

Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco,
Unidad Xochimilco, División de ciencias biológicas y de la salud

Licenciatura en Química farmacéutica biológica

REPORTE DE SERVICIO SOCIAL
20 de abril 2022 – 20 de octubre 2022

“Desarrollo de un método electroquímico para el estudio *insitu* de la
interacción de fármacos-DNA”

María Guadalupe Valencia Valencia 2173065419

Asesores:



Interno: Dra. Georgina Alarcón Angeles

No. económico: 34432



Externo: Dra. María Teresa Ramírez Silva

No. económico: 16775

INTRODUCCIÓN

La electroquímica es una rama que es utilizada para la química analítica mediante técnicas como la coulombimetría, potenciometría y voltamperometría para estudiar un analito en solución. Esto puede abarcar desde la detección y cuantificación de analitos, así como estudios de procesos electroquímicos de oxido-reducción hasta el estudio de sistemas biológicos utilizando técnicas más sofisticadas, así como modificaciones a electrodos. Un ejemplo de estas técnicas utilizadas son los biosensores que permiten realizar estudios más específicos como el del presente trabajo, el análisis de la interacción de un fármaco con el material genético (DNA)

Algunas técnicas que se pueden utilizar con este fin son la espectrofotometría, quimioluminiscencia, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis capilar, RMN, entre otras. A pesar de las ventajas brindadas por cada una de ellas, cuentan con las desventajas de que la mayoría de estas técnicas tienen un alto costo, requieren de sumo cuidado y en algunos casos una gran cantidad de analito para poder llevar a cabo el estudio de interacción fármaco-DNA. Por lo que la electroquímica es una gran alternativa debido a sus bajos costos, el equipo utilizado es fácil de manejar, utiliza poca cantidad de analito y tiene una alta especificidad además de tener la posibilidad de aumentar la sensibilidad y selectividad ante los analitos a través de la modificación de electrodos. (Dourandish et. al., 2023)

Marco teórico

- DNA (Composición, estructura, mutaciones (daño causado por fármacos (general), productos de oxidación)

El ácido desoxirribonucleico o DNA es la unidad principal de herencia en organismos de todo tipo y contiene toda la información genética de cada individuo. Es una molécula compleja que se compone por dos cadenas largas de polinucleótidos unidos a través de puentes de hidrógeno, cada nucleótido consta de un azúcar de 5 carbonos (pentosa) con uno o más grupos fosfatos unidos a él y una base nitrogenada que puede ser Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) o Citocina (C), las dos primeras bases mencionadas son purinas mientras que las otras dos son pirimidinas. Estos nucleótidos se unen de forma covalente por medio de los azúcares y grupos fosfatos formando una cadena larga que funciona como "columna vertebral o esqueleto" de la molécula de DNA (Fig. 1a). (Alberts, 2002)

Como se observa en la Fig. 1b la estructura tridimensional del DNA es en forma de doble hélice debido a las características fisicoquímicas de los nucleótidos. Los puentes de hidrógeno que unen las cadenas o hebras son entre las bases nitrogenadas, por lo que estas se encuentran en el interior de la doble hélice; los enlaces se forman de manera eficiente solo entre A y T por medio de dos puentes y G y C por tres puentes de hidrógeno (Fig. 1c). (Alberts, 2002)

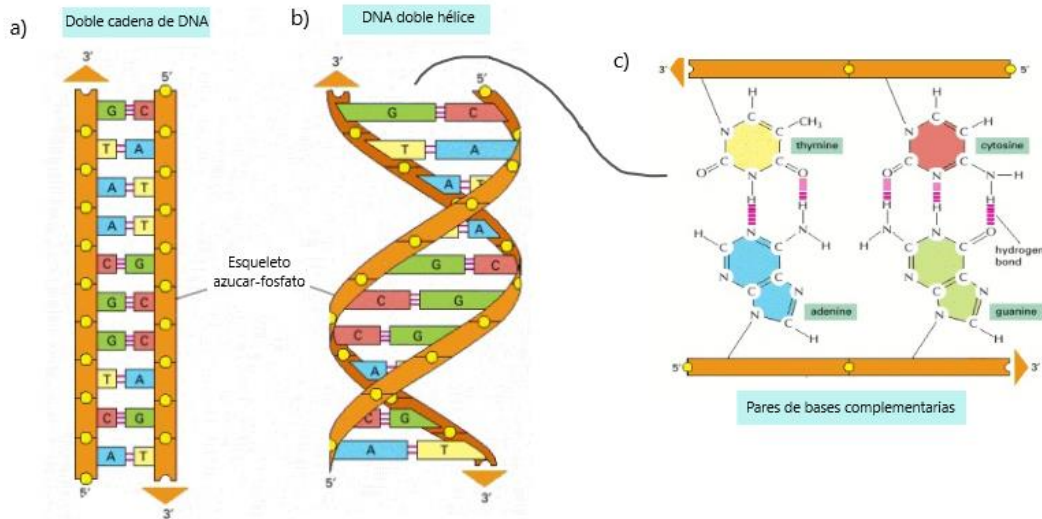
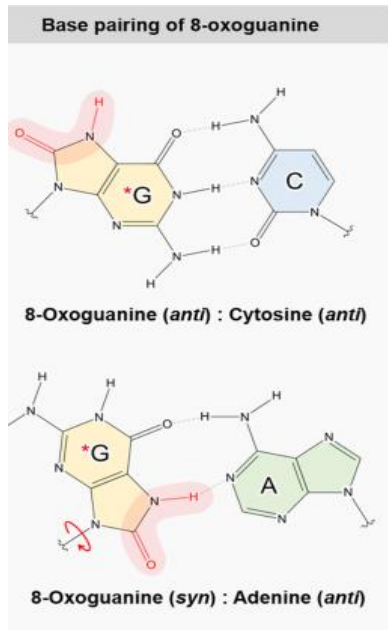


Fig. 1a) Doble cadena de DNA, 1b) Estructura de doble hélice del DNA, 1c) Enlaces en las pares de bases complementarias del DNA

EL DNA puede sufrir daños por diferentes factores que se subdividen en dos tipos: (1) daño endógeno causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) que se derivan de subproductos metabólicos y (2) daño exógeno causado por radiación (UV, rayos X, gamma), hidrólisis, plantas, toxinas y virus. Su reparación es de suma importancia ya que este daño podría provocar cambios o mutaciones en el material genético. (Williamson, 2012; Shimada, 2013)

Las bases nitrogenadas que son más susceptibles y se oxidan fácilmente son G y A, ya que sus potenciales de oxidación son menos positivos. La oxidación de la base G conduce a la formación de diferentes productos de oxidación, siendo la más predominante la 8-oxoguanina (8-oxoG) (Fig. 2). (Chiorcea-Paquim, Oliveira-Brett, 2021)

Esta especie oxidada puede emparejar no solo con la citosina (C) sino también con la adenina (A) durante la replicación del DNA lo que da como resultado una mutación por transversión de la base G:C a la base T:A. (Yudkina, 2019)



Las modificaciones de 8-oxoG no reparadas pueden generar diversas condiciones patológicas, por ejemplo, la fragmentación del DNA en los espermatozoides que se asocia con los niveles elevados de 8-oxoG. (Santio,2010) En un estudio realizado en 2021 se utilizó DNA y proteínas derivadas de espermatozoides infértiles para determinar si los niveles elevados de 8-oxoG inducen la infertilidad en hombres por medio de los efectos reguladores de los genes de espermatozoides. Los resultados obtenidos sugieren que la formación de esta especie durante la espermatogénesis puede desregular la actividad de los genes del acrosoma lo que conduce a defectos estructurales y funcionales de esperma. Sin embargo, los efectos genéticos moleculares del 8-oxoG generado en el DNA espermático por el estrés oxidativo en la espermatogénesis no se conocen por completo. (Kim, 2021)

Fig. 2. Estructura de 8-Oxoguanina y su emparejamiento con citosina y timina

La figura 3 muestran diferentes voltamperogramas por DPV a un pH de 7.4 utilizando un electrodo de carbón vítreo (GCE) donde se observan los potenciales de cada base de DNA (3a), del conjunto con el nucleótido (3b) además del producto de oxidación de Guanina, 8-OxoG (3c). La base G presenta el potencial de oxidación más bajo en $E_p \sim +0,70$ V, seguido de la base A. en $E_p \sim +0,96$ V, T en $E_p \sim +1,15$ V, de igual manera se observa que estas bases son las que presentan una mayor resolución en las señales por lo que los cambios ocurridos en estas al momento de aplicar potenciales son más evidentes, como es el caso de la Guanina, que al obtener sus productos de oxidación son evidentes los cambios en las señales con un desplazamiento de potenciales hacia valores negativos. (Chiorcea-Paquim & Oliveira-Brett, 2021)

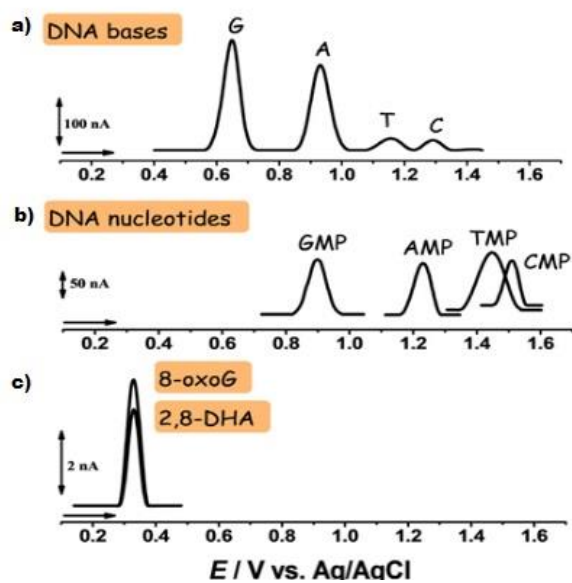
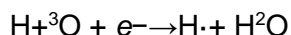


Fig. 3a) Voltamperogramas de bases de DNA 3b) Voltamperogramas de bases de DNA con nucleótido 3c) Voltamperogramas de los productos de oxidación de guanina

- o Electroquímica (Que es, reacciones REDOX, tipos de técnicas, CV, DPV, parámetros a evaluar, biosensores)

La electroquímica es considerada una ciencia multidisciplinaria que puede ser aplicada a diversos campos dentro de las ciencias físicas, químicas y biológicas, esta ciencia representa un área de la investigación que unificó los estudios de la química y la electricidad. (O'Mullane, 2013) Dentro de los electrodos ocurren reacciones que implican la transferencia de carga hacia o desde un electrodo, este proceso se lleva a cabo en la interfaz de la solución/electrodo donde la distribución de las cargas es diferente de la del interior de las fases. Los dos tipos de reacciones que ocurren en los electrodos es la oxidación (perdida de electrones) y reducción (ganancia de electrones), por ejemplo:



Donde los electrones resultantes de la reacción se mueven desde el ánodo (electrodo donde se lleva a cabo la oxidación) hasta el cátodo (electrodo donde se lleva a cabo la reducción). (Brett, 2014, Sawyer, 2003)

Como se mencionó anteriormente, la electroquímica es multidisciplinaria por lo que se puede aplicar a muchas áreas de la investigación, por ejemplo: estructura de soluciones, electrolisis orgánica, cinética y mecanismo de procesos de electrodos, baterías y pilas de combustibles, polímeros, electroanálisis, bioelectroquímica, sensores y biosensores entre otras. (Brett, 2014) Dentro de las áreas de investigación la química electroanalítica utiliza técnicas electroquímicas para estudiar un analito en solución. Se puede utilizar en la detección y cuantificación de analitos a través de métodos de coulombimetría, potenciometría y voltamperometría, así como estudios de procesos electroquímicos de oxido/reducción mediante equipo más sofisticado, nanomateriales novedosos y modelos teóricos apropiados. (O'Mullane, 2013)

Los métodos electroquímicos se pueden combinar con la fotoquímica, dando lugar al campo de la electroquimioluminiscencia (luminiscencia inducida por una reacción electroquímica en la superficie de un electrodo), un método viable para la detección selectiva de niveles extremadamente bajos de analito. (Lu, 2010)

- **Fármaco** (propiedades físico-químicas, propiedades farmacocinéticas, mecanismo de acción, reacciones adversas, posología, métodos de caracterización, **condiciones voltamperométricas**, productos de oxidación)

El acetaminofén (AFEN) también conocido como paracetamol es un derivado de para-aminofenol (4-acetamidofenol) que posee actividades terapéuticas analgésicas y antipiréticas. Tiene un aspecto sólido cristalino blanco de sabor amargo e inodoro, su estructura química se encuentra en la Fig. 4 (PubChem, 2022). Dentro de sus propiedades fisicoquímicas se encuentran:

- Punto de fusión: 78-80°C
- Punto de ebullición
- Solubilidad: Soluble en agua (23° C) 14 g/L
- Densidad: 1.293 g/cm³
- pKa: 9.38

