

Universidad de Guanajuato.
División de Ciencias Naturales y Exactas.
Maestría en Ciencia y Tecnología de Nanomateriales.

**LIBERACIÓN CONTROLADA DE INSULINA CON MATERIALES
NANOESTRUCTURADOS DE CARBONO.**

Tesis presentada:

IQ. Claudia Denisse Valtierra Montiel.

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencia y Tecnología de Nanomateriales

Directores de tesis.

Dra. María del Rosario Galindo González.

Dra. Rosalba Fuentes Ramírez.

Dr. Emilio Muñoz Sandoval.

Sinodales.

Dra. Beatriz Ruíz Camacho

Dra. Adriana Ramírez

Dra. Svetlana Kashina

Sinodal suplente.

Dr. David Contreras López



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE TRABAJO.

Claudia Denisse Valtierra Montiel, con NUA 820824, estudiante de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Nanomateriales, en relación con el trabajo titulado; **LIBERACIÓN CONTROLADA DE INSULINA CON MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE CARBONO**, presentado para su defensa y evaluación para obtener el grado de maestría, declara que asume la originalidad y autenticidad de dicho trabajo, el cuál fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Electroquímica ligado al cuerpo Académico de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.

Directoras de tesis.

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece leer "Rosa Fuentes", sobre una línea horizontal.

Dra. Rosalba Fuentes Ramírez.
Departamento de Ingeniería Química.

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece leer "María del Rosario Galindo", sobre una línea horizontal.

Dra. María del Rosario Galindo González.
Cátedra CONACYT DCNE-UG

Agradezco a **CONAHCYT**, porque este trabajo no hubiera sido posible sin su apoyo. A la Universidad de Guanajuato por impulsar a los estudiantes a realizar posgrados de investigación brindando recursos y ambientes para el desarrollo de proyectos. A la Dra. Rosalba Fuentes Ramírez y Dra. Rosario Galindo González por ser mi inspiración y motivación, por creer en mí y compartir su conocimiento. Al comité sinodal, Dra. Adriana Medina, Dra. Beatriz y Dra. Svetlana quienes me hicieron mejorar con sus comentarios siempre constructivos. Mi más sincera gratitud a mi familia; mi padre, mi madre y mi hermana; Adrian, Laura y Ariadna, por estar conmigo en cada paso, por su amor, apoyo incondicional y comprensión, gran parte de mi éxito es de ustedes. A mis amigos por ser mi contención emocional y motivación para seguir adelante. Y a mis colegas científicos, por su colaboración a lo largo de este proyecto.

Resumen.

En la actualidad, los nanomateriales de carbono son una solución innovadora para la administración de medicamentos, debido a su eficiencia y versatilidad en la liberación de fármacos en el cuerpo. Ofrecen numerosos beneficios, uno de ellos es la baja tasa de efectos secundarios, lo cual se atribuye a sus propiedades únicas.

En este trabajo se demostró la adsorción de insulina en nanomateriales de carbono sintetizados por método sol-gel (SG y EDA) y electroquímico (E1). Los materiales fueron caracterizados con difracción por rayos X (DRX), espectroscopía RAMAN, espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDS), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), las cuales demostraron que los materiales analizados presentan una morfología esférica y ordenamiento atómico característico de los materiales de carbono. Además, se encontró que el material E1 es capaz de adsorber 73% de insulina, SG 64% y EDA 73%. Así mismo, se comprobó la liberación de la insulina adsorbida, en donde los materiales alcanzaron un alto porcentaje de liberación electroquímica utilizando la técnica de voltametría cíclica. El material E1 liberó 99% de la insulina depositada en un ciclo, SG el 90% de la insulina en 12 ciclos, manteniendo una liberación constante a lo largo de ellos, y EDA el 86% de insulina en un ciclo. Estos resultados demuestran que estas nanoestructuras evaluadas podrían ser candidatas en el desarrollo de dispositivos para la detección y liberación de insulina.

Tabla de contenido

Capitulo I.....	6
Diabetes Mellitus.	7
Insulina.	9
Ciencia de nanomateriales.	14
La nanotecnología como tratamiento para la diabetes.	15
Nanomateriales de carbono.	17
Nanomateriales de carbono en el tratamiento de diabetes.	19
Electroquímica.	21
Técnicas electroquímicas.....	22
Capitulo II.....	24
Planteamiento del problema.	25
Justificación.	25
Hipótesis.	25
Objetivo general.	25
Objetivos específicos.....	26
Metodología.	26
Técnicas de caracterización.....	28
Metodología de adsorción de insulina humana de acción rápida en nanoestructuras de carbono.	29
Cromatografía por exclusión molecular	30
Metodología para la liberación de insulina.	31
Etapa I. Obtención de curvas de oxidación de la insulina mediante electrodos modificados con nanoestructuras de carbono.	31

Etapa II. Liberación de insulina mediante técnicas electroquímicas.....	32
Capitulo III.....	33
Resultados y discusiones.	34
Caracterización de las nanoestructuras de carbono.....	34
Mecanismo para la adsorción de insulina en nanoestructuras de carbono.	44
Cromatografía por exclusión molecular	50
Técnicas electroquímicas para la insulina humana de acción rápida.	54
Obtención de las curvas de oxidación de la insulina humana de acción rápida.....	54
Determinación de la degradación de insulina humana de acción rápida.....	58
Liberación de insulina.....	61
Conclusiones.	66
Referencias.	68

Índice de figuras.

Figura 1. *Exceso de mortalidad por diabetes mellitus (semana epidemiológica 01 de 2020 a la 25 de 2021).*

Figura 2. *Estructura de la proinsulina e insulina.*

Figura 3. *Estructura molecular de la insulina humana.*

Figura 4. *Sitios de acetilación de la molécula de insulina.*

Figura 5. *Estructuras cristalinas de los alótropos del carbono.*

Figura 6. *Nanomateriales utilizados para el tratamiento alternativo para la diabetes.*

Figura 7. *Ventana de electroactividad/potencial.*

Figura 8. *Instrumentación potenciometría.*

Figura 9. *Diagrama de las nanoestructuras utilizadas para análisis y caracterización.*

Figura 10. *Sistema utilizado en la síntesis electroquímica de las nanoestructuras de carbono.*

Figura 11. *Columna de exclusión molecular.*

Figura 12. *Microscopía electrónica de barrido por método sol-gel.*

Figura 13. *Microscopía electrónica de barrido material sintetizado por método electroquímico.*

Figura 14. *Microscopía TEM material sintetizado por método electroquímico.*

Figura 15. *Microscopía TEM materiales sintetizados por método sol-gel.*

Figura 16. *Difractograma de DRX.*

Figura 17. *Espectroscopía Raman.*

Figura 18. *Espectroscopía Raman.*

Figura 19. *Espectroscopía FTIR de muestra E1.*

Figura 20. *Espectroscopía FTIR de muestra SG y EDA.*

Figura 21. *Estudio EDS correspondiente a la muestra E1.*

Figura 22. *Estudio EDS correspondiente a la muestra SG.*

Figura 23. *Estudio EDS correspondiente a la muestra EDA.*

Figura 24. *Curva de calibración de la insulina humana rápida.*

Figura 25. *Adsorción de la insulina en E1.*

Figura 26. *Adsorción de la insulina en SG y EDA*

Figura 27. *Curva de calibración electroquímica.*

Figura 28. *Voltamperogramas de la adsorción de insulina.*

Figura 29. *Espectroscopía por UV-VIS obtenida de las fracciones recolectadas mediante la cromatografía por exclusión molecular.*

Figura 30. *Fotografías de la nanoestructura E1 después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina.*

Figura 31. *Fotografías de la nanoestructura SG después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina.*

Figura 32. *Fotografías de la nanoestructura EDA después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina.*

Figura 33. *Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con E1.*

Figura 34. *Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con SG.*

Figura 35. *Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con EDA.*

Figura 36. *Determinación de la degradación de insulina humana con electrodos modificados.*

Figura 37. *Voltamperograma de electrodo modificado con E1.*

Figura 38. *Voltamperogramas obtenidos para la liberación de insulina.*

Figura 39. *Posible mecanismo de liberación de insulina.*

Índice de tablas.

Tabla 1. *Clasificación de los nanomateriales según el tamaño de sus dimensiones.*

Tabla 2 Resultados de los estudios desarrollados en este capítulo.

Capitulo I.

Diabetes Mellitus.

En las últimas décadas la diabetes ha sido una de las enfermedades que más impacto ha tenido en la población mundial, según la International Diabetes Federation IDF, por sus siglas en inglés, en el 2021 uno de cada diez adultos padecía de diabetes. Sin embargo, a nivel mundial la población adulta con esta enfermedad se ha triplicado del 2000-2021, teniendo sumamente preocupados a la comunidad perteneciente al sector salud, ya que el creciente número de personas con diabetes se debe a múltiples factores como la obesidad y la dificultad de acceso a tratamiento eficiente para el control de la diabetes. El acceso a un tratamiento ha hecho que las personas con diabetes tengan un mejor control en su enfermedad ofreciéndoles una mejor calidad de vida y una mayor longevidad, disminuyendo así, la tasa de mortalidad de las personas con esta afección.(International Diabetes Federation, 2021)

México forma parte de los países con mayor número de adultos con diabetes. Según las estadísticas de mortalidad registradas de enero a junio de 2021 del INEGI, se tuvieron tres principales causas de muerte a nivel nacional: COVID-19 (25%), enfermedades del corazón (19.7%), y diabetes mellitus (12.8%). Estas estadísticas comprenden todos los tipos de diabetes que existen.

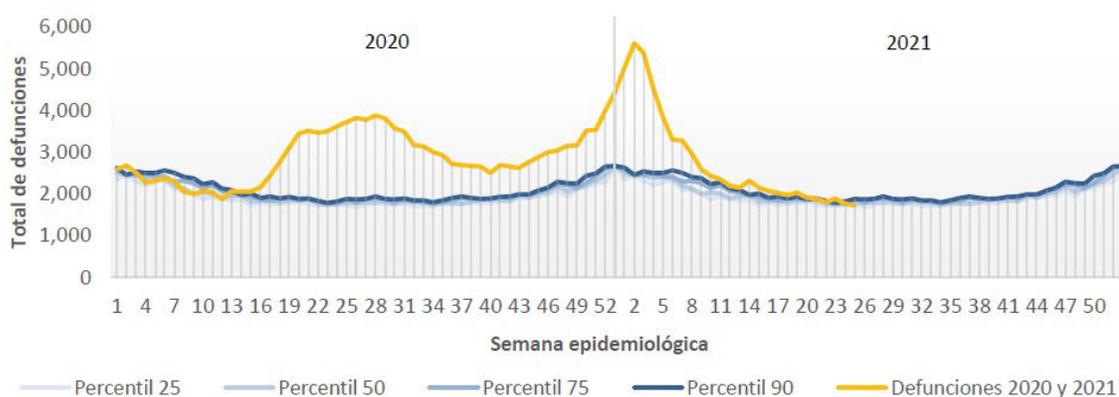


Figura 1. Exceso de mortalidad por diabetes mellitus (semana epidemiológica 01 de 2020 a la 25 de 2021). Nota. Adaptado “Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2021 (preliminar)” (p. 20) por INEGI, 2022.

La **Figura 1**, muestra las defunciones a causa de diabetes mellitus, en el 2021 se esperaban 164,889 defunciones, sin embargo, se presentaron 223,141 muertes, esto representa 35.3% más decesos de los esperados. (INEGI, 2022)

Existen varios tipos de diabetes mellitus, sin embargo, la diabetes tipo I y II son las más comunes en la población mundial.

La prevalencia para la diabetes tipo I aumenta cada año. Este tipo de diabetes es el más común en niños, se estima que 1,211,99 niños y adolescentes menores de 20 años la presentan. Se estima que cada año se diagnostican alrededor de 108,200 niños y adolescentes menores de 15 años. Sin embargo, este número puede incrementarse a 149,500 cuando el rango de edad se extiende a jóvenes mayores de 20 años (International Diabetes Federation, 2021). Este incremento en la tasa de niños y jóvenes con diabetes mellitus tipo I es un elemento clave en el desarrollo de enfermedades crónicas derivadas de las complicaciones de diabetes. Esto quiere decir que un incremento de incidencia en la población infantil con diabetes será una generación de adultos con complicaciones de salud graves.

Katzung et al., 2012, define la diabetes mellitus como el incremento de la glucemia (o glucosa en la sangre) que surge por la secreción nula o inadecuada de insulina por el páncreas, con o sin deficiencia de la acción de la hormona. En seres humanos sanos, se identifica una cifra de 5-15 $\mu\text{U/ml}$ (30-90 pmol/L) y hay un incremento máximo hasta 60-90 $\mu\text{U/ml}$ (360-540 pmol/L) durante el consumo de alimentos.

A continuación, se explica la diabetes tipo I y tipo II.

La característica principal de la diabetes tipo I es la destrucción de las células β (células encargadas de producir insulina que se encuentran en el páncreas) y la deficiencia parcial o absoluta de insulina. Lo anterior se puede deber a causas inmunitarias o desconocidas (idiopáticas). La causa más común es la inmunitaria. Generalmente estos pacientes son detectados en una edad temprana, o antes de los 30 años. Puede desarrollarse por un vínculo genético multifactorial, pero únicamente 10-15% de los pacientes tienen antecedentes familiares. Las personas que padecen esta enfermedad necesitan un

tratamiento para poder vivir. Este tratamiento es la insulina, que farmacológicamente se suele aplicar por medio de una inyección subcutánea.

Diabetes tipo II. Independientes de insulina.

Este tipo de diabetes se caracteriza por la resistencia de los tejidos por a la acción de la insulina, en combinación con la deficiencia de la secreción de esta hormona. Esto se debe a que los pacientes no producen una insulina adecuada para superar la resistencia a ella, de este modo aumenta la glucemia (glucosa en sangre). La acción de la insulina afecta el metabolismo de las grasas, aumentando el flujo de ácidos grasos y las concentraciones de triglicéridos. (Katzung et al., 2012)

En ocasiones las personas que padecen este tipo de diabetes no necesitan insulina para poder vivir, sin embargo, para estabilizar su hiperglucemia llevan un tratamiento a base de insulina en dosis muy pequeñas.

Según el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2021) los factores de riesgo para presentar la diabetes tipo II son los siguientes: tener prediabetes, sobrepeso, edad mayor a los 45 años, antecedentes familiares (padres o hermanos con este tipo de diabetes), actividad física menor a tres veces por semana. Son por estos factores que se dice que la diabetes tipo II es adquirida, ya que, al realizar un cambio en el estilo de vida la hipoglucemia se controla, ayudando a prevenir la diabetes tipo II.

La importancia que tiene la insulina en nuestro cuerpo es fundamental para regular los niveles de azúcar en nuestra sangre y a su vez de padecer enfermedades crónicas degenerativas como la diabetes mellitus.

Insulina.

La insulina es una proteína con peso molecular de 5,808 en seres humanos. Contienen 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas (A y B) unidos por enlaces de disulfuro. La proinsulina, una proteína larga de una sola cadena, se procesa dentro del aparato de Golgi de las células β y se almacenan en gránulos, en donde se hidroliza en insulina y se agrega

un segmento conector residual llamado péptido C, que se forma por eliminación de cuatro aminoácidos. (Katzung et al., 2012) **Figura 2.**

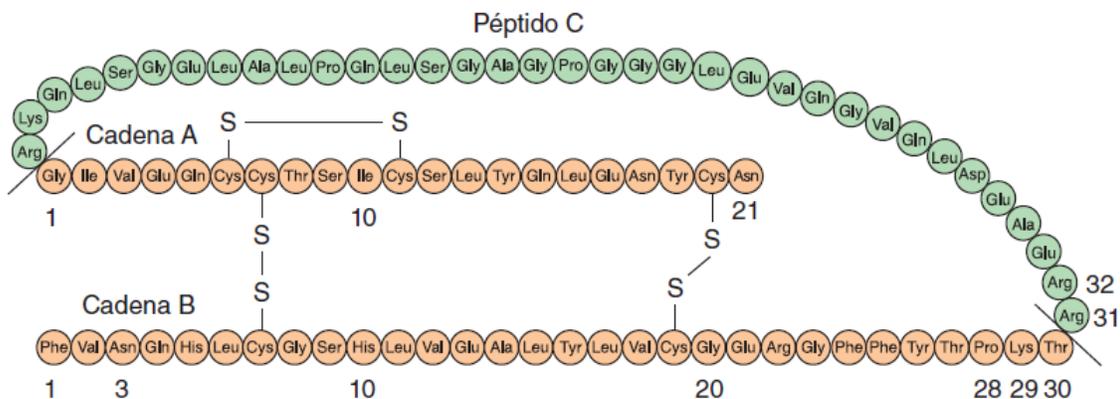


Figura 2. Estructura de la proinsulina e insulina. Distribución de los 51 aminoácidos en las dos cadenas peptídicas de la insulina (color naranja) y estructura química de la proinsulina (cadena de péptidos C con A y B). Nota. Adaptado de “Farmacología Básica y clínica” (p. 744) por (Katzung et al., 2012), McGrawHill Lange.

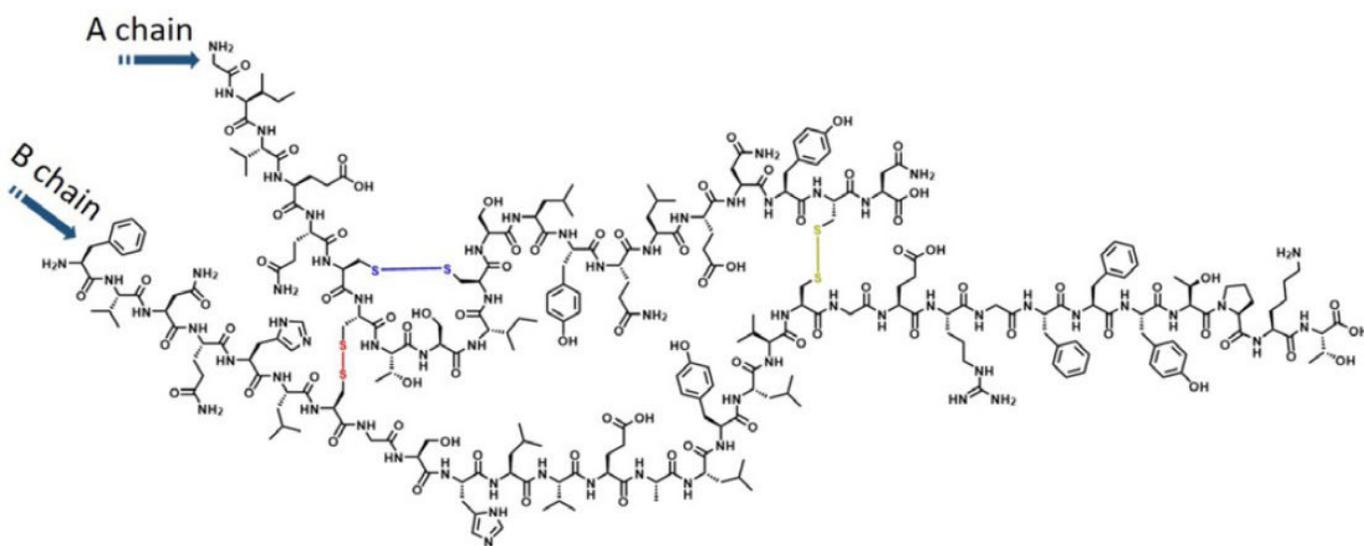


Figura 3. Estructura molecular de la insulina humana. Se identifican los principales grupos funcionales que conforman la estructura de la insulina, entre los cuales se encuentra en su mayoría aminas. Nota. Adaptado de “The ABC of Insulin: The Organic Chemistry of a Small Protein” (p. 8342) por (Østergaard et al., 2020), Chemistry—A European Journal.

La comunidad científica ha centrado su investigación en encontrar la manera de simular la insulina humana mediante la modificación química de la insulina. Encontrando que las condiciones que tienen mayor impacto en la insulina humana son el pH, la concentración y la presencia de iones metálicos covalentes. La molécula de la insulina presenta únicamente tres sitios activos en donde se puede realizar la acilación o modificación química, estos sitios corresponden a los aminoácidos Phe^{B1}, Gly^{A1} y Lys^{B29}. En soluciones acuosas, la acilación de cada uno de los sitios depende al pH de la solución, a pH>10.5 sucede en la Lys^{B29}, pH<9 sucede en los aminoácidos Phe^{B1}, Gly^{A1}, sin embargo, al tener un pKa muy similar, la amina más reactiva es la Gly^{A1}. (Østergaard et al., 2020) **Figura 4.**

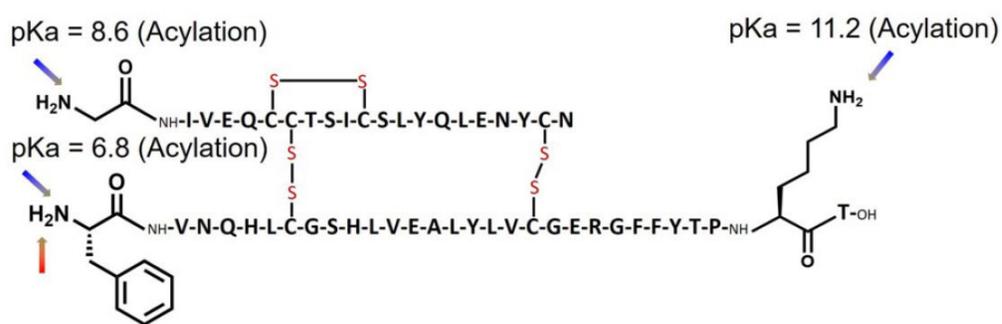


Figura 4. *Sitios de acetilación de la molécula de insulina.* Sitios activos en los cuales se puede llevar a cabo la acetilación, se muestra el pKa de cada uno de estos sitios. Nota. Adaptado de “The ABC of Insulin: The Organic Chemistry of a Small Protein” (p. 8345) por (Østergaard et al., 2020), Chemistry—A European Journal.

