

Liberación de insulina por pulsos electroquímicos

Insulin release through electrochemical pulses

J. Bárcenas¹, J. Cardona¹, O.A. Escalante¹, F. Gutiérrez¹, F.A Jacobo¹, E.A. Quiroz¹, R. Galindo²

¹ División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, 36050, Gto. México.

² Cátedra Conacyt adscrita a la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada s/n, Pueblito de Rocha, C.P. 36040 Guanajuato, Gto, México.
mr.galindo@ugto.mx²

RESUMEN

Se llevó a cabo una síntesis electroquímica con electrodos de grafito y/o cobre en solución electrolítica de KNO_3 a diferentes distancias para la obtención de nanopartículas de carbono. Con cada producto obtenido se prepararon tintas conductivas a base de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ y Nafion. Las tintas fueron dispuestas con y sin insulina sobre electrodos FTO-ITO, carbón vítreo y serigrafados. La tinta conductiva que mejor se adhirió varió con respecto al electrodo de elección, siendo Graf – Cu 2 cm para FTO-ITO y Graf – Graf 1.0 cm en electrodos serigrafados. Para la caracterización de las muestras sintetizadas se recurrió al uso de microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS), potencial de carga cero (PCZ) y voltamperometría cíclica (VC). Los resultados correspondientes a SEM presentan que las nanopartículas difieren morfológicamente entre sí, siendo las de Graf – Cu más irregulares en cuanto a superficie. Los datos recabados de la prueba de EDS sustentan que el grafito puro empleado careció de impurezas, a diferencia de los productos recuperados de la síntesis electroquímica, donde el KNO_3 permaneció remanente. Los resultados de PCZ señalan que el comportamiento de la superficie de la nanopartícula es negativo. Las curvas presentadas en la VC proyectan a los electrodos serigrafados como mejores conductores, denotan que la conductividad se ve favorecida durante la incorporación de insulina y sugieren que las nanopartículas con mayores beneficios corresponden a Graf – Cu 0.5 cm. La liberación de insulina se ve influenciada por factores como el tipo de cátodo durante la síntesis y voltaje empleado, además de parámetros entre los que se incluye la morfología, carga y conductividad de nanopartícula.

Palabras clave: nanopartículas de carbono, síntesis electroquímica, tintas conductivas.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos frecuentes que comparten el fenotipo de la hiperglucemia. Las personas con diabetes tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, que son la primera causa de morbilidad y mortalidad en esta población. Datos de la IDF (Federación Internacional de Diabetes) sugieren que la diabetes explicó casi 4.2 millones de defunciones en todo el mundo en 2019, lo que representa 11.3% de la mortalidad global por todas las causas en adultos de 20 a 79 años de edad. [1]

De acuerdo con la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser deficiencia de la secreción de insulina, disminución de la utilización de glucosa o aumento de la producción de esta. [1] La insulina es una hormona de estructura proteica de 51 aminoácidos, compuesta por dos cadenas, A y B, unidas por puentes disulfuro. Es producida de forma natural por las células beta del páncreas. [2] La insulina es esencial en el control de las concentraciones de glucosa en sangre facilitando la captación y el metabolismo de la glucosa en los tejidos periféricos, como el hígado, el músculo y el tejido adiposo. [3]

Los estados de enfermedad que subyacen al diagnóstico de la diabetes mellitus actualmente se clasifican en cuatro categorías: tipo 1, tipo 2, otros y diabetes mellitus gestación. [4]

El sello distintivo de la diabetes tipo 1 es la destrucción selectiva de células beta (células B) y la deficiencia de la insulina grave o absoluta. La mayoría de los pacientes de tipo 1 con presentación sintomática aguda tienen una pérdida significativa de células beta y el tratamiento con la insulina es esencial para controlar los niveles de glucosa y prevenir la cetosis. [4] Por otra parte, los pacientes con diabetes tipo 2 pueden controlarse inicialmente con dieta, ejercicio y agentes hipoglucemiantes orales o inyectables no insulínicos. Algunos pacientes tienen insuficiencia progresiva de las células beta y, ocasionalmente, también pueden necesitar terapia con la insulina. [4]

Actualmente existen diversos sistemas para la administración de insulina como jeringas, agujas, bolígrafos, bombas e incluso insulina inhalable. [4] No obstante, desde años atrás se ha emprendido una búsqueda para la adaptación a vías alternas de administración distintas a las convencionales, en razón de que algunas son invasivas, generan dolor,

requieren ser administradas con frecuencia y, al menos en el caso de la insulina inhalable, se ha descrito que posee efectos adversos como tos, disminución de la función pulmonar aunado a que, debido a sus contraindicaciones, la cantidad de pacientes que puede acceder a este tipo de administración se ve limitada. [4]

Una de las vías alternas es la administración transdérmica de fármacos que ofrece varios beneficios, pero ha resultado difícil descubrir fármacos lo suficientemente pequeños y lipofílicos como para atravesar la barrera cutánea. Entre los diferentes tipos de sistemas de administración transdérmica se encuentra el uso de nanopartículas. [5]

Las nanopartículas son una amplia clase de materiales que incluyen sustancias particuladas con una dimensión menor a los 100 nm, presentan propiedades fisicoquímicas diferentes a las que muestra el mismo material sintetizado a gran escala; dependiendo de su forma general, estos materiales pueden ser clasificados como 0D, 1D, 2D o 3D de acuerdo con el tamaño en nm y dimensión que tengan, con lo que se logra adquirir distintas clasificaciones entre las que se destacan las nanopartículas constituidas por carbono, que se presentan de forma esférica, elipsoidal o tubular; sus propiedades abarcan un peso reducido, alta área superficial, pureza, dureza, gran elasticidad y conducción de electricidad al exponer una carga molecular. Gracias a la interacción intermolecular por fuerzas de Van der Waals las nanopartículas son capaces de adsorber diversas moléculas en su superficie debido a una diferencia de cargas. [6]

Estas partículas, si son lo suficientemente pequeñas, pueden penetrar en las capas viables de la piel, y pueden transportar fármacos cargados en la superficie de la partícula o en su núcleo. [5]

Representa entonces una dificultad encontrar nanopartículas que cumplan con las características necesarias para ofrecer una función terapéutica, por lo que para enfrentar tal problemática se ha promovido el desarrollo de nuevas tecnologías.

