

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

INFORME DE CONCLUSIÓN DEL SERVICIO SOCIAL

**INTERACCIÓN DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA METFORMINA CON
EL ADN UTILIZANDO VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO.**

Asesora:

Georgina Alarcón Angeles

Dra. Georgina Alarcon Angeles

No. Económico: 34432

Alumno

Joaquin Emmanuel Arámbula Armeida

Matricula: 2193071995

CDMX, a 22 de mayo de 2024

INTERACCIÓN DEL PRODUCTO DE OXIDACIÓN DE LA METFORMINA CON EL ADN UTILIZANDO VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE PULSO.

Arámbula Armeida Joaquín Emmanuel

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México, 2193071995@alumnos.xoc.uam.mx.

Se estudió el comportamiento entre la Metformina (MET) y el ADN, centrándose especialmente en las bases púricas, utilizando la técnica de voltamperometría diferencial de pulso (VDP), en una solución amortiguadora a un pH de 4.5 con NaCl 0.1M. La evaluación de la interacción entre el fármaco y las bases púricas se realizó mediante la observación de cambios en la señal analítica, tanto en potencial como en corriente. Se observó que las respuestas de las bases púricas variaban según la concentración de MET añadida, lo que sugiere la existencia de una posible interacción electrostática entre MET-GUA, MET-ADE y MET-ADE-GUA. Es relevante destacar que se observó un mayor impacto en la Adenina (ADE) en comparación con la Guanina (GUA). El método propuesto es adecuado para el estudio de la interacción de la MET con el ADN, siendo sencillo y de bajo costo.

I. Introducción

En la actualidad, a escala global nos enfrentamos a una diversidad de desafíos y problemáticas que afectan la salud de las personas. Entre estos desafíos, las enfermedades crónicas degenerativas destacan como una preocupación significativa, dado que su incidencia es cada vez mayor en la sociedad contemporánea. La diabetes, por ejemplo, se posiciona como una de las enfermedades con mayor frecuencia de aparición, representando un riesgo considerable para la salud pública.

Según la página web oficial de la International Federation of Diabetes (IFD), en 2021 se registraron 537 millones de casos de diabetes en personas de entre 20 y 79 años a nivel mundial, lo que representa aproximadamente 1 de cada 10 personas. En el continente americano, se confirmaron un total de 83 millones de casos. La IFD señala que más del 75% de los adultos con diabetes residen en países de bajos y medianos ingresos. Además, la diabetes fue responsable de 6.7 millones de muertes en el mismo año, lo que equivale a una persona fallecida cada 5 segundos. Esta condición también generó al menos 966 mil millones de USD en gastos de salud, lo que representa un aumento del 316% en los últimos 15 años.

“La diabetes mellitus (o simplemente, diabetes) es una afección grave y de largo plazo (o “crónica”) que ocurre cuando los niveles de glucosa en la sangre de una persona son altos porque su cuerpo no puede producir insulina o la cantidad suficiente de esta hormona” (FID, 2019). Si bien se sabe, “la insulina es una hormona indispensable que se produce en el páncreas que permite que la glucosa del torrente circulatorio ingrese en las células del cuerpo, donde se convierte en energía” (FID, 2019)

Esta enfermedad no cuenta con una cura definitiva, pero sí con un tratamiento farmacológico eficaz que contribuye al control de la misma. En este sentido, la metformina, como un fármaco metabólico, “se continúa considerando como el tratamiento farmacológico de primera línea” (Kojdamanian, 2022)

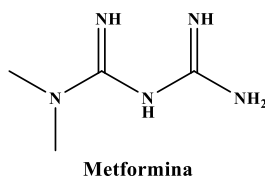


Figura 1. Estructura molecular de la Metformina (MET).

“La metformina (N,N-dimetilbiguanida, MET, Figura 1), es un fármaco antihiper glucemiante administrado por vía oral para controlar la diabetes” (Machini et al., 2019). Al ser una biguanida contiene grupos funcionales que pueden participar en reacciones redox experimentando así cambios en su estado de oxidación los cuales le permiten interactuar con otras moléculas, como tal es el caso de las bases púricas del ADN. “La oxidación electroquímica de un intermediario entre el grupo imino-hidroxi, formado después de una hidrólisis rápida del grupo guanidino, a un grupo imino-carbonilo” (Machini et al., 2019) obteniendo como producto final una oxoguanidina.

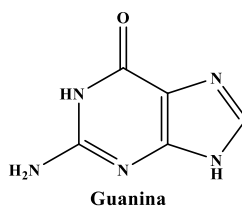


Figura 2. Estructura molecular de la Guanina (GUA).