Los efectos endocrinos de la insulina en diversos órganos son de suma importancia, por ejemplo: en el hígado inhibe tanto la conversión de ácidos grasos y aminoácidos en cetoácidos como la conversión de aminoácidos en glucosa, también intensifica la síntesis de triglicéridos y la formación de lipoproteínas de muy baja densidad; en los músculos, aumenta la síntesis de proteínas y aumenta la síntesis de glucógeno y en el tejido adiposo, produce un mayor almacenamiento de triglicéridos (Katzung et al., 2012).

Los principales órganos encargados para eliminar la insulina de la circulación de la sangre es el hígado y los riñones. En una persona sana, el hígado se encarga de captar el 60% de la insulina liberada por el páncreas y los riñones de alrededor de 40%. La vida media de la

insulina circulante es de 3 a 5 minutos (Ortiz González & Martínez Abundis, 2001). Es por esta razón que una falla en la producción de insulina lleva a un daño colateral de estos órganos.

Una vez que se ha diagnosticado la diabetes se debe de comenzar a llevar un tratamiento médico en el cual se administra insulina comercial. Las insulinas comerciales son sintetizadas por técnicas de ingeniería genética la cual se realiza introduciendo el gen de la proinsulina humana modificada en *Escherichia Coli* o levaduras.

El objetivo de la administración de la insulina es el imitar la función del páncreas, secretando continuamente insulina a lo largo del día. La forma en que se administra depende de las necesidades de cada paciente, sin embargo, las más comunes son por vía oral, en forma de pastillas, por vía subcutánea por medio de inyecciones en la piel o por vía respiratoria como los inhaladores.

Hoy en día existen varios dispositivos médicos, los cuales son utilizados para el control de la diabetes mellitus, entre los más populares se encuentran; el bolígrafo de insulina y la bomba de insulina. La bomba de insulina puede realizar la administración subdérmica de manera automática, esto permite que la bomba calcule la dosis ideal tomando en cuenta los niveles de glucemia en la sangre. El bolígrafo de insulina es un dispositivo de cartuchos hormonales con agujas desechables, suele ser muy discreto (Centers for Disease Control and Prevention, 2021). Sin embargo, presentan varias desventajas, debido a que no todos los tipos de insulina pueden ser administradas por estos método, el costo del dispositivo es elevado y al tener el mecanismo tradicional de inyecciones utilizando catéteres puede causar infecciones recurrentes en la piel, depósitos de grasa o bultos duros, los cuales aparte de agravar su salud, pueden ser antiestéticos, provocando que la insulina llegue a ser menos confiable y genere en los pacientes un impacto psicológico muy grande. (Pouwer, 2009)

A pesar de los avances sofisticados en la forma de suministrar los nuevos tratamientos para la insulina, como plumas y bombas de insulina, medicación oral antihiper glucemiante y la mejora en los modelos de atención a la salud ser una persona con diabetes es sumamente

complicado ya que implica un cambio al estilo de vida y psicológicos para el control eficaz de diabetes (Pouwer, 2009).

Enfrentar esta enfermedad en una etapa temprana es un desafío desde pequeños se asume la responsabilidad adicional de ser independientes al momento de llevar el control diario de su diabetes (Morrissey et al., 2022) Esta carga de trabajo delegada a los jóvenes y su círculo social, es denominada “carga de tratamiento”, lo cual conduce a una reducción en su calidad de vida. Esto siendo más particular en casos de jóvenes con diabetes tipo I, ya que se espera que implementen regímenes de tratamiento complicado en los que ellos calculan y administran continuamente las dosis de insulina. Cerca de tres de cada cuatro adultos-jóvenes con diabetes tipo I, indican que sus inversiones tiempo, energía y esfuerzos son destinados al cuidado de la salud y resultan ser insostenibles (Kunneman et al., 2022).

El manejo complejo de la diabetes tipo I dificulta que los jóvenes y sus familias cumplan con las recomendaciones de tratamiento, lo que los pone en riesgo de sufrir complicaciones de salud a corto y largo plazo. Los jóvenes con diabetes tipo I también tienen un mayor riesgo de malos resultados psicológicos y conductuales, incluida la depresión.(Grey et al., 2002)

La combinación de la diabetes y depresión en niños y adolescentes se ha asociado con el aumento en la tasa de suicidio siendo de hasta 10 veces más propensos a la idea suicida. (Kokkonen et al., 1997)

El impacto de vivir con diabetes se extiende más allá del riesgo de la angustia clínica. La resistencia psicológica al uso de la insulina se refiere a un conjunto de actitudes que tiene la persona con diabetes y provoca que se muestre renuente a comenzar la terapia con insulina. Muchas personas que viven con diabetes desarrollan creencias sobre la percepción de agregar insulina a su tratamiento, por ejemplo; comenzar con el uso de insulina es una indicación de una enfermedad grave, falla en el control de diabetes, que no son autosuficientes y ansiedad (Polonsky & Jackson, 2004).

No solamente el uso de tratamientos invasivos genera problemas psicológicos, la piel es uno de los órganos más afectados al administrar la insulina vía subcutánea. El mayor problema que presentan las personas con diabetes es lipohipertrofia, que es la acumulación

de grasa subcutánea por inyecciones repetitivas en una misma zona, debido la reutilización de agujas, la profundidad de la aplicación de insulina y la insuficiente desinfección de la piel generan riesgo de desarrollar este tipo de lesiones (Cano et al., 2017). Siendo sin duda un foco de infección y generando una baja penetración de la insulina.

Por todo lo mencionado anteriormente, se ha investigado acerca de nuevos métodos que permitan a las personas con diabetes llevar una mejor calidad de vida. Entre estos métodos, algunos podrían aprovechar el uso de nanomateriales, siendo el carbono uno de gran interés para el tratamiento de enfermedades crónicas o degenerativas.

Ciencia de nanomateriales.

La historia de los nanomateriales surge en la antigüedad, una evidencia es la presencia de nanomateriales en los vitrales que adornan las iglesias de la época medieval. Sin embargo, no fue hasta los años 60 cuando Richard Feynman propuso la idea de manipular los átomos para investigar las propiedades que presentaban las estructuras. Es por esta razón que es considerado el padre de la nanotecnología. Feynman comenzó a desarrollar síntesis de nanoestructuras, pero no podía comprobar la morfología ni las dimensiones obtenidas debido a que no se contaba con un microscopio capaz de detectar partículas a escala nanométricas. No fue hasta la década de los ochenta que se inventó el microscopio de efecto túnel, el cual fue pieza clave en la evolución de la nanotecnología como la conocemos en la actualidad ya que permitió el desarrollo de nuevos métodos de síntesis para la obtención de nuevos materiales. Las primeras nanoestructuras estudiadas fueron nanoestructuras de carbono; nanotubos de carbono y fullerenos (Alonso G et al., 2015).

De manera general la nanotecnología es la fabricación de materiales, estructuras, dispositivos y sistemas funcionales a través del control y ensamblado de la materia en una escala de 0.1 a 100 nm, así como su aplicación de nuevos conceptos y propiedades (físicas, químicas, biológicas, mecánicas, etc.) que surgen como consecuencia de esa escala (Fundación Española para la Ciencia y Tecnología, 2009).

El avance de la nanotecnología en las últimas décadas ha tenido un crecimiento exponencial, ya que gracias a esta disciplina ofrece posibles soluciones a problemas

importantes que afectan el mundo moderno; como es la contaminación del agua, desarrollo e implementación de nuevos materiales en la industria, tratamientos alternativos para enfermedades terminales o crónico-degenerativas, entre otras.

La nanotecnología como tratamiento para la diabetes.

En el campo de la medicina la nanotecnología y la nanociencia juega un papel muy importante. Ha aportado nuevos avances desde tratamientos para enfermedades (liberación de fármacos, nanomateriales para la regeneración celular, nanoacarreadores de fármacos, etc), hasta la detección temprana de enfermedades y el desarrollo de trazadores bioquímicos para la generación de imágenes para el diagnóstico médico.

Los nanoacarreadores de fármacos o nanovehículos son dispositivos de tamaño nanométrico capaces de penetrar las barreras que en años pasados se creían impenetrables tal es el caso de la barrera hematoencefálica, también son usados para transportar fármacos de manera selectiva, ya que se dirigen específicamente al órgano o tejido dañado para su liberación haciendo el tratamiento más eficaz y reduciendo los efectos secundarios.

La importancia que tienen estos avances tecnológicos en la medicina ha permitido mostrar una variedad de opciones para el tratamiento de enfermedades como la diabetes. La investigación para encontrar un tratamiento alternativo para la diabetes se ha desarrollado desde hace más de 30 años, en donde Aboubakar et al., 1999, Couvreur et al., 1979 y Speiser, 1974 utilizaron nanocápsulas poliméricas para prolongar la duración del efecto de la insulina para una administración oral.

Una de las principales desventajas que tienen los tratamientos de insulina orales es la poca biodisponibilidad que presentan ya que al entrar en contacto con el tracto digestivo la insulina es degradada debido al pH, temperatura y movimientos peristálticos. Es por lo que Leobandung et al., 2002, estudiaron la síntesis de nanoesferas de poli(N-isopropilacrilamida) y poli(etilenglicol) las cuales cargaron de insulina e investigaron el efecto que tiene la temperatura y el esfuerzo de cizallamiento en las nanoestructuras. Con esto se pudieron comprobar que el recubrimiento polimérico utilizado es capaz de proteger la insulina cargada a altas temperaturas (80°C) y a un alto esfuerzo cortante. Esto nos

demuestra que las nanoestructuras poliméricas sintetizadas en este trabajo son buena opción en el almacenamiento de la insulina.

Otro estudio que demuestra la importancia de utilizar un recubrimiento que sea capaz de soportar las condiciones ácidas del estómago fue reportado por Lin & Lin, 2009, quienes realizaron la síntesis de nanopartículas de N,O-carboximetilquitosano con tripolifosfato cargadas con insulina sensibles a pH para su liberación controlada por vía oral. En donde encontraron que las condiciones en las cuales se tiene una mayor adsorción es a pH bajos ya que se tienen más protones disponibles de aminas las cuales interactúan con la molécula de insulina. A mayores pH la solución genera una cantidad mayor de ácido carboxílicos lo que conduce a una mayor repulsión electrostática de fuerzas moleculares. Por otro parte, uno de los estudios más recientes acerca de polímeros utilizados para la liberación de insulina ha sido publicado por Asal et al., 2022, los cuales estudiaron 3 tipos de nanoestructuras, nanopartículas de quitosano, nanopartículas de oro reducidas con quitosano y nanopartículas reducidas con quitosano funcionalizadas con PLGA las cuales cargaron con insulina para evaluar su eficiencia de carga de insulina para ser utilizadas como vehículo para la liberación de insulina vía oral. Ellos obtuvieron que las nanopartículas con quitosano tuvieron una mayor liberación de la insulina en pH ácidos debido a la protonación de quitosano y a un pH más bajo el PLGA protegió a la insulina del medio. Esto quiere decir que el polímero utilizado le confiere mejores características.

Por otro lado, el polímero PLGA ya había sido antes estudiado por Packhaeuser & Kissel, 2007, quienes desarrollaron un sistema líquido inyectable que al entrar en contacto con las condiciones del torrente sanguíneo genera un depósito semi-sólido. El sistema se realizó sintetizando diversos tipos de polímeros anfifílicos modificados con aminas, los polímeros se cargaron con insulina, se evaluó la adsorción y la liberación de esta mediante un microscopio con focal. Se encontró que las nanopartículas de poliéster biodegradable PLGA modificada con aminas fue el que mejor encapsulaba la insulina debido a su potencial Z el cual es superior a 25 mV.

A pesar de que el quitosano es uno de los materiales más prometedores en la liberación de insulina aún sigue teniendo varias limitantes, una de ellas es la sensibilidad al pH, aunque el uso del quitosano ayuda a que la insulina no sea degradada en el sistema gastrointestinal, la cantidad que llega al torrente sanguíneo no es suficiente, es por esta razón que Fathy et al., 2023, sintetizaron nanopartículas de quitosano cargadas con insulina recubiertas por una película de sílice, demostrando que el sílice mejora la resistencia del quitosano a pH ácidos, y también disminuye la porosidad de la superficie provocando una menor interacción con el medio permitiendo una mayor liberación de insulina.

Nanomateriales de carbono.

En la historia de la nanotecnología las nanoestructuras derivadas del grafito, como son los fullerenos, los nanotubos de carbono y el grafeno fueron las primeras nanoestructuras sintetizadas y estudiadas, en la década de los sesenta (Virendra et al., 2011). Con el descubrimiento de estos materiales los científicos establecieron una clasificación tomando en cuenta el número de las dimensiones y que algunas de ellas se encuentren dentro de la escala de 0 a 100 nm, esta clasificación se describe en la **Tabla 1** presentada a continuación.

Tabla 1. Clasificación de los nanomateriales según el tamaño de sus dimensiones.

Clasificación	Definición	Nanomaterial.
0D	Las tres dimensiones son menores a los 100 nm	Nanoesferas, puntos cuánticos, fullerenos.
1D	Al menos dos de sus dimensiones están dentro de los 100 nm.	Nanocables, nanotubos, nanofibras.
2D	Una dimensión está dentro de los 100 nm.	Nanoláminas, grafeno.
3D	Ninguna dimensión está dentro de los 100 nm, pero está nanoestructurado.	Nanoesponjas.

Nota. Adaptado y modificado de “Graphene: carbon in two dimensions” (pp. 20-27) por (Katsnelson, 2007), *Materials Today*, 10.

A pesar de que las nanoestructuras mencionadas anteriormente son similares en su composición, la morfología, el tamaño, la disposición espacial y la manera en que los átomos están unidos entre ellos, son algunos factores que determinan las propiedades de cada una de ellas, por ejemplo; el grafeno es un material con estructura bidimensional que se presenta en forma de nanoplacas. Las nanoplacas son láminas constituidas por una red hexagonal de átomos de carbono dispuestos en un mismo plano (INSHT, 2015). Ya que posee propiedades eléctricas, ópticas y térmicas es considerado el material del futuro (Maduraiveeran & Jin, 2021). Es uno de los alótropos de carbono más importantes porque es el precursor para la construcción de los materiales de grafito, uno de ellos son los nanotubos de carbono. Su nombre se debe a su forma alargada y vacía con las paredes formadas por láminas de grafeno se pueden clasificar en dos tipos: nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) o de pared múltiple (MWCNT). Los nanotubos son materiales química y térmicamente muy estables, que presentan una elevada elasticidad, conductividad eléctrica y térmica, alta relación resistencia-peso y baja densidad. Asimismo, presentan una gran resistencia a la deformación y al estiramiento (Gallo, 2019). Otro alótropo de carbono es el fullereno. Los fullerenos están constituidos por átomos de carbono, adoptando la forma de una esfera hueca. Tienen una estructura de anillos hexagonales de carbono similar al grafito, aunque también tienen anillos pentagonales y heptagonales que son los que permiten que se formen estructuras tridimensionales (INSHT, 2015).

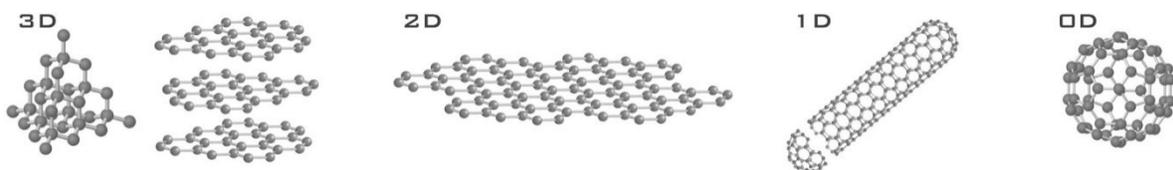


Figura 5. *Estructuras cristalinas de los alótropos del carbono.* En esta imagen se observan las estructuras cristalinas como son en 3D. El diamante y el grafito, 2D. Grafeno y 0D.

Fullerenos. Nota. Adaptado de “Graphene: carbon in two dimensions” (p. 21) por (Katsnelson, 2007), *Materials Today*, 10.

Nanomateriales de carbono en el tratamiento de diabetes.

Los materiales de carbono han comenzado a llamar la atención de los investigadores por el desempeño que tienen en el campo biomédico, ya que poseen múltiples propiedades como; una gran área superficial y un gran volumen de poros lo que hace un buen candidato para ser un vehículo para la liberación de fármacos, superficie fácilmente modificable podría facilitar la administración dirigida y controlada de manera eficaz reduciendo los efectos secundarios, excelente biocompatibilidad y estabilidad fisicoquímicas (Zhao et al., 2017). Estas ventajas permitieron que las nanoestructuras de carbono fueran candidatos para desarrollar posibles tratamientos para la diabetes, como vehículos para la liberación de insulina vía oral y vía subdérmica, por ejemplo, Ganeshkumar et al., 2013 sintetizaron nanoesferas de carbono huecas con recubrimiento de quitosano para la administración oral de insulina. La insulina fue adsorbida en la superficie de los poros de las esferas. El tamaño medio fue de 330 nm con un valor encapsulamiento de insulina de un 93.35%. También evaluaron la efectividad de las nanoestructuras in vivo lo cual dio un resultado favorable, mejorando notablemente la absorción intestinal de la insulina reduciendo eficazmente el nivel de glucosa de la sangre de las ratas diabéticas.

El grupo de investigación de H. Lin et al., 2019, sintetizó 3 tipos de nanoesferas de carbono mesoporosas cargadas con insulina para su administración oral, con un tamaño aproximado de 130 nm, 100 nm y 145 nm. Evaluaron su efecto en sistemas in vivo e in vitro. Estos estudios demostraron que las dos nanoesferas de tamaño menor fueron las mejores en la adsorción y liberación de insulina para la administración oral.

Aunque la administración de insulina por vía oral ha sido la más estudiada, sigue teniendo varias deficiencias, como la baja compatibilidad, fluctuaciones de la concentración sanguínea del fármaco, la degradación de la insulina en el tracto digestivo, entre otros, esto genera que se reduzca la efectividad clínica y aumenten los efectos secundarios (Xu et al., 2021). Es por esta razón que comenzaron a desarrollar tratamientos alternativos los cuales

no comprometieran la salud de las personas, utilizando, por ejemplo, la electricidad como estimulante para administrar la insulina

El sistema de estimulación eléctrica ha llamado mucho la atención debido a que las señales eléctricas se controlan fácilmente y se puede permitir una liberación de medicamento a través de la piel de manera repetible, fiable y sin dolor. Los biomateriales de respuesta eléctrica para la administración de fármacos son principalmente polímeros conductores, hidrogeles conductores, materiales de base carbono y algunos materiales metálicos/semiconductores, etc (Xu et al., 2021).

El uso de hidrogeles ha sido uno de los principales materiales estudiados para la liberación de insulina debido a su respuesta a la electricidad y biocompatibilidad por lo que Mallawarachchi et al., 2019 investigaron acerca de la posibilidad de utilizar hidrogeles de ácido poliacrílico (PAA) y ácido polimetacrílico (PMA) electrosensibles para la administración controlada de insulina utilizando señales eléctricas intermitentes a través de la deformación de la matriz. Mostrando una buena respuesta eléctrica bajo entradas de corriente tanto constantes como pulsada, liberando hasta un 80% de insulina con 10V.

Si bien los hidrogeles y los polímeros son buenos candidatos para desarrollar un dispositivo para la liberación de fármacos la sensibilidad que tienen a la corriente eléctrica aún no es suficiente para liberar la insulina con un potencial bajo. Es por esto que Teodorescu et al., 2015, describió un sistema electroquímico de administración de insulina basado en nanoláminas de grafeno reducido rGO cargadas con insulina, protegidas con una película de quitosano. Después de la aplicación de un pulso de potencial de 0.8 V durante 30 minutos (que es el marco de tiempo de la secreción normal de la insulina), se liberó hasta 70.4% de insulina en medio fisiológico conservando su actividad biológica. Siendo esto una técnica compatible para aplicaciones biomédicas.

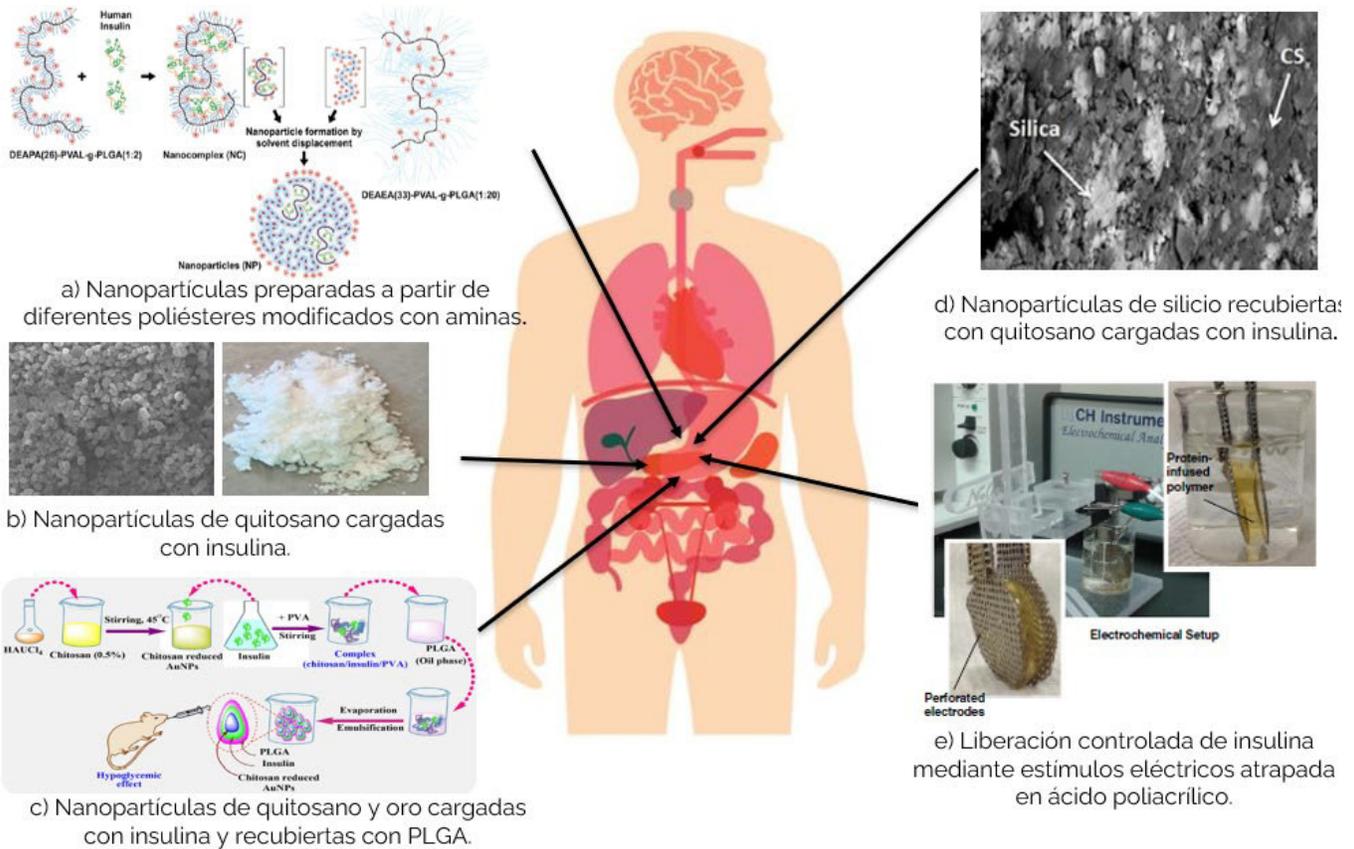


Figura 6. *Nanomateriales utilizados para el tratamiento alternativo para la diabetes.*

Resumen en forma de diagrama de los nanomateriales utilizados para la liberación de insulina.