De todas las tecnologías adoptadas para mejorar la permeación transdérmica de fármacos, la iontoforesis no sólo proporciona fácil aplicación, sino que también garantiza la administración de fármacos de forma programada y controlada, [7] por lo que puede ser utilizada para la administración de insulina a través de la piel. [8] La iontoforesis es un método de introducción de fármacos ionizados y neutros en la piel mediante corriente eléctrica. [7]

Un sistema de administración iontoforético consiste de varios componentes y la velocidad de administración por iontoforesis es típicamente proporcional a la aplicación de corriente, y, por lo tanto, programable con la posibilidad de entrega "bajo demanda". La administración de fármacos iontoforética es una tecnología interdisciplinaria que requiere el conocimiento de ciencia de los materiales, tales como geles poliméricos a modo de reserva de fármacos y electroquímica para la elección de materiales de electrodos. [9]

La electroquímica se basa en el estudio de la transformación entre la energía eléctrica y la energía química. El uso de celdas electroquímicas ha constituido una forma de generación de nanopartículas, las cuales se obtienen mediante la realización de síntesis electroquímica, donde se llevan a cabo reacciones químicas con la consecuente generación de corriente eléctrica. La síntesis consta de una celda con dos electrodos, siendo el ánodo donde se lleva a cabo la oxidación y el cátodo donde ocurre la reducción; a su vez se emplean disoluciones que funcionan como puentes salinos para completar el circuito eléctrico dando lugar a reacciones redox. En el presente trabajo se realizó la síntesis de nanopartículas de carbono al utilizar electrodos con diferente composición y a diferentes distancias, con solución electrolítica de nitrato de potasio. El uso de las nanopartículas se piensa utilizar como posible aplicación en iontoforesis para la adaptación de estas nanopartículas a moléculas de insulina para la generación de un parche transdérmico que funcione mediante pulsos electroquímicos.

Existen diversos métodos para la obtención de nanoestructuras de carbono los cuales cuentan con diversas ventajas y desventajas en función de los materiales y equipo que se emplean lo cual repercute en la pureza, porosidad, forma y tamaño. [10]

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los métodos para la síntesis de nanopartículas de carbono.

MÉTODO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Pirólisis directa	Alto grado de pureza	Alto costo y uso de equipo especial
Deposición química en fase vapor	Alto grado de pureza	Alto costo y uso de equipo especial.
Síntesis hidrotermal	Método "verde"	Baja porosidad en las esferas.
Método asistido por microondas	Rápido	No hay información al control de tamaño.
Método sol-gel	Formación de esferas uniformes con alto grado de porosidad	Tamaños mayores a 400 nm, requiere altas temperaturas para el tratamiento térmico posterior.
Síntesis electroquímica	Rápido, soluciones acuosas, no usan catalizadores	No hay reportes respecto al control del tamaño, método poco investigado.

Los dispositivos de electroterapia configurados para la aplicación de iontoforesis han reducido su tamaño y se han vuelto más asequibles debido a los bajos costos de producción. Actualmente los equipos que permiten la iontoforesis pueden ser adheridos a la piel de la misma forma que dispositivos transdérmicos y parches de nicotina. [8]

Debido a las ventajas que supone el uso de parches transdérmicos, en el presente estudio se propone una metodología que contribuya a posibilitar la combinación de iontoforesis para la administración de insulina a través de estos.

Los parches transdérmicos son formas farmacéuticas cuya aplicación permite la dosificación de los fármacos que vehiculan con una cesión continua, a una velocidad programada y durante un periodo de tiempo definido. [11]

Una de las formas del uso de parches es la adaptación de la incorporación de nanopartículas de carbono las cuales debido a su tamaño pueden favorecer la penetración de moléculas farmacológicas a través de las capas de la piel, órgano que sirve como una frontera semipermeable con alto grado de selectividad.

El uso de parches suele tener ventajas como la comodidad de la administración y mejora del cumplimiento de tiempo en el que se administra el medicamento con liberación controlada del principio activo, con la consiguiente obtención de niveles plasmáticos constantes y sostenidos y efecto terapéutico constante en el paciente, así como la reducción de la frecuencia y magnitud de las dosis y de efectos secundarios. [11]

Sin embargo, se presentan inconvenientes como la aparición de reacciones alérgicas en la zona de administración provocadas por el material del cual está formulado el parche, así como percepción de poca estética por parte del usuario o de incomodidad. [11]

El proyecto tiene como objetivo la obtención de nanopartículas de carbono mediante síntesis electroquímica al variar la composición y distancia entre electrodos durante el proceso, con el propósito de realizar un estudio comparativo de las diversas nanoestructuras de carbono sintetizadas para la determinación del mejor nanomaterial obtenido y así encontrar una aplicación a futuro en iontoforesis como nanopartícula liberadora de insulina a través de su adaptación en un parche transdérmico con funcionamiento mediante pulsos electroquímicos.

Los parámetros analizados para la comparación fueron la determinación del rendimiento de reacción, forma, carga y tamaño; adsorción y liberación de insulina, composición elemental, comportamiento electroquímico, microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis EDS, voltamperometría cíclica y determinación del potencial Z.

2. EXPERIMENTO

2.1 Síntesis electroquímica

Se colocó una pinza de tres dedos en el soporte universal de manera que quedara por encima de la celda que cuyo contenido fue la solución de nitrato de potasio (KNO_3 , 3M). Sumergidos en la celda con la solución, se colocaron los electrodos, el ánodo de grafito y el cátodo de grafito o cobre

La tensión de 10V utilizada para realizar la síntesis electroquímica fue suministrada por la fuente de poder. El tiempo de la síntesis se mantuvo en función de la descomposición del ánodo, es decir, fue variable.

Los cambios por considerar para cada síntesis fueron los cátodos utilizados, pudiendo ser de grafito o de cobre, así como la distancia entre electrodos, que fue de 0.5 cm, 1 cm y 2 cm.

Una vez montado el sistema, se encendió la fuente de poder para comenzar con la síntesis y se consideró el tiempo que tardó la barra de grafito del ánodo en consumirse.

Finalmente, mediante un proceso de decantación, se lavó el producto obtenido con agua destilada y acetona en repetidas ocasiones para posteriormente secarlo en el horno BLUE M a 50°C.

Rendimiento de la síntesis

Recuperación del material seco y molienda en mortero

Se retiró del secador BLUE M el material obtenido de cada una de las síntesis, posteriormente se colocaron en un mortero de Agatha y se procedió a su molienda.