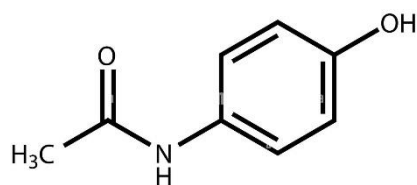
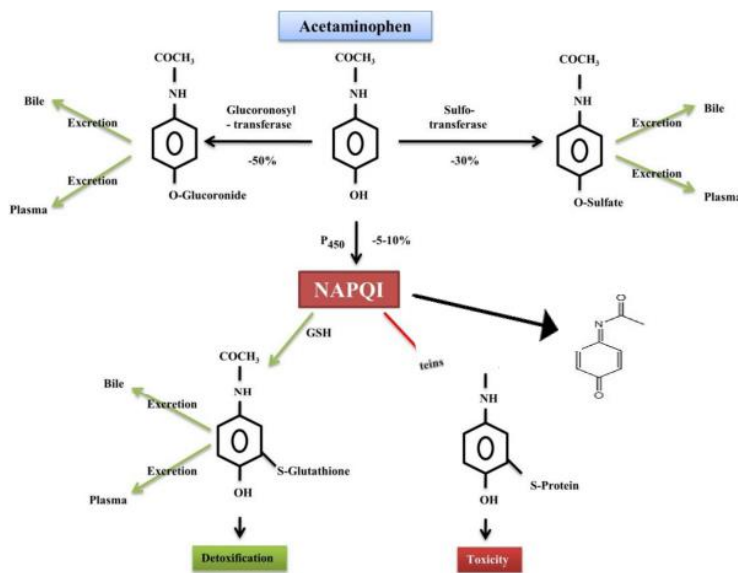


Fig. 4. Estructura química de acetaminofén

Thermofisher, 2020

Este fármaco cuenta con una biodisponibilidad oral del 88 % y alcanza su concentración plasmática máxima en 1 hora y 30 minutos posterior a su ingesta. Aproximadamente el 25% de este se une a proteínas plasmáticas y su vida media de eliminación es de 1 a 3 horas. (OSLON,2012) El AFEN es un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX) no específico de isoforma y parece tener poco efecto sobre los sistemas cardiovasculares y respiratorios a dosis terapéuticas; sin embargo, a dosis tóxicas pueden causar respiración rápida e insuficiencia circulatoria. De acuerdo a la FDA, el mecanismo de acción del AFEN no es conocido exactamente y sólo son especulaciones teóricas que abren paso a la investigación de ese. (Centro nacional de información biotecnológica, 2023)

Dentro del mercado, este medicamento está disponible sin receta médica y existen diferentes presentaciones como cápsulas, tabletas, soluciones, suspensiones entre otras. Para un adulto, las dosis recomendadas son entre 325 mg y 650 mg cada 4 o 6 horas, la dosis máxima que puede consumirse en un día es de 3 a 4 g y en el caso de pacientes pediátricos es de 15 mg/kg cada 6 horas. (CIGMA, 2023, CMAEP, 2021)



Los efectos secundarios como erupciones cutáneas, inflamación del páncreas y trastornos sanguíneos al consumir AFEN se presentan en raras ocasiones en una persona que lo consume regularmente durante tiempo prolongados; sin embargo, al llegar a ingerir altas concentraciones (>125 mg/kg) puede causar toxicidad renal y hepática o incluso provocar la muerte.

Fig. 5 Metabolismo del AFEN

El metabolismo de AFEN puede tomar diferentes rutas, la ruta principal es donde este fármaco se excreta en un 85% aprox. en forma de orina y bilis, mientras que lo restante es metabolizado por el citocromo P450 y transformarlo en N-acetil-parabenzquinoneimina (NAPQI)(Fig. 5). (Chowdhury et al., 2020)

Este metabolito tóxico juega un papel importante en la insuficiencia hepática aguda, ya que hasta el 46% de los casos de esta enfermedad son a causa del daño hepático inducido por acetaminofén (AILI). Una de las etapas de esta enfermedad es la muerte de hepatocitos, inducida por la acumulación de NAPQI en las mitocondrias conduciendo a estrés oxidativo. Además, este metabolito se considera un sello de distinción para identificar la necrosis de los hepatocitos, sin embargo, no hay estudios que confirmen si la apoptosis o necroptosis sea la principal causa de la muerte celular. (Jaeschke et al., 2012, Cai et. al, 2022)

Otro metabolito importante de AFEN es el 4-aminofenol (4-AF), producto de la degradación en formulaciones farmacéuticas durante la síntesis y/o almacenamiento. Al consumir el 4-AF puede provocar ciertas enfermedades como insuficiencia hepática, renal, pancreatitis y erupciones cutáneas (Dourandish et. al., 2023)

Es por ello la importancia de realizar estudios a este fármaco que si bien, en dosis terapéuticas no causa algún efecto adverso, al momento de un consumo desmedido puede metabolizarse a productos de oxidación nocivos para el ser humano. Hay un camino libre en la investigación del mecanismo y efectos que causan estos metabolitos tanto en el DNA como en los hepatocitos y demás células, por lo que se requieren métodos de alta precisión para que puedan ser observados estos mecanismos.

Por lo que, los métodos electroquímicos han surgido como una herramienta para la evaluación de la interacción entre fármacos y DNA, así como metabolitos y DNA. En este proyecto se propone el estudio de AFEN y sus metabolitos a través de técnicas electroquímicas para la evaluación de su interacción con DNA, para su entendimiento se analiza la interacción con las bases púricas y posteriormente con el material biológico.

Planteamiento del problema

Los fármacos son sustancias químicas que ayudan a dar tratamiento de enfermedades, provocando un cambio en las funciones biológicas de humanos y animales. En la mayoría de los casos actúa como agonista (activador) o antagonista (inhibidor) (Katzung, 2016). Uno de los aspectos más importantes para la investigación de los efectos secundarios causados por medicamentos es la genotoxicidad (NICHHD, 2018). Los agentes genotóxicos se definen como cualquier sustancia o producto químico que pueda afectar negativamente el material genético (Nai, et. al., 2015).

La importancia del análisis de los efectos causados al DNA radica en las consecuencias que causa un daño por estos agentes genotóxicos que pueden ser potencialmente mutagénicos dando como resultado una mutación somática que puede conducir a una transformación maligna (cáncer) (Phillips & Arlt, (2009). Dentro del cuadro básico de medicamentos se encuentran los AINES como el acetaminofén (AFEN), este fármaco de acceso libre es una de las causas más frecuentes de falla hepática aguda que puede llegar hasta un trasplante de hígado, por lo que es un campo activo de investigación (Castellanos, et. al., 2018). La intoxicación por AFEN provoca un daño en el DNA mitocondrial formando poros en la membrana mitocondrial, estas modificaciones alteran los niveles de Ca y Mg y a su vez la homeostasis además de que incrementa los niveles de N-acetil parabenzoquinoneimina (NAPQI) un metabolito tóxico y reactivo que conduce al deterioro de la función celular (Jaeschke, et. al. 2018).

Debido al efecto que los fármacos pueden causar sobre el DNA, es de relevancia proponer un método in situ para el estudio de la interacción fármaco-DNA, que sea fácil y de bajo costo. Por lo que en el presente trabajo se propone el desarrollo de un método analítico usando un biosensor electroquímico basado en DNA.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Objetivo general

Desarrollar un método electroquímico para el estudio de la interacción fármaco-DNA, usando un biosensor basado en DNA

Objetivos específicos

- Optimizar condiciones experimentales para la detección de fármacos (F) modelos para técnicas electroquímicas
- Caracterizar el comportamiento electroquímico del DNA y del fármaco modelo (AFEN)
- Optimizar las condiciones experimentales para favorecer la interacción fármaco-DNA
- Analizar la interacción Fármaco-DNA vía electroquímica.

METODOLOGÍA UTILIZADA

MATERIALES

- Potenciostato Dropsens DRP-STAT400 con software Dropview 8400
- Electrodos serigrafeados marca Metrohm D100 Dropsens
- Electrodo de Referencia de Ag/AgCl marca Basi Instrument
- Electrodo auxiliar de aluminio marca Basi Instrument
- Potenciómetro Hanna instruments HALO HI1102
- Celda electroquímica
- Pipeta Science MED de 10-100 μ L
- Pipeta Brand de 100-1000 μ L
- Adenina Sigma Lote: WXBC0575V \geq 99% de pureza
- Guanina Aldrich Lote: BCBM4380V \geq 98% de pureza
- Acetaminofén Sigma-Aldrich No. Lote: 061M0042V 98-101.0% de pureza
- Ácido clorhídrico
- Metanol
- Ácido acético glacial
- Acetato de amonio
- Cloruro de sodio
- DNA de salmón D1626-1G Sigma Aldrich
- Polvo de grafito microcristalino de 99.995% de pureza Alfa Aesar Lote: Q09A048
- Filtro de agua Millipore Replyle
- Aceite mineral Sigma-Aldrich Lote: MKBK0118V

METODOLOGÍA

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LOS EXPERIMENTOS

Preparación del blanco (buffer)

- Preparar 50 mL de una solución buffer de acetato de amonio/ ácido acético a una concentración 0.1 M pH 4.5: Colocar un poco de agua desionizada en un matraz volumétrico de 250 mL, tomar 1.431 mL de ácido acético glacial y colocar en el matraz, pesar 1.927 g de acetato de amonio, 1.462 g de cloruro de sodio y agregarlos al matraz. Aforar con agua desionizada. Posteriormente medir el pH de la solución con un potenciómetro.

Preparación de acetaminofén (referencia)

- Preparar una solución madre a una concentración de 2 mg/mL: Pesar 10 mg de acetaminofén y disolver en 5 mL de metanol en un matraz volumétrico
- Preparar 25 mL de una solución de acetaminofén a una concentración de 10 µg/mL: Tomar una alícuota de 1.25 mL, colocar en un matraz volumétrico y aforar con buffer.

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON ELECTRODOS SERIGRAFEADOS (SPE)

1) Experimentos para acetaminofén

a) Voltamperometría cíclica (VC)

I. Caracterización por Voltamperometría cíclica

- Correr el buffer aproximadamente 5 veces o hasta que se sobrepongan las curvas a una velocidad de 0.1 V/s
 - Correr la muestra a una velocidad de 0.5 V/s con un inicio en 0 fin en 1 y regreso en -0.5, realizarlo por triplicado.
- NOTA: Lavar electrodo con metanol y agua entre cada corrida.

II. Velocidad de barrido

Correr la muestra de acetaminofén a una concentración de 100 µg/mL a 12 velocidades diferentes iniciando por la velocidad mayor y descendiendo.

Tabla 1. Velocidades a las cuales deberá correr AFEN

1	1000 mV/s	7	90 mV/s
2	800 mV/s	8	80 mV/s
3	600 mV/s	9	60 mV/s
4	400 mV/s	10	40 mV/s
5	200 mV/s	11	20 mV/s
6	100 mV/s	12	5 mV/s

b) Voltamperometría de pulso diferencias (DVP)

I. Determinación de las condiciones de corrido

Correr la muestra de acetaminofén a una concentración de 10 µg/mL en las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones del potenciómetro para correr AFEN

Parámetro	Condición 1	Condición 2
Estep	0.006	0.016
Epuls	0.049	0.05
Tpuls	50	10
Srate	0.012	0.05
Ebegin	0	0
Eend	1.3	1.3

Correr la muestra variando diferentes parámetros del equipo como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Valores de los parámetros que deben variarse para obtener una buena resolución de voltamperogramas de las muestras de AFEN

Concentración (µg/mL)	Estep (V)	Epuls (V)	tPuls (ms)	Srate (mV/s)
10	0.016	0.05	20	50
			50	
			75	
			100	
			75	
		40		
		30		
		20		
	0.01	“	“	30
	0.008	“	“	“
	0.006	“	“	“
	0.01	0.08	“	“
	“	0.06	“	“
	“	0.04	“	“
“	0.02	“	“	

Correr 6 veces la muestra con las condiciones apropiadas para obtener señales del analito en una buena resolución

II. Rango lineal

Determinar el rango de concentraciones dentro del cual el pico característico de acetaminofén sea definido e identificable

i) Curvas de calibración

A) Rango menor

Correr la muestra de acetaminofén para generar una curva a las siguientes concentraciones tomando alícuotas de una solución stock a una concentración de 200 µg/mL:

Tabla 4. Diluciones para curva de calibración en un rango de concentraciones menores a 100 µg/mL

Concentración	Alícuota	Aforo
5 µg/mL	125 µL	5 mL
10 µg/mL	250 µL	
20 µg/mL	500 µL	
30 µg/mL	750 µL	
40 µg/mL	1000 µL	
50 µg/mL	1250 µL	

Tomar los datos de altura, amplitud, potencial y carga

B) Rango mayor

Correr la muestra de acetaminofén para generar una curva a las siguientes concentraciones tomando alícuotas de una solución stock a una concentración de 2 mg/mL:

Tabla 5. Diluciones para curva de calibración en un rango de concentraciones mayores a 100 µg/mL

Concentración	Alícuota	Aforo
100 µg/mL	250 µL	5 mL
200 µg/mL	500 µL	
400 µg/mL	1000 µL	
600 µg/mL	1500 µL	
800 µg/mL	2000 µL	
1000 µg/mL	2500 µL	

Tomar los datos de altura, amplitud, potencial y carga

C) Rango seleccionado

Realizar la curva por triplicado con el rango de concentraciones seleccionado de acuerdo a la siguiente tabla

Tabla 6. Diluciones para curva de calibración en un rango seleccionado donde las señales de los voltamperogramas son de buena calidad

Concentración	Concentración de sol. stock	Alícuota	Aforo
5 µg/mL	100 µg/mL	250 µL	5 mL
10 µg/mL		500 µL	
20 µg/mL		1000 µL	
30 µg/mL		1500 µL	
40 µg/mL		2000 µL	
50 µg/mL		2500 µL	
100 µg/mL	2 mg/mL	250 µL	
200 µg/mL		500 µL	

2) Experimentos con las bases nitrogenadas

a) Caracterización

I. Adenina (A)

Preparación de la muestra: Preparar 10 mL de la muestra a una concentración. [1 mg/mL] disolviendo 10 mg de adenina en 05 mL de HCl concentrado agregar 1.5 mL de agua, agitar 1-2 min y aforar con agua a 10 mL.

