

Caracterización y cuantificación electroquímica de las bases púricas de ADN sobre un electrodo de carbón vítreo

De la Cruz Morales Karla, Gómez Hernández Martín, Hurtado Y De la Peña Marcela, Medina López José Raúl, Alarcón Ángeles Georgina*

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos. Calzada del Hueso 1100, Coyoacán, Ciudad de México, 04960, México.

*Autor para correspondencia: galarcon@correo.xoc.uam.mx

Recibido:

19/julio/2017

Aceptado:

25/octubre/2017

Palabras clave

Electrodo de carbón vítreo, cuantificación, bases púricas del ADN

Keywords

Glassy carbon electrode, quantification, purine bases of DNA

RESUMEN

La voltamperometría cíclica (VC) y voltamperometría diferencial de pulso (VDP) se usaron para caracterizar electroquímicamente la guanina y adenina usando un electrodo de carbón vítreo (GCE). En este trabajo se propone cuantificar la cantidad de guanina y adenina basados en una curva de calibración, previo a la cuantificación se analiza el comportamiento electroquímico de las bases a través de VC. A partir de este estudio se encontró que el rango de concentración lineal de adenina fue de 2-28 μM cuyo límite de detección (LD) y cuantificación (LC) determinado fue de $1.54 \pm 0.18 \mu\text{M}$ y $5.12 \pm 0.183 \mu\text{M}$, respectivamente, con una sensibilidad de $0.1673 \mu\text{AV}^{-1}$, mientras que para guanina, el rango de concentración lineal fue de 1-30 μM con un LD y LC de $1.64 \pm 0.27 \mu\text{M}$ y $5.22 \pm 0.274 \mu\text{M}$, respectivamente, con una sensibilidad de $0.15 \mu\text{AV}^{-1}$. Se reporta una metodología sencilla y reproducible para cuantificar las bases púricas del ácido desoxirribonucleico (ADN).

ABSTRACT

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) were used to electrochemically characterize guanine and adenine behaviour using a glassy carbon electrode (GCE). In this work, we aim to quantify the amount of guanine and adenine based on a calibration curve. Before quantification, we study electrochemical behaviour of both purine bases using CV. The analyzed linear range of adenine was 2-28 μM , obtaining a limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) of $1.54 \pm 0.18 \mu\text{M}$ and $5.12 \pm 0.183 \mu\text{M}$, respectively, as well as a sensitivity of $0.1673 \mu\text{AV}^{-1}$. For guanine, the linear range was 1-30 μM with a LOD and LOQ of $1.64 \pm 0.27 \mu\text{M}$, and $5.22 \pm 0.274 \mu\text{M}$, respectively, as well as a sensitivity of $0.15 \mu\text{AV}^{-1}$. We report a simple and reproducible methodology to quantify purine bases of DNA.

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN), juega un papel importante en el proceso de vida debido a que lleva consigo la información hereditaria y las instrucciones para la síntesis biológica de proteínas y enzimas, cada hebra está compuesta por bases púricas: guanina, adenina, y pirimídicas: timina y citosina; todas electroactivas. Debido a la relativa facilidad con la que se oxidan, la guanina y adenina son las más estudiadas (Gilmartin y Hart, 1992).

La oxidación de los ácidos nucleicos pertenece a uno de los tipos de daño al ADN más común por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zitka et al., 2013). Debido a la existencia de un parecido entre las reacciones electroquímicas y las biológicas se puede asumir que la oxidación que se lleva a cabo en la superficie del electrodo y en sistemas biológicos sigue principios similares.

En años recientes, muchos estudios han tenido por objetivo el desarrollar métodos suficientemente selectivos, sensibles, precisos, exactos y baratos para la detección rápida de analitos. Entre las técnicas analíticas, destacan los métodos electroquímicos, los cuales proveen resultados confiables y rápidos, mientras que consumen pequeñas cantidades de reactivos y generalmente se disminuye la complicada preparación de la muestra. Además las técnicas electroquímicas son capaces de detectar y cuantificar la interacción entre un producto de reducción y su blanco (por ejemplo la interacción fármaco-metabolito-ADN) debido a que la interacción generará modificaciones en la respuesta corriente-voltaje (Tocher y Edwards, 1994). Por ello, esta es una alternativa viable en el desarrollo de la detección y cuantificación de diversos analitos (De Assis et al., 2014).