Electroquímica.

La electroquímica es la ciencia que estudia la conversión entre la energía eléctrica y la energía química, mediante el flujo de electrones a través de la interfase que ocurre en un material conductor electrónico (metal) y un conductor iónico (electrolito). El proceso se lleva a cabo en una celda electroquímica, este sistema se compone de electrodos de diversos materiales sumergidos en una fase electrolítica. Con la electroquímica se pueden estudiar diversos procesos o fenómenos, como la electroforesis, corrosión de un material, la elaboración de dispositivos electroanalíticos, baterías, la producción de materiales como el aluminio o carbono, entre otros. (Bard & Faulkner, 2001).

Es por esta razón que es importante saber que existe un intervalo de potencial en donde se realizan las reacciones químicas de oxidación y reducción del material, **Figura 7**. Esta ventana de potencial es una propiedad de cada uno de los materiales que se evalúan.

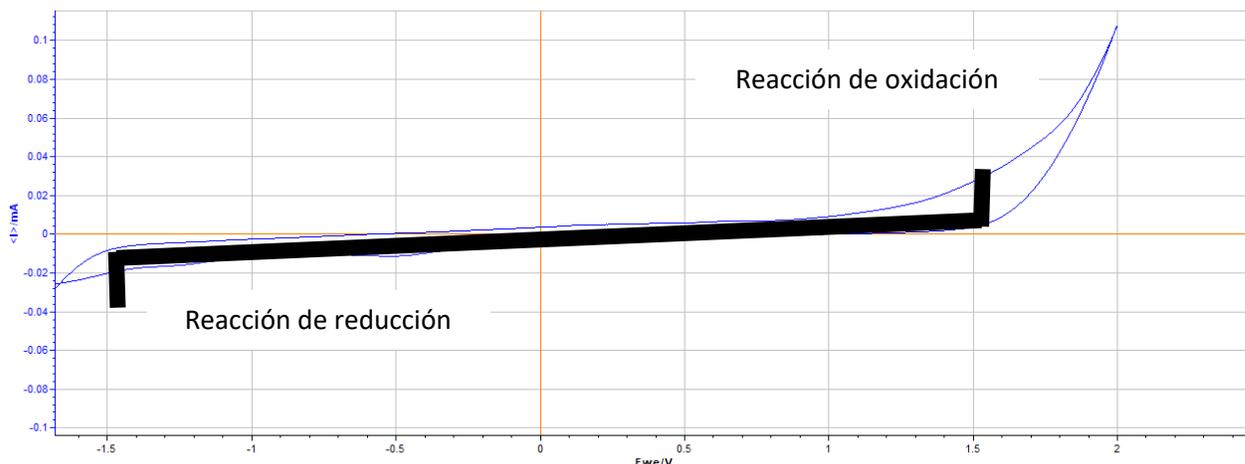


Figura 7. Ventana de electroactividad/potencial. De color negro está la ventana de potencial del electrodo de carbón vitreo con un intervalo de potencial de -1.5 a 1.5 eV aproximadamente, en donde ocurren las reacciones de oxido-reducción en el electrodo.

Técnicas electroquímicas.

La electroquímica tiene varias técnicas electroquímicas las cuales permiten estudiar la perturbación que existe en la interfase del sistema evaluado al hacer pasar corriente eléctrica o el voltaje generado en la interfase del material debido a la transferencia de electrones. Estas técnicas nos permiten conocer propiedades eléctricas, determinar procesos fisicoquímicos y la concentración de un analito en una celda electroquímica.

El uso de estas técnicas electroquímicas posee varias ventajas; proporcionan límites de detección muy bajos, puede proporcionar información hacer de actividades en sistemas biológicos en donde las respuestas de los organismos son susceptibles al intercambio iónico, el costo de los equipos es muy bajo, tiempo de análisis cortos, estudio de varias especies, entre otras.

Potenciometría.

Es una de las técnicas electroanalíticas más utilizadas en la determinación de la concentración de una especie electroactiva disuelta en una solución electrolíticas empleando en una celda electroquímica, en la cual se aplica una corriente eléctrica mediante un potenciostato.

El potenciostato es un dispositivo electrónico que mide y controla el potencial de un sistema detectando cambios en su resistencia manteniendo constante la diferencia de potencial. El sistema compuesto por tres electrodos; electrodo de trabajo en donde ocurren las reacciones electroquímicas, electrodo de referencia controlador de potencial de celda, contraelectrodo o electrodo auxiliar es capaz de medir la corriente que fluye a través de él contrarrestando los procesos que ocurren en el electrodo de trabajo. El sistema empleado se muestra en la **Figura 8**.

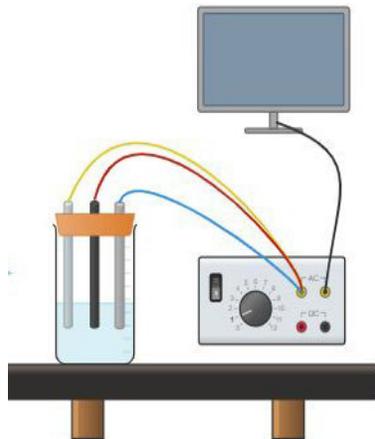


Figura 8. *Instrumentación potenciometría.*

Este sistema funciona manteniendo constante el potencial del electrodo de trabajo respecto al electrodo de referencia mediante el ajuste de corriente del electrodo auxiliar.

Capitulo II.

Planteamiento del problema.

Según la OMS, la diabetes adquirió el estatus de epidemia no infecciosa del siglo XXI (Tolkachov et al., 2015) debido a que el número de personas con diabetes mellitus se ha triplicado en la última década.

Se han realizado estudios acerca de la administración de la insulina con nanoestructuras de tipo poliméricas, metálicas y de carbono administradas vía oral, ocular o respiratoria teniendo efectos adversos como cáncer de pulmón, problemas respiratorios o baja disponibilidad de insulina al llegar al torrente sanguíneo. Esta la actualidad, existen muy pocos reportes acerca de tratamientos alternativos para la diabetes no invasivo y con una efectividad alta haciendo uso de nanoestructuras de carbono.

Justificación.

Las nanoestructuras de carbono son materiales prometedores en la administración de fármacos porque proporcionan métodos de tratamiento altamente eficaces y versátiles para lograr la liberación de fármacos con bajos efectos secundarios debido a sus propiedades como su variedad de morfologías, alta porosidad, buena capacidad de adsorción, superficie fácilmente modificable, biocompatibilidad, estabilidad fisicoquímica y conductividad eléctrica. Es por lo anterior que las nanoestructuras de carbono son candidatas para probar la adsorción de insulina y posteriormente la liberación de esta, mediante pulsos eléctricos de baja intensidad.

Hipótesis.

Las nanoestructuras de carbono, debido a su alta conductividad eléctrica, estabilidad en medio acuoso y porosidad, podrán ser capaces de adsorber la insulina y por medio de pulsos eléctricos liberarla de manera controlada.

Objetivo general.

Evaluar la capacidad adsorción de insulina empleando nanoesferas de carbono sintetizadas por el método sol-gel y electroquímico y su liberación mediante la aplicación de pulsos eléctricos utilizando dos tipos de arreglo electroquímico.

Objetivos específicos.

Evaluar electroquímicamente los materiales nanoestructurados de carbono sintetizados por el grupo de investigación, seleccionando los de mayor conductividad.

Determinar los parámetros electroquímicos de la insulina humana de acción rápida mediante técnicas de electroquímicas.

Elaborar curvas de calibración mediante técnica de espectroscopía UV y voltametría cíclica para determinar el límite de detección de insulina.

Caracterizar los materiales de carbono sintetizados por el método electroquímico y sol-gel antes y después de adsorción de la insulina.

Realizar y evaluar la adsorción de la insulina en las nanoestructuras de carbono.

Realizar pruebas de liberación de insulina por voltametría pulsada.

Evaluar dos sistemas electroquímicos para la liberación de la insulina.

Metodología.

Se evaluaron nanoestructuras de carbono sintetizados por dos métodos diferentes; electroquímico y sol-gel. Los cuales, fueron sintetizados previamente por el grupo de investigación.

El método sol-gel se seleccionó ya que es uno de los métodos más utilizados en la obtención de nanoesferas de carbono, sin embargo, el uso de este proceso de síntesis da como resultado nanoestructuras de carbono de un tamaño mayor a 100 nm. Para la disminución del tamaño de partícula Kashina et al., 2019 probaron la adición de compuestos nitrogenados como el EDA. Es por esta razón que en esta investigación se trabajó con dos tipos de materiales obtenidos mediante esta síntesis, los cuales se les asignó el nombre de SG (material sintetizado por el método sol-gel convencional) y EDA, (material sintetizado por método sol-gel utilizando etilendiamina).

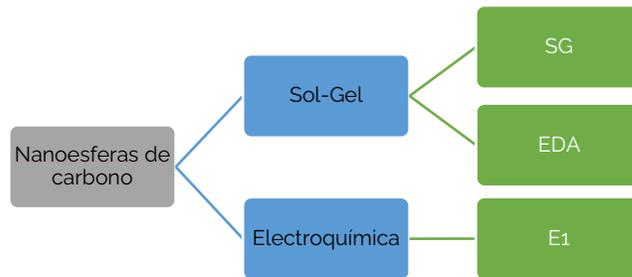


Figura 9. Diagrama de las nanoestructuras utilizadas para análisis y caracterización.

Métodos de síntesis seleccionados para la obtención de nanoestructuras y nomenclatura utilizada para cada uno de ellos.

La síntesis por el método sol-gel la llevó a cabo Kashina et al., 2019, quien mezcló durante 1 hora H_2O , etanol y NH_4OH , después de transcurrido el tiempo agregó 1g de resorcinol y se disolvió durante 1 hora. Posteriormente, agregó gota a gota formaldehído y la muestra permaneció en agitación durante 3 horas a $25^{\circ}C$. Los materiales se centrifugaron, lavaron con agua y etanol y fueron secados a $100^{\circ}C$. En la síntesis del material EDA se siguió la metodología descrita anteriormente, teniendo como única diferencia la adición de etilendiamina al momento de la adición de resorcinol.

La síntesis electroquímica la realizó Sánchez et al., 2022, utilizando como ánodo y cátodo una barra de grafito (99.99% de pureza), con una distancia entre electrodos de 2 cm, sumergidos en un electrolito soporte de KNO_3 (3 M) y suministrando un voltaje de 5V durante 1 hora, como se observa en la **Figura 10**.



Figura 10. Sistema utilizado en la síntesis electroquímica de las nanoestructuras de carbono. Constituido de un ánodo y cátodo de grafito 99.99% de pureza.

Técnicas de caracterización.

Para observar la morfología y determinar el tamaño de las nanoestructuras obtenidas por método sol-gel, se utilizó como referencia las imágenes reportadas por el grupo de investigación de Kashina et al. 2019, las cuales se realizaron con un equipo SU 3500 SEM (Hitachi, Japón). Para las nanoestructuras sintetizadas electroquímicamente se utilizó el equipo JEOL JSM-6010PLUS/LA (Japón). Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó un equipo JEOL JEM-1010, para su preparación se realizó una dispersión de cada una de las muestras en etanol y posteriormente se depositó una gota de la dispersión en una gradilla de cobre y carbono.

La espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FT-IR) se empleó para obtener información acerca de los grupos funcionales presentes en nuestra muestra, antes y después de la adición de la insulina. Esta caracterización se realizó con el equipo PerkinElmer UATR Two, las muestras fueron analizadas en sólido, sin una preparación previa.

Otras técnicas de caracterización utilizadas fueron la Difracción por Rayos X (DRX) y la microscopía RAMAN. Las cuales nos ayudaron a determinar el grado de ordenamiento de los materiales de carbono. Para la DRX se empleó un equipo D8 ADVANCE (Bruker), con un intervalo angular de 2θ , de 10° y 80° . Para la obtención de los espectros RAMAN se utilizó el DXRTMRAMAN MICROSCOPE (THERMO FISHER SCIENTIFIC, USA), utilizado una longitud de onda de 633 nm.

La espectroscopía de UV-VIS se usó para determinar la concentración de insulina que contenía las soluciones en cada una de las pruebas realizadas, las cuales se determinaron con el espectrómetro PekinElmer Lambda 35.

Mediante el uso de técnicas electroquímicas, como la voltametría cíclica se obtuvo la información acerca del comportamiento electroquímico del material estudiado, tal como su resistencia al paso de la corriente eléctrica y las reacciones de óxido reducción en su superficie. Estas caracterizaciones electroquímicas, se realizaron utilizando un potenciostato/galvanostato marca Biologic SP150, equipado con un software de análisis EC-Lab, se usó un sistema de 3 electrodos, utilizando alambre de platino como contraelectrodo, como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo modificado con cada una de los materiales seleccionados y como electrodo de referencia un electrodo de (Ag/AgCl)_{KCl saturado}.

Metodología de adsorción de insulina humana de acción rápida en nanoestructuras de carbono.

Para realizar las pruebas de adsorción de la insulina humana rápida (INSULEX, PISA BIOTEC), en las nanoesferas de carbono, se pesaron 2 mg de nanoestructura de carbono en un tubo eppendorf, después se agregaron 500 µL de insulina humana rápida, se añadió un agitador magnético y el sistema se colocó en un baño de hielo con agitación constante, tomando alícuotas de 100 µL por varias horas. Los 100 µL recolectados se aforaron en un matraz de 5 mL con PBS. Esta disolución se analizó por espectroscopía de UV-VIS y por técnicas electroquímicas. Mediante los gráficos generados por espectroscopía UV-VIS se obtuvo el tiempo en donde fue mayor la adsorción de insulina en las nanoestructuras, el cual llamamos tiempo óptimo.

Para poder conocer la adsorción máxima en las nanoestructuras de carbono, primero se calculó el %Adsorción en el medio utilizando la ecuación 1), y posteriormente se utilizó la ecuación 2).

$$1) \%Adsorción_{medio} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

$$2) \%Adsorción_{nc} = \%Adsorción_{medio} - 100$$

Cromatografía por exclusión molecular.

La cromatografía de exclusión molecular es un mecanismo utilizado para la separación de biomoléculas de acuerdo con su tamaño. Esta técnica consta de dos fases, estacionaria y dinámica. La fase estacionaria está constituida por un material poroso, el cual generalmente es un gel polimérico sintético. La fase dinámica se encuentra en fase líquida es en donde se encuentran las moléculas a separar. Estas son separadas dependiendo del peso molecular que se tenga en la muestra. Las moléculas más grandes son las primeras en eludir, al contrario de las moléculas más pequeñas que tardan más tiempo en separarse, debido a que entran en contacto con los poros de la fase estacionaria de la columna. En este trabajo se utilizó esta técnica para confirmar de manera visual, la adsorción y la interacción de la insulina con los materiales de carbono. (Miller, 1988)

El primer paso para realizar la exclusión molecular es el acoplamiento de la biomolécula con un marcador. Para el acoplamiento de insulina se utilizó un compuesto llamado fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (Sigma Chemical CO No. F7250). Se realizó una solución de insulina-FITC con 4.5 mg de FITC, 1.5 mL de insulina, 100 μ L de DMSO y 440 mL PBS, la cual permaneció en agitación constante durante 18 horas en un baño de hielo a 4 °C, evitando la exposición a la luz. (Packhaeuser & Kissel, 2007)

Se preparó la fase estacionaria hidratando el bio-gel con agua desionizada durante 4 horas, una vez transcurrido este tiempo se desgasificó utilizando una bomba de vacío conectado a un matraz Büchner. Finalizada esta etapa, se colocó la columna de exclusión molecular, esta se llenó en una proporción de 2/3 del volumen con bio-gel y después se estableció el flujo de la fase dinámica a 1.35 mL/min. Una vez ajustados estos parámetros se recolectaron 20 fracciones de 2 mL cada una, (**Figura 11**). Posteriormente, cada una de las fracciones fueron analizadas por espectroscopía de UV-VIS para determinar la fracción con mayor concentración de FITC acoplada a la insulina. Para después, llevar a cabo la adsorción de

insulina-FITC en las nanoestructuras de carbono siguiendo la metodología descrita anteriormente.

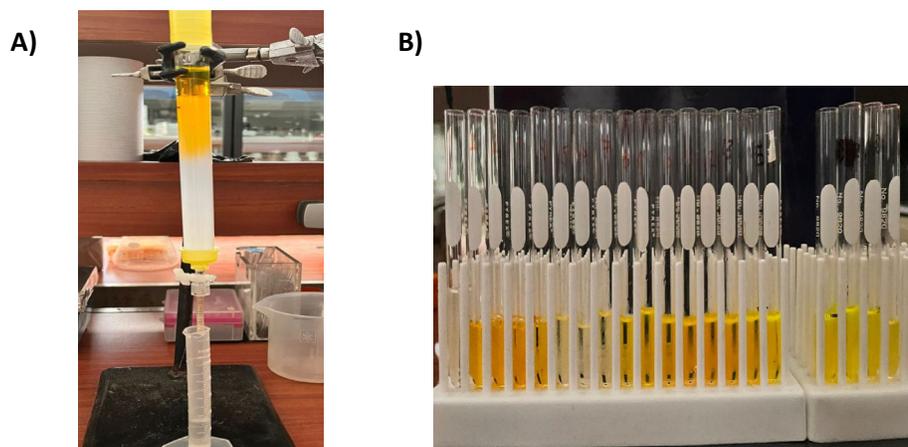


Figura 11. *Columna de exclusión molecular.* A). Equipo empleado para realizar la cromatografía por exclusión molecular. B) Fracciones recolectadas al realizar la exclusión molecular.

Metodología para la liberación de insulina.

Etapa I. Obtención de curvas de oxidación de la insulina mediante electrodos modificados con nanoestructuras de carbono.

Para determinar esta prueba electroquímica se necesitó modificar el electrodo de trabajo con tintas conductoras hechas con cada uno de los materiales que se evaluaron. Las tintas conductoras se prepararon con 1 mg de nanoestructura de carbono y 95 μL de isopropanol, esta suspensión se dispersó utilizando ondas ultrasonido durante 1 hora, posteriormente se agregaron 5 μL de Nafión (Sigma Aldrich), después se sonicó durante 1 hora. La tinta conductiva se depositó por el método drop-casting o goteo en un electrodo de carbón vitreo de 5 mm de diámetro, se dejó secar durante varias horas a temperatura ambiente. Este electrodo de trabajo modificado se utilizó para obtener las curvas de oxidación en un sistema de 3 electrodos.

En esta etapa se utilizó una solución de 50 mL de PBS pH=7 a 25°C con 50 μL de insulina humana de acción rápida, cada uno de los electrodos modificados se evaluaron a las siguientes velocidades de barrido; 5, 10, 15, 20, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 200 y 250 mV/s

para poder determinar la velocidad en la cual se tiene una mejor señal y comprobar el comportamiento de la molécula de la insulina con los materiales utilizados.

Etapa II. Liberación de insulina mediante técnicas electroquímicas.

La liberación de insulina se evaluó utilizando dos tipos de arreglos electroquímicos; el primero fue utilizando una celda electroquímica de tres electrodos, en el cual el electrodo de trabajo se modificó mediante tintas conductoras utilizando la metodología descrita anteriormente y el segundo, mediante el uso de un electrodo serigrafiado de carbono.

El primer arreglo electroquímico se realizó mediante el uso de electrodos de trabajo modificados con cada una de las nanoestructuras, una vez que la tinta conductiva se secó se agregaron 5 μL de insulina humana de acción rápida en la superficie del electrodo, y se dejó secar durante varias horas dentro del refrigerador a 10 °C. El sistema de tres electrodos mencionados anteriormente, se sumergió en 15 mL de PBS, realizando voltametrías cíclicas a la velocidad en la que el material tuvo una mejor respuesta.

El segundo arreglo electroquímico se llevó a cabo utilizando electrodos serigrafiados, los cuales son dispositivos en donde se encuentran impresos en una sola placa los tres electrodos; electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia. El electrodo de trabajo se fabrica depositando una serie de capas de tintas conductoras. Este electrodo de trabajo es de carbono, en él se le agregaron 5 μL de insulina humana de acción rápida y este dispositivo fue sumergido en 15 mL de PBS. Una ventaja que tiene el uso de estos electrodos serigrafiados es que tienen un tamaño muy pequeño y al estar incorporados los 3 electrodos en un solo sistema disminuye la interferencia y la confiabilidad de los resultados.

Capitulo III

Resultados y discusiones.

Caracterización de las nanoestructuras de carbono.

En el estudio realizado por Kashina et al., 2019, se obtuvieron las microscopías SEM para los materiales sintetizados por el método sol-gel. En ellas se puede observar la morfología esférica bien definida de los materiales y su homogeneidad. El tamaño promedio reportado de estas nanoestructuras es de 700 nm para la muestra SG y 150 nm para la muestra EDA (etilendiamina). Las nanoesferas del material EDA **Figura 12B)** presentan una rugosidad que recubre toda la superficie del material, esto debido al efecto que tiene la etilendiamina empleada en la síntesis. A diferencia del proceso realizado para el material SG en donde dicho compuesto no fue empleado y su superficie no muestra esta característica.