Preparación de la solución a 50 µg/mL: Preparar 10 mL de la solución tomando una alícuota de 0.5 mL de la solución stock y aforar con buffer de acetatos pH 4.5.

II) Guanina (G)

Preparación de la muestra: Preparar 10 mL de la muestra a una concentración [1 mg/mL] disolviendo 10 mg de adenina en 0.5 mL de HCl concentrado agregar 1.5 mL de agua y agitar de 30-40 min. Posteriormente agregar 2.5 mL más de agua, agitar 10-15 min más y aforar con agua a 10 mL.

Preparación de la solución a 50 µg/mL: Preparar 10 mL de la solución tomando una alícuota de 0.5 mL de la solución stock y aforar con buffer de acetatos.

b) Curva de calibración de mezcla de adenina y guanina

Realizar la curva de calibración de acuerdo con la siguiente tabla tomando alícuotas de una solución stock a una concentración de 1 mg/mL

Tabla 7. Diluciones para curva de calibración de una mezcla de guanina y adenina

Matraz	Concentración	Alícuota	Aforo
1	10 µg/mL	50 µL	5 mL
2	20 µg/mL	100 µL	
3	40 µg/mL	200 µL	
4	60 µg/mL	300 µL	
5	80 µg/mL	400 µL	
6	100 µg/mL	500 µL	

Debido a que la concentración de la solución stock de adenina y guanina es la misma, la alícuota tomada es la misma para ambas bases nitrogenadas.

c) Mezcla de bases nitrogenadas y acetaminofén

I) Caracterización de la mezcla a mismas concentraciones

Realizar a una mezcla de acetaminofén/adenina/guanina [50/50/50 µg/mL] colocando en un matraz volumétrico de 5 mL una alícuota de 250 µL de guanina al igual que adenina de una solución stock [1mg/mL] y una alícuota de 12 µL de acetaminofén de una solución stock [2 mg/mL].

II) Curva de calibración (A/G/AFEN)

La curva se realizó a una concentración de 50 µg/mL de las bases nitrogenadas y en diferentes concentraciones de acetaminofén conforme a la siguiente tabla:

Tabla 8. Diluciones de AFEN para curva de calibración de una mezcla de las bases y AFEN

Matraz	Concentración	Alícuota	Aforo
1	20 µg/mL	50 µL	5 mL
2	40 µg/mL	100 µL	
3	60 µg/mL	150 µL	
4	80 µg/mL	200 µL	
5	100 µg/mL	250 µL	

d) Adición continua

I) Adición de acetaminofén a una solución de guanina

i) Concentración menor

Instalar un sistema en una celda agregando 15 mL de la una solución de guanina a una concentración de 50 µg/mL (3.304×10^{-4} M), agregar 20 µL en cada adición de una solución de acetaminofén a una concentración de 3.775 mg/mL, poner en agitación magnética por 30 s y correr la muestra.

Tabla 9. Molaridad y relación molar de adiciones continuas de AFEN a G

Punto	Vol. Acumulado (ACET) (µL)	Molaridad de acetaminofén	Relación molar
1	20	3.32×10^{-5}	0.106
2	40	6.64×10^{-5}	0.201
3	60	9.94×10^{-5}	0.301
4	80	1.32×10^{-4}	0.401
5	100	1.65×10^{-4}	0.502
6	120	1.98×10^{-4}	0.603
7	140	2.30×10^{-4}	0.703
8	160	2.63×10^{-4}	0.805
9	180	2.96×10^{-4}	0.905
10	200	3.28×10^{-4}	1.004
11	220	3.60×10^{-4}	1.106
12	240	3.93×10^{-4}	1.207
13	260	4.25×10^{-4}	1.307
14	280	4.57×10^{-4}	1.408
15	300	4.89×10^{-4}	1.509
16	320	5.21×10^{-4}	1.610
17	340	5.53×10^{-4}	1.710
18	360	5.85×10^{-4}	1.811
19	380	6.16×10^{-4}	1.911
20	400	6.48×10^{-4}	2.012

ii) Concentración mayor

Instalar un sistema en una celda agregando 15 mL de la una solución de guanina a una concentración de 50 µg/mL, agregar 20 µL en cada adición de una solución de acetaminofén

a una concentración de 37.75 mg/mL, poner en agitación magnética por 30 s y correr la muestra.

Tabla 10. Molaridad y relación molar de adiciones continuas de AFEN a G

Punto	Vol. Acumulado (ACET) (μ L)	Molaridad de acetaminofén	Relación molar
1	20	3.32 e^{-4}	1.06
2	40	6.64 e^{-4}	2.01
3	60	9.94 e^{-4}	3.01
4	80	1.32 e^{-3}	4.01
5	100	1.65 e^{-3}	5.02
6	120	1.98 e^{-3}	6.03
7	140	2.30 e^{-3}	7.03
8	160	2.63 e^{-3}	8.05
9	180	2.96 e^{-3}	9.05
10	200	3.28 e^{-3}	10.04
11	220	3.60 e^{-3}	11.06
12	240	3.93 e^{-3}	12.07
13	260	4.25 e^{-3}	13.07
14	280	4.57 e^{-3}	14.08
15	300	4.89 e^{-3}	15.09
16	320	5.21 e^{-3}	16.10
17	340	5.53 e^{-3}	17.10
18	360	5.85 e^{-3}	18.11
19	380	6.16 e^{-3}	19.11
20	400	6.48 e^{-3}	20.12

II) Adición de acetaminofén a una solución de adenina

i) Concentración menor

Instalar un sistema en una celda agregando 15 mL de la una solución de adenina a una concentración de 50 μ g/mL, agregar 20 μ L en cada adición de una solución de acetaminofén a una concentración de 3.775 mg/mL, poner en agitación magnética por 30 s y correr la muestra. Seguir el procedimiento utilizado para guanina que se muestra en la tabla 9

ii) Concentración mayor (1:10)

Instalar un sistema en una celda agregando 15 mL de la una solución de adenina a una concentración de 50 μ g/mL, agregar 20 μ L en cada adición de una solución de acetaminofén a una concentración de 3.775 mg/mL, poner en agitación magnética por 30 s y correr la muestra. Seguir el procedimiento que se muestra para guanina que se muestra en la tabla 10 .

iii) Aplicación de potencial

Se seleccionó el sistema 2 de interacción para aplicar potencial

a) Adenina

- i) Preparar un control de acetaminofén a la misma concentración del sistema 2 (15 mL buffer + 200 μ L acetaminofén)
 - ii) Correr solo adenina como un segundo control [50 μ g/mL]
 - iii) Preparar el sistema 2 y aplicar un potencial de 0.55 V a los 1, 2 y 3 min.
- b) Guanina
- i) Preparar un control de acetaminofén a la misma concentración del sistema 2 (15 mL buffer + 300 μ L acetaminofén)
 - ii) Correr solo adenina como un segundo control [50 μ g/mL]
 - iii) Preparar el sistema 2 y aplicar un potencial de 0.55 V a los 1, 2, 3, 4 y 5 min.

PREPARACIÓN DE ELECTRODOS DE GRAFITO

1) Preparación de la mezcla

- I) Pesar de 300 a 400 mg de polvo de grafito para cada electrodo y agregar la misma cantidad de peso de aceite mineral (1:1)
- II) Revolver poco a poco hasta obtener una pasta homogénea con apariencia semisólida

2) Empaquetamiento

- I) En un tubo de plástico 5 mm colocar la pasta poco a poco evitando formar burbujas de aire dentro del tiro
- II) En una punta del electrodo colocar el conductor eléctrico (Fig. 6) que irá conectado con un caimán al potencióstato

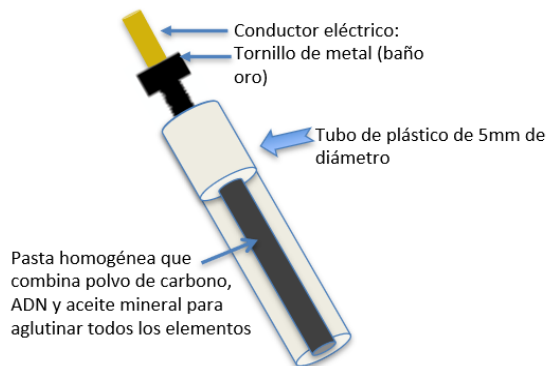


Fig. 6a) Esquema de electrodo de grafito, b) Instalación de la celda electroquímica con los 3 electrodos

3) Pruebas

- I) En una celda electroquímica colocar un poco de buffer hasta que la superficie del electrodo de grafito, la del electrodo de referencia (Ag/AgCl) y auxiliar (platino) queden totalmente cubiertos sin tener alguna burbuja en la superficie de los anteriormente mencionados.

- II) Correr varias veces el ciclo limpiando la superficie del electrodo en cada corrida hasta observar que no haya alguna contaminación y observar la sobreposición de los voltamperogramas.

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON LOS ELECTRODOS DE GRAFITO

A partir de la metodología realizada con los electrodos SPE se seleccionaron los siguientes experimentos para desarrollarse con los electrodos de grafito:

1) Análisis individual de las especies utilizadas

a) Preparación de las muestras

A partir de la metodología mencionada anteriormente preparar 50 mL de una solución de adenina, guanina y acetaminofén a 50 µg/mL.

b) Caracterización de acetaminofén, guanina y adenina por DPV

- i) Instalar una celda electroquímica en la cual se agregarán 15 mL de la solución de la especie a caracterizar
- ii) Colocar los electrodos dentro de la celda revisando que no tengan burbujas
- iii) Correr la muestra (con las condiciones anteriormente mencionadas) varias veces hasta observar un empalme en los voltamperogramas. Limpiar la superficie del electrodo entre cada corrida
- iv) Repetir este procedimiento para las tres especies

c) Preparación curvas de calibración

i) Acetaminofén

Preparar una solución stock de 7.55 mg/mL pesando 37.5 mg de AFÉN y diluir en 10 mL de metanol. Con la solución stock previamente preparada, realizar la curva de calibración por triplicado como se indica en la siguiente tabla.

Tabla 11. Diluciones para curva de calibración de Acetaminofén

Concentración	Concentración de sol. stock	Alícuota	Aforo
15 µg/mL	7.55 mg/mL	100 µL	50 mL
30 µg/mL		200 µL	
45 µg/mL		300 µL	
60 µg/mL		400 µL	
75 µg/mL		500 µL	

ii) Guanina

Realizar una solución stock a una concentración de 1 mg/mL, de esa solución tomar una alícuota de 2 mL y llevar a aforo de 10 mL con buffer de acetatos pH 4.5. Posteriormente, preparar la curva de calibración por triplicado con las diluciones indicadas en la tabla 12.

Tabla 12. Diluciones para curva de calibración de Guanina

Concentración	Concentración de sol. stock	Alícuota	Aforo
1.6 µg/mL	200 µg/mL	400 µL	50 mL
1.8 µg/mL		450 µL	
2 µg/mL		500 µL	
2.2 µg/mL		550 µL	
2.4 µg/mL		600 µL	

- iii) Adenina
Preparación de curva de calibración a las mismas concentraciones y diluciones indicadas en la metodología “Experimentos realizados con los electrodos de grafito sección 1) inciso c) apartado ii”).
- d) Estudio de velocidad de barrido para acetaminofén
El estudio de velocidad de barrido se realizó siguiendo la metodología que se utilizó para realizar este estudio con los electrodos SPE, con la diferencia del cambio de concentración (50 µg/mL)

2) Preparación de los sistemas de interacción Acetaminofén-bases nitrogenadas

Siguiendo la relación molar

- Acetaminofén-adenina
- Acetaminofén-guanina
- Acetaminofén-mezcla de ambas bases

3) Aplicación de potencial a los sistemas de interacción

- Acetaminofén-adenina
- Acetaminofén-guanina
- Acetaminofén-mezcla de ambas bases

PREPARACIÓN DE BIOSENSORES A BASE DE DNA

1) Método de disolución de DNA (Método E)

- Preparar una solución buffer de fosfatos a pH 7.5 con Fosfato monobásico de potasio y Fosfato bifásico de potasio.
- Pesar 100 mg de DNA
- Disolver los 100 mg de DNA en 1 mL de buffer pH 7.5
- Colocar en un Thermo shaker a x rpm hasta formar una gelatina.
- A 250 mg de polvo de grafito agregar en DNA gelatinizado y el mismo volumen en peso (250 mg) de aceite mineral.
- Revolver poco a poco hasta obtener una pasta homogénea con apariencia semisólida.
- Para el proceso de empaquetamiento seguir el proceso del apartado 2 de la sección “Preparación de electrodos de grafito” del capítulo Materiales y Métodos.
- Realizar este proceso por triplicado.