Por lo anterior, se ha planteado utilizar un electrodo de carbón vítreo (GCE), que por su bajo costo, en combinación con las técnicas electroquímicas son desde el punto de vista económico (Huai-Sheng et al., 2002; Hongying et al., 2008), más accesibles que los métodos tradicionales, como cromatografía de alta resolución. En este trabajo se propone cuantificar la cantidad de guanina y adenina basados en una curva de calibración de las mismas; previo a la cuantificación se analiza el comportamiento electroquímico de las bases a través de voltamperometría cíclica (VC).

Metodología

La guanina y adenina se obtuvieron de Sigma Aldrich. Las soluciones stock se prepararon en agua destilada libre de iones, a partir de las cuales se prepararon las diferentes concentraciones por dilución de la cantidad apropiada. La solución de electrolito soporte fue preparada usando reactivos

de grado analítico y agua purificada de un sistema Millipore Simpact® de Merck. Los microvolúmenes fueron medidos usando micropipetas (Transferpette® de Brand, Finnpiptette de Labsystems, Epperndorf, y Socorex). La medición de pH se llevó a cabo con un potenciómetro Corning 340.

Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25 ± 1 °C).

Los experimentos se realizaron en un equipo Autolab con software Nova 1.7. Las mediciones fueron llevadas a cabo usando un electrodo de trabajo (ET) de carbón vítreo, un electrodo de Ag/AgCl como referencia (ER), y un electrodo de carbono como electrodo auxiliar (EA).

Todos los experimentos se llevaron a cabo en solución amortiguadora de acetatos 100 mM, pH= 4.3 ± 0.1 , y NaCl 10 mM como electrolito soporte.

Caracterización electroquímica de guanina y adenina mediante VC y VDP

La caracterización del proceso electroquímico de la adenina y la guanina fue realizada usando VC y VDP. La VC, se llevó a cabo mediante mediciones de una solución de guanina 500 μM y de adenina 100 μM , a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} . Las mediciones de VDP de guanina y adenina se realizaron a una concentración de 100 μM para ambos compuestos.

El estudio de velocidad se llevó a cabo mediante VC, bajo las siguientes condiciones voltamperométricas: ventana de potencial: iniciando en el potencial de corriente nula hasta 1.5 V (para adenina) y a 1 V (para guanina).

El rango de las velocidades de estudio fue de 10 a 1000 mVs^{-1} . La concentración analizada de adenina y guanina fue de 100 μM . En la figura 1, se detallan los electrodos utilizados para las mediciones, un esquema del funcionamiento del electrodo así como la respuesta electroquímica de la oxidación de una de las bases.

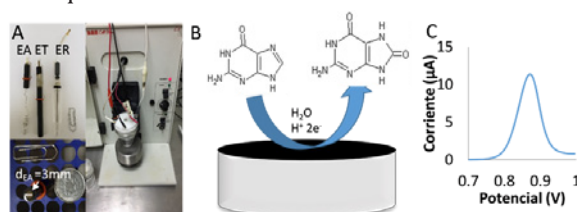


Figura 1. A. Electrodos: auxiliar (EA), de trabajo (ET) y de referencia (ER). Celda típica de 3 electrodos usados en las mediciones, ET con diámetro de 3 mm. B. Representación esquemática del funcionamiento del electrodo. C. VDP de la respuesta electroquímica de la oxidación de guanina.

Cuantificación de bases púricas mediante VDP

Curva de calibración de adenina

Se realizó una curva de calibración de adenina y guanina en un rango de concentraciones de 2 μM a 28 μM y 1 a 30 μM respectivamente. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: potencial inicial, 0 V; potencial final, 1.2 V y 1 V, para adenina y guanina respectivamente; velocidad de barrido 12 mVs^{-1} para ambos compuestos.

Resultados y discusión

Caracterización electroquímica de guanina y adenina mediante VC y VDP

El voltamperograma cíclico de adenina se muestra en la figura 2. En el gráfico se puede observar un pico anódico a 1.29 V con una corriente de pico de 9.36 μA , la cual corresponde a la oxidación de la adenina. Debido a que no se observó un pico con corrientes negativas cuando se invirtió el potencial, se considera como un proceso irreversible.

