizat $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, *Chem Lab*; peroxidul de hidrogen (35%, *Sigma-Aldrich, Germania*) ca oxidant; *PNDMA* (colorantul 4-nitrozo-N,N-dimetilanilină), *Sigma-Aldrich, Germania*, captator de radicali liberi; pH-metru WTW Ionlab 720; spectrofotometrul UV-Viz T80+; lampa policromatică – DRT-400 și Simulatorul Solar Oriel Model 9119X (SS) echipat cu filtrele Air Mass 0 (AM0) și Air Mass 1.5 Direct (AM1.5D).

Organizarea experimentului

În scopul izolării și identificării legităților de transformare a *CNCbl* și identificării rolului acesteia în procesele de autopurificare radicalică în sistemele acvatice, cercetările s-au efectuat în condiții de laborator, pe următoarele sisteme model: *CNCbl–PNDMA-H_2O–hv; CNCbl–H_2O–H_2O_2–PNDMA–hv; și CNCbl–H_2O–H_2O_2–Cu(II)–hv.*

Soluțiile au fost pregătite folosind apă bidistilată la pH 6,0-6,9, care a fost monitorizat periodic (înainte și după iradiere). Toate experimentele au fost efectuate în condiții de control al temperaturii, la 25 ºC și la agitare continuă. Soluțiile au fost menținute în condiții aerobe, creând condițiile de modelare cât mai apropiate de cele din sistemele acvatice naturale. Probele, 10 mL – preparate conform modelelor menționate mai sus, au fost trecute în pahare de cuarț cu pereți subțiri de 100 mL și supuse iradierii, consecutiv la lampa DRT-400 și la Simulatorul Solar Oriel Model 9119X (SS). Pentru a exclude posibilele interferențe, concomitent se iradiază proba cu *CNCbl* în lipsă și în prezența peroxidului de hidrogen.

Concentrația peroxidului de hidrogen, a soluției de *PNDMA*, capacitatea de inhibiție și concentrația staționară a radicalilor OH au fost determinate cu ajutorul metodelor spectrofotometrice descrise în [5-7].-

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru estimarea capacității de autopurificare pe sisteme model, în prezența *CNCbl*, s-au folosit parametrii capacitatea de inhibiție și concentrația radicalilor OH. La determinarea acestor parametri a fost folosită metoda capcanelor cu *PNDMA* [7]. Din start, s-a variat concentrația inițială a *CNCbl* ($(0,5\text{-}5)\cdot 10^{-6}$ M), iar concentrațiile celorlalți componenți au fost menținute constante. Sistemele modelate, cu diferite concentrații de *CNCbl*, au fost supuse iradierii, inițial, cu lampa DRT-400**,** care emite radiații mult mai rigide, comparativ cu SS, respectiv, mult mai ușor pot fi determinate legitățile cinetice. Paralel au fost efectuate aceleași operații pentru sistemul model de comparație (fără H_2O_2). Rezultatele practice sunt prezentate în Figura 1.

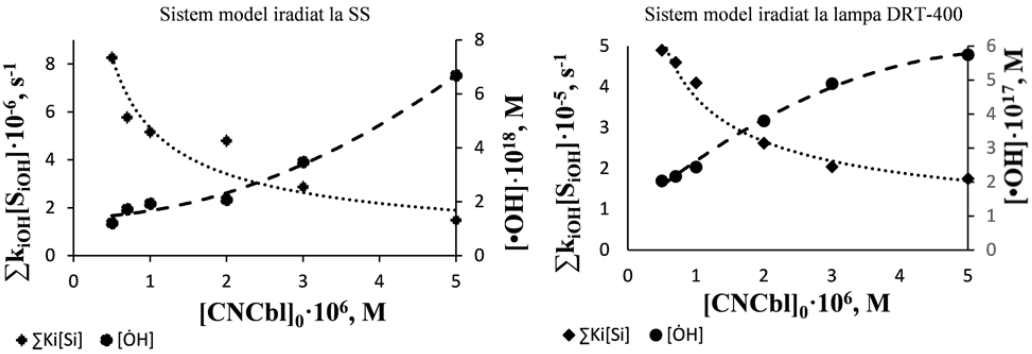


Fig. 1. Variația capacității de inhibiție și concentrației radicalilor OH în funcție de concentrația *CNCbl*, *$[PNDMA]_0$=const=2,0·10^{-5} M, $[H_2O_2]_0$=const=1·10^{-2} M, pH=6,2, t=25℃ [date proprii]*