2) Método por homogenización directa (Método A)

- I) En este método se utilizaron tres diferentes concentraciones de DNA:
 - a) Pesar 50 mg de DNA
 - b) Pesar 100 mg de DNA
 - c) Pesar 150 mg de DNA
- II) Pesar 250 mg de polvo de grafito y agregar el DNA y el mismo volumen en peso (250 mg) de aceite mineral.
- III) Revolver poco a poco hasta obtener una pasta homogénea con apariencia semisólida.
- IV) Para el proceso de empaquetamiento seguir el proceso del apartado 2 de la sección "Preparación de electrodos de grafito" del capítulo Materiales y Métodos.

Nota: Para cada diferente concentración de DNA, se utilizan 250 mg de polvo de grafito y la misma cantidad de aceite mineral

EXPERIMENTOS REALIZADOS CON BIOSENSORES

1) Análisis individual de biosensores y su reproducibilidad

- I) En una celda electroquímica colocar un poco de buffer hasta que la superficie del electrodo de grafito, la del electrodo de referencia (Ag/AgCl) y auxiliar (platino) queden totalmente cubiertos sin tener alguna burbuja en la superficie de los anteriormente mencionados.
- II) Correr varias veces el ciclo limpiando la superficie del electrodo en cada corrida hasta observar que no haya alguna contaminación y observar la sobreposición de los voltamperogramas.
- III) A partir de los resultados obtenidos, seleccionar el método y biosensor con las condiciones óptimas para realizar los estudios de interacción con AFEN

2) Análisis de interacción Acetaminofén-biosensor

- I) Agregar adiciones de AFEN en diferentes concentraciones hasta observar algún cambio en las señales características de las bases nitrogenadas

3) Aplicación de potencial a los sistemas de interacción

- I) Determinar la concentración y relación molar en la cual las señales de las bases nitrogenadas presentan un cambio
- II) Aplicar potencial a el (los) sistemas de interacción seleccionado (s)

RESULTADOS

1. Análisis con SPE

Caracterización electroquímica

Como se ha informado el AFEN se oxida a N-acetil-para-benzoquinoneimina (NAPQI) (Salehzadeh, H., 2021), en la Fig. 7 se presenta el comportamiento electroquímico de AFEN por voltamperometría cíclica, donde se observan las señales del proceso de oxidación y reducción, la relación de corrientes entre los picos anódico y catódico superior a 1, así como la diferencia entre los potenciales superior a 60mV es un indicativo de que el proceso redox del fármaco presenta una cinética de transferencia electrónica lenta. Por otra parte, el estudio de velocidad mostró que el proceso redox de AFEN está controlado por difusión, lo que se demuestra con el grafico de corriente en función de la raíz de velocidad de barrido con $r^2=0.99$, la ecuación que representa el comportamiento es $I_a=402.02 v^{1/2}-5.14$, $I_c=205.89v^{1/2}+19.54$. El voltamperograma de la Fig. 7, muestra que el acetaminofén tiene una corriente máxima de oxidación a 0.41V.

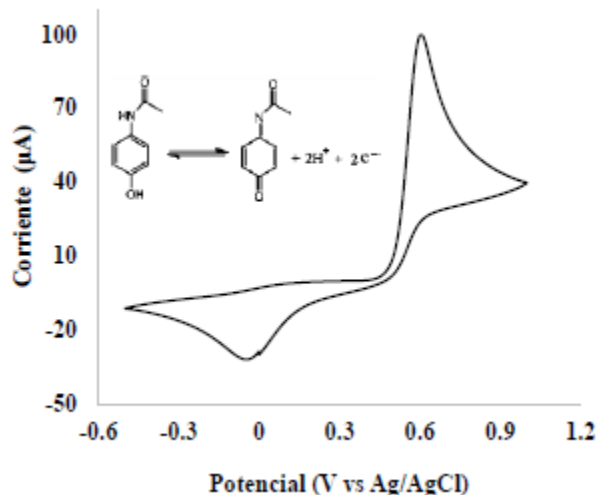


Fig. 7. VC de acetaminofén [50µg/ml] a 100mV/s, en SAA,0.1 M, pH 4.5, electrodo SPE

La interacción fármaco-bases púricas se analizó a partir de los VDPs, la Fig. 8A muestra la señal electroquímica característica del proceso de oxidación de acetaminofén, guanina y adenina, a 0.41 V, 0.78V y 1.10 V respectivamente, existe una separación de las señales cercana a 300 mV, por lo que no existe interferencia entre las señales de los analitos y es factible la determinación individual en una mezcla (Fig. 8B).

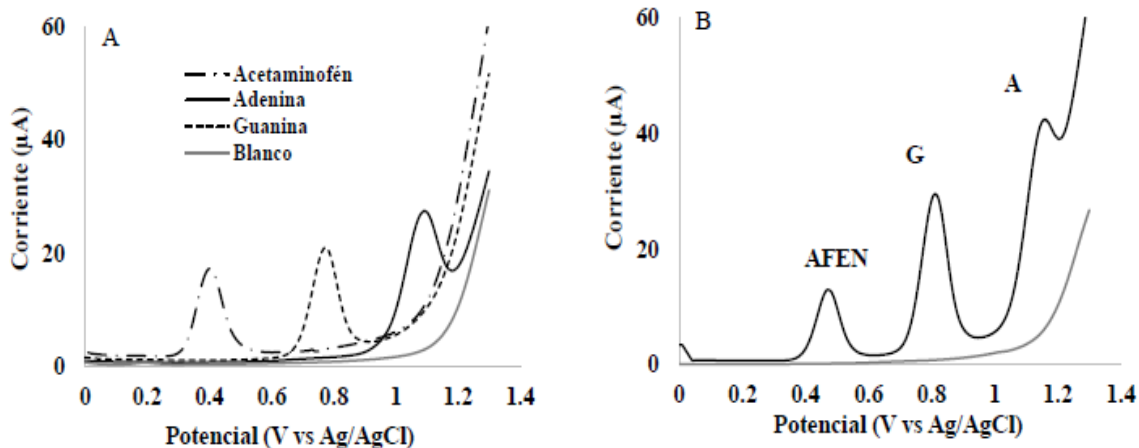


Fig. 8 A) VDPs de soluciones de acetaminofén, guanina y adenina por separado, a una concentración de 0.33mM, B) Mezcla de acetaminofén, guanina y adenina a pH 4.5, sobre un electrodo SPE

Análisis cuantitativo

Para la determinación cuantitativa de las bases púricas se evaluó la relación lineal entre la corriente de oxidación máxima y la concentración, en el intervalo de 20-100 µg/ml. Las ecuaciones que representan las curvas de calibración son:

$$\text{Guanina: } I_{pa}(\mu\text{A}) = 0.461C (\mu\text{M}) + 1.26; r^2=0.996$$

$$\text{Adenina: } I_{pa} (\mu\text{A}) = 0.517C (\mu\text{M}) + 0.921; r^2=0.995$$

1.2 Efecto de la concentración de acetaminofén sobre guanina

Con el fin de conocer la interacción entre el fármaco y su producto de oxidación con la guanina, se analizó el efecto de la concentración de AFEN sobre la intensidad y potencial de la señal de la G (Fig. 9A), Se observa que la señal de la base disminuye hasta casi desaparecer y el potencial de la señal de oxidación de la guanina se desplaza 80mV más positivo (Fig. 9A). Un aspecto importante es que la señal de la guanina se inhibe cuando la concentración del fármaco es 20 veces mayor que la de la G. Por lo anterior se elige un sistema con una relación molar 5:1 AFEN /guanina para poder hacer el seguimiento en la interacción en función del tiempo de oxidación de AFEN, en estas condiciones los cambios producidos por la concentración de AFEN sobre la corriente de G no son significativos ($\Delta I < 10\%$ y $\Delta E < 50\text{mV}$).

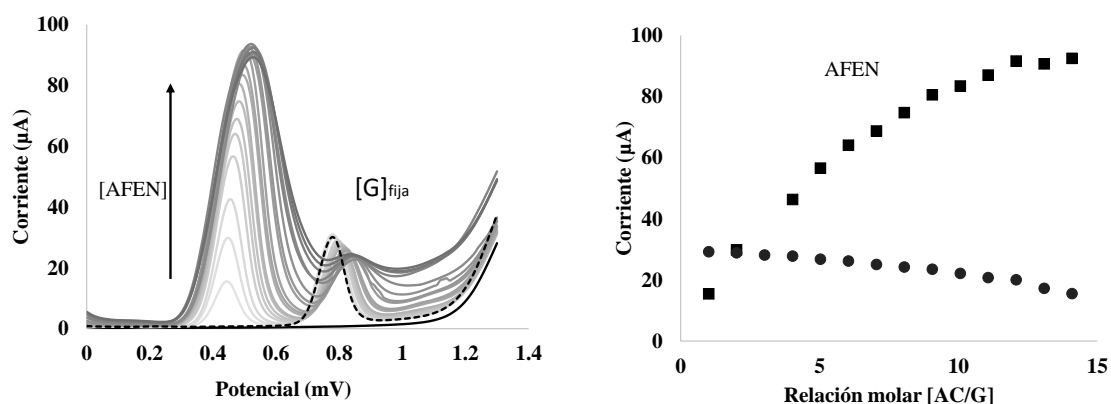


Fig. 9. A) VDPs de la interacción de G con AFEN a diferentes concentraciones. B) Efecto de la concentración de AFEN [0.3 a 6 mM] sobre G [0.3 mM].

1. Efecto de la concentración de acetaminofén sobre adenina

El efecto del incremento de la concentración de acetaminofén sobre la señal de adenina (Fig. 10A), no tiene impacto a concentraciones bajas, donde la señal de A permanece sin cambios significativos. Cuando la concentración del fármaco es 8 veces mayor respecto a la de la base, la señal de la adenina no es cuantificable, es decir la adenina es inhibida por el acetaminofén. Para el AFEN se presenta un comportamiento lineal de la corriente en función del incremento en la concentración, y a concentraciones altas se presenta un desplazamiento en el potencial de 50mV. Cabe mencionar que el tiempo de interacción no rebasa los 2min en cada concentración. Para el seguimiento de la interacción fármaco-adenina al imponer un potencial de oxidación se seleccionó un sistema con una relación molar 5:1 AFEN/ A (Fig. 10B), donde los cambios producidos por la concentración de AFEN sobre A son pequeños ($\Delta I < 10\%$ y $\Delta E < 50\text{mV}$).

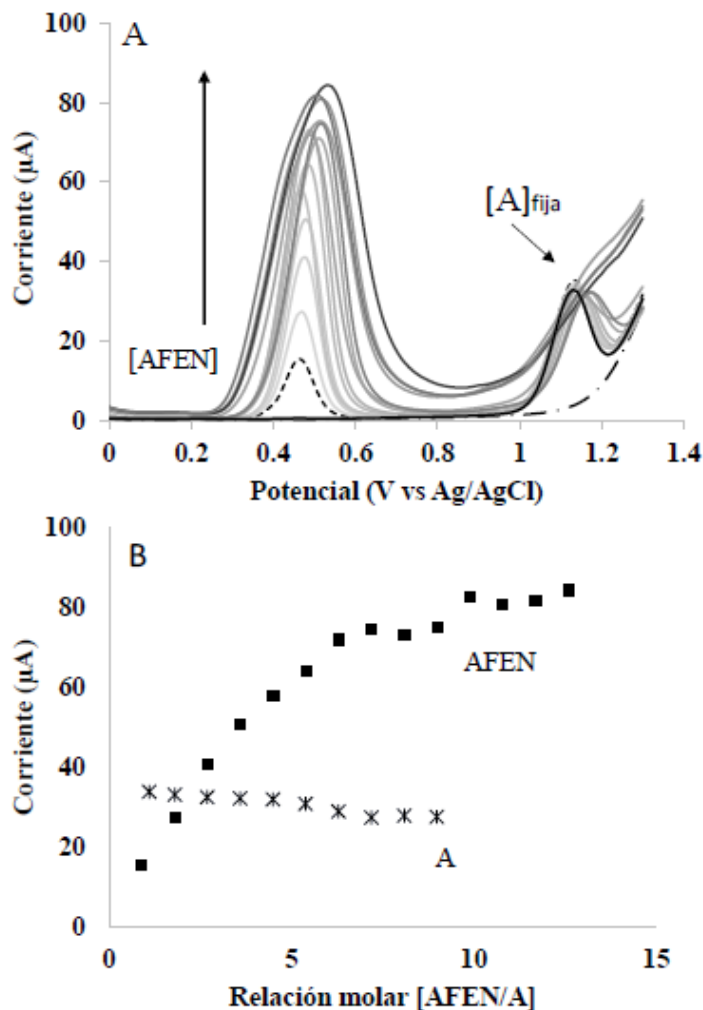


Fig. 10. A) VDPs de la interacción de A con AFEN a diferentes concentraciones. B) Efecto de la concentración de AFEN [0.3 a 4.5 mM] sobre A [0.3 mM].

2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo por la NAPQI, el producto de la oxidación de AFEN fue evaluado con la imposición al electrodo de un potencial de oxidación de 0.55V durante diferentes tiempos. Cuando el potencial se aplica tres minutos y después se evalúa el VDP la señal del AFEN disminuye significativamente (42%) y la especie oxidada se debe incrementar sobre la superficie del electrodo, lo que da lugar a la señal al tiempo indicado (Fig. 11), otro indicativo de la presencia de la especie oxidada de paracetamol es el desplazamiento del potencial (40mV), el cambio en la amplitud del pico, así como el desplazamiento en la línea base.