Pesaje del material molido.

Se utilizó una balanza analítica modelo FA2204C para la determinación del peso de cada material previamente molido.

Determinación del porcentaje de rendimiento (peso recuperado/ masa total).

Se determinó el porcentaje de rendimiento de la síntesis relacionando la cantidad de masa perdida en el ánodo con respecto a la cantidad de masa recuperada después del secado empleando la siguiente expresión matemática:

$$\%R = \frac{m_a}{m_r} \times 100$$

R= Rendimiento
 m_a = masa perdida del ánodo
 m_r = masa recuperada

2.2 Preparación de tintas conductivas

Posterior a los lavados, cada uno de los seis productos derivados de la síntesis electroquímica fue dispuesto individualmente en porciones de 0.1 g dentro de tubos Eppendorf. Se agregó un volumen inicial de 95 μ L de C_3H_8O y fueron sometidos a un baño de ultrasonido marca LUZEREN modelo PS-10A durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió por segunda ocasión 100 μ L de C_3H_8O y nuevamente fueron colocados en el baño de ultrasonido, reduciendo el tiempo a 15 minutos a temperatura ambiente. A todas las muestras se les fue adicionado, además, 5 μ L de Nafion proveniente de Sigma-Aldrich en conjunto con 100 μ L de C_3H_8O . La formulación se realizó en dos ocasiones debido a la gran cantidad de electrodos utilizados.

Nota: En caso de que la formulación anteriormente descrita presente una consistencia seca o, demasiado grumosa, agregar 50 μ L de C_3H_8O y colocar en el baño ultrasónico 20 minutos. Repetir si es necesario.

2.3 Preparación de electrodos

Se trabajó con tres tipos de electrodos diferentes: FTO-ITO, carbón vítreo y serigrafiados.

Electrodos FTO-ITO

A fin de realizar las comparaciones correspondientes, se trabajó con un total de 30 electrodos FTO-ITO divididos en 5 grupos de 6 de acuerdo con el número de tintas (Graf-Graf y Graf-Cu con distancias de 0.5, 1 y 2 cm). Todos los electrodos FTO-ITO fueron lavados con detergente líquido neutro y enjuagados con agua destilada como pretratamiento. Una vez secos, se eligió como superficie de trabajo el lado que presentara continuidad de flujo de corriente comprobada a través de un multímetro digital marca Steren modelo MUL-50.

El primer grupo fue cubierto con una capa de tinta que abarcó 1 cm^2 de superficie aproximadamente, para todos la cantidad agregada fue 20 μ L de tinta (a excepción de la tinta Graf-Graf 1 cm, donde se utilizaron 40 μ L). Consecutivamente se distribuyó 20 μ L de insulina sobre cada capa de tinta. Para el segundo grupo se repitió la adición de una cubierta fina de tinta con las mismas cantidades, pero sin la incorporación de insulina. En el caso del tercer grupo, los 20 μ L de insulina fueron directamente mezclados en cada uno de los tubos Eppendorf utilizados para almacenar las tintas, acto seguido se cubrió nuevamente alrededor de 1 cm^2 de los electrodos. En lo que al cuarto grupo respecta, fueron recubiertos con tintas de manera igual a los grupos anteriores, la diferencia recayó en que, cada electrodo fue acomodado verticalmente y asegurado con cinta de enmascarar dentro de un vaso de precipitado, al cual se le vertió 20 mL de insulina, de tal manera que la parte recubierta de tinta quedara inmersa.

Electrodos carbón vítreo

A tres electrodos carbón vítreo se les colocó 20 μ L de tinta Graf-Graf variando el tipo de distancia a 0.5, 1 y 2 cm respectivamente. Adicionalmente se colocaron 20 μ L de insulina y fueron puestos en refrigeración durante 24 horas aproximadamente.

Electrodos serigrafiados

Cada una de las tintas obtenidas de la segunda preparación fue colocada por separado en 6 electrodos serigrafiados en porciones de 5 μ L. De manera similar, se colocaron 5 μ L de cada tinta en conjunto con 5 μ L de insulina en 6 diferentes electrodos serigrafiados para el análisis de estabilidad, mientras que para el estudio de liberación fueron dispuestas las mismas cantidades (5 μ L de cada tinta y 5 μ L de insulina) en otra serie de 6 electrodos serigrafiados.

2.4 Punto de carga Z (PCZ)

Preparación de soluciones para PCZ

La determinación del potencial de carga Z de las nanopartículas requirió preparar soluciones de KNO_3 0.1 M, NaOH 0.1 M y HNO_3 0.1M. Los reactivos sólidos fueron pesados en la balanza analítica modelo FA2204C, mientras que los reactivos líquidos se midieron con pipeta volumétrica PYREX.

Determinación del PCZ

En distintos recipientes se mezcló con ayuda de una parrilla de agitación modelo 6795-220 marca CORNING y un agitador magnético 0.1 g de muestra con 20 mL de una solución de KNO_3 0.1 M. Se midió el pH inicial de la solución con un potenciómetro SM-25CW MICROPROCESOR pH/mV meter, posteriormente se ajustó el pH de los recipientes a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 utilizando soluciones de NaOH 0.1 M y HNO_3 0.1 M. Una vez ajustado al pH deseado los recipientes se dejaron en agitación vigorosa por 24 hrs. Transcurrido el tiempo de agitación se midió el pH final para determinar el ΔpH (diferencia entre el pH inicial y el pH final); el pH inicial donde el ΔpH fue cero se consideró como el PCZ.

2.5 Caracterización

Aplicación de SEM y EDS

Para la determinación de la morfología superficial, así como el tamaño y el análisis elemental cualitativo y cuantitativo de las nanopartículas sintetizadas, se utilizó el microscopio electrónico de barrido (SEM) con detector de espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) integrado, modelo JEOL JSM 6010 PLUS/LA; por lo que, de igual forma se analizó la composición química de los materiales.

Voltamperometría cíclica (VC)

La voltamperometría cíclica utilizada para el análisis de la variación de corriente conforme se modifica su potencial [12] permite modelar un sistema electroquímico y observar los cambios que ocurren en el sistema [13]. Se empleó esta metodología con el propósito de conocer la adsorción y liberación de la molécula de insulina.