Din Figura 1 este evident că creșterea concentrației de *CNCbl* în sistem conduce la micșorarea valorilor capacității de inhibiției în limita aceluiași ordin, la ambele surse de iradiere folosite în studiu. Totodată s-a determinat că în prezența *CNCbl* valorile capacității de inhibiție sunt de ordinul 10^5 s^{-1} pentru sistemul iradiat cu lampa DRT-400 și de ordinul 10^6 s^{-1} pentru sistemul iradiat cu SS, valori caracteristice apelor poluate și foarte poluate. Astfel, *CNCbl*, având proprietăți reducătoare conduce la consumul unei cantități însemnate de radicali OH, pe de o parte, ceea ce este confirmat prin valori mari ale capacității de inhibiție și valori mici de radicali OH în sistem. Iar pe de altă parte, vitamina contribuie la regenerarea unei cantități suplimentare de radicali, astfel intensifică procesele de autopurificare a apelor. La fel, s-a stabilit că valorile capacității de inhibiție, depind foarte mult și de sursa de iradiere, Figura 1, deoarece radicalii OH sunt generați forțat la degradarea fotolitică a peroxidului de hidrogen și viteza de generare a lor depinde de spectrul de emisie al lămpii folosite. Cele mai mici valori ale capacității de inhibiție, s-au determinat în sistemul iradiat cu lampa DRT-400 ((4,9-1,7)·10^5 s^{-1}), deoarece aceasta emite o cantitate mare de radiații rigide, cu energie mai mare și într-un domeniu larg de valori (220-600 nm). Iar cele mai mari valori ale capacității de inhibiție au fost determinate în sistemele iradiate cu SS (8,27-2,87)·10^6 s^{-1}. Aceste valori sunt de 8-16 ori mai mari decât cele obținute pentru sistemul iradiat cu lampa DRT-400. Aceasta se explică prin faptul că SS, emite radiații similare radiațiilor emise de Soare, respectiv, filtrele folosite blochează trecerea radiațiilor cu lungimi de undă mai mici de 290 nm.

Un alt parametru foarte important folosit la determinarea capacității de autopurificare radicalică a apelor naturale este concentrația staționară a radicalilor OH. Ca rezultat al cercetărilor s-a constatat că odată cu creșterea concentrațiilor de *CNCbl* în sistem, valorile concentrațiilor radicalilor OH cresc și sunt de ordinul 10^{-17} M, pentru sistemul iradiat cu lampa DRT-400 și de ordinul 10^{-18} M pentru sistemul iradiat cu SS. Rezultatele obținute denotă faptul că la concentrații de *CNCbl* de ordinul 10^{-6} M, după parametrii capacitatea de inhibiție și concentrația staționară a radicalilor OH, sistemele acvatice se vor include în categoria apelor poluate și foarte poluate.

Pentru a confirma sau infirma faptul că *CNCbl* se supune unor transformări în timpul iradierii s-au înregistrat și spectrele de absorbție a sistemelor model până și după iradiere, Figura 2.

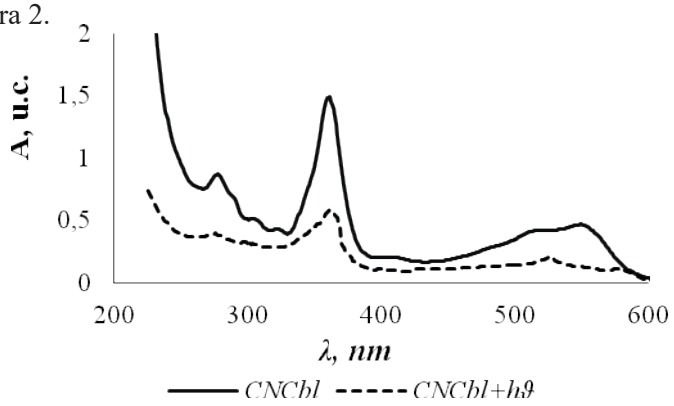


Fig. 2. Spectrele de absorbție ale *CNCbl* până și după iradiere: *[CNCbl]=5·10^{-5} M, l=1 cm [date proprii]*

Spectrele de absorbție înregistrate până și după iradiere au evidențiat trei maxime de absorbție. Până la iradiere acestea au fost la 548 nm, 361 nm și 278 nm, iar după iradiere s-a înregistrat o deplasare hipsocromă a maximului de absorbție de la 548 nm la 527 nm, ceea ce indică asupra faptului că *CNCbl* a trecut în *OHCbl*, fapt afirmat și în literatura de specialitate, Figura 3.