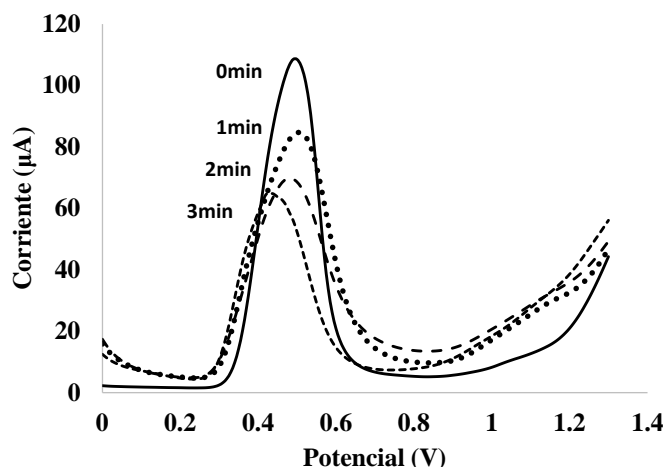


Fig. 11. VDP acetaminofén [2.2 mM] con estrés oxidativo a diferentes tiempos de potencial de aplicación ($E_a=0.55V$)

3. Interacción Acetaminofén guanina y Acetaminofén adenina

Para evaluar el efecto de la especie oxidada de acetaminofén sobre la guanina, fue necesario conocer el impacto del potencial aplicado sobre guanina en ausencia del acetaminofén. La fig. 12A, muestra que la guanina no presenta ninguna alteración sobre el potencial de oxidación, sin embargo, el valor de la corriente del pico tiende a disminuir ligeramente de acuerdo con el tiempo de aplicación de potencial (25% en 15 min). La disminución en la corriente se asocia a la disminución en la concentración de la guanina; se propone que existe la oxidación a subpotencial. Por otra parte, en el estudio de la interacción del fármaco con guanina ($[AFEN/G]=5:1$) en condiciones de estrés oxidativo, ver Fig. 12B, se encontró que al aplicar el potencial por 5min, tanto la señal del AFEN como de la G disminuyen de forma significativa, la aparición de una señal nueva en la ventana de potencial de 0.2 a 0.35V sugiere la formación de una nueva especie. Considerando que la nueva señal aumenta con tiempo de exposición de la guanina con el producto de oxidación del fármaco, entonces en $E_a=0.34V$ se propone un producto generado a partir de la interacción AFEN-guanina, en particular se ha reportado que la guanina puede formar puentes de hidrogeno entre los grupos amino de la base y grupos funcionales como $C=O$ de otras especies, por lo que no se descarta que exista este tipo de interacción entre el producto de oxidación del acetaminofén y la guanina. La inhibición de la señal de la guanina es otro indicativo de esta posible interacción.

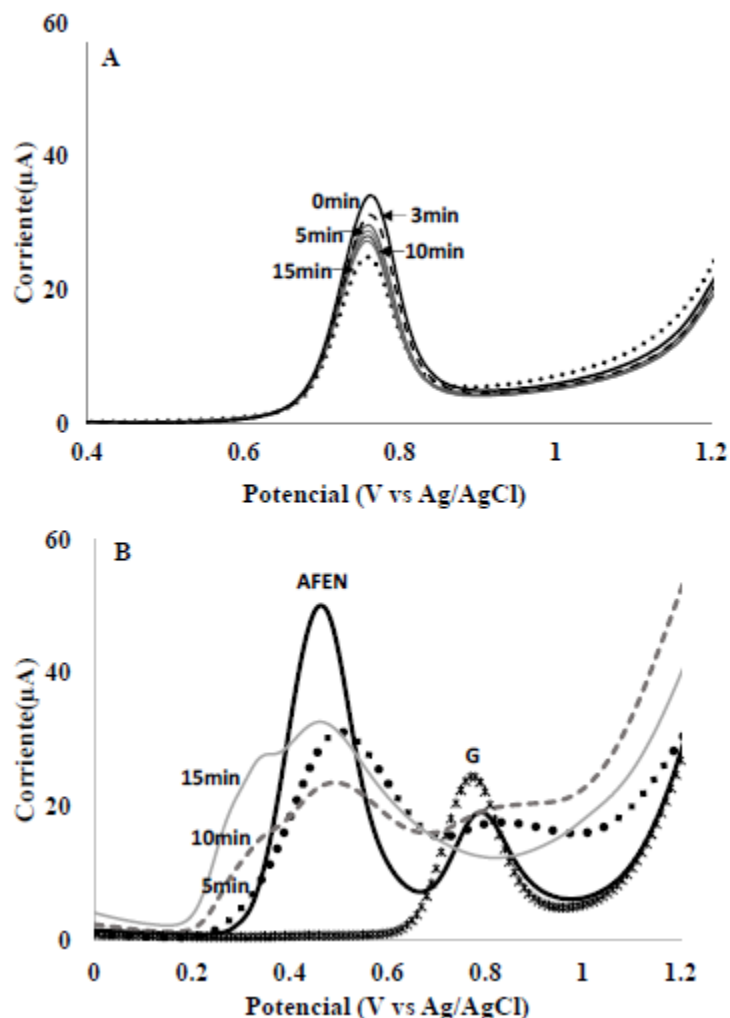


Fig. 12. Efecto del potencial (0.55V) aplicado A) guanina B) guanina en presencia de acetaminofén (1.5mM) durante 0, 5, 10 y 15min.

Para el análisis de la interacción del AFEN con adenina, primero se evaluó el efecto de imponer un potencial de oxidación de 0.55V sobre la señal de adenina y se encontró que no hay cambios significativos sobre la corriente ó sobre el potencial de oxidación de la base (Fig. 12A). En el caso de la relación molar AFEN/A 5:1 Fig. 12B, la señal de adenina disminuye hasta desaparecer después del primer minuto de generación del producto de oxidación del fármaco, Los cambios en la señal del AFEN sugieren que disminuye la concentración del AFEN y que su proceso de oxidación se modifica ya que el potencial de pico se desplaza y el ancho es mayor.

4. Interacción de la NAPQI con mezcla guanina-adenina en condiciones de estrés

En el estudio de la interacción AFEN: A: G (Fig. 14) a una relación molar 10:1:1, a través de los VDPs muestra que la especie oxidada del fármaco y las bases púricas interactúan, y que la señal de guanina y adenina tienden a desaparecer cuando están expuestas por más tiempo al producto de oxidación del AFEN, la base púrica que sufre mayor efecto es la adenina, pues la señal ya no es detectada en los primeros 5 min. de interacción con la especie NAPQI.

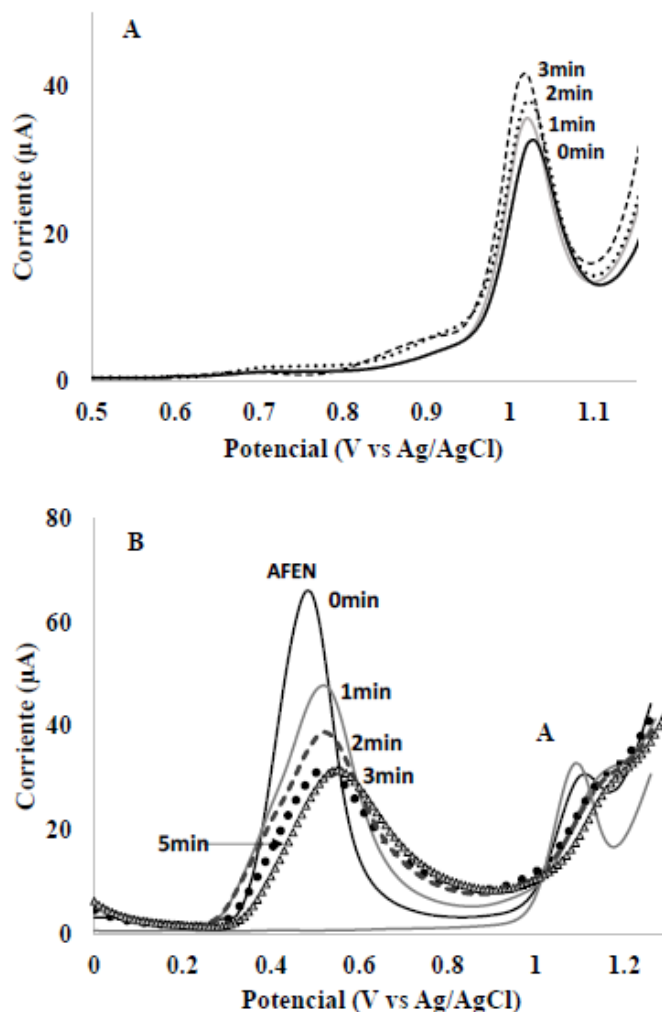


Figura 13. VDPs Efecto del potencial (0.55V) aplicado sobre a) adenina b) adenina en presencia de acetaminofén [2mM] durante 0, 1, 2 y 2 min.

De la misma forma que en la Fig. 12, en la interacción entre el AFEN, NAPQI y guanina, se observa la aparición de una señal en la ventana de potencial 0.2 a 0.42 V. Se puede proponer que interacciones individuales de bases con el fármaco se conoce que la guanina contribuye fuertemente a la formación de la especie que se oxida en 0.34V, así también se observa que la línea base (corriente capacitiva) tiende a incrementar como un resultado de la interacción lo que no se observa en las Figuras 12 y 13.

Las interacciones entre el acetaminofén y de la NAPQI con las bases púricas pueden asociarse a la formación de enlaces tipo puente de hidrogeno siendo mayores en el producto de oxidación del fármaco con la base, ya que la formación de la quinona facilita la interacción con la base a través de los grupos C=O C=N NH de los 4 compuestos. Otro mecanismo reportado en estudios electroquímicos indica la presencia de especies degradadas de guanina a potenciales inferiores a la oxidación de la base, usualmente involucra la formación de radicales libres que dan origen a la formación de 8-oxoguanina o bien 8-oxoadenina (Hassani et al, 2021, Oliveira-Brett et al, 2002, 2002), por lo que no se descarta que en los sistemas evaluados se generen radicales libres favoreciendo la formación de las especies de las bases púricas antes mencionadas, ya que sólo la combinación degradación de fármaco y las bases púricas presentan la señal en 0.38V.

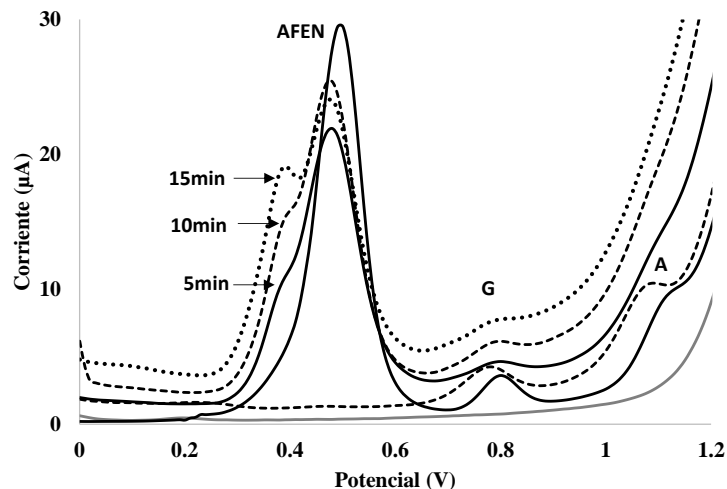


Figura 14. Interacción Acetaminofén ($5e^{-5}M$) guanina, adenina (relación molar 10:1:1) con aplicación de potencial 0.55V, en solución amortiguadora pH = 4.5

Los resultados anteriormente presentados se encuentran publicados en la revista: Padi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI vol. 11, fecha: 2023/4/28 “Interacción acetaminofén-bases nitrogenadas de DNA, un estudio electroquímico”

2. Análisis con electrodos de grafito

Los electrodos pueden ser modificados para mejorar la especificidad y sensibilidad de estos, dando paso a los denominados biosensores, el cuál es el propósito de la presente investigación. Para poder obtener biosensores a base de DNA que sean más duraderos, eficaces y sin problemas de fijación como lo es en caso de usar SPE fue necesario cambiar de tipo de electrodo. Los más efectivos para este proceso son los electrodos de pasta de grafito como electrodo de trabajo. Debido a algunas variaciones entre los electros SPE y los de grafito fue necesario repetir alguno de los estudios realizados para la interacción de DNA-acetaminofén antes de realizar las pruebas correspondientes. Cabe mencionar, que el área de los electrodos de grafito es mayor que las de los SPE por lo tanto fue necesario disminuir la concentración de los analitos para obtener buenas señales ya que a mayor área de la superficie del electrodo, la altura de la señal aumenta. La relación molar utilizada para estos análisis fue de AFEN:A/G 20:1

1. Caracterización

En la fig. 15, se muestra que a pesar de hacer cambios en los electrodos las tres especies utilizadas para el estudio, acetaminofén, guanina y adenina tienen señales claras y picos definidos en 0.57, 0.85 y 1.1 V respectivamente, además de una diferencia de al menos 250 mV entre cada señal, permitiendo así realizar los siguientes estudios de interacción sin interposición alguna de señales que perjudique la investigación.