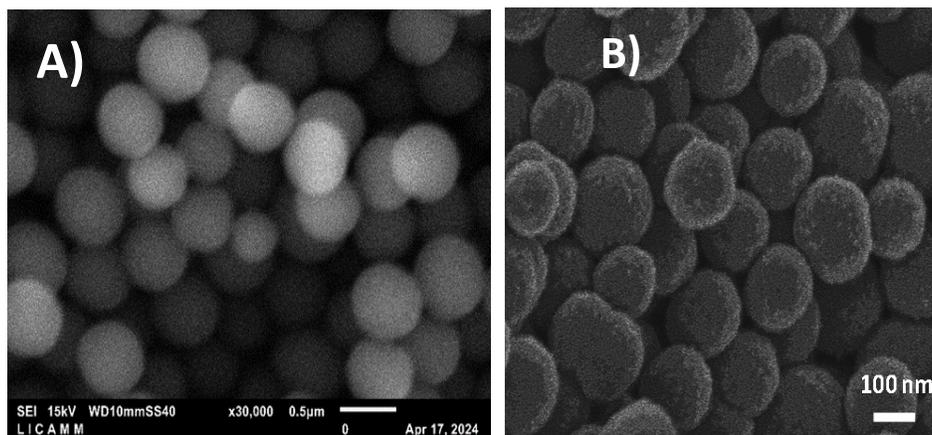


Figura 12. *Microscopía electrónica de barrido método sol-gel.* Imágenes obtenidas de la microscopía electrónica de barrido A) Material SG y B) Material EDA. Nota. Adaptada de Kashina, S. (2019). Síntesis y caracterización de nanoesferas de carbono para aplicaciones de interés medioambiental. [Tesis doctoral, Universidad de Guanajuato]. Repositorio institucional de la Universidad de Guanajuato.

<http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/6553>

Por otra parte, en la imagen SEM **Figura 13** el material sintetizado por el método electroquímico muestra en la superficie de las láminas de grafito el inicio del proceso de formación de las nanoesferas de carbono, sin embargo, destaca que la nanoestructura

presenta un ordenamiento distinto a las sintetizadas por el método sol-gel antes mencionadas, tanto la morfología y el tamaño no son homogéneos.

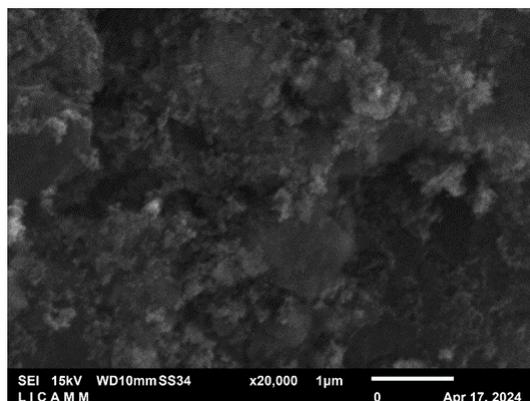


Figura 13. *Microscopía electrónica de barrido material sintetizado por método electroquímico.* Imagen obtenida de la microscopía electrónica de barrido del material E1.

Para confirmar que la morfología de los materiales estudiados no haya cambiado por factores externos al proceso de síntesis, factores como el paso del tiempo, la humedad y su preservación, posterior se realizó una microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los resultados para el material E1 evidencia el crecimiento de las nanoesferas de carbono en las láminas de grafito **Figura 14** y el tamaño de las nanoestructuras menor a 200 nm.

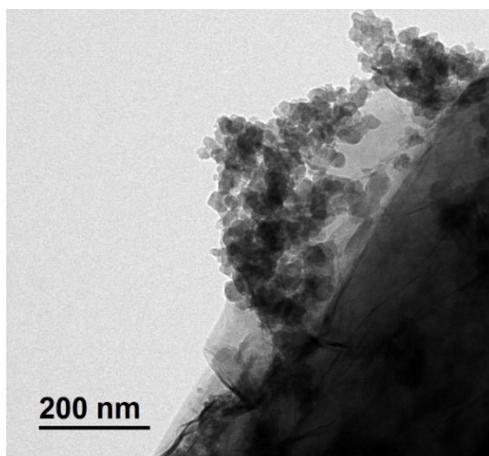


Figura 14. *Microscopía TEM material sintetizado por método electroquímico.* Imagen TEM de material E1.

Respecto a los materiales sintetizados por el método sol-gel **Figura 15** se identifica una ligera variación en la morfología, en esta se aprecia una forma más alargada y menos definida presentando una mayor aglomeración debido a la ausencia de humedad.

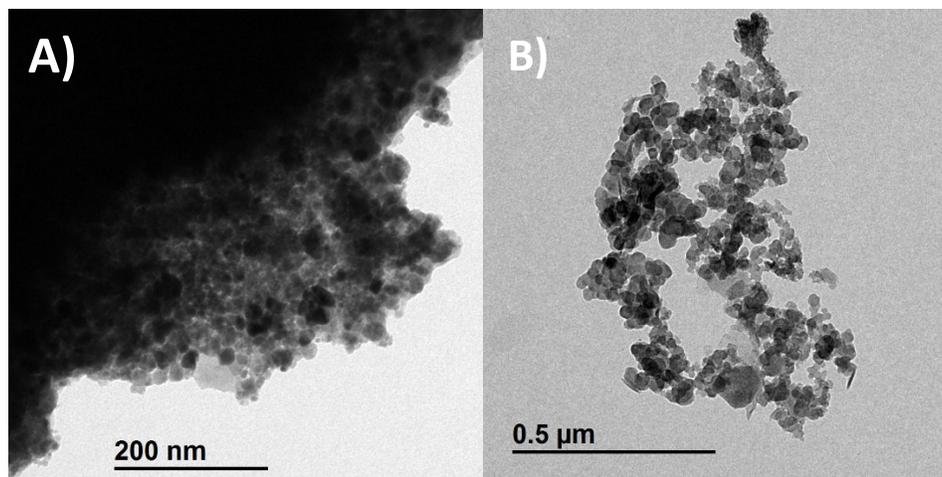


Figura 15. *Microscopía TEM materiales sintetizados por método sol-gel.* Imágenes obtenidas de la microscopía electrónica de transmisión A) Material SG y B) Material EDA.

La técnica de caracterización por Difracción de Rayos X se muestra en la **Figura 16**. En el patrón de difracción de E1 y EDA resalta una señal en $2\theta=23^\circ$ correspondiente al plano (002) de la estructura hexagonal característica del grafito. Esta señal estrecha significa un desplazamiento en los ángulos debido a una distorsión estructural como consecuencia de un desorden en la disposición de las capas de carbono y a las impurezas presentes en el material. No obstante, presentan un grado alto de ordenamiento cristalino en comparación con el material SG en donde no se detecta ninguna señal.

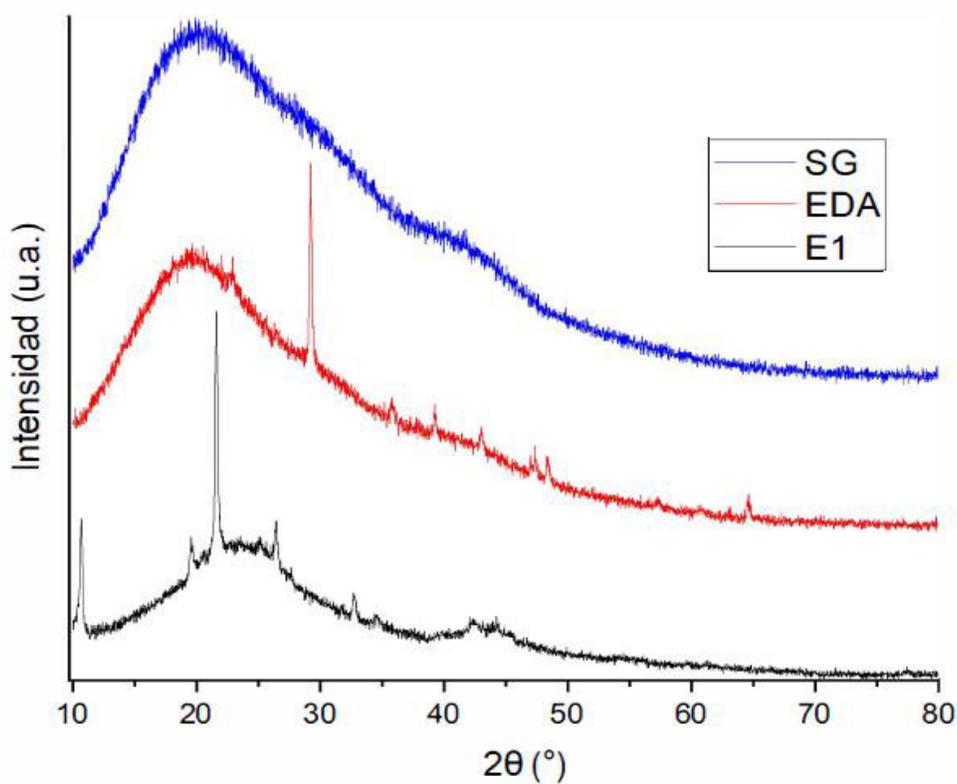


Figura 16. Difractograma de DRX.

Otra manera de determinar el grado de ordenamiento es utilizando la espectroscopía Raman. La **Figura 17** contiene el espectro del material E1 en donde se distingue una señal en 1331 cm^{-1} y 1593 cm^{-1} asociada a la banda D y G, propiedad de los materiales de carbono. La banda D corresponde al grado de desorden estructural, debido a la presencia de impurezas en la muestra y la banda G se asociada a estructuras gráficas perfectas (Ferrari & Basko, 2013).

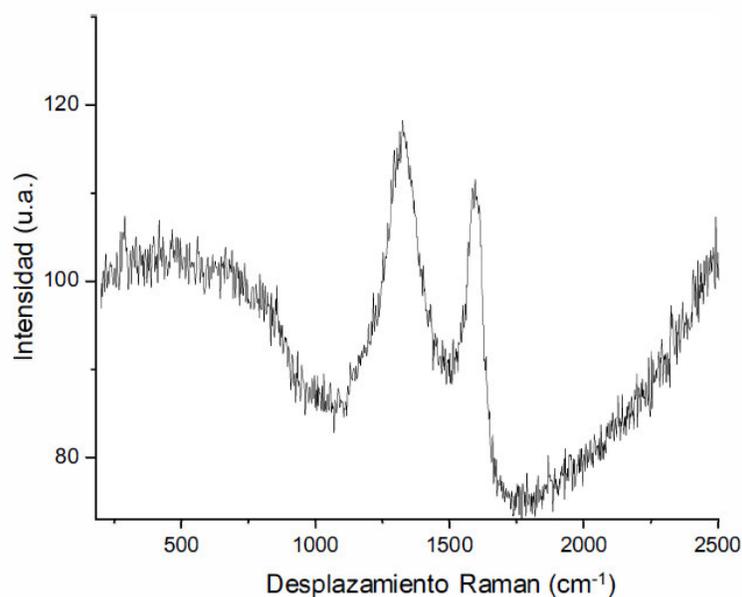


Figura 17. *Espectroscopía Raman.* Espectro Raman del material E1, en donde se observa la banda D y G propiedad de los materiales de carbono.

En cambio, en los espectros Raman de las muestras SG y EDA **Figura 18** no se logra apreciar ninguna señal de las bandas características, debido a que no presentan ordenamiento en sus átomos. Esto puede deberse a que estos materiales carecen de un tratamiento térmico, como la pirólisis, la cual ayuda a propiciar el ordenamiento de los materiales.

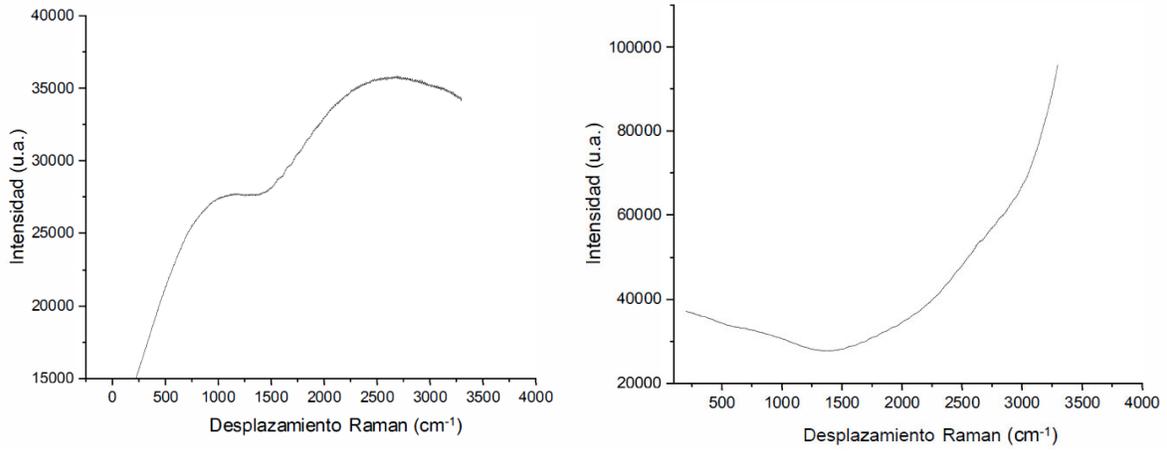


Figura 18. Espectroscopía Raman. Espectro Raman del material A) SG y B) EDA, los cuales carecen de la presencia de las bandas D y G propias de los materiales de carbono.

A continuación, se describen los resultados derivados de la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). En cada uno de estos, se comparó el espectro de la insulina humana de acción rápida con las nanoestructuras de carbono antes y después del proceso de adsorción.

En la **Figura 19** se muestra el espectro del material E1 sin insulina (color negro), evidencia la ausencia de grupos funcionales en su estructura, sin embargo, después de estar en contacto con la insulina (color azul) sus grupos funcionales se modifican ya que se observan señales en $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ y $1700-1600\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$, pertenecientes a la insulina (color rojo). Con esta información podemos suponer que las nanoestructuras de carbono llamada E1 mantiene un enlace químico con la hormona.

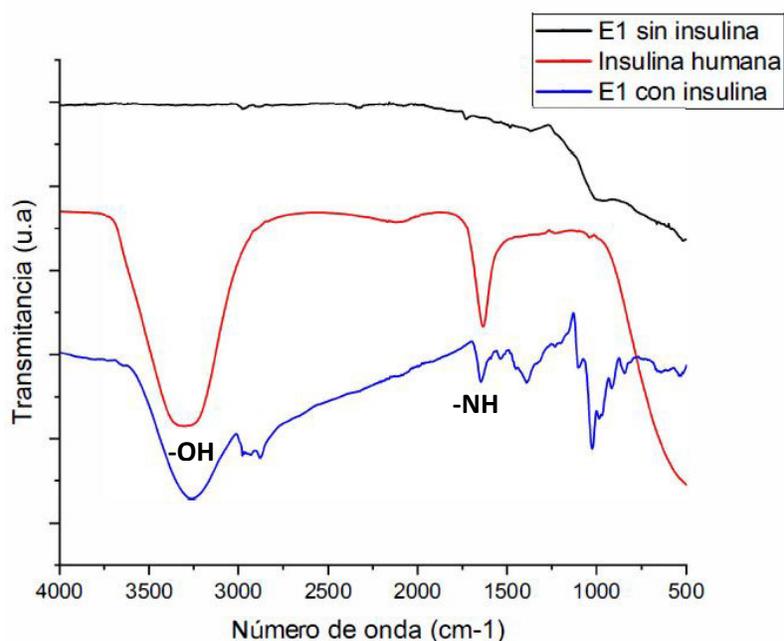


Figura 19. Espectroscopía FTIR de muestra E1. Espectro FTIR de muestra E1 en donde aparecen las señales pertenecientes a los grupos funcionales $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$.

Por otro lado, los espectros de la **Figura 20** revela que ninguno de los dos materiales sintetizados por el método sol-gel presentan un cambio en sus señales originales, por lo cual no podemos asegurar que las nanoestructuras establecen enlace químico con la insulina, pero sí una interacción entre ellas.

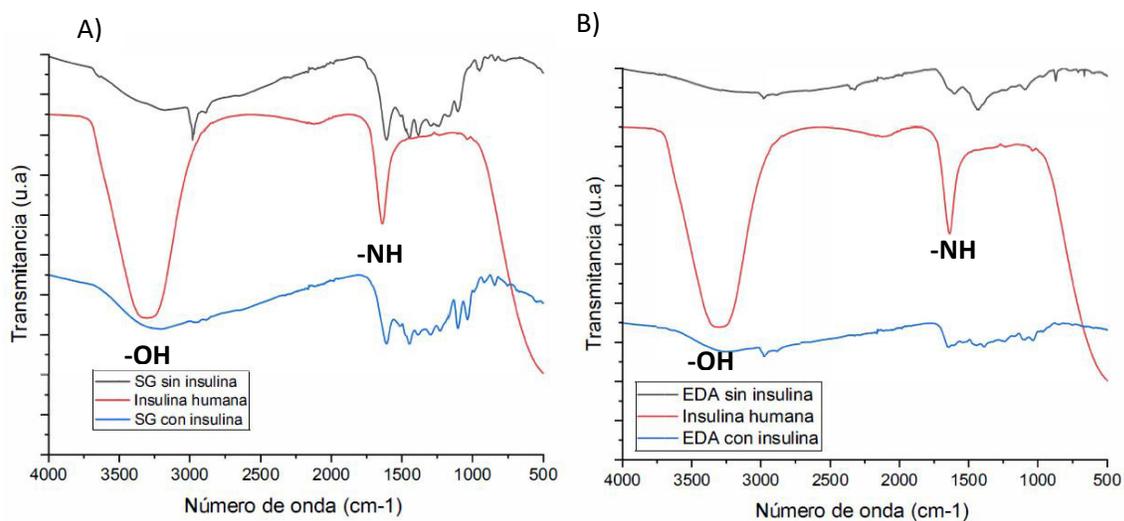


Figura 20. Espectroscopía FTIR de materiales sintetizados por sol-gel. Espectro FTIR de la insulina y de los materiales A) SG y B) EDA.

Para conocer los elementos presentes en los materiales utilizados, se realizó un análisis de EDS; estos estudios demostraron que el material E1 **Figura 21** contiene carbono y oxígeno, teniendo elementos de impurezas como Al, Si, Fe, los cuales se deben al material utilizado del proceso de síntesis y al proceso de molienda previa a su análisis.

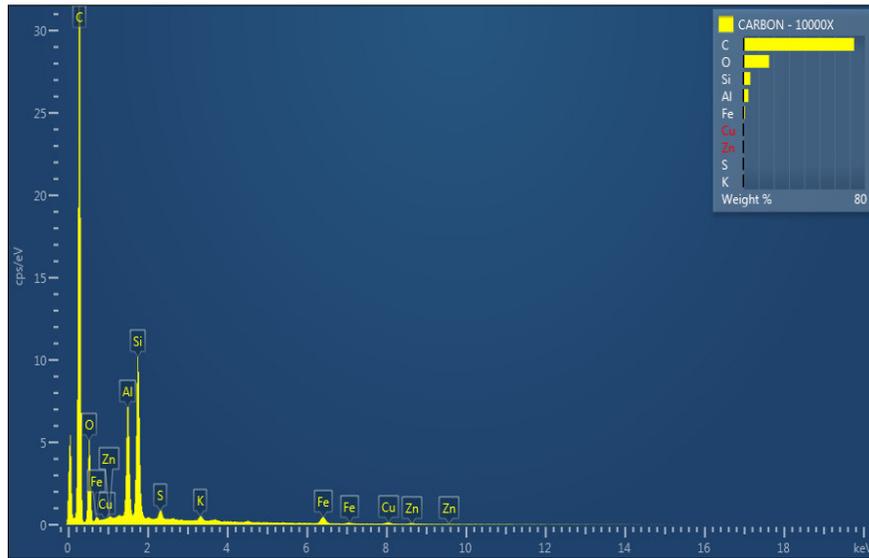


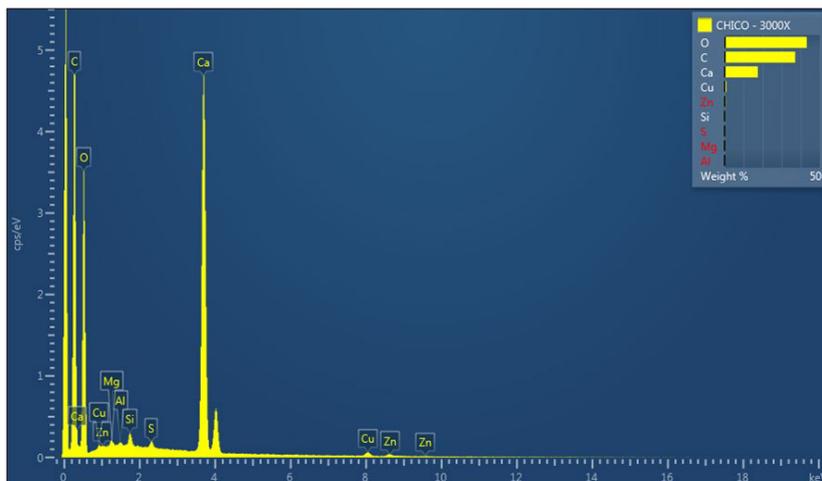
Figura 21. Estudio EDS correspondiente a la muestra E1.

En el material SG está compuesto únicamente por dos elementos: el carbono y el oxígeno **Figura 22**. Es un resultado esperado, debido a que la síntesis por medio de sol-gel ha sido la más estudiada y utilizada para la obtención de nanoesferas de carbono.



Figura 22. Estudio EDS correspondiente a la muestra SG.