Para analizar las muestras se utilizó el potencióstato @SP-150 *Potentiostat BioLogic* en 3 electrodos diferentes: de vidrio con película conductora FTO-ITO, de carbón vítreo y serigrafiado. Para los 2 primeros electrodos se montó un sistema que consistió de una celda electrolítica con una solución buffer de fosfatos a $\text{pH}=7.4$. El sistema de 3 electrodos (electrodo de sacrificio, electrodo de trabajo y electrodo de referencia (Ag/AgCl)) se dispusieron dentro de la solución electrolítica.

Los datos arrojados fueron procesados por el software *EC-Lab®*, donde se variaron factores como velocidad de barrido y número de ciclos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de reacción

Tabla 2. Rendimientos obtenidos de la síntesis electroquímica empleando los electrodos Graf– Graf (0.5, 1.0, 2.0 cm) y Graf– Cu (0.5, 1.0, 2.0 cm).

Muestra		% Rendimiento
Graf - Graf	0.5 cm	103.80
	1.0 cm	91.81
	2.0 cm	99.77
Graf - Cu	0.5 cm	98.62
	1.0 cm	158.47
	2.0 cm	111.47

Graf: Electrodo de Grafito
Cu: Electrodo de Cobre

La muestra Graf – Graf 0.5 cm (103.80 %) correspondió a la de mayor rendimiento dentro de todas las muestras de la síntesis Graf – Graf. Las muestras de la síntesis Graf – Cu de 2.0 cm (111.47 %) y 1.0 cm (158.47 %) mostraron un

rendimiento superior con respecto a las muestras de la síntesis Graf – Graf; siendo la síntesis de Graf - Cu 1.0 cm (158.47%) la de mayor porcentaje de rendimiento con respecto a todas las muestras analizadas.

La síntesis que involucra al electrodo de Cu muestra un mayor porcentaje de rendimiento que puede asociarse a las características electroquímicas superiores del Cu con respecto al grafito. Además, el electrodo de Cu tiende a degradarse ligeramente durante la síntesis, lo cual aporta masa al producto final y puede corroborarse con la prueba EDS (**Tabla 6 y Figura 6**) donde las muestras de Graf – Cu presentan señales que indican la presencia de cobre en la composición del producto. Asimismo, la solución saturada de KNO_3 aparentemente precipitó algunos residuos puesto que el análisis EDS muestra señales correspondientes a O y K.

En la síntesis de Graf – Graf 0.5 cm se observa un rendimiento superior al 100% que puede estar relacionado con la degradación simultánea del ánodo y cátodo, siendo este último en menor medida. De igual forma, se debe considerar el efecto de la solución saturada de KNO_3 encontrada en menor proporción en el producto determinado a través del análisis EDS que muestra señales de O y K.

Preparación de tintas conductivas

Pese a que se esperaba obtener tintas homogéneas de color negro que fueran fáciles de dispensar para ser aplicadas por drop-casting sobre los tres tipos de electrodos empleados, la combinación de los productos derivados de las síntesis con $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ y Nafion dio como resultado una solución parcialmente homogénea. Las tintas fueron preparadas en dos ocasiones con variación en su contenido de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, además del tiempo de estancia en baño ultrasónico, pero en todo momento las nanopartículas presentaron una tendencia a sedimentar y a fijarse en las paredes de los tubos Eppendorf (**Figura 1**).



Figura 1. Tintas conductivas posterior a su preparación.

Preparación de electrodos

El $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, al actuar como solvente y vehículo favorece tanto la dispensación como el esparcimiento de los productos de las síntesis sobre la superficie de electrodos, pudiendo incluso llegar a evaporarse para que solo permanezcan los componentes de interés (**Figura 2**).



Figura 2. Comparación de electrodos FTO-ITO con y sin tinta conductiva (Graf-Graf 1 cm), respectivamente.

La consistencia de las tintas conductivas condiciona entonces, además de su manejo, la capacidad de adherencia sobre los electrodos de trabajo. Por lo que, para conocer la porción en masa de nanopartículas adheridas a 1 cm² de superficie de electrodos FTO-ITO, se recurrió a correlacionar la diferencia de peso después de haber agregado tinta conductiva por unidad de área recubierta (**Tabla 3**). Cabe mencionar que el área propuesta no se encontraba delimitada en el electrodo, situación que conlleva a que la medida de la superficie difiera en cada caso.

Si bien se procuró distribuir la misma cantidad de tinta (20 µL) en todos los casos, debido al aspecto de estas en cuanto a consistencia, fue necesario adicionar por segunda vez 20 µL de tinta Graf – Cu 1 cm en su respectivo electrodo a fin de cubrir el área propuesta. Es por esta razón que, una mayor cantidad de nanopartículas lograron asentarse sobre la superficie para el caso de dicha tinta en específico (Graf – Cu 1 cm). De acuerdo con los datos recabados, la tinta conductiva que se depositó mejor en el área de interés con respecto a la porción de nanopartículas presentes fue aquella proveniente de la síntesis Graf – Cu 1 cm (**Tabla 3**). No obstante, si se toma en cuenta el hecho de que se duplicó la cantidad de tinta utilizada, no podría ser comparada con el resto y, por el contrario, la diferencia de peso por área más alta correspondería a Graf – Cu 2cm. La tinta con menor adherencia de peso de nanopartícula por área fue G – Cu 0.5 cm.

Tabla 3. Diferencia de peso por área (g/cm²) en electrodos FTO-ITO.

Tinta en electrodo	Peso sin tinta (g)	Peso con tinta (g)	Tinta agregada (µL)	ΔP (g)	Área (cm ²)	ΔP/A (g/cm ²)
Graf-Graf 0.5 cm	2.0784	2.0826	20	0.0042	1.08	0.0039
Graf-Graf 1 cm	1.8777	1.8834	20	0.0057	1.3	0.0044
Graf-Graf 2 cm	2.7142	2.7200	20	0.0058	1.5	0.0039
Graf-Cu 0.5 cm	2.1394	2.1434	20	0.004	1.4	0.0029
Graf-Cu 1 cm	2.1747	2.1834	40	0.0087	1.17	0.0074
Graf-Cu 2 cm	2.4689	2.4745	20	0.0056	1.2	0.0047

A diferencia de los electrodos FTO-ITO, los de tipo serigrafiado cuentan con un área señalada donde se deposita la muestra de estudio, y es debido a esto que en todos los casos se presenta constante. El espacio reducido provocó que la cantidad de tinta agregada fuera considerablemente menor también, por lo que solamente fueron utilizados 5 µL (véase **Tabla 4**) A pesar de lo anterior, la diferencia de peso por área incrementó en comparación con la presentada en la (**Tabla 3**). La razón detrás es que se emplearon ambas preparaciones de tintas, lo cual es indicio de que la primera formulación aplicada en los electrodos FTO-ITO es menos eficiente que la segunda formulación, utilizada en los electrodos serigrafiados. La adición repetida de C₃H₈O durante la primera formulación suscitó que la tinta repartida contuviera menor cantidad de nanopartículas.