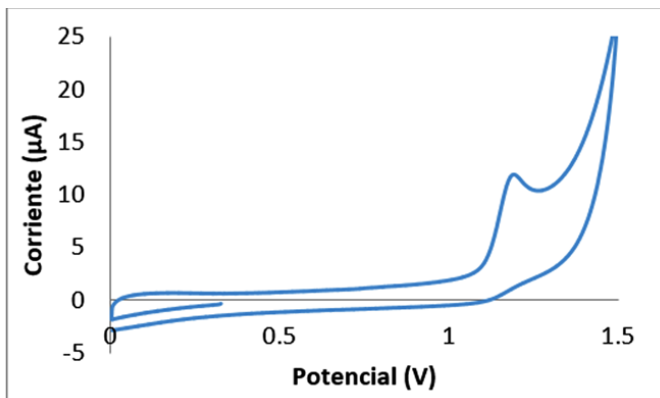


Figura 2. VC de adenina 100 μM en solución amortiguadora $\text{pH}= 4.3 \pm 0.1$ con NaCl 10 mM como electrolito soporte. Velocidad de barrido: 100 mV mVseg^{-1}

Por otro lado, el voltamperograma cíclico de guanina, en figura 3, muestra un pico anódico a 0.68 V, y una corriente de 1.64 μA . No se observó pico de reducción cuando se invirtió el potencial, por lo que la oxidación tiene características de un proceso irreversible.

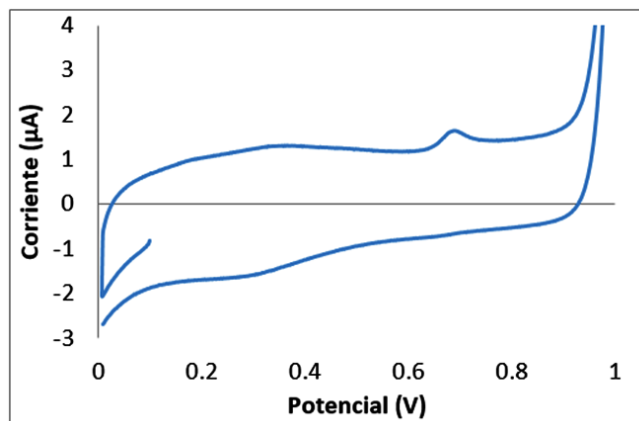


Figura 3. VC de guanina 500 μM en solución amortiguadora $\text{pH}= 4.3 \pm 0.1$ con NaCl 10 mM como electrolito soporte. Velocidad de barrido: 100 mVs^{-1}

La caracterización electroquímica, también se realizó mediante VDP. Para adenina, figura 4A, el potencial de pico anódico relacionado con su oxidación fue de 1.17 V con una corriente de pico de 6.52 μA . Por otra parte, el VDP de guanina que se observa en la figura 4B, muestra que la posición del pico en 0.87 V con una corriente de pico de 11.37 μA .

Estudio de Velocidad

Se realizaron estudios con el objetivo de conocer el comportamiento electroquímico de la adenina usando VC. Para las respuestas obtenidas, se observó que la corriente incrementa con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, como se muestra en la figura 5.

De acuerdo a la ecuación de Randles-Sevcik, para una reacción irreversible, la ecuación encontrada fue la siguiente:

$$I_{pc} = 0.8514v^{1/2}(\text{mVs}^{-1}) + 1.1821; R^2 = 0.9901$$

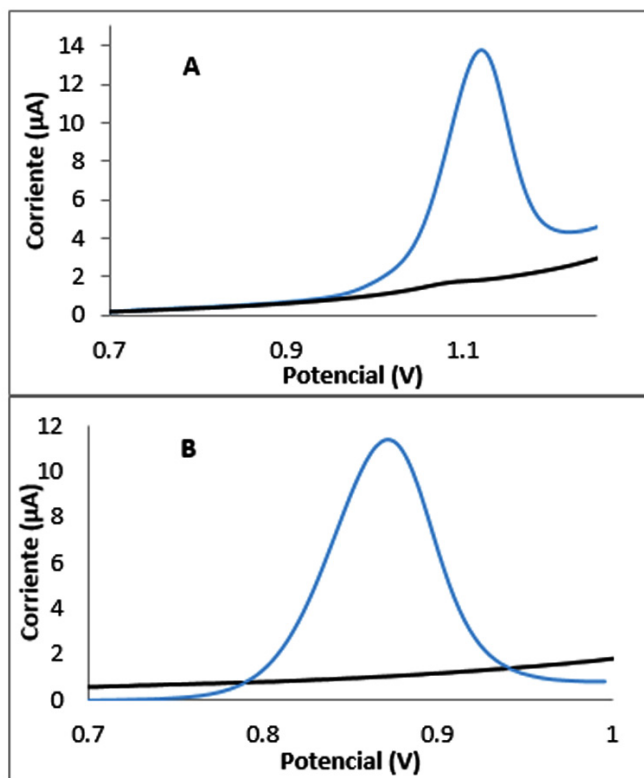


Figura 4. A. VDP de adenina 100 μM en solución amortiguadora $\text{pH} = 4.3 \pm 0.1$ con NaCl 10 mM como electrolito soporte y B. VDP de una solución de guanina 100 μM . Así como sus respectivos blancos (color negro).

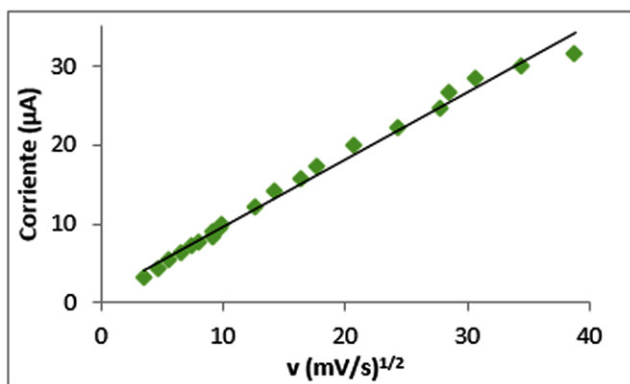


Figura 5. Estudio de velocidad mediante VC de adenina 100 μM en solución amortiguadora $\text{pH} = 4.3 \pm 0.1$ con NaCl 10 mM como electrolito soporte.

Con base en lo anterior, se confirmó que la adenina presenta un proceso controlado por la difusión y que no hay evidencia de un proceso adsorptivo, la oxidación tiene características de un proceso irreversible, debido a la ausencia de picos catódicos cuando se invierte el potencial. Por tanto, la velocidad de la oxidación

electroquímica de la adenina es controlada por la difusión de las especies electroactivas.

Los resultados obtenidos del estudio electroquímico de guanina mediante VC se muestran en la figura 6; de esta se observa que la corriente incrementa con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido. De acuerdo a la ecuación de Randles-Sevcik, para una reacción irreversible, la ecuación que describe el aumento de la corriente en función de la velocidad es la siguiente:

$$I_{pc} = 0.0899v^{1/2}(\text{mVs}^{-1}) - 0.3653, R^2 = 0.97$$

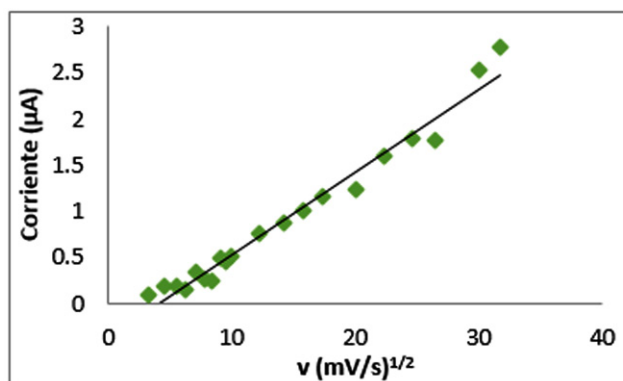


Figura 6. Estudio de velocidad mediante VC de guanina 500 μM en solución amortiguadora $\text{pH} = 4.3 \pm 0.1$ con NaCl 10 mM como electrolito soporte.

Este comportamiento es atribuido a un proceso controlado por la difusión de la guanina, por lo que no hay evidencia de un proceso adsorptivo.

Linealidad de bases púricas para su cuantificación durante la interacción con especies reactivas de oxígeno mediante VDP

A partir de los VDP obtenidos de la variación de concentración de las bases púricas, adenina y guanina, se encontró que las corrientes de pico aumentan linealmente con el incremento en la concentración.