Los resultados de EDS para el material EDA muestran que este material está compuesto por carbono y oxígeno. Teniendo al igual que el material E1 trazas e impurezas de otros elementos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la síntesis de este material fue propuesta como un caso de estudio por Kashina et al., 2019 en donde investigaron la influencia de la etilendiamina en el tamaño de las nanoesferas de carbono. Al agregar este compuesto químico el tamaño disminuyó considerablemente. La composición reportada por Kashina et al., 2019 para las dos muestras sintetizadas por sol-gel contenían 85% de carbono para SG y 75.8% para EDA, con una composición de 2.5% nitrógeno y 7.9% respectivamente. Los resultados obtenidos anteriormente por el grupo de investigación permiten complementar el análisis elemental de las nanoestructuras estudiadas.



Elementos	Wt%
C	37.08
O	43.14
Mg	0.17
Al	0.09
Si	0.34
S	0.19
Ca	17.47
Cu	0.93
Zn	0.60
Total	100.00

Figura 23. Estudio EDS correspondiente a la muestra EDA.

Mecanismo para la adsorción de insulina en nanoestructuras de carbono.

Haciendo uso de las técnicas de caracterización se obtuvo información acerca de la morfología, tamaño, el ordenamiento atómico y composición de los materiales. Al mismo tiempo, nos permitió inferir el comportamiento que tienen los materiales al interactuar con la insulina, por ejemplo, los estudios IR nos demostraron la posible interacción entre ellos. Por esta razón se propuso un mecanismo para determinar la adsorción de la insulina en las nanoestructuras de carbono. Para encontrar la longitud de onda máxima de la insulina se llevó a cabo un barrido espectral de UV-VIS, esta señal se detectó a los 270 nm. Después, una curva de calibración de la insulina con un rango de concentración de 0.4 $\mu\text{L/mL}$ a 2.6 $\mu\text{L/mL}$ **Figura 24**. Con los datos obtenidos de las diferentes concentraciones en la longitud de onda máxima, se ajustó en un 0.977 el siguiente modelo lineal: $y = 0.0102x + 0.1927$.

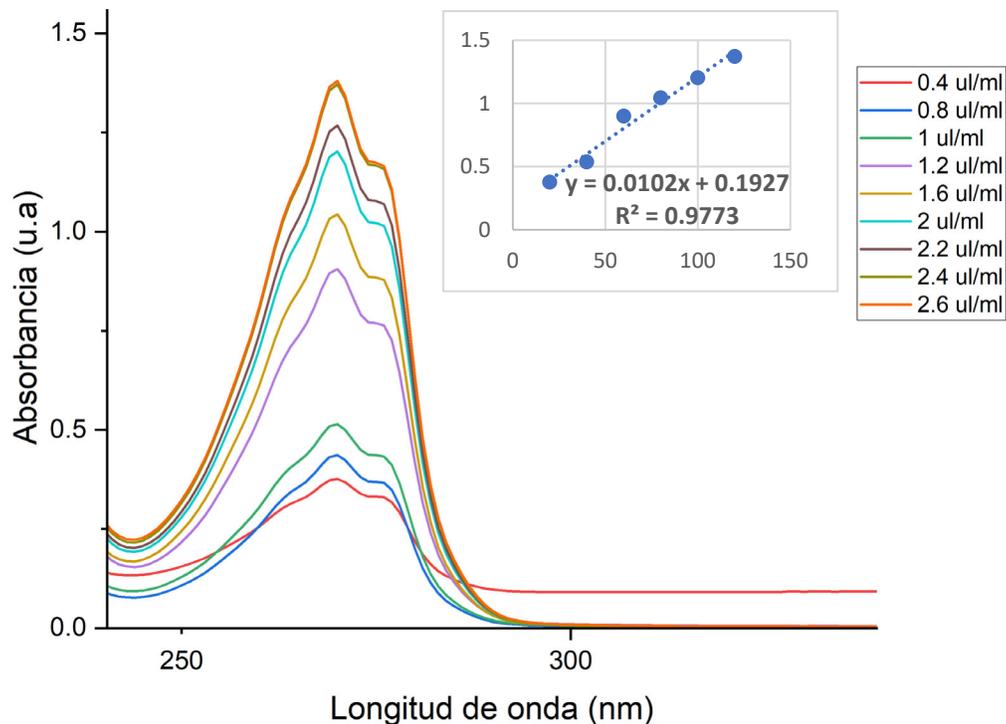


Figura 24. Curva de calibración de la insulina humana rápida. Concentraciones utilizadas y la ecuación lineal ajustado al modelo lineal.

Una vez llevado a cabo el proceso de adsorción descrito en el Capítulo II, las alícuotas recolectadas se analizaron con espectroscopía de UV-VIS. Mediante el comportamiento de los resultados determinamos el tiempo en el que se obtuvo una mayor interacción de la

insulina con la nanoestructura. En la **Figura 25** muestra la gráfica del proceso de adsorción de insulina del material E1: el tiempo óptimo encontrado fue de 90 minutos (color azul turquesa), transcurrido este tiempo el material comienza a llevar a cabo una desorción (color rosa) aumentando la concentración de insulina en el medio. Con ayuda del modelo lineal obtenido anteriormente, se calcularon las concentraciones de insulina en el medio y utilizando la ecuación mencionada en el Capítulo II para conocer el porcentaje de adsorción, se calculó el porcentaje de adsorción de insulina en el medio (%Adsorción_{medio}) el cual fue de 27% y de 73 en porcentaje de adsorción de insulina en las nanoestructuras (%Adsorción_{nc}).

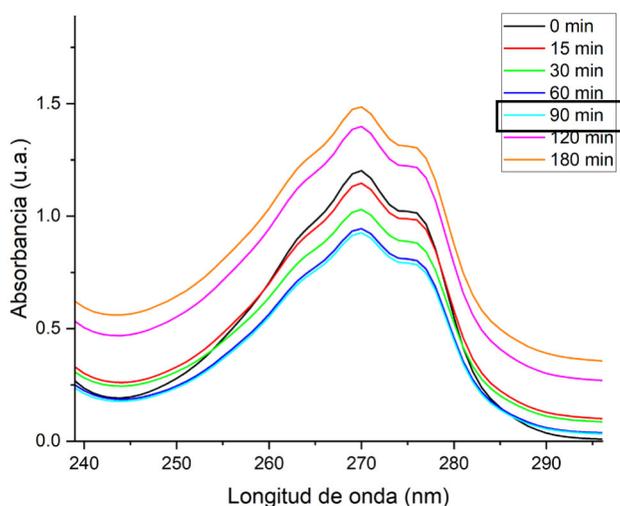


Figura 25. Adsorción de la insulina en E1.

El tiempo de mayor interacción de la insulina con el material SG **Figura 26 A)** es a los 60 minutos con %Adsorción_{medio} de 36% y un %Adsorción_{nc} de 64%. La nanoestructura EDA **Figura 26 B)** presentó un %Adsorción_{nc} de 73% en 90 minutos.

A pesar de que los 3 materiales después de cierto tiempo comienzan a realizar la desorción de la insulina, no se genera un cambio o degradación de la insulina ya que las dos señales características de esta molécula persisten a pesar del tiempo de evaluación.

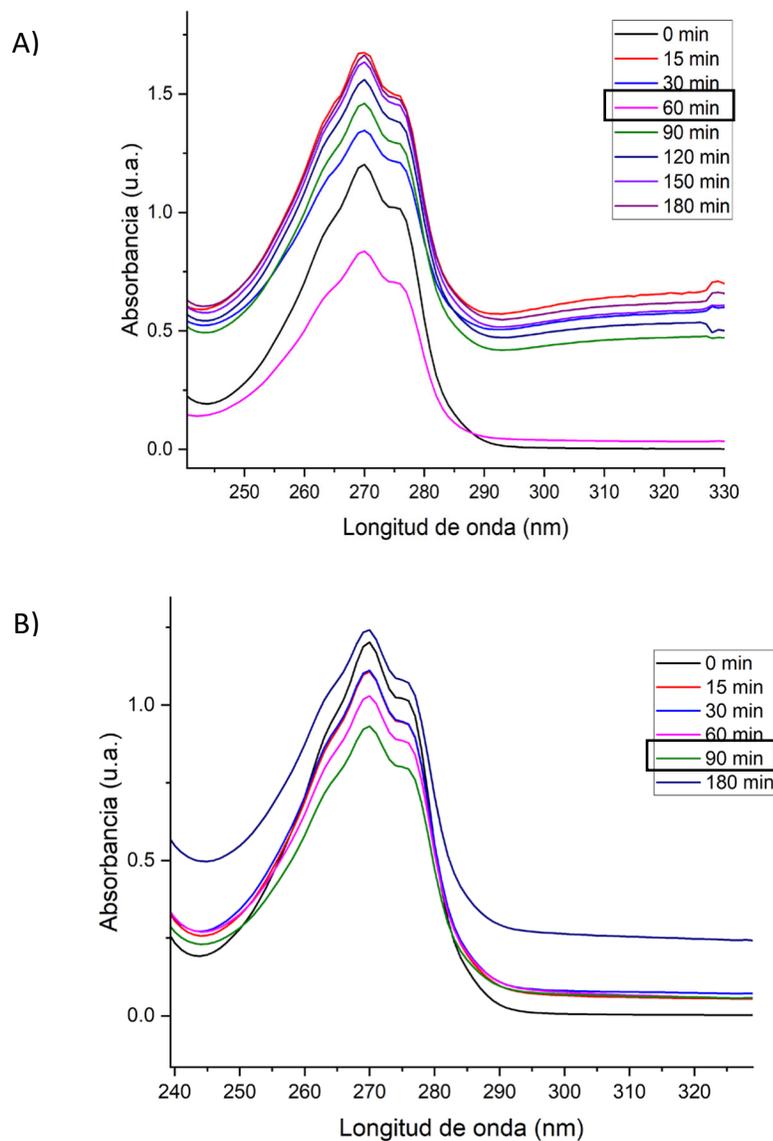


Figura 26. Adsorción de la insulina en SG y EDA. Gráficas de los resultados de espectroscopía de UV-Vis de la adsorción de la insulina en A) SG y B) EDA.

Otra técnica utilizada para determinar la concentración adsorbida de la insulina en las nanoestructuras de carbono es la voltametría cíclica, de igual manera que en la espectroscopía de UV-VIS, se realizó la curva de calibración para obtener los límites de detección de la insulina y la ecuación del modelo lineal mostrado en la **Figura 27**.

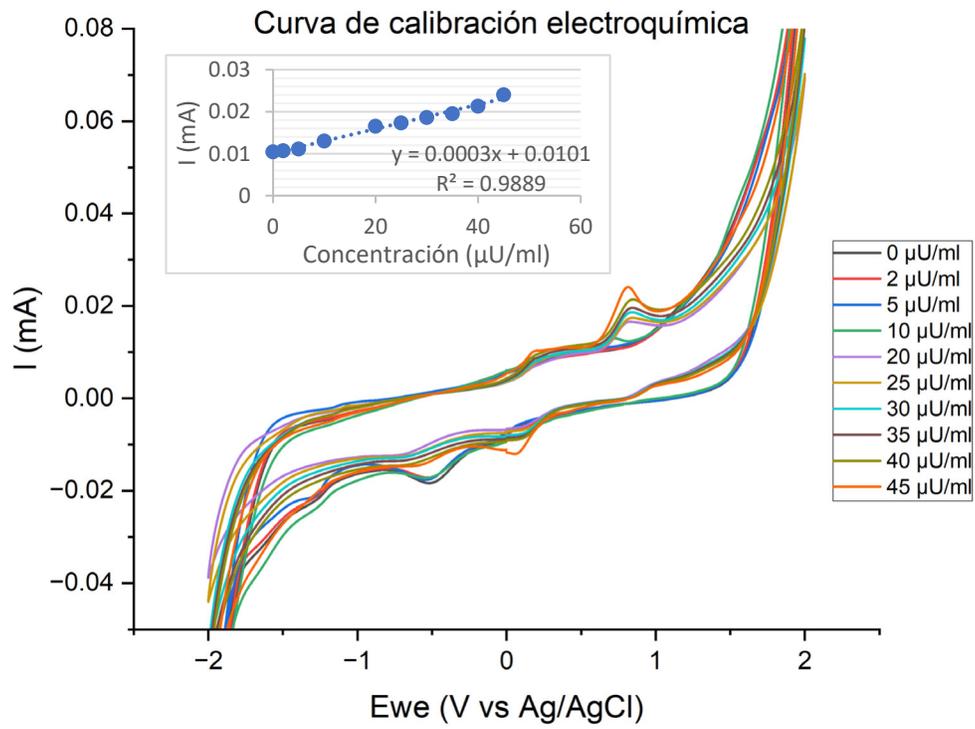
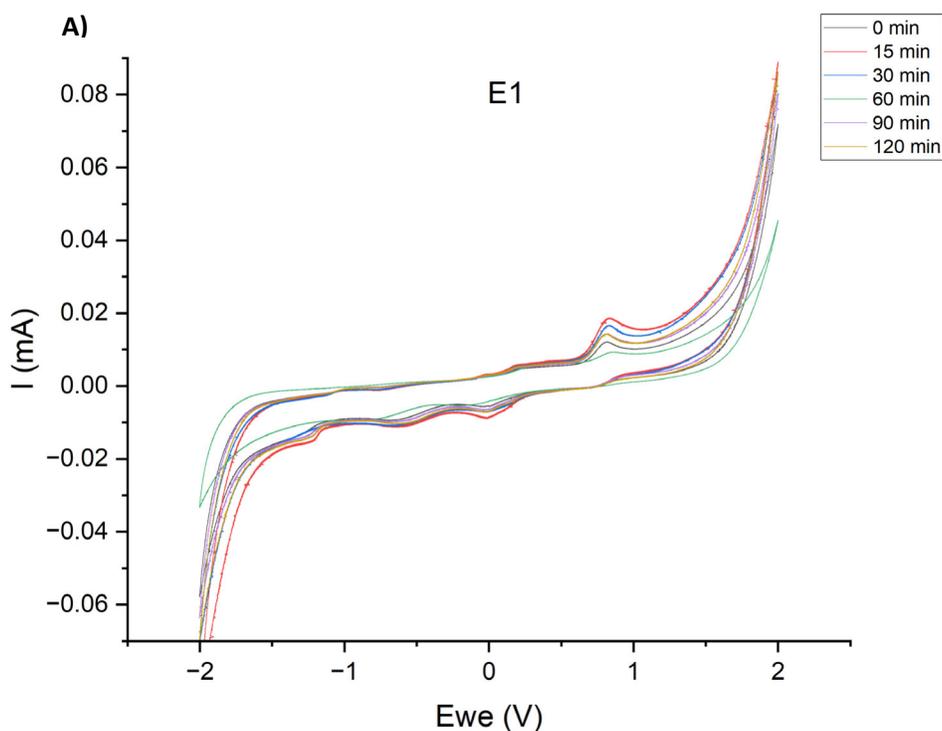


Figura 27. Curva de calibración electroquímica. Curva de calibración electroquímica de 0-45 µU/mL, con modelo de ajuste lineal propuesto.

Los voltamperogramas del mecanismo de adsorción de las alícuotas recolectadas cada 15 minutos **Figura 28**, demostraron que el tiempo óptimo en los 3 materiales de carbono es de 60 minutos **Figura 28A)**, **Figura 28B)** y **Figura 28C)**. El comportamiento que tuvo la insulina con la nanoestructura de carbono fue muy inestable, ya que a pesar de que las técnicas electroquímicas son sumamente sensibles, la variación de la concentración entre cada una de las alícuotas era muy pequeñas, casi indetectables, dando resultados inexactos. Es por este motivo, que este estudio no es considerado confiable para calcular la concentración de insulina adsorbida.



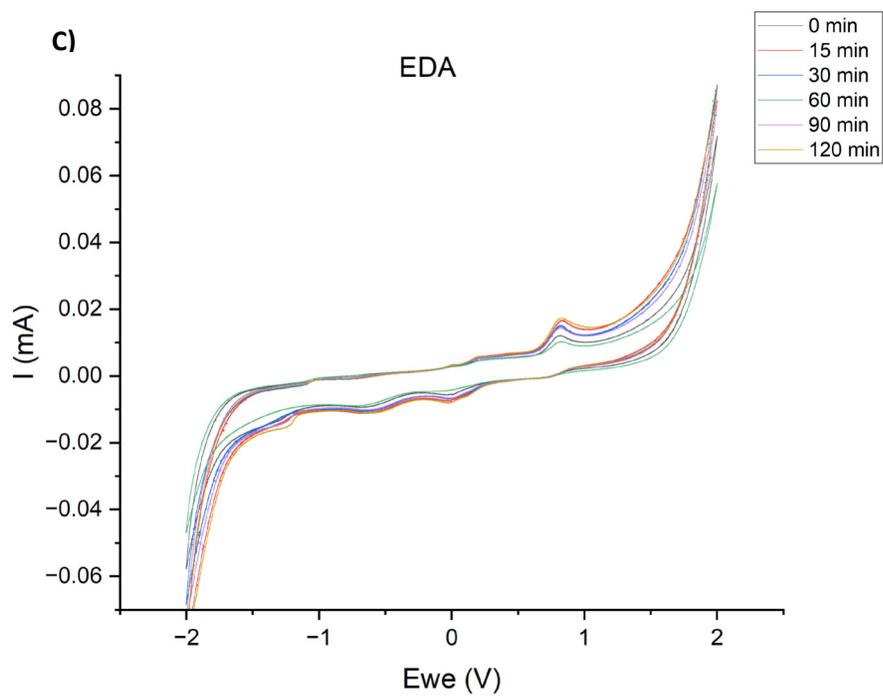
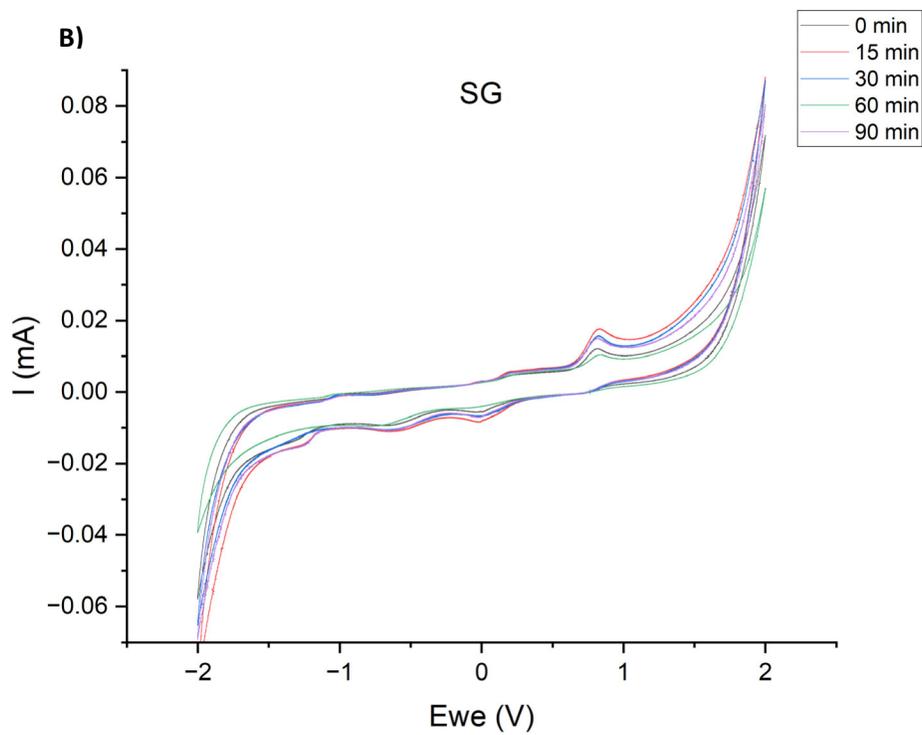


Figura 28. Voltamperogramas de la adsorción de insulina. Voltametrías cíclicas de A) E1, B) SG y C) EDA.

Cromatografía por exclusión molecular.

La prueba de cromatografía por exclusión molecular se realizó para comprobar de manera visual el proceso de adsorción de la insulina en las nanoestructuras de carbono. Las fracciones recolectadas en el proceso fueron analizadas por espectroscopía por UV-VIS con el fin de determinar la fracción que tiene una mayor concentración de insulina-FITC, esto se realizó graficando la absorbancia en la longitud de onda máxima de la insulina vs el número de fracción **Figura 29**. El principio de exclusión molecular establece que las moléculas de mayor tamaño son las primeras en eludir. Dado que el peso molecular de la insulina (5800 Da), es determinante para inferir que las fracciones No. 1,2,3 y 4 son las que contienen mayor concentración de la insulina acoplada con el FITC.

Tomando en cuenta lo anterior, la **Figura 29** muestra (color negro) una señal en la fracción No. 3 debido al alto grado de concentración de insulina, por lo que se seleccionó para llevar a cabo la adsorción con los materiales.

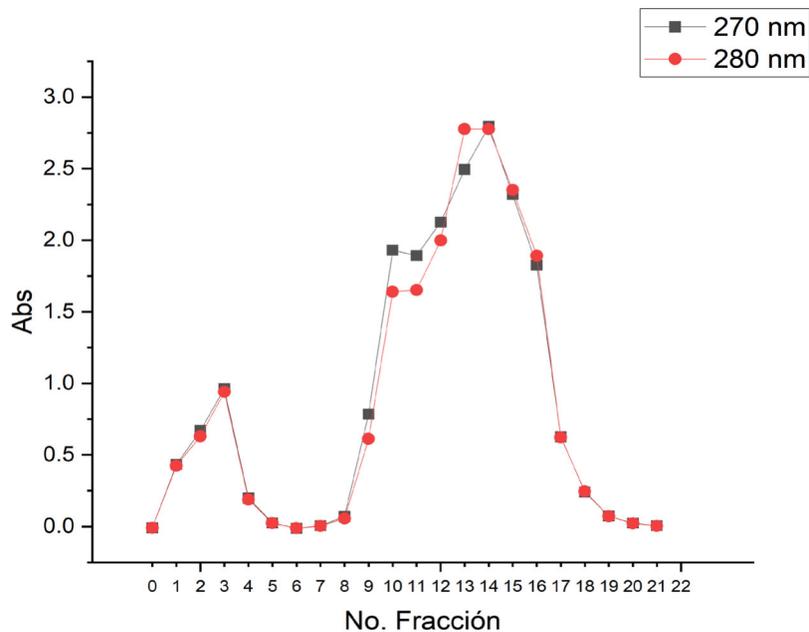


Figura 29. Espectroscopía por UV-VIS obtenida de las fracciones recolectadas mediante la cromatografía por exclusión molecular.

