

Determinação voltamétrica dos biomarcadores biológicos adenosina e seus nucleotídeos derivados visando a avaliação da ação de benzopireno sobre células epitélio brônquio humanas parte II

Wellington de Lima Santana (Graduação)

Rafael Alessandro Chioquetti de Lima (Pós-Graduação)

Orientador: Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano

Instituto de Química da Universidade de São Paulo

wellingtonlima@usp.br, rafaelchioquetti@usp.br, shps@iq.usp.br

Introdução e Objetivos

A adenosina (ADO) e seus nucleotídeos derivados (AMP, ADP e ATP) são reguladores chave do sistema metabólico e imunológico, podendo atuar na supressão ou indução de respostas imunes em diversos contextos, incluindo os microambientes tumorais. Nesse contexto, os papéis de ADO e ATP, por exemplo, podem ser bastante diferentes e até opostos. Assim, para uma melhor compreensão dos efeitos da variação de concentração de ADO em meios biológicos e microambientes tumorais, a detecção *in situ* seletiva dessa molécula se faz importante.

Em etapas anteriores deste projeto, foram desenvolvidos sensores seletivos para ADO em pH fisiológico. Os objetivos deste trabalho foram i) caracterizar os eletrodos de pasta de carbono (EPC) modificados em solução de adenina (EPC-ADE) quanto a morfologia, composição e propriedades eletroquímicas ii) testar a aplicação dos eletrodos modificados no meio de cultura utilizado para crescimento de células epitélio brônquio humanas (BEGM).

Métodos e Procedimentos

Para a modificação dos eletrodos em solução de adenina, foi feita aplicação de 1,3 V sobre o eletrodo de trabalho numa solução 0,5 mmol L⁻¹ de adenina em tampão fosfato 7,4 sob

agitação durante 12 minutos. Para a modificação dos eletrodos com Náfion[®], foi depositado na superfície do eletrodo 4 µL de Náfion[®] 0,5%, o eletrodo foi deixado em repouso por 30 minutos antes de ser utilizado para realizar as medidas. Para testar os eletrodos modificados, foi utilizada a voltametria de pulso diferencial.

Simulações computacionais unidimensionais foram obtidas com o *software* DigiElch 8 e simulações em duas dimensões foram feitas no programa MATLAB 2022b.

Imagens de microscopia ótica e microscopia de varredura eletrônica foram obtidas com um microscópio Olympus SC30 e no equipamento do Instituto Mauá de Tecnologia, respectivamente. Também se utilizou a técnica de Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz acoplada com Espectrometria de Massas de Tempo de Voo (do inglês, MALDI-TOF). O experimento foi feito na Central Analítica IQ-USP. Para a obtenção dos espectros, a superfície do EPC/ADE foi removida e em seguida foi misturada em solução aquosa de ácido trifluoroacético e proporção equimolar de di-hidroxitirato e α -ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico.

Resultados

Em uma etapa anterior deste projeto, foi verificado que eletrodos de pasta de carbono modificados eletroquimicamente em

soluções de bases purínicas são capazes de atuar como sensores seletivos para adenosina (ADO) em meios contendo nucleotídeos como AMP, ADP e ATP. A partir de experimentos com sondas eletroquímicas eletricamente carregadas, foi concluído que a superfície de EPC modificada em solução de ADE interage mal com espécies carregadas negativamente, o que justifica a supressão de sinal de nucleotídeos.

No presente trabalho, simulações de uni- e bidimensionais de voltamogramas em condições de cinética eletródica heterogênea revelaram que a superfície modificada da pasta de carbono provavelmente é heterogênea, apresentando propriedades cinéticas eletroquímicas diferentes ao longo de sua extensão (**Figura 1**). Isso foi confirmado por meio dos espectros de massas (MALDI-TOF) e imagens de microscopia (óptica e MEV) obtidas para a superfície eletródica, que não apenas revelaram a presença de múltiplos compostos na superfície eletródica modificada e uma morfologia irregular diferente do EPC sem modificação.

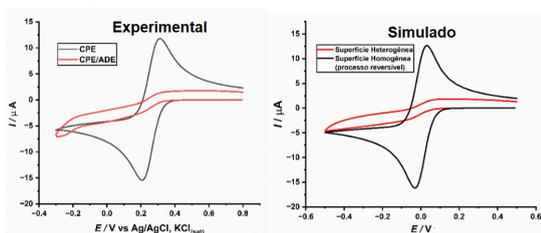


Figura 1. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC (linha sólida preta) e EPC-ADE (linha sólida vermelha) em KCl 0,5 mol L⁻¹ contendo 1 mmol L⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] (à esquerda) e, à direita, voltamogramas simulados pelo método de elementos finitos para um processo reversível sobre uma superfície homogênea e uma superfície heterogênea.

No entanto, ao utilizar o EPC/ADE para medidas no meio de cultura, não foi possível quantificar ADO devido à presença de cloreto no meio e outros interferentes presentes no meio. Para tentar contornar essa situação, nesta parte do projeto os eletrodos foram modificados em solução de adenina e com Nafion[®] em diferentes condições, e foram obtidos voltamogramas no meio de cultura, como mostrado na **Figura 2**. O problema de sensibilidade na presença dos interferentes no

meio de cultura não foi resolvido, e será focado na continuidade do projeto.

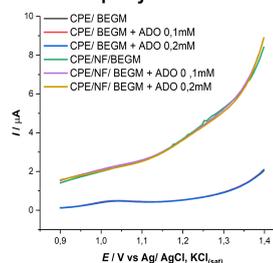


Figura 2. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em BEGM utilizando como eletrodo de trabalho EPC na ausência de ADO, contendo 0,1 mM, 0,2 mM de ADO e utilizando EPC modificado com Nafion nas mesmas condições.

Conclusões

A superfície do eletrodo parece ter caráter heterogêneo, de modo que a interação da superfície com espécies negativamente carregadas depende da sua posição na superfície do eletrodo. As imagens de microscopia óptica e de varredura indicam a formação de um filme fino sobre a superfície da pasta de carbono. Os espectros de massas revelaram a presença de dímeros hidroxilados de adenina na superfície modificada, além de outros compostos mais pesados ainda não identificados. As medidas em BEGM indicam que as interferências nesse meio vão além do cloreto, e deverão ser contornadas para possível quantificação de ADO. Futuramente, serão feitas medidas em tampão fosfato contendo células epitélio brônquio humanas na tentativa de quantificar ADO nesse meio.

Agradecimentos

Agradecemos o Dr. Marcos Makoto e o técnico Maurício Pereira da Silva do Instituto Mauá de Tecnologia (IMT) pela colaboração na obtenção das imagens de microscopia de varredura eletrônica (processo FAPESP n^o 2020/09163-3) e o Dr. Helton Pereira Nogueira pelo auxílio na execução dos experimentos envolvendo MALDI-TOF.

Referências

- Chioquetti RA de L, da Silva DPC, Serrano SHP (2024) Modification of carbon paste electrodes for the selective determination of adenosine in the presence of phosphate adenylic derivatives. *J Solid State Electrochemistry*. doi:10.1007/s10008-024-05972-w
- Gonçalves LM, Batchelor-McAuley C, Barros AA, Compton RG (2010) Electrochemical Oxidation of Adenine: A Mixed Adsorption and Diffusion Response on an Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode. *J Phys Chem*. Doi: 10.1021/jp1046672
- Goyal RN, Sangal A (2002) Electrochemical investigations of adenosine at solid electrodes. *J Electroanal Chem*. Doi: 10.1016/S0022-0728(02)00645-9