Curva de calibración de adenina

Los VDP obtenidos al incrementar la concentración de adenina muestran un rango lineal de 2 μM a 28 μM , como se muestra en la figura 7. Se obtuvo un límite de detección y cuantificación $1.54 \pm 0.18 \mu\text{M}$ y $5.12 \pm 0.183 \mu\text{M}$, respectivamente, así como una sensibilidad de $0.1673 \mu\text{A}\cdot\text{V}^{-1}$. La relación lineal está dada por la siguiente ecuación:

$$I_{pa} (\mu\text{A}) = 0.1673c (\mu\text{M}) + 0.0117; R^2 = 0.9988$$

Tabla 1. Comparación de las principales características de diferentes técnicas para las que se ha reportado la cuantificación de adenina y guanina.

| Analito | Técnica | Electrodo | Sensibilidad | Linealidad | LD | Referencia |
|---------|---------|----------------------------|----------------|--------------------|------------------|-------------------------------|
| A | VDP | Funcionalizado con grafeno | 0.0075 M | 0.5-200M | 50 nM | Ke-Jing et al., 2011 |
| G | | | 0.0065M | | 25 nM | |
| A | VDP | PTH/NPAu/MWNTs | 0.5796 μ M | 0.01-10 μ M | 8.0 nM | Hongying et al., 2008 |
| G | | | 0.1253 μ M | 0.05-5 μ M | 1 nM | |
| A | SWV | pretratado | 1.96 μ M | 0.08-2.72 μ M | 3 nM | Huai-Sheng et al., 2002 |
| | | | 1.02 μ M | 1 μ M | | |
| G | | | 1.96 μ M | 0.08-1 μ M | | |
| | | | 1.18 μ M | 1-2.72 μ M | | |
| A | SWV | poly(negro de ericromo T) | 15817 μ M | 0.05-1.00 μ M | 0.017 μ M | Youli et al., 2013 |
| G | | | 23421 μ M | 0.025-1.00 μ M | 0.008 μ M | |
| A | SWV | polimelamina | NR | 0.1-60 μ M | 0.07 μ M | Xiao et al., 2012 |
| G | | | | 0.1-50 μ M | 0.08 μ M | |
| A | HPLC | - | 0.173 mg/L | 5-50 mg/L | 1.75 mg/L | García del Moral et al., 2005 |
| G | | | 0.292 mg/L | | 1.17 mg/L | |
| A | GC | - | NR | 0.5-50 μ mol/L | 0.08 μ mol/L | Brohi et al., 2016 |
| G | | | | | 0.01 μ mol/L | |

VDP: Voltamperometría diferencial de pulso, SWV: voltamperometría de onda cuadrada, HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución, GC: GC: Cromatografía de gases, A: Adenina, G: Guanina, PTH/NPAu/MWNTs Nanopartículas de poliuretano / oro / nanotubos de carbono multicapa. NR= No reporta.

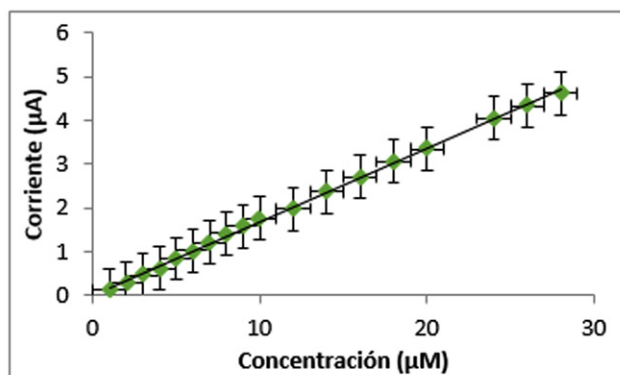


Figura 7. Curva de calibración de adenina en solución amortiguadora pH= 4.3 \pm 0.1 con NaCl 10 mM como electrolito soporte.

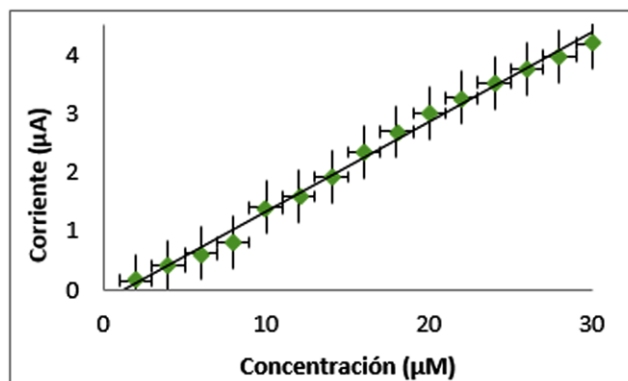


Figura 8. Curva de calibración de guanina en solución amortiguadora pH= 4.3 \pm 0.1 con NaCl 10 mM como electrolito soporte.