Al finalizar el mecanismo de adsorción de la insulina-FITC en las nanoestructuras de carbono, las alícuotas recolectadas de cada uno de los materiales de carbono fueron vistas al microscopio y fotografiadas como evidencia. En el material E1 **Figura 30** la fluorescencia del FITC acoplada con la insulina aumenta conforme al tiempo, teniendo un máximo de material fluorescente a los 90 minutos, que concuerda con el tiempo óptimo obtenido en el ensayo de adsorción. Para confirmarlo, el material interactuó con el compuesto por 24 horas **Figura 30B)** teniendo como resultado una nula fluorescencia en las nanoestructuras evaluadas como consecuencia de la completa tinción del medio.

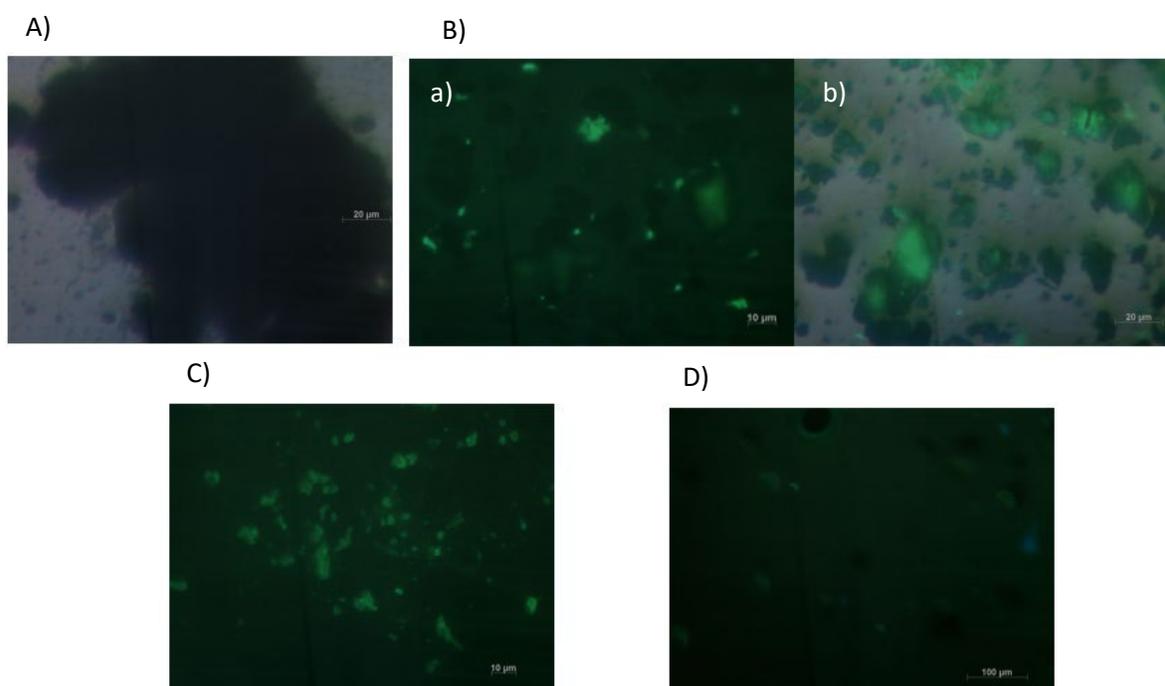


Figura 30. Fotografías de la nanoestructura E1 después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina. Interacción que la insulina-FITC tuvo con el material E1; A) 0 minutos, B) 60 minutos a) campo oscuro, b) campo claro, C) 90 minutos, D) 24 horas.

Lo mismo ocurrió con el material SG **Figura 31** y EDA **Figura 32**, donde la fluorescencia va en crecimiento con el aumento del tiempo en contacto, sin embargo, es notoria que la interacción de la insulina con la nanoestructura fue en sitios selectivos. Esto puede deberse a las cargas parciales específicas que presenta el material las cuales coinciden con la

protonación de los aminoácidos generada por el pH del medio, promoviendo así la interacción de cargas electrostáticas en estos sitios.

Por otra parte, la mayor intensidad de fluorescencia es apreciada en los tiempos óptimos, mencionados en la metodología anterior. En conclusión, este ensayo nos permitió entender el posible mecanismo de adsorción y demostrar los resultados de adsorción obtenidos por espectroscopía por UV-VIS.

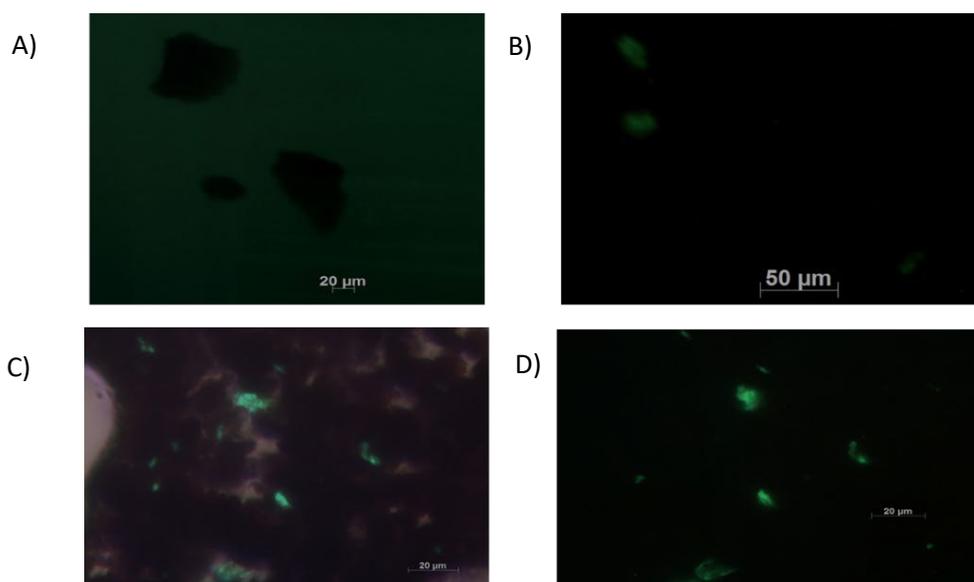


Figura 31. Fotografías de la nanoestructura SG después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina. Interacción que la insulina-FITC tuvo con el material SG; A) 0 minutos, B) 60 minutos, C) 90 minutos a) campo claro, b) campo oscuro.

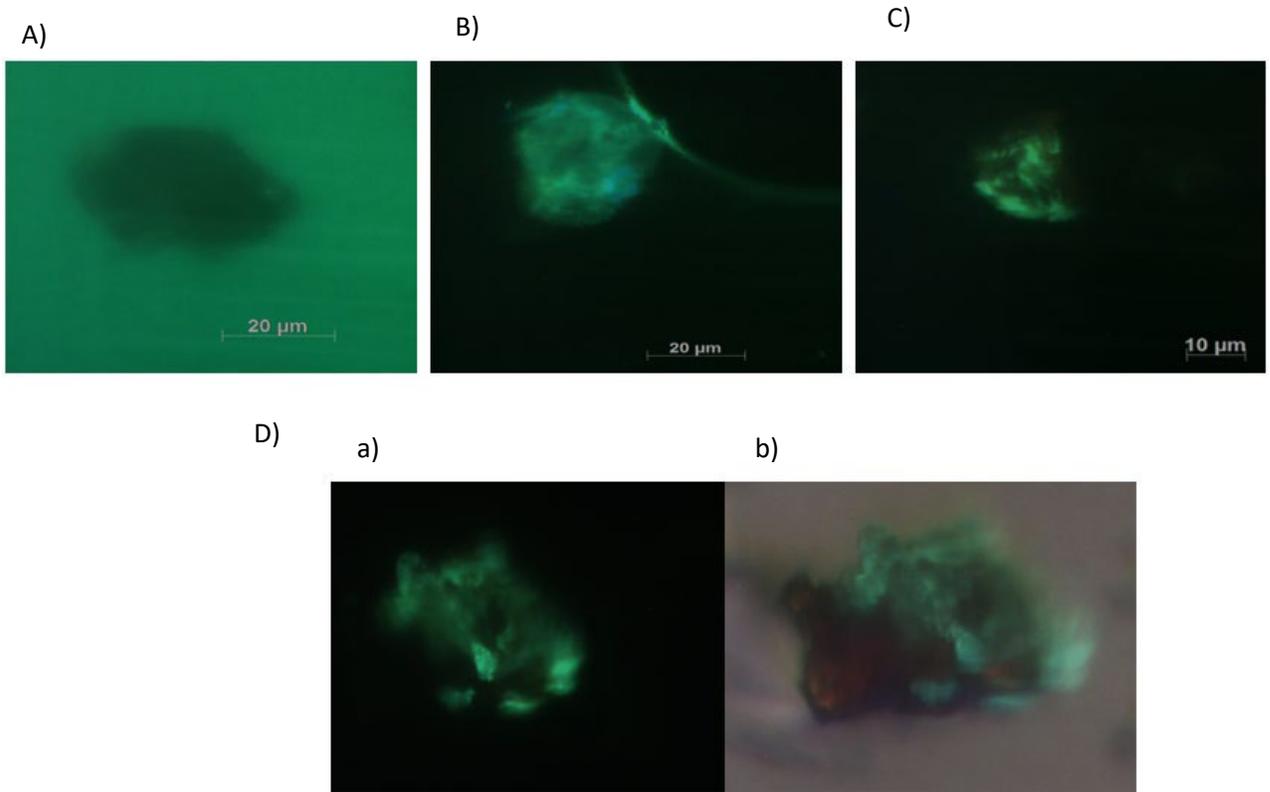


Figura 32. *Fotografías de la nanoestructura EDA después realizar el mecanismo de adsorción de la insulina.* Tiempos de interacción de la insulina-FITC con el material EDA; A) 0 minutos, B) 60 minutos, C) 90 minutos, D) 150 horas a) campo oscuro b) campo claro.

Técnicas electroquímicas para la insulina humana de acción rápida.

Derivado de las técnicas de caracterización las cuales, revelaron que las tres nanoestructuras de carbono tienen una morfología esférica, donde E1 y EDA mantienen un ordenamiento atómico correspondiente a una estructura de carbono; la variabilidad de composición y de tamaño entre ellas permiten que sean buenas candidatas para la evaluación de la adsorción de insulina. Por consiguiente, los estudios correspondientes de la adsorción de insulina evidenciaron que estos materiales adsorben la insulina en un tiempo de 60-90 minutos de contacto, manteniendo un porcentaje de adsorción del 60-73%. En consecuencia, es necesario conocer si estos son capaces de liberar la insulina haciendo uso de técnicas electroquímicas. Dichas técnicas nos brindan información esencial para esta investigación como: señales de óxido-reducción y las condiciones óptimas para obtener una señal clara; para después demostrar con base en la linealidad si el mecanismo que rige un proceso es de adsorción o difusión, el potencial para la liberación de insulina y así mismo entender si la molécula de insulina sufre una degradación por el paso de la corriente eléctrica.

Obtención de las curvas de oxidación de la insulina humana de acción rápida.

En la determinación de las curvas de oxidación de la insulina se realizó un barrido de velocidades para cada uno de los materiales, mediante la linealidad de la gráfica $V^{1/2}$ vs intensidad de corriente. El voltamperograma de la **Figura 33B)** pertenece al material E1 donde es posible observar la respuesta favorable al aplicar velocidades de barrido bajas, de igual manera se distingue una señal muy clara a 1.5 mV provocada por la oxidación de la insulina, este resultado coincide con el reportado en la literatura por Y. Zhao et al., 2021. El modelo lineal que sigue la gráfica en la **Figura 33B)** a velocidades de barrido menores a 80 mV/s representa el mecanismo de difusión que se lleva a cabo en el material E1, sin embargo, al aplicar una velocidad de barrido mayor a 100 mV/s el sistema presenta una adsorción como resultado del comportamiento no lineal de la gráfica.

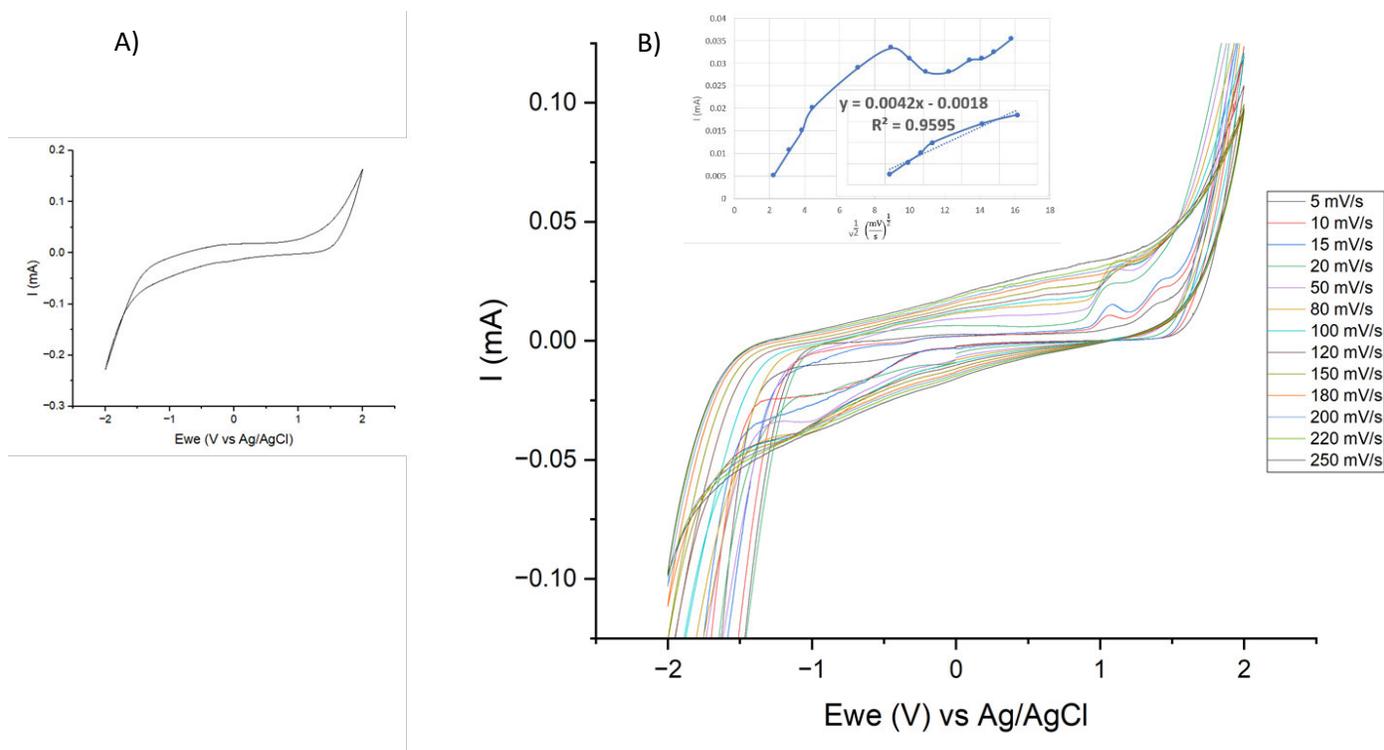


Figura 33. Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con E1. A) Voltamperograma con electrodo modificado sin insulina en la solución electrolítica. B) Voltamperograma a diferentes velocidades de barrido con insulina en electrolito soporte.

Por otro lado, en la **Figura 33A)** podemos observar que no existe señal de oxidación, ni de reducción en el medio de buffer de fosfatos, lo cual representa que el sensor es selectivo a la presencia de insulina en el medio.

La **Figura 34** muestra el voltamperograma correspondiente al material SG. Se distingue una estabilidad en la señal de oxidación al aumentar la velocidad de barrido, esto quiere decir que el sistema es favorecido a velocidades altas. Mediante el análisis de la gráfica $V^{1/2}$ vs I , y el ajuste que tuvieron los datos al modelo lineal es posible deducir que se lleva a cabo un proceso de difusión. La señal de oxidación, característica de la insulina es observable a 0.4 mV, potencial menor en comparación a los 0.8 mV del óxido de grafeno reportado por Teodorescu et al., 2015. A pesar de que la difusión es el proceso que ocurre en la nanoestructura SG el sistema mantiene una estabilidad y una mayor intensidad de la señal

de oxidación de insulina a velocidades de barrido mayores a 80 mV/s, como se señala en la **Figura 34B**), en donde la señal máxima de oxidación se aprecia a 150 mV/s. La obtención de una velocidad de barrido alta es conveniente en el análisis de muestras con insulina, porque la rapidez de la voltametría cíclica evita el deterioro y la desnaturalización de la insulina.

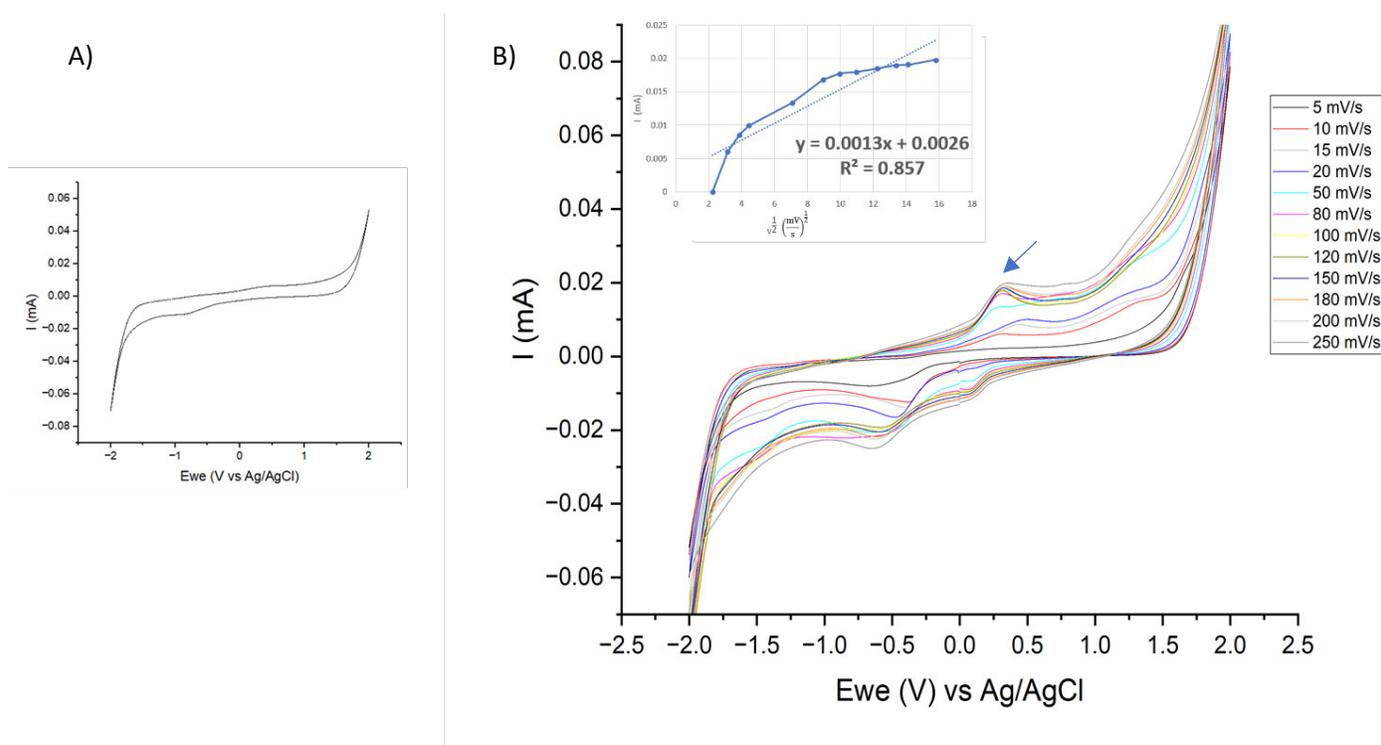


Figura 34. Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con SG. A) Voltamperograma con electrodo modificado sin insulina en la solución electrolítica. B) Voltamperograma a diferentes velocidades de barrido con insulina en electrolito soporte.

Así como en la **Figura 34** el material EDA muestra en **Figura 35** una estabilidad en el comportamiento de la señal de oxidación de la insulina a velocidades altas, observándose en 150 mV/s la señal más intensa, así mismo el potencial de liberación se distingue en 0.75 mV aproximadamente. A través del análisis de la gráfica $V^{1/2}$ vs I y del ajuste lineal de los datos recabados, es posible interpretar que en un intervalo de velocidades de barrido de 5 mV/s a 50 mV/s el mecanismo que rige el sistema es la difusión, después sucede un cambio

en la gráfica **Figura 35B)** de 50 mV/s a 150 mV/s en donde el comportamiento de los datos es no lineal derivado de un mecanismo de adsorción, a partir de los 150 mV/s el sistema mantiene la linealidad, regresando a la difusión.