Por otra parte, se realizaron ensayos para encontrar la mejor manera de incorporar insulina a las nanopartículas y que de tal manera, ocurriera la adsorción. Uno de los dos métodos consistió en la adición directa mediante micropipeta, lo que permite controlar la cantidad, aunado al hecho de que se logra evitar cualquier tipo de pérdidas; mientras que, con el segundo método sucede lo contrario debido a que la insulina se integra a las nanopartículas depositadas en los electrodos por inmersión (**Figura 3**). Dicho proceso ocasiona que la tinta conductiva se desprenda y sedimente en la solución de insulina, dando lugar no solo a la pérdida de tinta, sino también a desconocer qué tanta porción del fármaco logra situarse sobre la superficie recubierta. Se considera entonces que el método de inmersión es poco efectivo para conseguir una combinación ajustada de ambos objetos de interés, así como su adherencia en el electrodo.

Tabla 4. Diferencia de peso por área (g/cm²) en electrodos serigrafiados.

Tinta en electrodo	Peso sin tinta (g)	Peso con tinta (g)	Tinta agregada (µL)	ΔP (g)	Área (cm ²)	ΔP/A (g/cm ²)
Graf-Graf 0.5 cm	0.5253	0.5264	5	0.0011	0.002	0.55
Graf-Graf 1 cm	0.5266	0.5308	5	0.0042	0.002	2.1

Graf-Graf 2 cm	0.5299	0.5324	5	0.0025	0.002	1.25
Graf-Cu 0.5 cm	0.5288	0.5310	5	0.0022	0.002	1.1
Graf-Cu 1 cm	0.5316	0.5342	5	0.0026	0.002	1.3
Graf-Cu 2 cm	0.5308	0.5330	5	0.0022	0.002	1.1

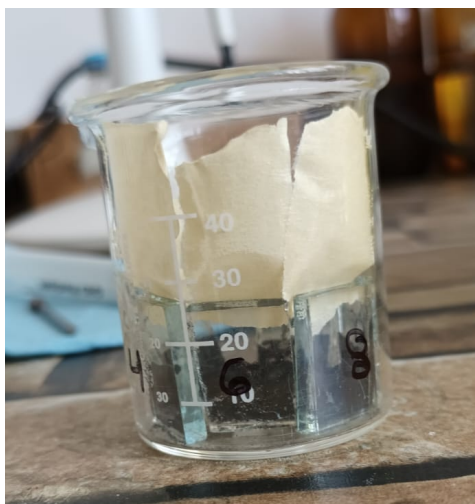


Figura 3. Electrodo FTO-ITO asegurados con cinta para enmascarar de manera vertical, con la tinta dispuesta en la parte inferior para su inmersión en insulina.

Punto de Carga Cero (PCZ)

Tabla 5. Resultados obtenidos de la determinación del PCZ para la muestra de Graf-Cu 2cm.

Muestra	pH inicial	pH ajustado	pH final	Δ pH
Graf - Cu 2 cm	5.91	2.19	2.32	3.59
	5.71	2.91	2.84	2.87
	5.94	5.07	4.46	1.48
	6.27	6.04	5.14	1.13
	5.52	9.09	6.86	-1.34
	7.76	11.05	10.78	-3.02
	5.87	11.93	11.75	-5.88

Graf: electrodo de grafito
 Cu: electrodo de cobre

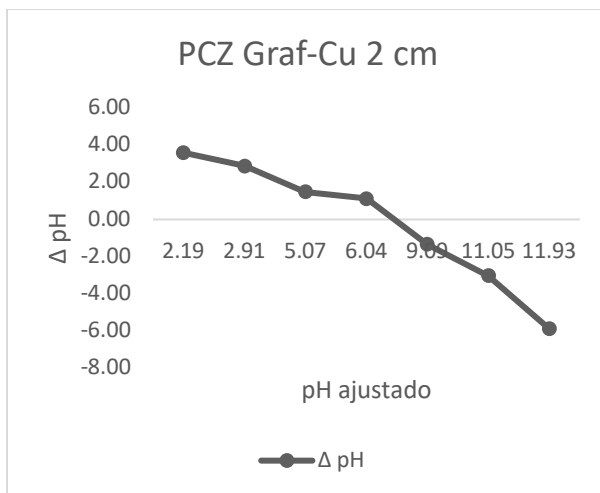


Figura 4. Determinación del PCZ Grafito-Cu 2 cm. Se muestra el pH inicial, pH ajustado, pH final y Δ pH obtenido.

En la figura 4 Se muestra el pH inicial, pH ajustado, pH final y Δ pH obtenido para la muestra de Graf-Cu 2 cm, los valores de Δ pH y pH ajustado fueron utilizados para la determinación del PCZ en la (Figura 4).

Utilizando la muestra Graf – Cu 2 cm se determinó el PCZ de las nanopartículas, cuyo valor se encontró en el rango de pH entre 6.04 – 9.09. Esto indica que las cargas de la superficie en las nanopartículas de carbono tienen tendencia negativa.

El análisis de las otras nanopartículas no pudo realizarse ya que no se obtuvieron suficientes mediciones para encontrar un valor representativo del PCZ.

Se realizó la determinación del PCZ para la caracterización de la carga superficial neta que adquiere la molécula, lo cual favorece al análisis de la carga eléctrica que adquiere la molécula repercutiendo así en la adsorción que podrá establecer con otras moléculas tales como la insulina. El valor obtenido para la muestra de Graf-Cu 2 cm se situó en un rango de pH entre 6.04 y 9.09, debido a que los valores de pH de la solución (Tabla 5) son mayores que los valores correspondientes al PCZ, por lo que la superficie de la nanopartícula presenta un comportamiento de carga negativo, este valor obtenido mediante el pH de la solución permite reconocer que la molécula será más afín a unirse a moléculas cargadas positivamente.