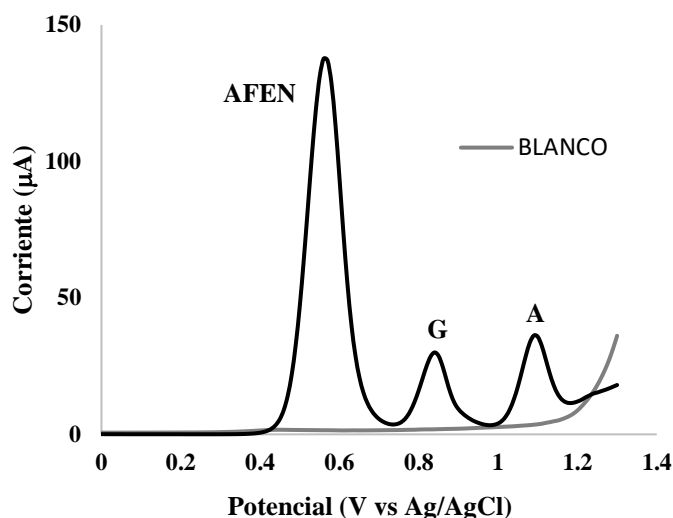


Fig. 15. VDP de mezcla de acetaminofén [2.49 mM], guanina y adenina a una concentración de [0.165 mM y 0.185 mM] a pH 4.5, sobre un electrodo de trabajo a base de grafito

Al ya haber realizado un estudio de efectos del aumento de concentración de acetaminofén sobre las bases nitrogenadas (A y G) y conocer en qué relaciones molares (AFEN: A/G 10:1) las especies presentan interacción se establecieron las condiciones para realizar los estudios de estrés oxidativo por la NAPQI y en su caso corroborar los resultados obtenidos por medio de los SPE a concentraciones mayores de AFEN:A/G 10:1.

3. Interacción Acetaminofén guanina y Acetaminofén adenina

Análisis cuantitativo

Al igual que en el análisis con SPE para la determinación cuantitativa de A y G, se evaluó la relación lineal entre la corriente de oxidación máxima y la concentración, en el intervalo de 1.6-2.4 µg/ml. Las ecuaciones que representan las curvas de calibración son:

$$\begin{aligned} \text{Guanina: } I_{pa}(\mu\text{A}) &= 3.162C (\mu\text{M}) - 1.0992; r^2=0.9985 \\ \text{Adenina: } I_{pa} (\mu\text{A}) &= 2.3859C (\mu\text{M}) + 7.8054; r^2=0.9975 \\ \text{Acetaminofén: } I_{pa} (\mu\text{A}) &= 0.6391C (\mu\text{M}) + 0.6263; r^2=0.9995 \end{aligned}$$

En comparación con el análisis cuantitativo de las bases sobre SPE se resalta que este electrodo presenta mayor sensibilidad en ambas bases, así mismo la respuesta de la señal analítica es lineal en función a la concentración.

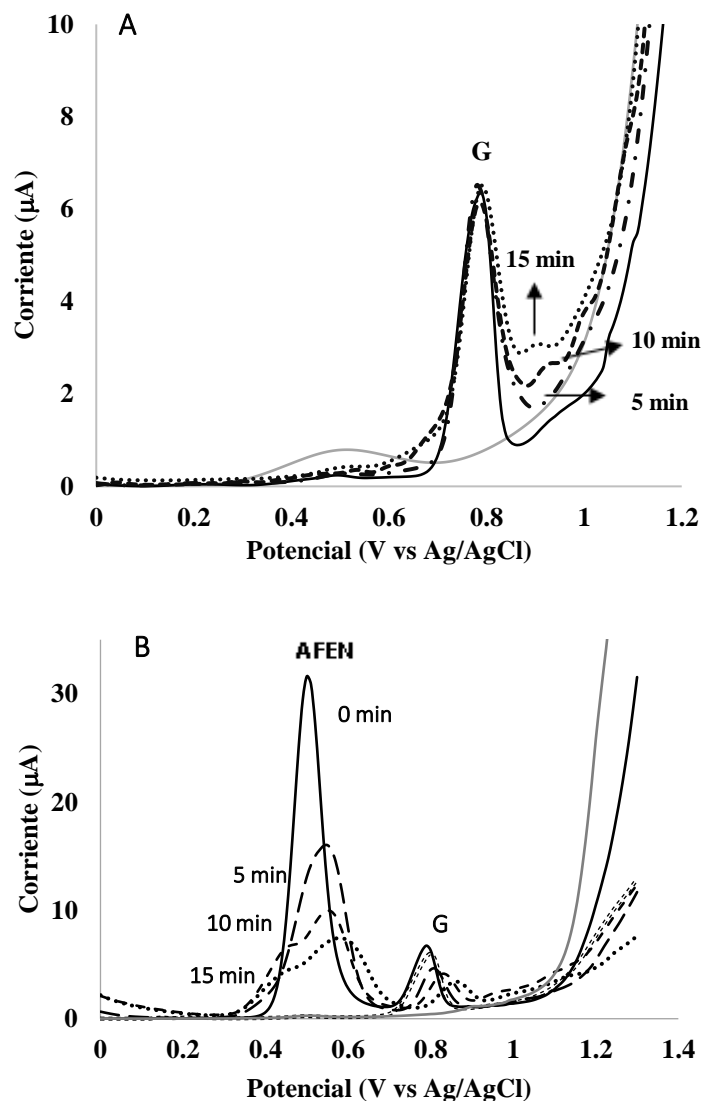


Figura 16. Efecto del potencial (0.55V) aplicado A) guanina [0.0147 mM] B) guanina en presencia de acetaminofén [0.3009 mM] relación molar 20:1 durante 0, 5, 10 y 15min.

Para corroborar que efectivamente el desplazamiento y disminución de las señales de guanina sea causado por la interacción de AFEN y NAPQI, se realizaron controles aplicando el mismo potencial de 0.55 V al electrodo y siendo expuesta solamente G a los mismos tiempos de potencial aplicado. Los resultados muestran que no ocurre algún cambio significativo tanto en el potencial como en la corriente incluso aumentando el tiempo de exposición de guanina al estrés oxidativo. En la Fig. 16A, se observa cómo solo ocurre un ligero cambio a los 10 y 15 minutos de la exposición de G formándose nueva señal a potencial similar al de la señal característica de G. En la Fig. 16B se muestra que al aumentar el tiempo de exposición de G a la especie oxidada de AFEN se observa inicialmente un desplazamiento de la señal de G así como una disminución en I de la señal tanto de G como AFEN, a los 5 minutos disminuye un 21% aprox., a los 10 un 68% y a los 15 un 51%, en el caso del potencial, G se desplaza hacia valores positivos hasta unos 80

mV. Al aumentar cada vez más el tiempo de exposición a estrés oxidativo, surge una nueva señal como sucedió en el análisis de interacción aplicando un potencial con los electrodos SPE (Fig. 12B)

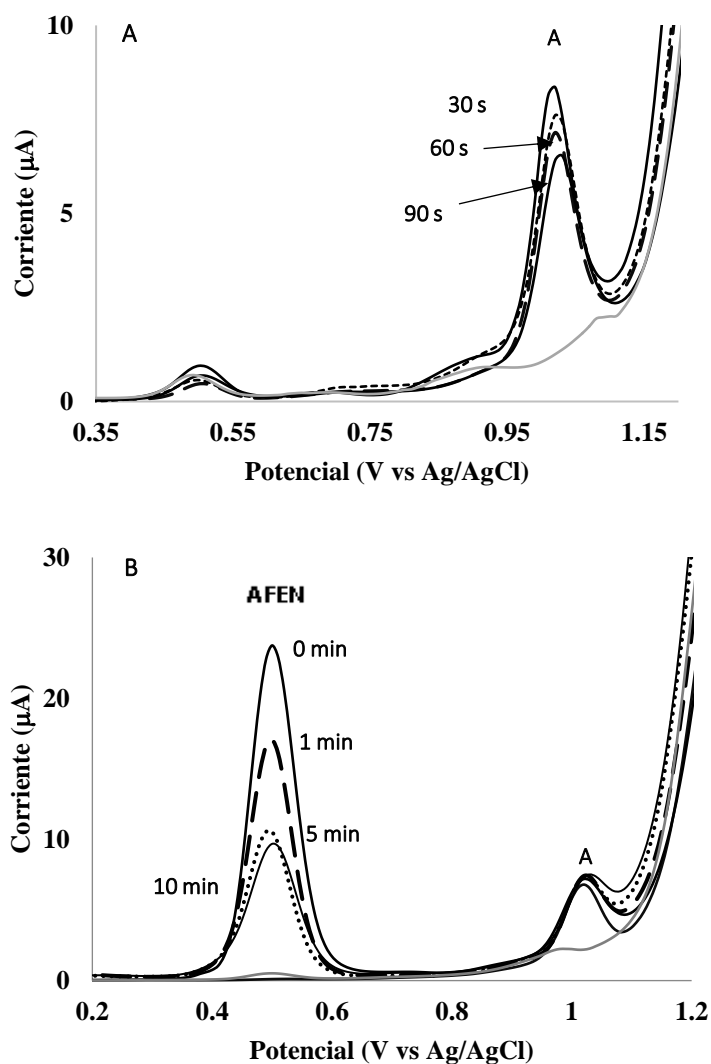


Figura 17. Efecto del potencial (0.55V) aplicado A) adenina [0.0148 mM] B) adenina en presencia de acetaminofén [0.3025 mM], relación molar 20:1 durante 0, 1, 5 y 10 min.

De igual manera, se aplicó el potencial a adenina, véase en la Fig. 17A, la corriente de aumenta ligeramente pero no ocurren cambios significativos por lo que los cambios observados en el estudio efectivamente corresponden a una interacción entre AFEN y las bases nitrogenadas. En el caso del estudio de estrés oxidativo de adenina (Fig 17B) donde el potencial de la base púrica no se desplaza, la intensidad de corriente de A disminuye y en general la señal característica de A se ve afectada al punto de casi desaparecer en el mayor tiempo de exposición (10 minutos) a AFEN y especie oxidada NAPQI.

2. Interacción de la NAPQI con mezcla guanina-adenina en condiciones de estrés

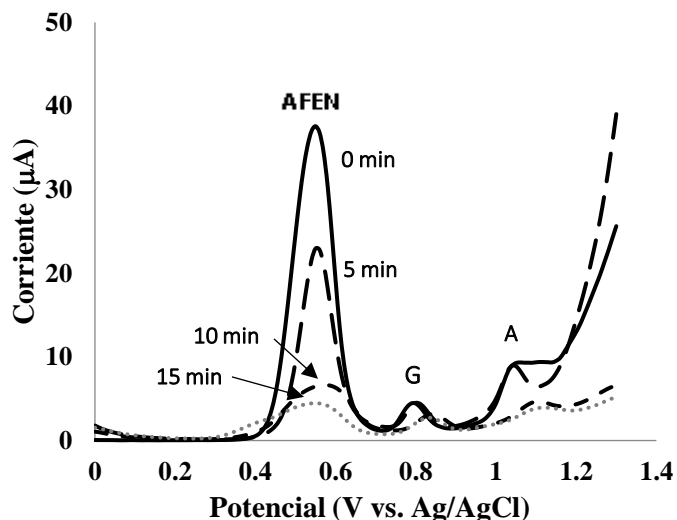


Figura 18. Interacción Acetaminofén (0.3001 mM) guanina, adenina (relación molar 20:1:1) con aplicación de potencial 0.55V, en solución amortiguadora pH = 4.5

En el caso de las mezclas 20:1:1 AFEN:A:G el cambio en las corrientes de AFEN, A y G (Fig. 18) son mayores los cambios en las tres especies analizadas en comparación con la aplicación del potencial a los sistemas de interacción de las bases individualmente, iniciando por AFEN que al incrementar el tiempo de exposición se observa una gran disminución de la corriente de este, y de igual manera una ligera nueva señal que nos indica la formación de una nueva especie. Por otro lado, A prácticamente desaparece; a los 5 minutos de exposición al potencial hay un cambio tanto en potencial como en intensidad de corriente (disminución del 30%), se desplaza hacia valores positivos y de igual manera, G tiene cambios tanto en el potencial como en la intensidad. Ambas bases nitrogenadas, G y A, a los 10 minutos de exposición a la microelectrolisis pierden más del 50% de I (52% y 55%, respectivamente). Cuando se llega al mayor tiempo de exposición (15 min) las tres especies están prácticamente degradadas y en el caso de AFEN se observan dos señales prácticamente juntas. (Esto puede ser debido a la cantidad o concentración de especie oxidada que se está generando).

Las señales obtenidas a través de los voltamperogramas son herramientas que a partir de curvas de calibración y de la regresión lineal de datos, se obtuvieron resultados cuantitativos. En la tabla 13 se muestra el porcentaje de residuos de G y A mediante la medición de la corriente del pico de los gráficos de las figuras 16B, 17B y 18 para determinar la cantidad inicial y porcentaje conforme aumenta el tiempo de exposición de las bases nitrogenadas con adición de AFÉN a las condiciones de estrés anteriormente mencionadas.