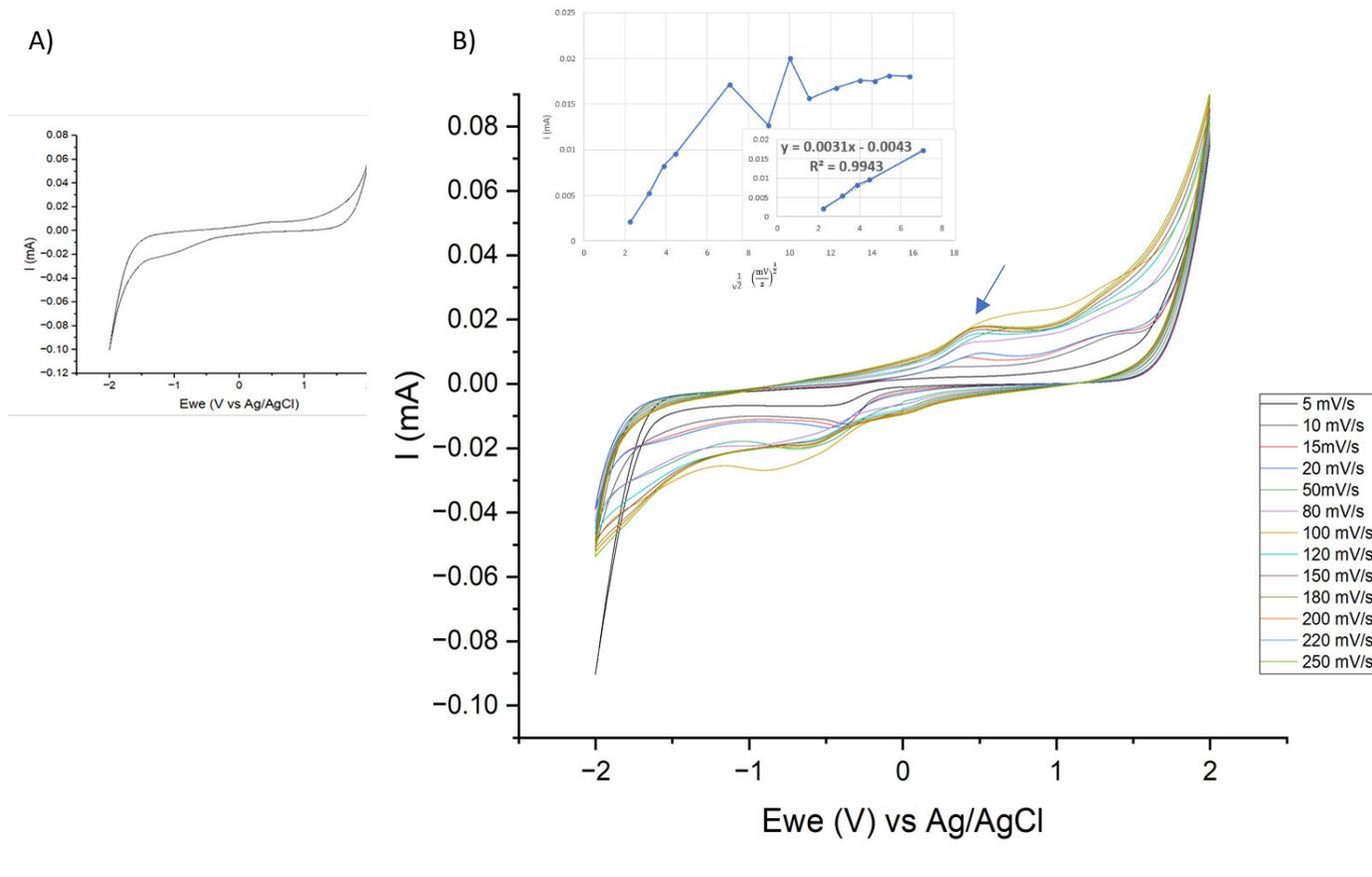


Figura 35. Voltametría cíclica para determinar las curvas de oxidación con electrodo modificado con EDA. A) Voltamperograma con electrodo modificado sin insulina en la solución electrolítica. B) Voltamperograma a diferentes velocidades de barrido con insulina en electrolito soporte.

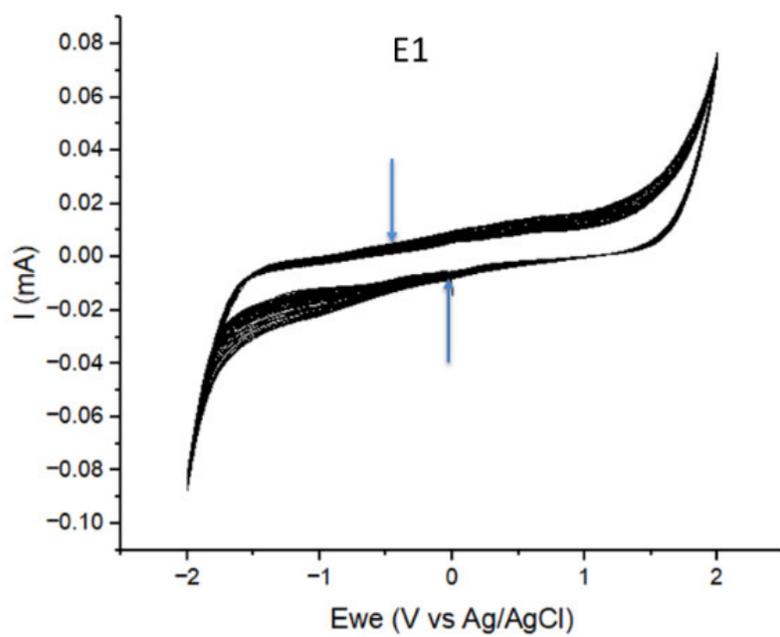
Determinación de la degradación de insulina humana de acción rápida.

Con la ayuda de los datos anteriores y la interpretación de los voltamperogramas se conoció la velocidad de barrido, donde es favorecido cada sistema dando como resultado una señal más definida de oxido-reducción de la insulina; 80 mV/s para E1 y 150mV/s para SG y EDA respectivamente. Con la finalidad de corroborar que la insulina no fuera degradada por el paso de la corriente eléctrica al electrodo de trabajo se aplicaron 50 ciclos de voltamperometría cíclica, en una solución de 50 ml PBS y 50 μ l de insulina humana de acción rápida.

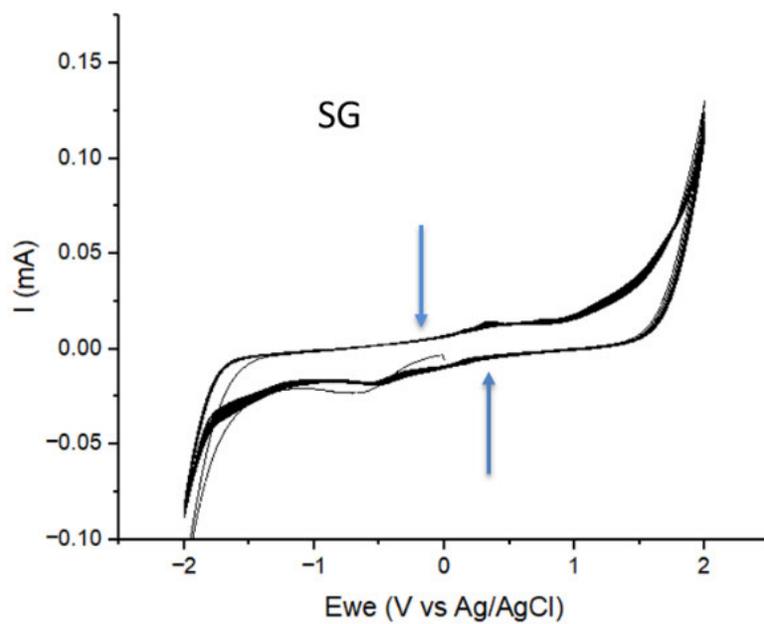
La **Figura 36** muestra los voltamperogramas cíclicos obtenidos para cada uno de los materiales. El material E1 (**Figura 36A**) presenta nula detección de insulina y la reducción del área de la ventana de potencial conforme aumentan los ciclos evaluados. Por otro lado, en las nanoestructuras sintetizadas por el método sol-gel (**Figura 36B**), (**Figura 36C**) es apreciable la señal de oxidación de insulina y mantiene el mismo comportamiento durante los 50 ciclos aplicados, sin disminuir la ventana de potencial. Lo anterior, prueba que la insulina se mantiene sus propiedades y su eficacia al interactuar con los materiales SG y EDA, en otras palabras, no existe degradación de la molécula por el paso de la corriente eléctrica, también demuestra la reproducibilidad al mantener una señal clara y constante a lo largo de los ciclos evaluados. Estas dos condiciones favorables son imprescindibles para considerar las técnicas electroquímicas como posible método de tratamiento para la diabetes.

Es importante destacar que el sistema electrodo-tinta conductiva se mantuvo estable, esto quiere decir que el material depositado en el electrodo de carbono permaneció intacto a lo largo de toda la prueba.

A)



B)



C)

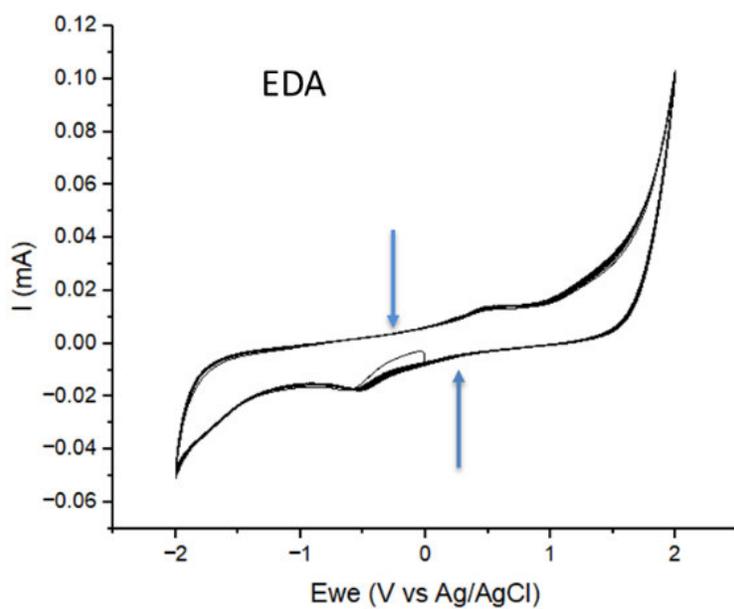


Figura 36. Determinación de la degradación de insulina humana con electrodos modificados. Voltamperogramas obtenidos para A) E1 Velocidad 80 mV/s, B) SG y C) EDA. Velocidad 150 mV/s.

Liberación de insulina.

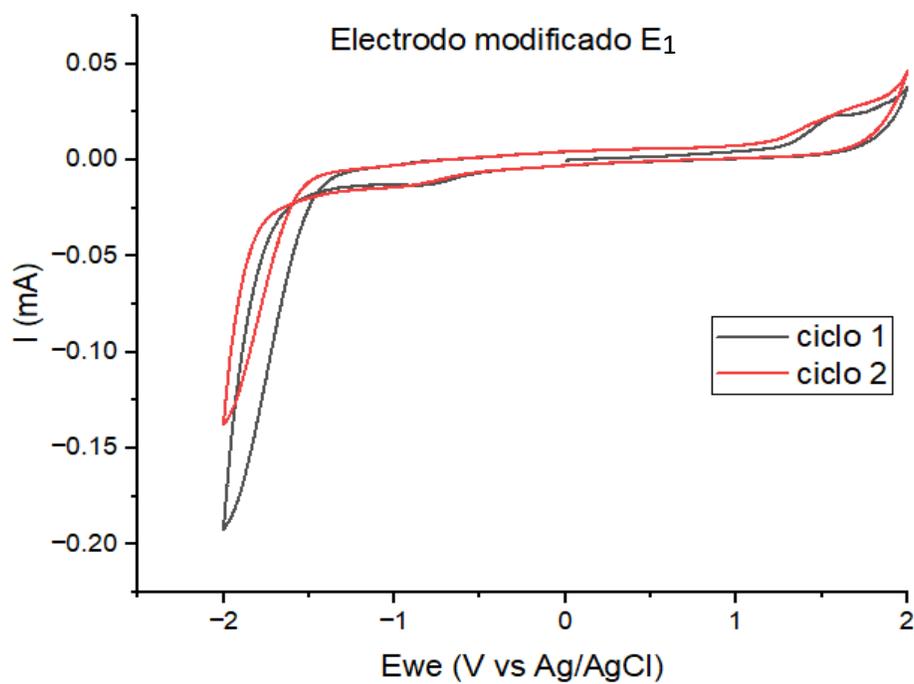
Los resultados favorables de las técnicas electroquímicas anteriores dieron pauta a desarrollar la metodología para la liberación de insulina aplicando voltamperometría cíclica a electrodos modificados con tintas electroactivas en una celda electroquímica convencional, con el fin de determinar el número de ciclos en los que es liberada y seleccionar el mejor material para este proceso.

La **Figura 37A)** muestra que el material E1 es capaz de liberar la insulina en un ciclo electroquímico, por la señal de oxidación que se presenta en el primer ciclo (color rojo) a 1.5 mV y desaparece por completo en el segundo (color negro), demostrando que la insulina se liberó casi por completo de la superficie del electrodo. Por el contrario, en el material SG la liberación de la insulina ocurre de manera lenta **Figura 37B)**, en cada ciclo la señal disminuye gradualmente, completando la liberación del 90% en 12 ciclos. A diferencia del material EDA que libera el 86% de la insulina en un ciclo (color rojo) con un potencial de 0.75 mV **Figura 37C)**. Estos resultados son favorables en comparación con los obtenidos por Teodorescu et al., 2015, quien logró liberar el 70% de la insulina depositada en el electrodo utilizando un potencial de 0.8 mV.

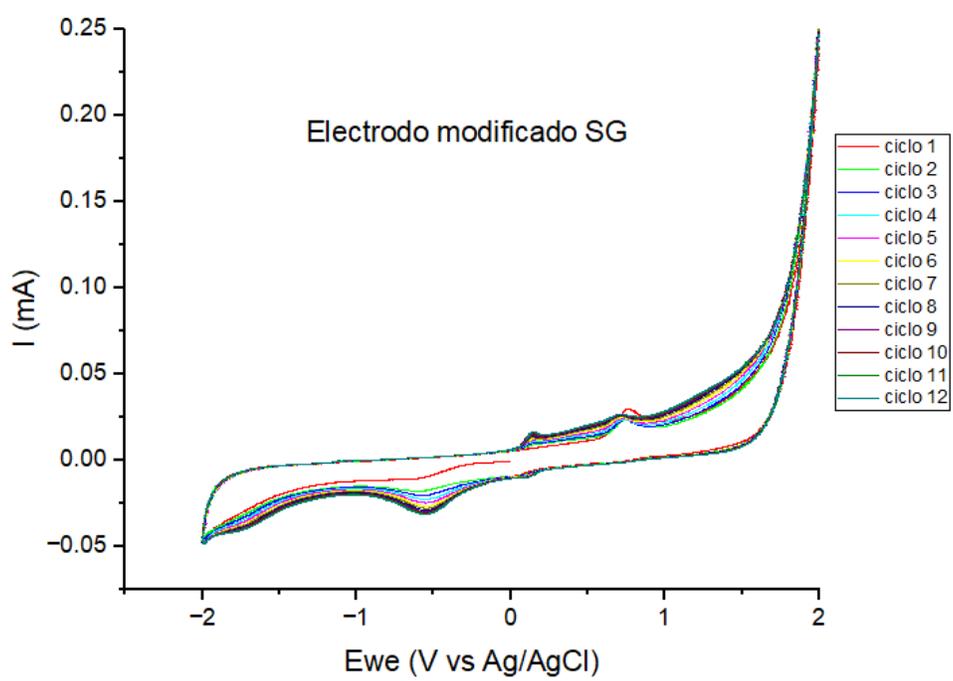
Con base a lo analizado anteriormente, los tres materiales evaluados son buenos candidatos para realizar el proceso de liberación de insulina. Sin embargo, se necesita clasificarlos considerando la velocidad de liberación. El material EDA y E1 se adaptan a un sistema de liberación inmediata, ya que la insulina es liberada completamente al inicio del proceso en un ciclo. En cuanto al material SG se adapta a una liberación controlada puesto que la liberación de insulina es de manera gradual y constante por un tiempo mayor.

A pesar de que cada material cuenta con características únicas el material EDA es considerado el material óptimo ya que con el mínimo de los ciclos encontrados en los voltamperogramas analizados, logra alcanzar la máxima liberación de insulina en el potencial más bajo.

A)



B)



C)

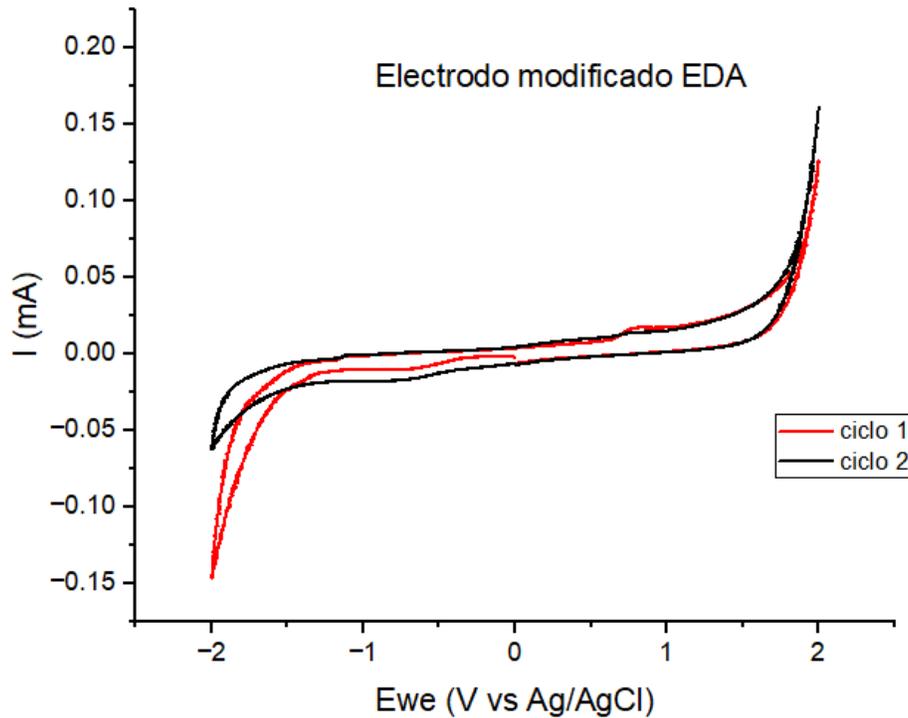


Figura 37. Voltamperograma de electrodo modificado con E1.

Aun cuando los resultados obtenidos son favorables en las pruebas electroquímicas anteriores, en la siguiente prueba se propone un sistema de electrodo serigrafado, dispositivo que sustituye a las celdas electroquímicas convencionales en la medicina moderna, por la presencia de tres electrodos compactados en un tamaño pequeño para la detección, liberación y tratamiento de algunas condiciones médicas. Estas pruebas de liberación de insulina se llevaron a cabo de manera satisfactoria. En la **Figura 38** se muestra el voltamperograma en donde al aplicar el primer ciclo (color negro), se aprecia la señal de oxidación en 0.5 mV, sin embargo, en el segundo ciclo (color rojo) esta señal no es detectada en consecuencia de la nula concentración de la insulina depositada en el electrodo; estos resultados coinciden con los obtenidos al utilizar las celdas electroquímicas convencionales, sin embargo, es necesario enfocar nuestra atención a los beneficios del uso de este dispositivo.

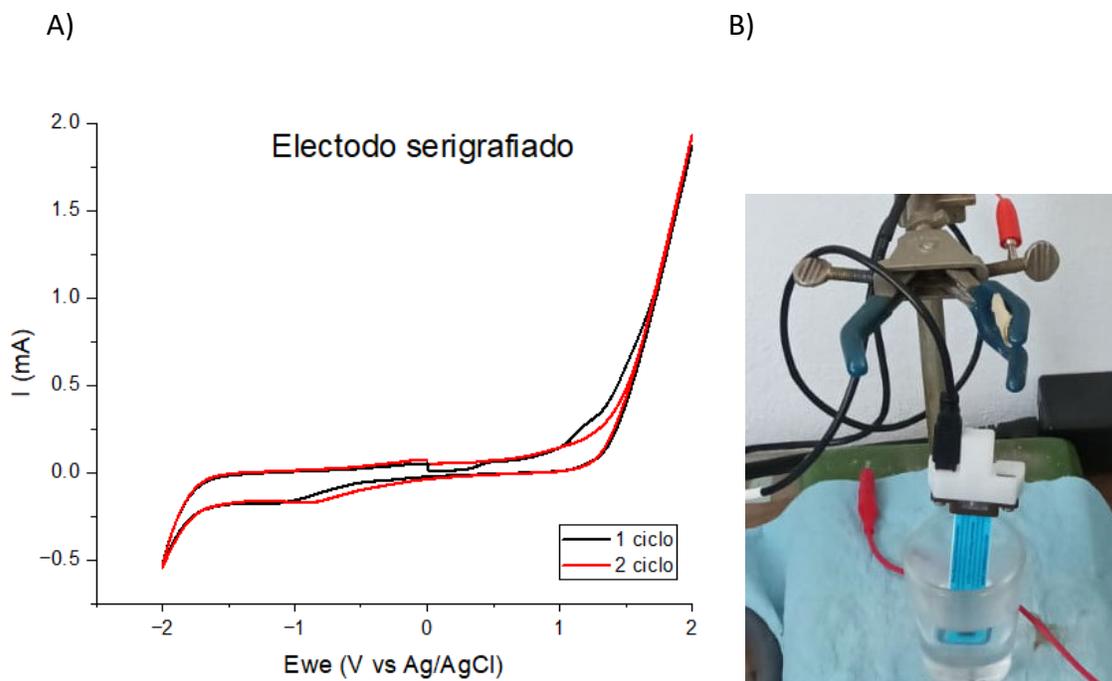


Figura 38. Voltamperogramas obtenidos para la liberación de insulina. A)

Voltamperogramas utilizando electrodos serigrafiados como sistema para la liberación de insulina. B) Sistema electroquímico con electrodo serigrafiado.

Es indispensable conocer el posible mecanismo de liberación electroquímica de insulina, propuesto por Teodorescu et al., 2015, menciona que se logra debido a la aplicación de un potencial catódico, de -0.8 V a 0.8 V, que reduce el hidrógeno disuelto en el agua generando iones -OH , como consecuencia provoca un aumento del pH local en la superficie del electrodo, manteniendo una condición favorable para la liberación de insulina **Figura 39**.