Aplicación de SEM

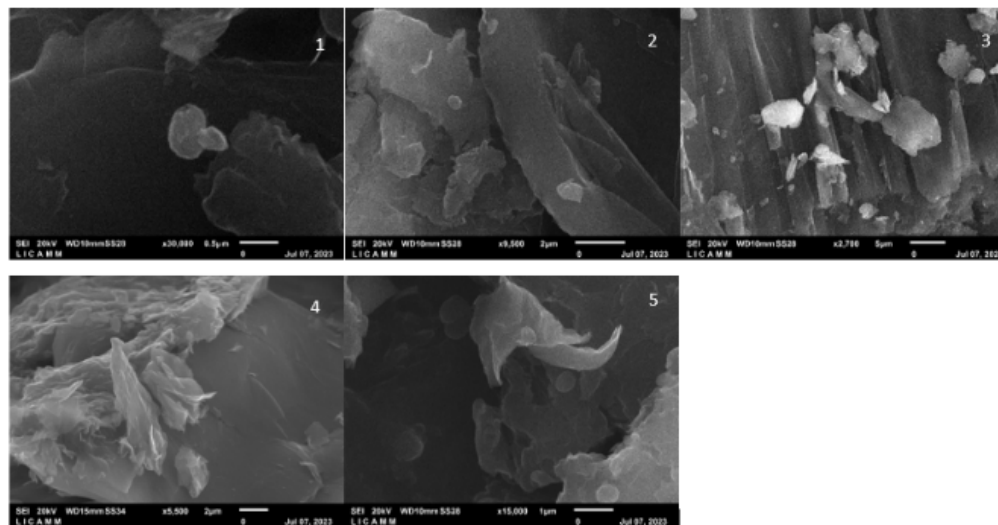


Figura 5. (1) Graf - Graf 0.5cm se observaron estructuras de un tamaño de 0.5 μ m en el diámetro mayor y de 0.729 μ m en el diámetro menor. (2) Graf – Graf 1.0 cm presenta nanopartículas esféricas con un diámetro mayor y menor igual a 0.58 μ m. (3) Graf – Cu 1.0cm sus medidas fueron 2.27 μ m con

un diámetro mayor y 2.045 μm de diámetro menor, estas son las estructuras más grandes correspondientes a todas las muestras. (4) Grafito puro no se observa presencia de nanoestructuras de carbono. (5) Graf – Cu a 2.0 cm de se obtuvieron las partículas de menor tamaño con un diámetro menor de 0.5 μm y un diámetro mayor de 0.58 μm .

Con base a los resultados arrojados por el SEM (**Figura 5**), las nanopartículas de Graf – Graf 1 y 2 cm tuvieron un tamaño similar a pesar de diferir en distancia en razón de que se utilizó el mismo tipo de material en ambos electrodos durante su síntesis. Específicamente en la muestra 1, se observan dos nanopartículas: la primera (de lado izquierdo) presenta forma ovalada sin demasiadas irregularidades en la superficie, mientras que la situada de lado derecho mide menos de la mitad y posee una forma similar. En la muestra 2, el aspecto es más liso y redondeado. En cuanto a la muestra 3, es posible identificar partículas brillantes de color blanco, mismas que son asociadas al cobre dada la presencia de este en el producto sintetizado. Las nanopartículas exponen tanto la forma como la superficie con apariencia irregular. Al comparar las muestras 2 (G – G 1 cm) y 3 (G – Cu 1 cm) con distancia equivalente pero diferente cátodo, sale a relucir que las nanopartículas derivadas de cobre poseen un mayor tamaño que las de grafito. Una distinción apreciable entre nanopartículas derivadas de Graf – Graf es que presentan mejor morfología a las de Graf – Cu, que se caracterizaron por ser irregulares en cuanto a superficie.

Por otra parte, y, como era de esperarse, el grafito puro (4), no presentó nanopartículas de carbono en vista que no había sido sometido a síntesis electroquímica.

De entre todas las muestras analizadas, las nanopartículas de G – Cu 2 cm fueron las de menor tamaño. Se plantea entonces la hipótesis de que, al aumentar la distancia entre electrodos, las nanopartículas consiguen reducir su tamaño.

Aplicación de EDS

Tabla 6. MUESTRA 3: 2500X Graf– Cu 1 cm

Elemento	Línea	Wt%	Wt% Sigma	Standard
C	K series	77.73	0.24	C Vit
O	K series	16.93	0.24	SiO2
K	K series	4.76	0.05	KBr
Cu	K series	0.59	0.06	Cu
Total:		100.00		

Wt%: Porcentaje de peso

Línea: Orbital k

En la columna de elemento (**Tabla 6**) se encontraron C, O, K y Cu, donde el carbono resultó como el elemento con mayor proporción en la muestra (77.3%), la segunda columna corresponde a la línea del orbital medido (orbital K). En la tercera columna se muestra el estimado de porcentaje total (Wt%) de cada elemento y en la última columna la señal utilizada en el sistema para la detección de cada uno de los elementos.

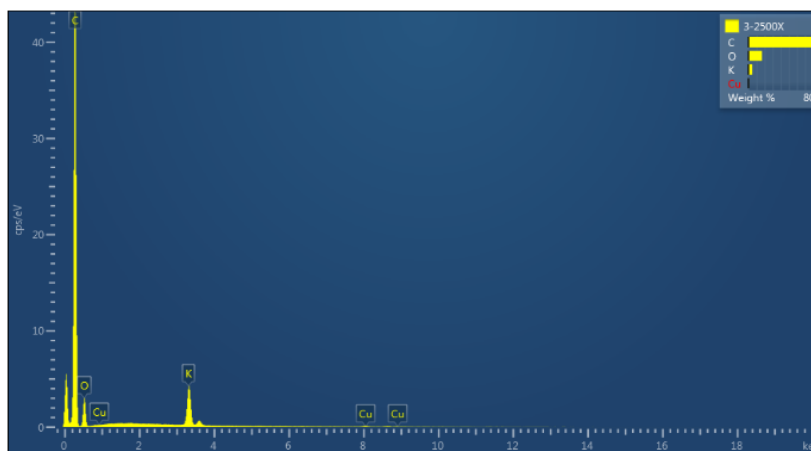


Figura 6. Muestra 3 analizada mediante EDS. Elucidación elemental de la muestra 3 (Graf – Cu 1.0 cm), se observa en la gráfica obtenida por EDS señales correspondientes a los elementos C, O, K y Cu.