Tabla 13. Porcentaje de degradación de A y G en los sistemas de interacción G:AFEN, A:AFEN y A:G:AFEN expuestos a condiciones de estrés en diferentes tiempos de exposición a un potencial de 0.55 V

Tiempo de exposición	Sistema G:AFEN	Sistema A:AFEN	Sistema mezcla A:G:AFEN	
	% de G	% de A	% de A	% de G
Control*	100	100	100	100
0 min	100	92.83	71.19	70.96
5 min	78.93	91.21	64.91	70.16
10 min	62.68	83.07	48.15	45.90
15 min	49.07	72.01	45.53	SI**

*El control es la señal de la base nitrogenada y mezcla sin adición de AFEN

**SI=Señal imperceptible

3. Biosensores

1. Pruebas a los biosensores

Para la preparación de biosensores de DNA utilizando los métodos descritos en el apartado de METODOLOGÍA (Preparación de biosensores) se realizaron 3 biosensores por dos métodos: Los E1, E2 y E3 (por disolución de DNA) y los A1, A2 y A3 (por homogenización directa).

Para realizar los biosensores por el método E se utilizó la misma concentración de DNA en cada uno, en la FIG19 se muestran los voltamperogramas de cada biosensor donde solo se observa una señal (G) en los tres casos, además de que las corrientes obtenidas para esta base nitrogenada son diferentes no solo entre cada biosensor si no entre cada voltamperograma de un mismo biosensor, los cambios representes entra las corrientes son significativos por lo que ningún biosensor cuenta con reproducibilidad.

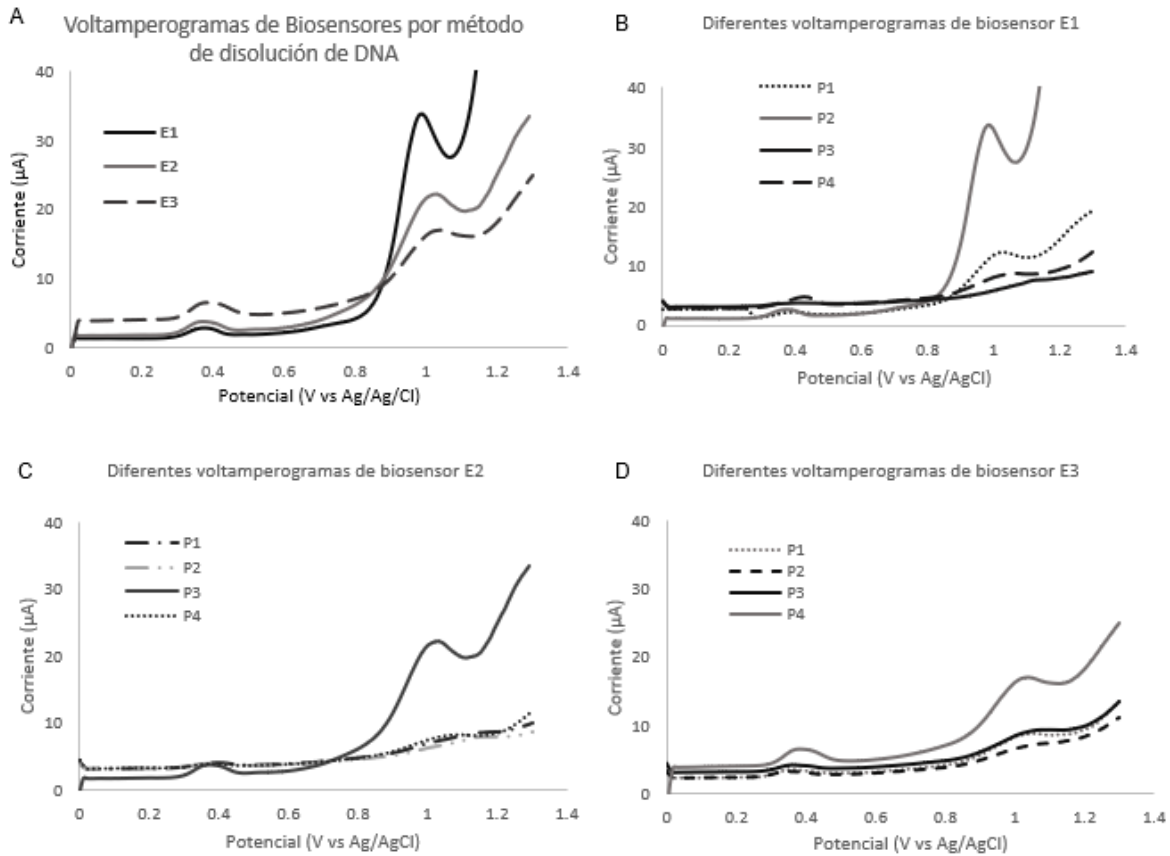


Fig. 19. Voltamperogramas de biosensores hechos por el método de disolución de DNA a) Biosensores E1, E2 y E3 b) Pruebas de reproducibilidad del biosensor E1 c) Pruebas de reproducibilidad del biosensor E2 d) Pruebas de reproducibilidad del biosensor E3

Respecto a los biosensores realizados por el método A (Método de homogenización directa) se utilizaron diferentes concentraciones de DNA para cada uno, por lo que las corrientes de las bases nitrogenadas serán diferentes entre sí (Fig. 20A). Se observaron diferencias en las señales de los voltamperogramas con respecto al método anterior puesto que con los electrodos A1 y A3 se observan las señales de las bases nitrogenadas de interés en este reporte (G y A), además de que en el biosensor A2 se observó una tercera señal que de acuerdo a lo reportado en la bibliografía se trata de la señal de la base Timina (T) por lo que el método A fue seleccionado como el que muestra resultados más reproducibles. Para la selección del biosensor utilizado para las pruebas de interacción DNA-AFEN se tomaron diferentes criterios a consideración

1. Que los voltamperogramas presenten la menor cantidad de señales ruido que puedan interferir en la interpretación de los resultados del estudio
2. Que no se muestren otras señales (contaminación) más que las características de A, G y en dado caso las señales de alguna otra base nitrogenada (T y C)
3. Que la corriente (altura del pico, eje de Y) y potencial (eje de X) de las señales de cada base no cuente con una diferencia significativa entre cada corrida de prueba

del biosensor, es decir, en su sistema de celda electroquímica que contenga solución buffer de acetatos pH 4.5 como blanco.

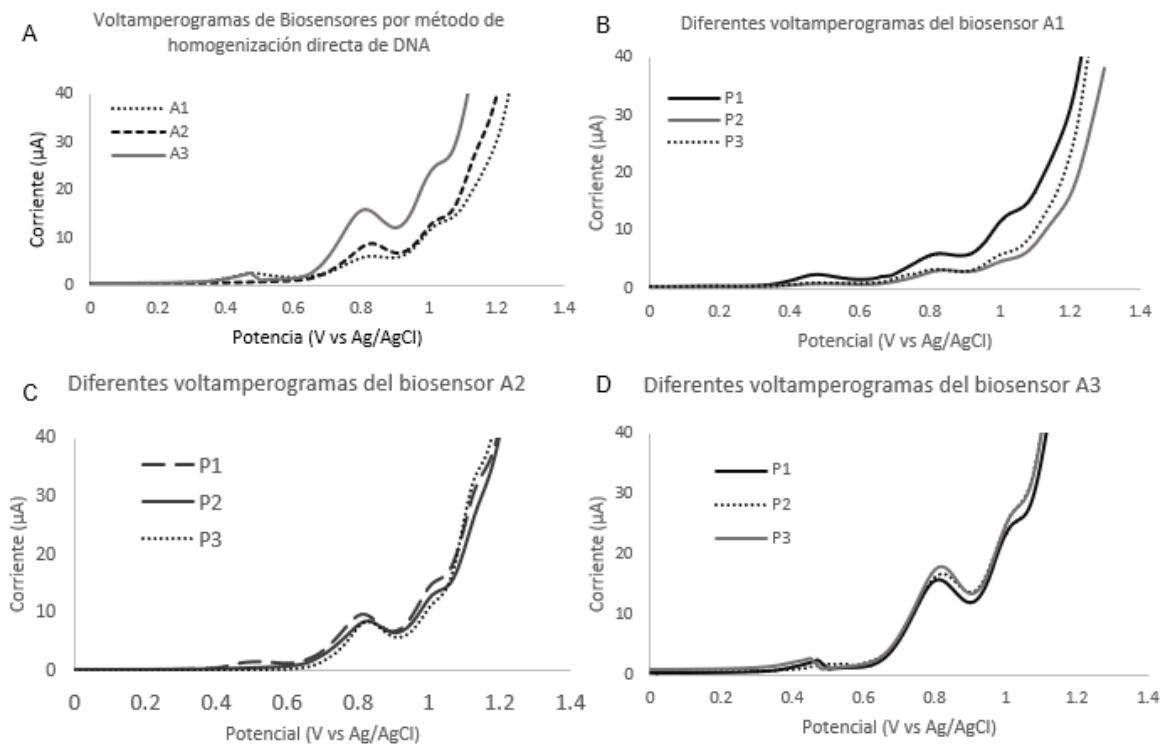


Fig. 20. Voltamperogramas de biosensores hechos por el método de disolución de DNA a) Biosensores A1, A2 y A3 b) Pruebas de reproducibilidad del biosensor A1 c) Pruebas de reproducibilidad del biosensor A2 d) Pruebas de reproducibilidad del biosensor A3

En la tabla 13 se muestra la desviación estándar de la corriente entre las señales prueba de cada biosensor y de acuerdo con los criterios previamente mencionados se tomó como mejor opción el biosensor A2 para realizar las pruebas de interacción farmaco-biosensor.

Tabla 14. Valores de la corriente y desviación estándar de las corridas de prueba de los biosensores A1, A2 y A3

Repetición	Biosensor A1		Biosensor A2			Biosensor A3	
	Guanina	Adenina	Guanina	Adenina	Timina	Guanina	Adenina
No. 1	6.117	12.753	9.685	15.079	32.539	15.9	22.936
No. 2	3.260	5.144	8.642	14.761	28.730	16.778	25.396
No. 3	3.360	5.942	8.620	13.015	32.539	15.638	22.936
Desv. Est.	1.621	4.181	0.608	1.111	2.199	0.597	1.420

2. Interacción de AFEN-BIOSENSOR A BASE DE DNA

Para realizar el estudio de interacción de AFEN-DNA se analizaron dos concentraciones de AFEN con el fin de determinar el efecto de la concentración de AFEN sobre las bases

puricas del DNA de salmón, donde como ya se ha establecido los cambios sobre las señales de DNA están asociados con la interacción con el fármaco.

En los voltamperogramas de la adición de AFEN al biosensor A2 se observa cambios tanto en la corriente de las señales de A, G y T así como en el potencial de éstas. De igual manera, se observa una pequeña nueva señal que es indicativo de una posible nueva especie.

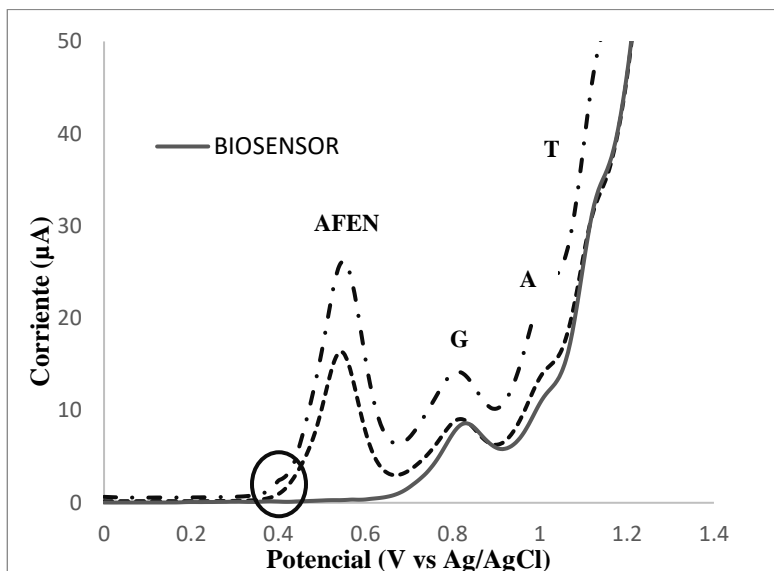


Fig. 21. Voltamperograma de adición de AFEN a biosensor A2 a concentraciones de (0.1 mM y 0.2 mM)

Para la cuantificación de ADN, se realizó una interpolación con las curvas de calibración previamente realizadas en electrodos de grafito, se determinó que las concentraciones correspondiente a los residuos de Guanina y Adenina que en promedio(n=3) son equivalentes a 3.188 µg/mg y 4.865 µg/mg respectivamente.

Realizando una comparación de los cambios en las señales de las bases nitrogenadas en contradas en el biosensor con respecto a la adición de AFEN en diferentes concentraciones, se determinó que, sin importar la concentración de este fármaco, el efecto sobre el comportamiento del DNA es similar en ambos casos.