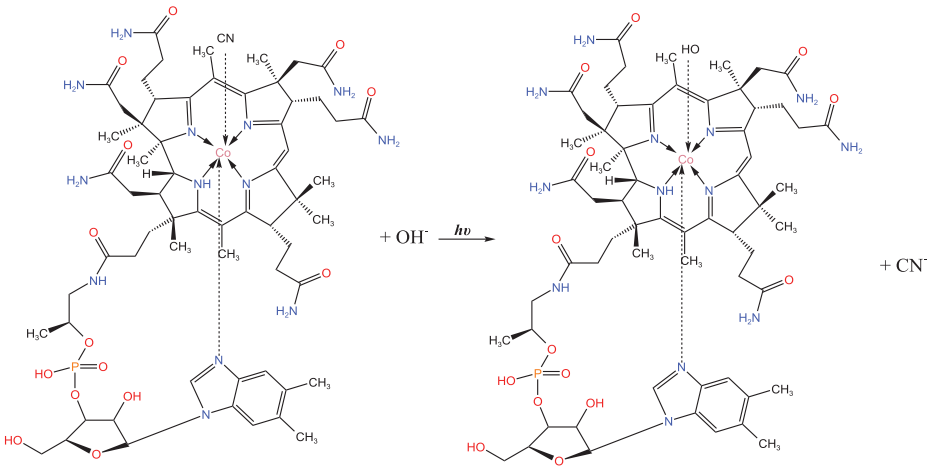


Fig. 3. Mecanismul de fototransformare al *CNCbl* în *OHCbl [8]*

Reieșind din cele expuse mai sus se constată că *CNCbl* este un bun captator de radicali OH, respectiv în prezența ei, capacitatea de inhibiție ar trebui să crească. Pentru a explica faptul că rezultatele sunt opuse, s-a studiat literatura de specialitate și s-a ajuns

la concluzia că *CNCbl*, în soluții apoase, la iradiere mai acționează și ca fotosensibilizator, astfel contribuie la regenerarea unei cantități suplimentare de radicali OH, conform mecanismului descris de ec. 1-6 [2, 4]:

$$^1CNCbl \rightarrow {}^3CNCbl \quad (2)$$

$$^3CNCbl + O_2 \rightarrow CNCbl + {}^1O_2 \quad (3)$$

$$^3CNCbl + O_2 \rightarrow CNCbl^{\bullet+} + O_2^{\bullet-} \quad (4)$$

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (5)$$

$$H_2O_2 + h\vartheta \rightarrow 2^{\bullet}OH \quad (6)$$

La iradiere, *CNCbl* absoarbe fotonii de lumină, în domeniul UV și VIZ și se excită (ec. 1). Ulterior, din starea excitată singlet, prin mecanisme intersistemice, trece în starea de excitare triplet (^3CNCbl) (ec. 2). Apoi, în soluții oxigenate, energia de excitare electronică este transmisă oxigenului dizolvat din apă, ca rezultat formându-se particule active precum oxigenul singlet și anion radicalul superoxid (ec. 3-4). Anion radicalul superoxid în prezența protonilor se reduce până la H_2O_2, care la iradiere generează radicali OH (ec. 5-6).

Pornind de la faptul că ionii de Cu(II) joacă un rol important în generarea radicalilor OH și respectiv în procesele de autopurificare ale sistemelor acvatice, s-a studiat influența *CNCbl*, în prezența acestora, asupra proceselor de autopurificarea chimică a apelor. Valorile capacității de inhibiție în prezența ionilor de Cu(II) și concentrațiile radicalilor OH sunt prezentate în Figurile 4-5. Inițial, în sistemul model cu adaos de ioni de Cu(II), s-a variat concentrația inițială a *CNCbl*, restul parametrilor menținându-se constanți (Figura 4). Ulterior, pentru a determina influența ionilor de Cu(II) asupra procesului s-a variat concentrația inițială a acestora (Figura 5).