Curva de calibración de guanina

El rango de concentraciones de la curva analizado fue de 1 a 30 μ M, el cual se observa en la figura 8. Se obtuvo un límite de detección y de cuantificación de $1.64 \pm 0.27 \mu$ M y $5.22 \pm 0.274 \mu$ M, respectivamente, así como una sensibilidad de 0.15μ AV⁻¹. La relación lineal está dada por la siguiente ecuación: $I_{pa}(\mu A) = 0.1526c (\mu M) + 0.1959$, $R^2 = 0.9932$

En la tabla 1, se recopilan las características principales de las técnicas usadas para realizar la cuantificación de adenina y guanina. La comparación de éstas con nuestro método, indica que es rápida y presenta bajos límites de detección en comparación con las técnicas cromatográficas (García del Moral et al., 2005; Brohi et al., 2016), mientras que con técnicas electroquímicas, la modificación de los electrodos sin lugar a duda mejora

sustancialmente el límite de detección. Para fines prácticos, el uso del electrodo aquí empleado hace que la técnica sea sencilla, fácil y rápida, por lo que es una alternativa viable para la detección de las bases púricas adenina y guanina.

Conclusiones

Basados en los resultados de VC, se encontró que la velocidad de la oxidación electroquímica de la adenina es controlada por la difusión de las especies electroactivas en la superficie del electrodo de carbón vítreo. Por otro lado, dadas las ventajas que presenta la técnica de VDP, esta se usó para la construcción de curvas de calibración de las bases púricas y establecer la linealidad para su posterior cuantificación durante su interacción con especies reactivas de oxígeno.

Cabe mencionar que el comportamiento electroquímico de estas bases en un electrodo de carbón vítreo sin previa modificación, no se ha reportado. Además se reporta una metodología sencilla y reproducible para cuantificar los biomarcadores de daño oxidativo al ADN.

Agradecimientos

Lo autores agradecen PRODEP por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto. KDCM agradece al CONACYT por la beca otorgada (beca número 467906).

Referencias

Brohi R. O. Z., Khuhawar M. Y., Jahangir T. M. (2016). GC-FID determination of nucleobases guanine, adenine, cytosine, and thymine from DNA by precolumn derivatization with isobutyl chloroformate. *J. Anal. Sci. Technol.*, 7: p.10.

De Assis A., Okumura L., Saczk A., Oliveira M. (2014). New voltammetry-based technique for the determination of tebutiuron in cristal and Brown sugar samples, *J. Braz. Chem. Soc.* 25: 27-35.

García del Moral P., Arín M., Resines J., Díez M. (2005). Simultaneous determination of adenine and guanine in ruminant bacterial pellets by ion-pair HPLC. *J. Chromatogr. B.* 826: 257-260.

Gilmartin A. T., Hart J. P. (1992). Comparative study of the voltammetric behavior of guanine at carbon paste and glassy electrodes and its determination in purine mixtures by differential-pulse voltammetry. *Analyst.* 117: 1613-1618.

Hongying L., Guangfeng W., Daolei C., Wei Z., Chunjing, L. (2008). Fabrication of polythionine/NPAu/MWNTs modified electrode for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. *Sensors and Actuators B.* 128: 414-421.

Huai-Sheng W., Huang-Xian J., Hong-Yuan C. (2002). Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta.* 461: 243-250.

Ke-Jing H., De-Jun N., Jun-Yong S., Cong-Hui H., Zhi-Wei W., Yan-Li L., Xiao-Qin X. (2011). Novel electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 82: 543-549.

Tocher J., Edwards D. (1994). Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1089-1094.

Xiao L., Liqiang L., Yaping D., Qingsheng W., Youli W., Daixin Y. (2012). A highly sensitive method for determination of guanine, adenine and epinephrine using poly-melamine film modified glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* 675: 47-53.

Youli W., Liqiang L., Yaping D., Xiao L., Yuliang C. (2013). A glassy carbon electrode modified with poly(eriochrome black T) for sensitive determination of adenine and guanine. *Microchim. Acta.* 180: 887-893.

Zitka O., Krizkova S., Skalickova S., Kopel P., Babula P., Adam V., Kizek R. (2013). Electrochemical study of DNA damaged by oxidation stress. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 16: 130-141.