La guanina (2-amino-6-hidroxipurina, GUA, Figura 2) es una de las dos bases púricas esenciales en la estructura del ADN, las cuales “participan en la transducción y señalización de energía mediada por reacciones de oxidación enzimática” (Oliveira-Brett, 2002). La GUA oxidada es irreversible. Esta oxidación “conduce a la formación de diferentes productos oxidados, siendo las formas predominantes la 8-oxoguanina” (Chiorcea & Oliveira, 2021). Además, la “guanina presenta el potencial de oxidación más bajo en electrodos de carbono, a $E_p+0.80\text{ V}$ ” (Chiorcea & Oliveira, 2021).

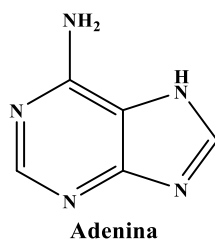


Figura 3. Estructura molecular de la Adenina (ADE).

Por otro lado, la adenina (6-aminopurina, ADE, Figura 3) es la otra base púrica esencial en la estructura del ADN. Cabe destacar, que los procesos de oxidación para ADE también son irreversibles por lo que al ser oxidada deja residuos. Esta oxidación “conduce a la formación de diferentes productos de oxidación, siendo el más importante la 2,8-dioxoadenina” (Chiorcea & Oliveira, 2021). Además, el pico característico que corresponde a la oxidación de adenina es a $E_p+1,05\text{ V}$ ” (Chiorcea & Oliveira, 2021).

Las especies oxidadas, tanto de bases púricas como de metformina, en un sistema biológico pueden producir un alto riesgo para la salud en general puesto que “los productos oxidados de G y A pueden alterar al ADN durante la replicación o reparación” (Chiorcea & Oliveira, 2021). En particular, “las lesiones del ADN más frecuentes son causados por el estrés oxidativo de la 8-oxoguanina que es considerada como biomarcador del daño oxidativo del ADN.” (Chiorcea-Paquim, 2022). Por otra parte, “la 2,8-oxoadenina también es reconocida como biomarcador de daño oxidativo del ADN y estrés oxidativo” (Chiorcea & Oliveira, 2021), haciéndolas altamente mutagénicas y por ende carcinogénicas.

La caracterización de la interacción ADN-fármaco generalmente requiere una combinación de técnicas químicas y biológicas, en este sentido las técnicas electroquímicas son usadas

con el fin de evaluar la interacción ADN-fármaco puesto que “los procesos electroquímicos implicados en la oxidación de bases púricas de ADN son similares a las involucradas en reacciones de oxidación enzimática”(Oliveira-Brett et al., 2002), por lo que en este trabajo se estudia la interacción que tienen la metformina con el ADN (bases púricas: guanina, GUA y adenina, ADE) mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulso optimizando los parámetros electroquímicos y la concentración de metformina usada.

II. Metodología

2.1. Reactivos.

Se utilizarán acetato de sodio, cloruro de sodio, ácido acético glacial, GUA ($\geq 98\%$), ADE ($\geq 99\%$) y MET grado analítico, todos de la marca Sigma Aldrich. Se trabaja a base de solución amortiguadora de acetatos, la cual tiene una preparación que será realizada mediante el uso de acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$) y de ácido acético glacial (CH_3COOH), con una concentración de 0.15 M, además de que la disolución está preparada con agua desionizada (MliO 18M Ω)

2.2. Mediciones electroquímicas.

Todas las mediciones electroquímicas se realizaron con un potenciostato-galvanostado (AUTOLAB), para el estudio se usó una celda electroquímica típica de 3 electrodos: un electrodo de referencia (Ag/AgCl/Plata-Cloruro de Plata), un electrodo auxiliar o contra electrodo (Pt/platino) y un electrodo de trabajo (C/carbono). La caracterización de MET y la realización de la interacción MET-GUA/MET-ADE se realiza por voltamperometría diferencial de pulso (VDP) en la ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06V, un tiempo de pulso de 75ms y velocidad 32mV/s. Para todas las mediciones se verificó que la superficie de electrodo no estuviera contaminada utilizando un sistema blanco.

El análisis cuantitativo de cada base púrica se realiza a partir de las curvas de calibración de los estándares. Los productos de oxidación de MET se obtuvieron de forma electroquímica aplicando un voltaje de 0.55 V, durante un tiempo establecido.

2.3. Interacción Fármaco-base púrica

Se diseñaron y prepararon sistemas experimentales mediante la combinación de MET-ADE, MET-GUA y MET-GUA-ADE, con la manipulación de las concentraciones de MET como variable. Se determinó la concentración óptima de MET para la interacción deseada. Para cada ensayo, se estableció un sistema control, donde se evaluaron las soluciones de MET, GUA y ADE de manera individual.