Din Figura 4, se observă că odată cu creșterea concentrațiilor de *CNCbl* în sistem, capacitatea de inhibiție scade, iar concentrațiile radicalilor OH cresc. Ceea ce confirmă faptul că ionii de Cu(II) la iradiere, în prezența H_2O_2, intensifică procesul de generare a radicalilor OH.

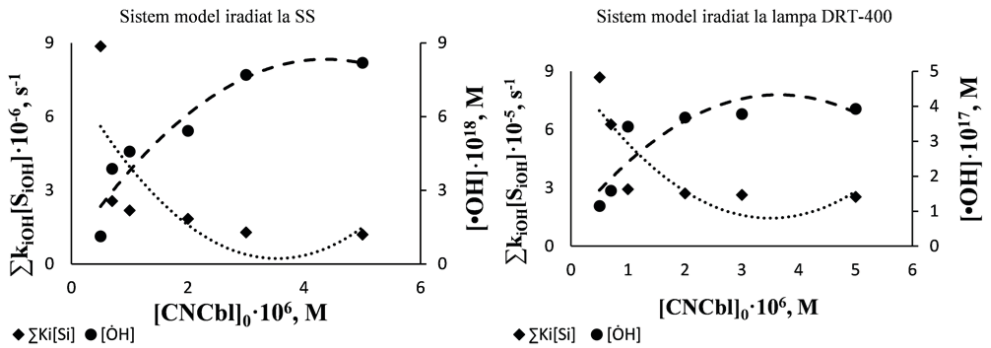


Fig. 4. Variația capacității de inhibiție și concentrației radicalilor OH în funcție de concentrația *CNCbl*, la diferite surse de iradiere, *[PNDMA]$_0$=const=2,0·10^{-5} M, [H$_2$O$_2$]$_0$=const=1·10^{-2} M, [Cu(II)]$_0$=const=1·10^{-5} M, pH=6,2, t=25 ℃ [date proprii]*

Totuși, ca și în cazurile precedente s-a determinat că capacitatea de inhibiție și concentrațiile radicalilor OH din sistem depind și de sursa de iradiere. Astfel, pentru sistemele iradiate la lampa DRT-400 valorile capacității de inhibiție se încadrează în intervalul $(8,69\text{-}2,54)\cdot10^5$ s^{-1}, iar concentrațiile radicalilor OH sunt în diapazonul $(1,15\text{-}3,93)\cdot10^{17}$ M, valori caracteristice apelor poluate. Iar pentru sistemele iradiate cu SS valorile capacității de inhibiție sunt de 5-10 ori mai mari și se încadrează în intervalul $(8,87\text{-}1,21)\cdot10^6$ s^{-1}, iar concentrațiile radicalilor OH sunt de 5-10 ori mai mici $(1,13\text{-}8,20)\cdot10^{18}$ M. Aceste valori sunt caracteristice apelor poluate și foarte poluate.

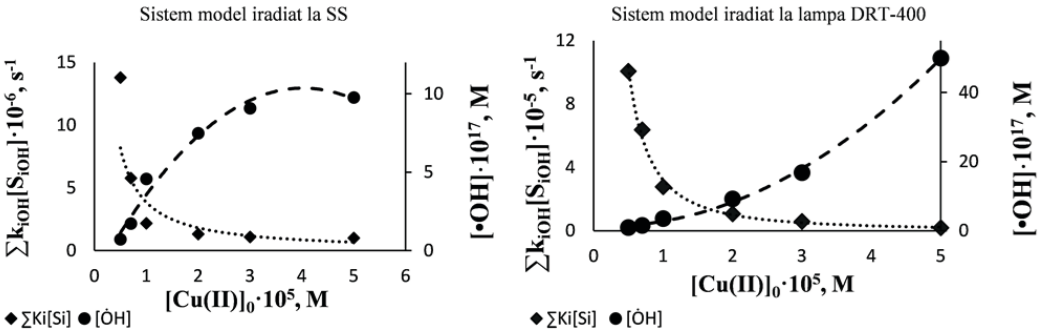


Fig. 5. Variația capacității de inhibiție și concentrației radicalilor OH în funcție de concentrația ionilor de Cu(II), la diferite surse de iradiere, *[PNDMA]$_0$= const=2,0·10^{-5} M, [H$_2$O$_2$]$_0$= const=1·10^{-2} M, [CNCbl]$_0$= const=1·10^{-6} M pH=6,2, t=25 ℃ [date proprii]*