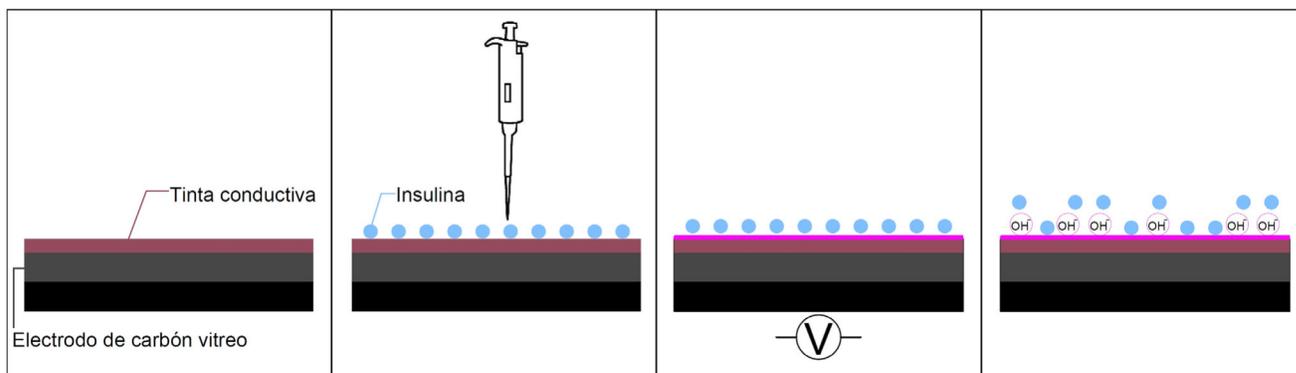


Figura 39. Posible mecanismo de liberación de insulina.

Tabla 2 Resultados de los estudios desarrollados en este capítulo.

Material	Caracterización de materiales			Adsorción UV-VIS		Electroquímica		Interacción insulina-nanoestructura	Ciclos electroquímicos de liberación de insulina	
	DRX (2θ)	RAMAN (Bandas)	FT-IR (grupos funcionales)	%Adsorción	Tiempo óptimo (min)	Velocidad de barrido	Señal red-ox		No. Ciclo	%Liberación de insulina
E1	24°	D y G	-NH	73%	90	Bajas 5mV/s	1.5 V	Enlaces químicos	1	99%
SG	-----	-----	-----	64%	60	Altas 150 mV/s	7.5 V	Fuerzas electrostáticas	1-6	80%
									7	81%
									8	83%
									9	89%
									10-12	90%
EDA	31°	-----	-----	73%	90	Altas 150 mV/s	7.5 V	Fuerzas electrostáticas	1	86%

Conclusiones.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que afecta más de 500 millones de adultos en todo el mundo. La búsqueda de tratamientos alternativos para controlarla ha sido muy exhausta, sin embargo, en la actualidad no se ha encontrado un tratamiento eficaz que sustituya la aplicación transdérmica de la insulina. Con el crecimiento de nuevas ciencias como la nanotecnología se abrió una esperanza para el desarrollo de posibles soluciones.

A pesar de las características de biocompatibilidad, químicas, eléctricas, entre otras, los nanomateriales de carbono han sido poco estudiados en la liberación de insulina. Con el fin de contribuir a esta investigación en este trabajo fueron evaluadas tres nanoestructuras de carbono nombradas como E1, SG y EDA.

En el material E1 las imágenes SEM mostraron nanoestructuras poco definidas que se formaban en la placa de grafeno, presentando buen ordenamiento atómico, compuesto en su mayoría por carbono y oxígeno con trazas de otros metales. La modificación en sus grupos funcionales evidenció que la interacción con la insulina es por medio de enlaces químicos. La espectroscopía de UV-VIS determinó que las nanoestructuras adsorbían 73% insulina en 90 minutos. Sin embargo, tuvieron poca respuesta electroquímica ya que las señales de oxidación no fueron muy claras, a pesar de esto, la insulina se liberó el 99% de insulina en un ciclo.

La morfología bien definida del material SG se observó por medio de la espectroscopía electrónica de barrido, en este no se encontró un ordenamiento atómico ni una modificación en sus grupos funcionales. Fue capaz de adsorber un 63% de insulina en 90 minutos, presentando una buena respuesta electroquímica a velocidades altas, la liberación máxima de 90% se dio en 12 ciclos.

La nanoestructura EDA presentó características similares de los materiales anteriores, teniendo una forma esférica bien definida sin modificación en sus grupos funcionales, poco ordenamiento atómico, interacción por fuerzas electrostáticas con la insulina, adsorción de 73% en 60 minutos y el 86% de insulina en un ciclo de liberación.

Con los resultados obtenidos podemos destacar que los materiales que presentan un ordenamiento en sus átomos tienen una mayor adsorción de la insulina. Las trazas de los metales en los materiales crean una mayor interacción entre los grupos funcionales de la nanoestructura e insulina. Como se ha observado, la composición juega un papel importante identificando que el material SG compuesto únicamente por carbono y oxígeno tiene una mayor respuesta electroquímica.

Cada uno de los materiales aportó información importante para esta investigación, podemos concluir que la baja respuesta electroquímica y su gran capacidad adsorbente el material E1 es un buen candidato para la liberación de insulina administrada de manera oral o nasal. El material SG presentó un buen comportamiento electroquímico a altas velocidades en un potencial bajo, siendo posible implementarse en futuros trabajos como sensor electroquímico en la detección de insulina, también puede ser considerada en la liberación de insulina de manera controlada, por la liberación constante de insulina en cada uno de sus ciclos. El material EDA es el material óptimo para la liberación de insulina inmediata por su buena adsorción, seguido de la mejor respuesta electroquímica, potencial de liberación de 0.75mV y el porcentaje de liberación de insulina.

Las aportaciones hechas en este trabajo servirán como base para futuras investigaciones, las cuales podrán concentrarse en probar la adsorción de la insulina en materiales con morfología diversa y homogénea. También, podrían estudiar la interacción y el comportamiento de la insulina con los materiales utilizando técnicas de caracterización como el análisis de potencial Z. Explorar la variación de condiciones experimentales, como la temperatura, el pH y el tipo de insulina empleada para encontrar el efecto que tienen en la adsorción y liberación de insulina. Incluir ensayos in vivo sumaría a la investigación para el desarrollo tratamientos alternativo eficaz para la diabetes mellitus.

Referencias.

- Aboubakar, M., Puisieux, F., Couvreur, P., Deyme, M., Pinto- Alphandary, H., Gouritin, B., Lacour, L., Farinotti, R., & Vauthier, C. (1999). *J. Biomed. Mater. Res.* 47, 568–576.
- Ali, N., Öchsner, A., & Ahmed Wagar. (2010). *Carbon Based Nanomaterials* (L. Trans Tech Publications, Ed.; 1st ed., Vols. 65–66).
- Alonso, B., López, A., Rodríguez, C., & Lázaro, D. (2015). La nanotecnología a 40 años de su aparición: Logros y tendencias. *Ingenierías*, 18(66), 13–23.
- Asal, H., Shoueir, K., El-Hagrasy, M., & Toson, E. (2022). Controlled synthesis of in-situ gold nanoparticles onto chitosan functionalized PLGA nanoparticles for oral insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 2188–2196.
- Bard, A., & Faulkner, L. (2001). *ELECTROCHEMICAL METHODS. Fundamentals and Applications*. (INC. JOHN WILEY & SONS, Ed.; 2nd ed.).
- Bard, A., & Faulkner, L. (2001). *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Cano, S., Lastre, G., & Oróstegui, M. A. (2017). *LIPOHIPERTROFIA: CONOCIMIENTO Y EDUCACIÓN AL TRATAMIENTO CON INSULINA EN LA DIABETES MELLITUS*. *Revista Med.*
- Cardona, R. (2020). *Tratamiento de insulina*. Fundación Para La Diabetes Novo Nordisk. <https://www.fundaciondiabetes.org/infantil/181/tratamiento-de-insulina-ninos>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021a, April 23). *Diabetes Risk Factors*. CDC. <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/risk-factors.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2021b, July 30). *4 Ways To Take Insulin*. CDC. <https://www.cdc.gov/diabetes/basics/type-1-4-ways-to-take-insulin.html>
- Crisóstomo, J., & Guoa, L. (2012). Ordered mesoporous carbon for electrochemical sensing: A review. *Analytica Chimica Acta*, 747, 19–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.032>

- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, M., Bauduin, P., & Speiser, P. (1979). Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and absorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, *31*, 422–424.
- Crevillen, A., Escarpa, A., & García, C. (2018). Carbon-based Nanomaterials in Analytical Chemistry. *Royal Society of Chemistry*, 1–36.
- De Godoya, K., De Almeida, J., Dias de Lima, B., Camillo, L., Brassolatti, P., Assis, M., Nogueira, C., Speglich, C., Longo, E., & De Freitas, F. (2022). Cytotoxic Effects Caused by Functionalized Carbon Nanotube in Murine Macrophages. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *56*, 514–529.
- Eilleia, S., Soliman, M., Mansour, S., & Geneidi, A. (2018). Novel technique of insulin loading into porous carriers for oral delivery . *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 297–309. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.03.003>
- Elçioğlu, H., & Demir Sezer, A. (2014). Nanoparticle Insulin Drug Delivery — Applications and New Aspects. In IntechOpen (Ed.), *Application of Nanotechnology in Drug Delivery* (pp. 237–256).
- Fathy, M., Hassan, A., Elsayed, A., & Fahmy, H. (2023). Controlled release of silica-coated insulin-loaded chitosan nanoparticles as a promising oral administration system. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *24*(21).
- Ferrari, A., & Basko, D. (2013). Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene. *Nature Nanotechnology.*, *84*, 235–25.
- Fundación Española para la Ciencia y Tecnología. (2009). *Nanociencia y Nanotecnología. Entre la ficción del presente y la tecnología del futuro.*
- Gallo, J. C. (2019). *Chemical functionalization of carbon nanomaterials* (Ashland: Arcler Press, Ed.; Vol. 1).
- Ganeshkumar, M., Ponrasu, T., Sathishkumar, M., & Suguna, L. (2013). Preparation of amphiphilic hollow carbon nanosphere loaded insulin for oral delivery. *Colloids and*

Surfaces B: Biointerfaces, 103, 238–243.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.043>

García-Betancourt, M., Fajardo-Díaz, J., Galindo, R., Fuentes-Ramírez, R., López-Urías, F., & Muñoz-Sandoval, E. (2020). Holey nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes from extended air oxidation at low-temperature. *Applied Surface Science*, 1446–1465.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.146546>

Goldman, L., & Schafer, A. (2017). *Tratado de Medicina Interna* (Gea Consultoría Editorial, Ed.; 25th ed.). ELSEVIER.

Grey, M., Whittemore, R., & Tamborlane, W. (2002). Depression in type 1 diabetes in children: natural history and correlates. *J Psychosom Res.*, 53, 907–911.

Guo, Y., Baldelli, A., Singh, A., Fathordoobady, F., Kitts, D., & Pratap-Singh, A. (2022).

Production of high loading insulin nanoparticles suitable for oral delivery by spray drying and freeze drying techniques. *Nature Scientific Reports*.

Horibata, K., Takasawa, H., Hojo, M., Taquahashi, Y., Shigano, M., Yokota, S., Kobayashi, N., Sugiyama, K., Honma, M., & Hamada, S. (2022). In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment*, 24–44.

Hovancová, J., Šišoláková, I., Oriňáková, R., & Oriňak, A. (2017). Nanomaterial-based electrochemical sensors for detection of glucose and insulin. *J Solid State Electrochem*, 2147–2166. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3544-0>

INEGI. (2022). *Estadísticas de defunciones registradas de enero a junio de 2021*.

INSHT. (2015). *Seguridad y salud en el trabajo con nanomateriales*.

International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (Berkeley Communications, Ed.; 10th ed.). 2021.

Jones, A. (2013). DAWN2: results from Denmark. The psychological impact of living with diabetes. *Diabetes Voice*, 58–43.

- Jones, A., Vallis, M., & Pouwer, F. (2014). If it does not significantly change HbA1c levels why should we waste time on it? A plea for the prioritization of psychological well-being in people with diabetes. *Diabetic Medicine*.
- Kashina, S., Balleza, M., Jacobo-Azuara, A., & Galindo, R. (2019). Production of carbonaceous materials with high capacitance by electrochemical technique. *Journal of New Materials for Electrochemical Systems*, 22, 107–111.
- Kashina, S., Balleza, M., Jacobo-Azuara, A., & Galindo-González, R. (2019). Carbon nanospheres as an electrode material for electroadsorption of Cu (II). *ECORFAN-Journal Bolivia*, 6, 17–19.
- Katsnelson, M. I. (2007). Graphene: carbon in two dimensions. *Materials Today*, 10(1–2), 20–27.
- Katzung, B., Masters, S., & Trevor, A. (2012). *Farmacología. Básica y clínica*. (MacGraw-Hill, Ed.; 12th ed., Vol. 1).
- Kokkonen, J., Lautala, P., & Salmela, P. (1997). The state of young adults with juvenile onset diabetes. *International Journal of Circumpolar Health*, 56, 76–85.
- Kunneman, M., Graner, M., & Tran, T. (2022). *Making Care Fit in the Lives of Young Adults with Type 1 Diabetes*. Making Care Fit in the Lives of Young Adults with Type 1 Diabetes.
- Langkjær, L., Brangea, J., Grodsky, M., & Guy, H. (1998). Iontophoresis of monomeric insulin analogues in vitro: effects of insulin charge and skin pretreatment. *Journal of Controlled Release*, 51, 47–56.
- Laurel, A., Sacco, N., Miranda, F., Galindo, R., Muñoz Sandoval, E., & Marchesini, F. (2022). *Dopamine removal from water by AOPs with N-doped carbon nanotubes*. Universidad de Guanajuato.
- Leobandung, W., Ichikawa, H., Fukumori, Y., & Peppas, N. (2002). Preparation of stable insulin-loaded nanospheres of poly(ethylene glycol) macromers and N-isopropyl acrylamide. *Journal of Controlled Release*, 80, 357–363.

- Lin, C., & Lin, C. (2009). Preparation of N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles as an insulin carrier. *Drug Delivery*, 458–464.
- Lin, H., Zhang, J., Yu, C., Lu, Y., Ning, J., Le, S., Li, Y., & Zang, L. (2019). Oral delivery of insulin via mesoporous carbon nanoparticles for colonic release allows glycemic control in diabetic rats. *Carbon Letters*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s42823-019-00033-z>
- Liu, J., Qiao, S. Z., Liu, H., Chen, J., Orpe, A., Zhao, D., & Lu, G. Q. (2011). Extension of the Stöber method to the preparation of monodisperse resorcinol–formaldehyde resin polymer and carbon spheres. *Angewandte Chemie*, 26, 6069–6073.
- Maduraiveeran, G., & Jin, W. (2021). Carbon nanomaterials: Synthesis, properties and applications in electrochemical sensors and energy conversion systems. *Materials Science & Engineering B*, 272.
- Mallawarachchi, S., Mahadevan, A., Gejji, V., & Sandun, F. (2019). Mechanics of controlled release of insulin entrapped in polyacrylic acid gels via variable electrical stimuli. *Drug Delivery and Translational Research*.
- Mesiha, S., Sidhom, B., & Fasipe, B. (2005). Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 289–293.
- Miller, M. (1988). *Chromatography: Concepts and Contrasts* (New York: Wiley, Ed.; 2da edición).
- Modrzynska, J., Berthing, T., Ravn-Haren, G., Jacobsen, N., Weydahl, I., Loeschner, K., Mortensen, A., Thoustrup, A., & Vogel, U. (2018). Primary genotoxicity in the liver following pulmonary exposure to carbon black nanoparticles in mice. *Particle and Fibre Toxicology*.
- Moore, N., Readman, J., Readman, W., Lowe, M., Frickers, E., & Beesley, A. (2009). Lysosomal cytotoxicity of carbon nanoparticles in cells of the molluscan immune system: An in vitro study. *Nanotoxicology*, 3, 40–45.

- Morrissey, C., Dinneen, F., Lowry, M., de Koning, J., & Kunneman, M. (2022). Reimagining care for young adults living with type 1 diabetes. *J Diabetes Investig, 13*, 1294–1299.
- Nicolucci, A., Kovacs, K., Holt, R., Comaschi, M., Hermanns, N., & Ishii, H. (2013). Diabetes Attitudes, Wishes and Needs second study (DAWN2): cross-national benchmarking of diabetes-related psychosocial outcomes for people with diabetes. *Diabet Med, 767–777*.
- Northam, E., Matthews, L., Anderson, P., Cameron, F., & Werther, G. (2005). Psychiatric morbidity and health outcome in type 1 diabetes: perspectives from a prospective longitudinal study. *Diabetes Medicine, 22*, 152–157.
- Ortiz-González, M., & Martínez-Abundis, E. (2001). Las insulinas. *Investigación En Salud, 2*, 62–65.
- Østergaard, M., Kumar, N., & Jensen, J. (2020). The ABC of Insulin: The Organic Chemistry of a Small Protein. *Chemistry—A European Journal, 26*, 8341–8357.
- Ouzouni, A., Galli-Tsinopoulou, A., Kazakos, K., & Lavdaniti, M. (2019). Adolescents with Diabetes Type 1: Psychological and Behavioral Problems and Compliance with Treatment. *International Journal of Caring Sciences, 12(2)*, 1298–1304.
- Packhaeuser, C. B., & Kissel, T. (2007). On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release, 123*, 131–140.
- Packhaeuser, C., & Kissel, T. (2007). On the design of in situ forming biodegradable parenteral depot systems based on insulin loaded dialkylaminoalkyl-amine-poly(vinyl alcohol)-g-poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release, 123*, 131–140.
- Pillai, O., Nair, V., & Panchagnula, R. (2004). Transdermal iontophoresis of insulin: IV. Influence of chemical enhancers. *International Journal of Pharmaceutics, 269*, 109–120.
<https://doi.org/doi:10.1016/j.ijpharm.2003.09.032>

- Polonsky, W., & Jackson, R. (2004). What's so tough about taking insulin? Addressing the problem of psychological insulin resistance in type 2 diabetes. *Clin Diabetes*, 22, 147–150.
- Pouwer, F. (2009). Should we screen for emotional distress in type 2 diabetes mellitus? *Nat Rev Endocrinol*, 5, 665–671.
- Prudkin, C. (2018). *Diseño de nano-microvehículos para insulina constituidos por quitosano como encapsulante*. Universidad de Buenos Aires.
- Sadhasivam, L., Dey, N., Prakash Francis, A., & Devasena, , Thiyagarajan. (2015). Transdermal patches of chitosan nanoparticles for insulin delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(5), 84–88.
- Salandari-Jolge, N., Ensafi, A. A., & Rezaei, B. (2021). An ultrasensitive electrochemical aptasensor based on a single-stranded aptamer-Au@Fe-MIL-88 complex using methylene blue as an electrochemical probe for insulin detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 7451–7462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00216-021-03703-y>
- Shamaeli, E., & Alizadeh, N. (2015). Functionalized gold nanoparticle-polypyrrole nanobiocomposite with high effective surface area for electrochemical/pH dualstimuli-responsive smart release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 502–509.
- Skyler, J., Jovanovic, L., & Klioze, S. (2007). Two-year safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) in adult patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 579–585. <https://doi.org/doi:10.2337/dc06-1863>
- Speiser, P. (1974). Microcapsules de l'ordre de grandeur du nanometre. *Brevet Belge*, 2, 208–716.
- Tari, K., Khamoushian, S., Madrakian, T., Afkhami, A., Jan, M., Ghoorchian, A., Reza, M., & Ghavami, S. (2021). Controlled Transdermal Iontophoresis of Insulin from Water-Soluble Polypyrrole Nanoparticles: An In Vitro Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 12479. <https://doi.org/10.3390/ijms222212479>

- Teodorescu, F., Rolland, L., Ramarao, V., Abderrahmani, A., Mandler, D., Boukherrouba, R., & Szunerits, S. (2015). Electrochemically triggered release of human insulin from an insulin-impregnated reduced graphene oxide modified electrode. *The Royal Society of Chemistry*, *51*, 14167–14170.
- Tolkachov, V., Bogutska, I., Savchuk, M., & Prylutsky, I. (2015). Nanomaterials in the diagnosis and therapy of diabetes mellitus. *Biotechnologia Acta*, *8*.
<https://doi.org/10.15407/biotech8.01.009>
- Virendra, S., Daeha, J., Lei, Z., & Soumen, D. (2011). Graphene based materials: Past, present and future,. *Progress in Materials Science*, *56*(8), 1178–1271.
- Walker, K. (2019, November 19). *Working with Carbon Nanoparticles*. Feature.
- Wang, J., & Musameh, M. (2004a). Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 33–36.
- Wang, J., & Musameh, M. (2004b). Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* *511*, 33–36.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.035>
- Wang, J., Yin, H., Meng, X., Zhu, J., & Ai, S. (2011). Preparation of the mixture of graphene nanosheets and carbon nanospheres with high adsorptivity by electrolyzing graphite rod and its application in hydroquinone detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *662*, 317–321.
- World Health Organization. (2022, September 16). *Diabetes*.
- Xu, L., Yang, Y., Mao, Y., & Li, Z. (2021). Self-Powerbility in Electrical Stimulation Drug Delivery System. *Advanced Materials Technologies*, 1–19.
- Yin, H., Zhou, Y., Meng, X., Shang, K., & Ai, S. (2011). One-step “green” preparation of graphene nanosheets and carbon nanospheres mixture by electrolyzing graphite rob and its application for glucose biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, *30*, 112–117.

- Zare, Y., Soleymani, J., Rahimi, M., Nuri, Y., & Jafarzadeh, S. (2022). Trends in advanced materials for the fabrication of insulin electrochemical immunosensors. *Chemical Papers* .
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11696-022-02416-5>
- Zhang, M., Mullens, C., & Gorski, W. (2005a). Insulin Oxidation and Determination at Carbon Electrodes. *Analytical Chemistry*, 77(19), 6396–6401.
- Zhang, M., Mullens, C., & Gorski, W. (2005b). Insulin Oxidation and Determination at Carbon Electrodes. *Analytical Chemistry*, 77, 6396–6401.
- Zhao, Q., Lin, Y., Han, N., Li, X., Geng, H., Wang, X., Cui, Y., & Wang, S. (2017). Mesoporous carbon nanomaterials in drug delivery and biomedical application. *DRUG DELIVERY*, 24, 94–107.
- Zhao, Y., Zhang, H., Li, Y., Yu, X., Cai, Y., Sha, X., Wang, S., Zhan, Z., Xu, J., & Liu, L. (2021). AI powered electrochemical multi-component detection of insulin and glucose in serum .
Biosensors and Bioelectronics, 186.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113291>