En el caso de la muestra 3 (**Figura 6**), las señales de potasio y oxígeno pudieron deberse a la contaminación durante la síntesis electroquímica de la solución electrolítica de KNO_3 , que pudo asociarse a la insuficiencia de los lavados para remover los residuos del electrolito. En cuanto al elemento cobre, se percibe como el elemento en menor proporción, lo que puede explicarse con el uso del cátodo de cobre, el cual se degrada durante la síntesis provocando que las partículas queden atrapadas en las nanoestructuras de carbono.

Tabla 7. MUESTRA 4 5500X Grafito puro.

Elemento	Línea	Wt%	Wt% Sigma	Standard
C	K series	100.0	0.00	C Vit
Total:		100.00		

Wt%: Porcentaje de peso
 Línea: Orbital k

En el análisis de grafito puro se encontró que el contenido total es carbono.

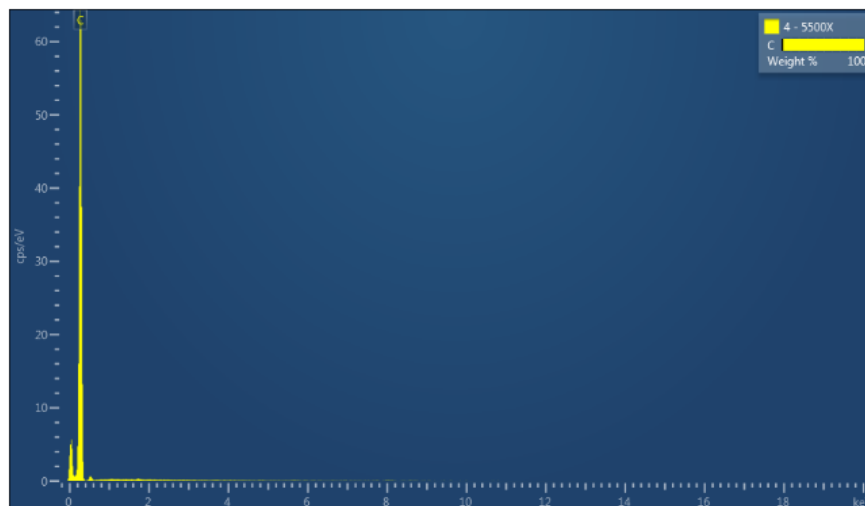


Figura 7. Muestra 4 analizada mediante EDS. Elucidación elemental de la muestra 4 (Grafito puro), se observa en la gráfica obtenida por EDS la señal correspondiente al C.

En el análisis mediante EDS de la muestra 4 correspondiente a grafito puro (**Figura 7**) solo se aprecia la señal de carbono, debido a que el grafito puro está compuesto en su totalidad por este elemento, esto indica, además, que el material de trabajo no se encontraba contaminado durante su uso.

Voltamperometría cíclica (VC)

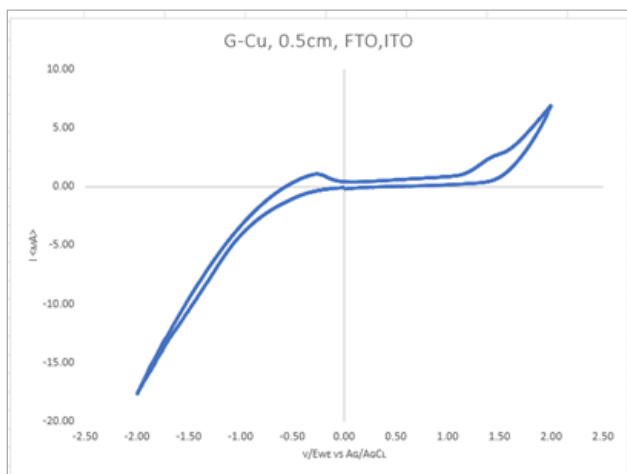


Figura 8. Voltamperograma G-Cu sobre 0.5 cm sobre electrodo FTO-ITO. La conductividad de la muestra es alta debido a la señal estrecha. La señal de la insulina se presenta a 1V y el punto máximo en la corriente en aproximadamente 2.5 mA.

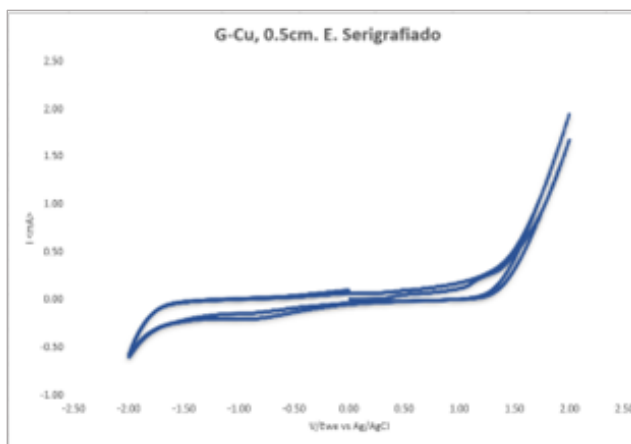


Figura 9. Voltamperograma G-Cu 0.5 cm sobre electrodo serigrafiado. La conductividad de la muestra es alta debido a la señal estrecha. La señal de la insulina se presenta a 1 V y el punto máximo en la corriente en aproximadamente en 0.4 mA.

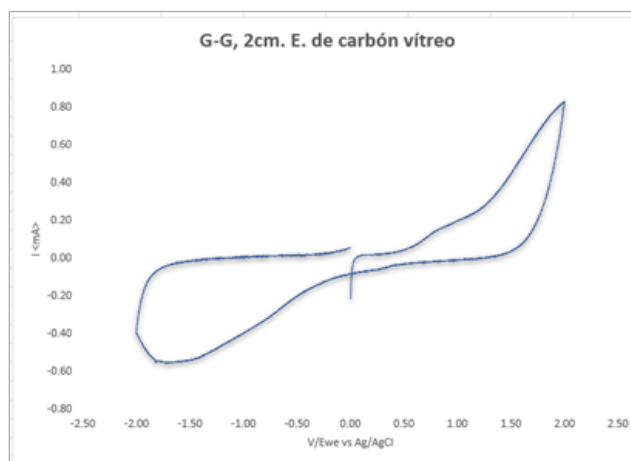


Figura 10. Voltamperograma G-G 2cm sobre electrodo de carbón vítreo. Esta muestra presenta una mayor capacitancia debido a una mayor distancia entre puntos en la zona de oxidación. La señal de la insulina se presenta aproximadamente a los 0.7 V y el punto máximo de corriente en 0.20 mA aproximadamente