Posteriormente, se aplicó el potencial de 0.55 V a diferentes tiempos para favorecer la degradación de AFEN y determinar si existe o no interacción con el DNA. En la tabla 15 se encuentra el porcentaje de degradación de las bases nitrogenadas y AFEN a 0.1 mM con respecto al tiempo de exposición del potencial

Tabla 15. Porcentaje de degradación de A y G en el biosensor A2 adicionando AFEN A 0.1 mM expuestos a condiciones de estrés en diferentes tiempos de exposición a un potencial de 0.55 V

Tiempo de exposición	Biosensor (G)	Biosensor (A)	AFÉN
----------------------	---------------	---------------	------

	% de G	% de A	% de AFEN
Control*	100	100	100
10 s	89.85	SI	51.56
30 s	73.91	SI	38.23
60 s	59.42	87.5	26.89

*El control es la señal de la base nitrogenada encontradas en el biosensor y AFEN adicionado sin aplicación de potencial

**SI=Señal imperceptible

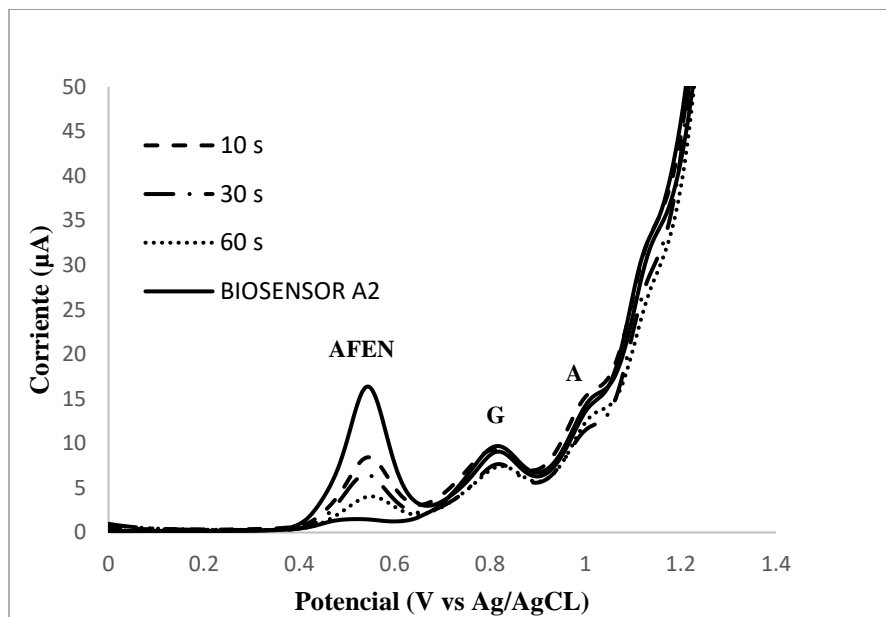


Fig. 22. Voltamperograma de la aplicación de potencial de 0.55 V a biosensor A2 adicionando AFEN a una concentración de 0.1 mM

En el caso de la señal de Adenina, el valor de la corriente es muy bajo, los voltamperogramas (Fig. 22), muestran el efecto de la degradación de AFEN sobre ambas bases, así como, la degradación de AFEN, donde claramente se observa que en 60s el fármaco se ha degradado más del 70%.

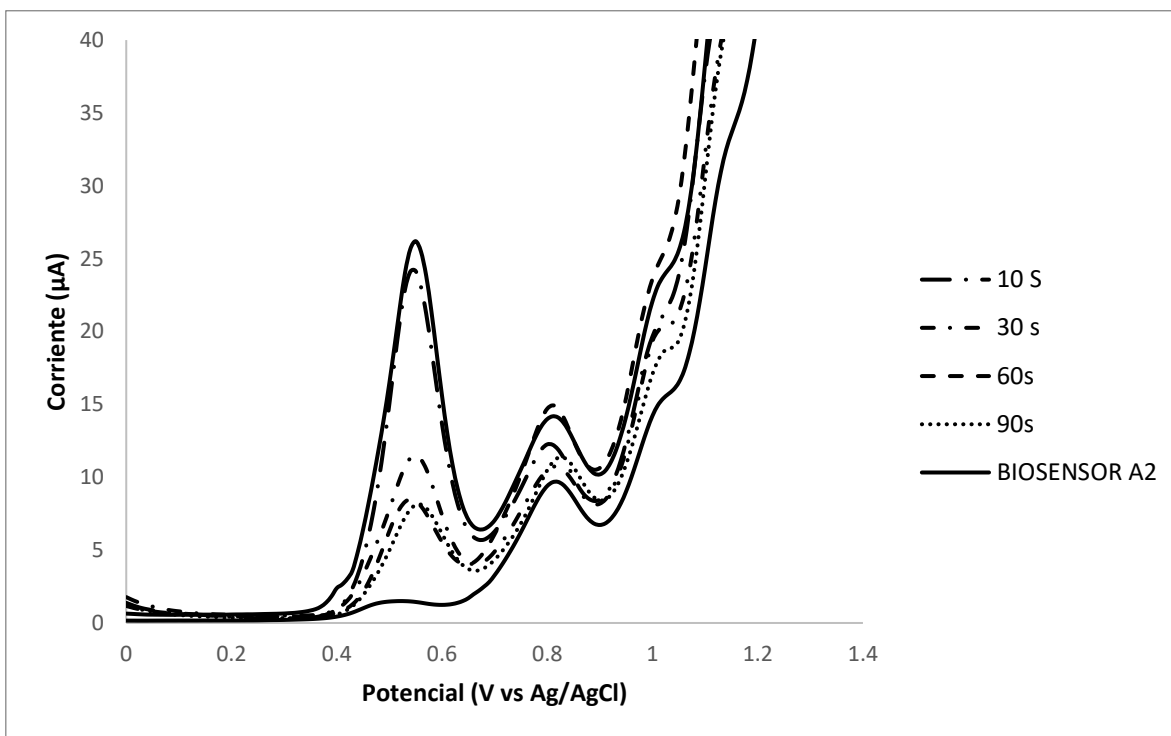


Fig. 23. Voltamperograma de la aplicación de potencial de 0.55 V a biosensor A2 adicionando AFEN a una concentración de 0.2 mM

Tabla 16. Porcentaje de degradación de A y G en el biosensor A2 adicionando AFEN A 0.2 mM expuestos a condiciones de estrés en diferentes tiempos de exposición a un potencial de 0.55 V

Tiempo de exposición	Biosensor (G) % de G	Biosensor (A) % de A	AFÉN % de AFEN
Control*	100	100	100
10 s	92.56	SI	92.62
30 s	90.90	SI	44.11
60 s	109.91	SI	33.28
90 s	83.47	118.75	31.08

*El control es la señal de la base nitrogenada encontradas en el biosensor y AFEN adicionado sin aplicación de potencial

**SI=Señal imperceptible

Como se puede observar tanto en los voltamperogramas como en la tabla de porcentajes de degradación, la diferencia en la señal de G y A no supera el 5% entre la exposición al estrés oxidativo durante 30 y 60 segundos, por lo que se puede determinar que la interacción entre las bases nitrogenadas y AFEN se mantiene a partir de un tiempo de

exposición de 60 s a un potencial de 0.55 V. Por otra parte, la presencia del producto de degradación de AFEN produce una pérdida en la concentración del DNA superior al 30%, en los primeros 60s de exposición Tabla 17.

De acuerdo a la ICH un fármaco no es apto para su uso si pierde el 10% de su concentración, por lo que, en las condiciones experimentales, se ha rebasado este criterio donde el fármaco sufre estrés oxidativo y los metabolitos generados tienen un efecto significativo sobre las bases púricas de DNA al perder cerca del 50% de su concentración inicial.

Partiendo de la información en la literatura donde existen parámetros voltamperométricos relacionados con la interacción fármaco-DNA (tabla 17), es decir que el parámetro voltamperométrico que cambie da una pauta sobre el posible mecanismo de interacción que esta ocurriendo entre el fármaco y el DNA.

De acuerdo a la tabla 17, se asocia que el mecanismo de interacción esta asociado con la formación de un complejo fármaco-DNA, favorecido por enlaces débiles como interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno entre los grupos amino y oxidrilo.

Tabla 17. Parámetros voltamperométricos relacionados con la interacción fármaco-DNA

CAMBIOS EN LAS BASES PÚRICAS	VALORES	MECANISMO DE ACCIÓN
POTENCIAL	POSITIVO	INTERCALATIVO
	NEGATIVO	ELECTROSTÁTICO
CORRIENTE	INCREMENTO	LIBERACIÓN DE LAS BASES PÚRICAS DE LA HEBRA
	DISMINUCIÓN	COMPLEJO ADN-FÁRMACO (COVALENTE/ELECTROSTÁTICO)
NUEVAS SEÑALES		FORMACIÓN DE NUEVAS ESPECIES

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en electrodos SPE, electrodos de grafito y biosensores, todos cuentan con similitudes. Una de ellas es la disminución de AFEN al aplicar un potencial en determinado tiempo de exposición. La presencia de este producto de degradación afecta al DNA, disminuyendo su concentración, es decir, que la corriente disminuye e igualmente se observan desplazamientos a potenciales positivos en las bases púricas. En diferentes casos se observa la aparición de una nueva señal dentro del voltamperograma, que si bien no es totalmente definida, conforme aumenta el tiempo de exposición al potencial esta señal se observa más. Todos estos cambios en los parámetros voltamperométricos puede estar relacionado a la formación de un complejo fármaco-DNA por medio de interacción electrostática debido a la disminución de la corriente, mientras que el desplazamiento de del potencial hacia valores positivos nos indica un mecanismo de interacción de intercalación.

REFERENCIAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Structure and Function of DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>
2. Brett, C.M.A. (2014). *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering || Electrochemistry*, -. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.10742-5
3. Castellanos Garzón, R. G., Barrios Peralta, E. R., Vides Velásquez, A. A., & Olarte, M. F. (2018). Actualización en la comprensión y manejo de la intoxicación por acetaminofén. In *Universitas Médica* (Vol. 59, Issue 4, pp. 1–11). Editorial Pontificia Universidad Javeriana. <https://doi.org/10.11144/javeriana.umed59-4.acet>
4. Chiorcea-Paquim, A. M., & Oliveira-Brett, A. M. (2021). DNA Electrochemical Biosensors for In Situ Probing of Pharmaceutical Drug Oxidative DNA Damage. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(4), 1125. <https://doi.org/10.3390/s21041125>
5. Chowdhury A, Nabila J, Adelusi Temitope I, et al., 2020. Comprensión etiológica actual y objetivos terapéuticos de la hepatotoxicidad inducida por paracetamol. *Pharmacol Res*, 161 : 105102. 10.1016/j.phrs.2020.105102
6. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. *Pediamécum*. Edición 2015. ISSN 2531-2464. . Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/paracetamol-acetaminofen>
7. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), (2018). ¿Por qué son importantes las investigaciones sobre farmacología? Recuperado de: <https://espanol.nichd.nih.gov/salud/temas/pharma/informacion/importante>
8. Hu, L., & Xu, G. (2010). Applications and trends in electrochemiluminescence. *Chemical Society Reviews*, 39(8), 3275. doi:10.1039/b923679c
9. Jaeschke, H., McGill, M. R., & Ramachandran, A. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug metabolism reviews*, 44(1), 88–106. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.602688>
10. Katzung, B. G., & Trevor, A. J. (2016). *Farmacología básica y clínica* (13a. ed.). México: McGraw-Hill.
11. Kim, S. W., Kim, B., Mok, J., Kim, E. S., & Park, J. (2021). Dysregulation of the Acrosome Formation Network by 8-oxoguanine (8-oxoG) in Infertile Sperm: A Case Report with Advanced Techniques. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5857. <https://doi.org/10.3390/ijms22115857>
12. M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza, (2001) DNA electrochemical biosensors, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 369:15–22.
13. Nai, GA, Oliveira, MC de, Tavares, G. de O., Pereira, LFF, Soares, NDSL, & Silva, PG (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. En *Revista Brasileira*

- de Anestesiología (Edición en Español) (Vol. 65, Número 1, pp. 21–26). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.bianes.2013.07.008>
14. National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 1983, Acetaminophen. Retrieved June 6, 2023 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>.
 15. O'Mullane, A.P. (2013). *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering || Electrochemistry*. , (), -. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.05344-0
 16. Oslon, KR (Ed.). *Envenenamiento y Sobredosis de Drogas, Sexta Edición*. McGraw-Hill, Nueva York, NY 2012, pág. 69
 17. Phillips, D. H., & Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. In A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. (Vol. 1, pp. 87-110). Basel: Birkhäuser Verlag
 18. Ramotowska S, Ciesielska A, Makowski M. (2021) What Can Electrochemical Methods Offer in Determining DNA–Drug Interactions? *Molecules*; 26(11):3478. <https://doi.org/10.3390/molecules26113478>
 19. Salehzadeh, H., (2021) Tunable oxidative release of N-acetyl-p-benzoquinone-imine and acetamide from electrochemically derived sub-monolayer acetaminophen modified glassy carbon electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry*,880:1572-6657, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114845>
 20. Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., & Fernández, J. L. (2010). Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertility and sterility*, 93(1), 314–318. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.07.969>
 21. Sawyer, Donald T. (2003). *Encyclopedia of Physical Science and Technology || Electrochemistry*. , (), 161–197. doi:10.1016/B0-12-227410-5/00206-4
 22. Shimada, K., Crother, T. R., & Arditi, M. (2013). DNA Damage Responses in Atherosclerosis. In *Biological DNA Sensor: The Impact of Nucleic Acids on Diseases and Vaccinology* (pp. 231–253). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404732-7.00010-1>
 23. Williamson, E. A., Wray, J. W., Bansal, P., & Hromas, R. (2012). Overview for the histone codes for DNA repair. *Progress in molecular biology and translational science*, 110, 207–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00008-0>
 24. Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Endutkin, A. V., Makarova, A. V., & Zharkov, D. O. (2019). Reading and Misreading 8-oxoguanine, a Paradigmatic Ambiguous Nucleobase. *Crystals*, 9(5), 269. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/cryst9050269>