Din Figura 5, s-a stabilit că la variația concentrației ionilor de Cu(II) în sistem, valorile capacității de inhibiție scad și mai evident, ceea ce încă o dată confirmă aportul considerabil al acestora în procesele de autopurificare a sistemelor acvatice. Ca rezultat s-a stabilit că valorile capacității de inhibiție obținute pentru sistemele iradiate la SS, care emite radiații similare radiațiilor solare, sunt de ordinul 10^6 s^{-1}. Iar concentrațiile radicalilor OH de ordinul 10^{-18} M, valori caracteristice apelor poluate și foarte poluate. Se confirmă încă o dată că ionii de Cu(II), în sistemele acvatice, joacă rolul de catalizatori în procesele de autopurificare chimică.

CONCLUZII

Rezultatele cercetării denotă faptul că în condițiile apelor naturale, *CNCbl*, primordial va trece în *OHCbl*, care este cea mai stabilă formă dintre toate Cbl cunoscute.

S-a constatat că *CNCbl* la concentrații de 10^{-6} M, conduce la poluarea ecosistemelor acvatice, deoarece consumă intens radicalii OH în procesele de fotooxidare și oxidare. Astfel, pe de o parte, *CNCbl* este o substanță reducătoare și conduce la consumul echivalenților oxidativi, ca rezultat oxidându-se. Pe de altă parte, *CNCbl*, la iradiere, poate avea și funcția de sensibilizator. Ea absoarbe activ fotonii de lumină în domeniul *UV* și *VIZ*, trece în stare excitată, iar apoi energia de excitare electronică o transmite

oxigenului dizolvat din apă, ca rezultat formându-se particule active precum oxigenul singlet și anion radicalul superoxid.

Reieșind din mecanismul foarte complex și concentrațiile foarte mici se poate afirma că concentrațiile *CNCbl*, în condițiile sistemelor acvatice naturale, nu se vor micșora evident în procesele fotochimice și chimice de oxidare. Dar totuși cascada de reacții ce decurg în condițiile apelor naturale va influența în cele din urmă degradarea lentă a *CNCbl*.

REFERINȚE

1. RIZZO, G., LAGANÀ, A.S. A review of vitamin B12. In: *Molecular Nutrition*. 2020, pp. 105–129. doi:10.1016/b978-0-12-811907-5.00005-1.
2. SHATALIN, Y., SHUBINA, V., SOLOVIEVA, M., AKATOV, V. Differences in the Formation of Reactive Oxygen Species and Their Cytotoxicity between Thiols Combined with Aqua- and Cyanocobalamins. In: *Int J Mol Sci.* 2022, nr. 23(19). doi: 10.3390/ijms231911032.
3. BONNET, S. et al. Geographical gradients of dissolved Vitamin B_{12} in the Mediterranean Sea. In: *Frontiers in Microbiology*. 2013, 4(126). doi:10.3389/fmicb.2013.00126.
4. DEREVEN'KOV, I.A. et al. Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. In: *Coordination Chemistry Reviews*. 2016, nr. 309, pp. 68–83. doi:10.1016/j.ccr.2015.11.001.
5. Duca, Gh., Lis, A., Gladchi, V., Travin, S. Indirect photolysis of cysteine and thiourea in the aquatic environment. In: *Inorganica Chim Acta*, 2023, vol. 557, p. 121682. doi: 10.1016/j.ica.2023.121682.
6. LIS, A., GLADCHI, V., DUCA, Gh., TRAVIN, S. Sensitized photolysis of thioglycolic acid in aquatic environment. In: *Chemistry Journal of Moldova*, 2021, nr. 1(16), pp. 46-59. ISSN 1857-1727.
7. TRAVIN, S., DUCA, Gh., GLADCHI, V. Self-purification of aquatic media from hexachlorocyclohexane in a radical process. In: *Chemistry Journal of Moldova*, 2019, nr. 1(14), pp. 47-53. ISSN 1857-1727.
8. JUZENIENE, A., NIZAUSKAITE, Z. Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*. 2013, nr. 122, pp. 7–14. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.03.001.

NOTĂ. Lucrarea a fost efectuată în cadrul proiectului 010603 *„Identificarea Procedeelor Tehnologice de Tratare, Formare a Calității și Cantității Apelor și Cercetări Avansate în Chimia Computațională și Ecologică”,* finanțat de ANCD.