Mediante el análisis de las voltamperometrías cíclicas se seleccionó la mejor muestra de cada electrodo. En el que 2 de las 3 mejores muestras resultaron de la síntesis de Graf-Cu con una distancia entre electrodos de 0.5 cm. Mientras que la mejor muestra del electrodo de carbón vítreo fue la proveniente de la síntesis Graf – Graf con 2cm de distancia entre electrodos. (Las 3 mejores muestras resultaron cuando se aplicó la insulina posterior a la aplicación de la tinta). Las señales más estrechas, es decir, las que presentan una mejor conductividad fueron las provenientes de los electrodos serigrafiados. Por otra parte, todas las gráficas que se muestran presentaron una curva que indica la presencia de insulina, sin embargo, las señales de los electrodos serigrafiados y de vidrio con película conductora se presentaron a una tensión de 1 V, mientras que la señal del electrodo de carbón vítreo se dio a los 0.7 V de tensión.

4. CONCLUSIÓN

La síntesis electroquímica es una herramienta que permitió la obtención de nanopartículas de carbono empleando como ánodo un electrodo de grafito sumergido en una solución electrolítica de KNO_3 . Las nanopartículas recuperadas de la síntesis electroquímica variando la distancia entre electrodos (0.5, 1 y 2 cm) y el tipo de cátodo (grafito y cobre) resultaron con características y propiedades electroquímicas distintas. En cuanto al porcentaje de rendimiento la síntesis Graf – Cu 1.0 cm, resultó ser ampliamente superior, mostrando de forma general que el uso del cátodo de Cu sugiere una mejora del rendimiento. Asimismo, las nanopartículas de Graf – Cu 1.0 cm mostraron el mejor comportamiento en la formulación de tintas y retención en electrodos, siendo superado solo por las partículas de Graf – Graf 2.0 cm en los electrodos serigrafiados. Las imágenes del SEM arrojaron que las

partículas más grandes resultaron de la muestra Graf – Cu 1.0 cm mientras que las de menor tamaño resultaron de la muestra Graf – Cu 2.0 cm.

Tomando en cuenta los parámetros anteriores, se podría considerar a las nanopartículas de la muestra Graf – Cu 1.0 cm y Graf – Cu 2.0 cm como las más aptas para implementarse en el parche transdérmico. A esto se le puede sumar que las partículas obtenidas con cátodo de Cu presentaron un comportamiento electroquímico superior en cuanto a liberación y adsorción de insulina, así como mejores propiedades electroquímicas; esto puede asociarse a que las partículas pueden estar dopadas con partículas de Cu provenientes de la descomposición del cátodo durante la síntesis, indicando así que el uso del cátodo de Cu mejora las propiedades electroquímicas de las nanopartículas.

Se requieren más estudios para determinar la estabilidad de las partículas al asociarse intermolecularmente con insulina, la modulación de la dosis que se debe administrar a través del parche, así como la purificación de las nanopartículas, sin embargo, este trabajo aporta datos útiles para el desarrollo de una vía alternativa a la administración de insulina como lo es el parche transdérmico y a su vez implementa un uso novedoso para las nanopartículas de carbono.

5. AGRADECIMIENTOS

- Agradecemos al proyecto 199/2023 titulado LIBERACIÓN CONTROLADA DE INSULINA CON MATERIALES NANOESTRUCTURADOS DE CARBONO., aprobado dentro del marco de la Convocatoria Interna de Apoyo a la Investigación y Posgrado 2023.
- LICAMM UG "LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MINERALES Y MATERIALES"

REFERENCIAS

- [1] Jameson, J. L., Kasper, D. L., Longo, D. L., Fauci, A., Hauser, S. L., Loscalzo, J., & Harrison, T. R. (2023). *Harrison Principios de Medicina Interna* (21st ed.). McGraw Hill.
- [2] Mullins, P., Monami, M., Bretzel, R. G., Monnier, L., Ohkubo, Y., Yki-Järvinen, H., Hermansen, K., Rosenstock, J., & Hirsch, I. B. (2012, Noviembre 23). *Tratamiento de la diabetes: Insulinoterapia*. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(12\)70431-6](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70431-6)
- [3] Conn, P. M., Conn, P. M., & Conn, P. M. (2013). *Animal models for the study of human disease* (2nd ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809468-6.00010-3>
- [4] Katzung, B. G. (2019). *Farmacología básica y clínica* (14th ed.). MacGraw Hill.
- [5] Palmer, B. C., & DeLouise, L. A. (2016). Nanoparticle-Enabled *Transdermal Drug Delivery Systems for Enhanced Dose Control and Tissue Targeting*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 21(12), 1719. <https://doi.org/10.3390/molecules21121719>
- [6] Cigales Canga, J. (2016). Síntesis y caracterización de nanopartículas de carbono luminiscentes: carbón quantum dots (CQDs).
- [7] Wang, Y., Zeng, L., Song, W., & Liu, J. (2022). *Influencing factors and drug application of iontophoresis in transdermal drug delivery: an overview of recent progress*. *Drug delivery and translational research*, 12(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00898-6>
- [8] Krueger, E., Claudino Junior, J. L., Scheeren, E. M., Neves, E. B., Mulinari, E., & Nohama, P.. (2014). *Iontophoresis: principles and applications*. *Fisioterapia Em Movimento*, 27(3), 469–481. <https://doi.org/10.1590/0103-5150.027.003.AR02>
- [9] Anand, J. (2003). Techwatch: Iontophoresis- Application of Electrochemical Materials and Methods for Therapeutics and Diagnostics. *The Electrochemical Society Interface* 12 (27), DOI 10.1149/2.F02034IF
- [10] 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*. Vol.22, No.2, pp. 107-111.
- [11] Bonet, R. (2015, 1 septiembre). *Parches medicamentosos*. *Farmacia Profesional*. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-parches-medicamentosos-X0213932415390826>
- [12] BSG Institute. (s. f.). *BSG Institute*. <https://bsginstitute.com/bs-campus/blog/Voltametría-Cíclica-109>
- [13] Calabozo Sánchez, J. L. (2004). *Realización de un potenciostato* [Tesis]. Universitat Rovira i Virgili