2.4. Evaluación de la interacción.

Posteriormente se monitoreo la respuesta de potencial y de corriente de pico anódica. Se caracterizó la interacción entre MET-GUA, MET-ADE y MET-GUA-ADE, a través de los desplazamientos de potencial y/o cambios en la señal analítica (corriente). Se considerará una posible interacción entre las especies cuando se tiene un cambio en la concentración mayor o igual 10% o cuando el potencial de las señales de oxidación se desplaza más de 50 mV.

III. Resultados y discusión.

Para fines del estudio, se prepararon todas las muestras de los sistemas de manera individual, incluyendo el blanco, las muestras con solo base púrica y aquellas con MET a diferentes concentraciones ya que el objetivo era observar la interacción entre la metformina y las bases púricas del ADN, es por ello a tener en cuenta que, tras la primera lectura del voltamperograma, es probable que se hayan formado especies oxidadas en el medio, lo que podría contribuir a una variabilidad.

También en cada cambio de las muestras de los sistemas se realizó la limpieza adecuada de la celda electroquímica y del electrodo de trabajo (carbono), esto se realizó con agua desionizada tanto para la celda como para cada electrodo, además para este último y como forma de optimizar su limpieza se realizó un pulido con una tela especial y de esta forma garantizar que el electrodo no tuviera residuos sobre la superficie electroactiva y que esto no fuera un factor de variabilidad en los resultados.

Por otro lado, el parámetro para considerar que se está en presencia de una interacción deberá ser un desplazamiento, ya sea de potencial o de corriente eléctrica, igual o mayor al 10% con

base a la referencia (base púrica en sistema aislado), o la aparición de una nueva señal electroquímica, esta para mayor confiabilidad y validez del estudio.

3.1. Metformina

La oxidación de MET es un proceso químico que conlleva transformaciones estructurales en la molécula con la intención de hacerla interactiva con otras especies químicas. En la Figura 4, se muestra una propuesta del mecanismo de oxidación llevado a cabo en el estudio, dando como producto final la N,N-dimetil-2-oxoguanida (Trautwein & Kümmerer, 2011).

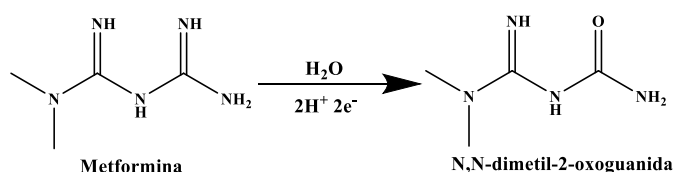


Figura 4. Esquema del mecanismo de oxidación de MET en un sistema acuoso con NaCl 0.1M y aforado con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 4.5.

El mecanismo (Figura 4) proporciona una comprensión visual de la transformación de la molécula de MET, proporcionándole grupos funcionales tales que interactúan con las otras especies químicas presentes en un sistema.

3.1.1. Caracterización de la Metformina

Se realizó el estudio de manera directa de la MET en solución (Figura 5) en la cual en las condiciones de este análisis no se observó ningún pico de oxidación correspondiente al fármaco, por lo que se optó en un análisis de manera indirecta. La figura 5 muestra la respuesta de la MET en concentración de 1 mg/mL, es importante recalcar que se analizaron diferentes concentraciones y no fue posible detectar ninguna señal de oxidación.

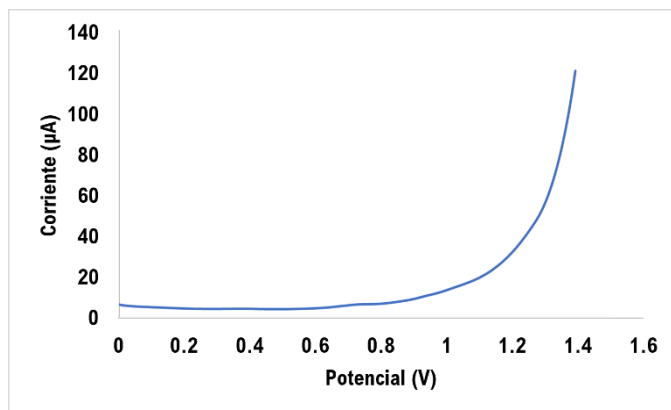


Figura 5. VDP de MET 1 mg/mL en un medio con NaCl 0.1 M y aforado con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, en un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

3.2. Guanina

La oxidación de la GUA es un proceso químico que implica la transferencia de electrones, se lleva a cabo mediante el siguiente mecanismo, Figura 6, resultando como producto final la 8-oxoguanina. (Papavasileiou et. Al, 2022).

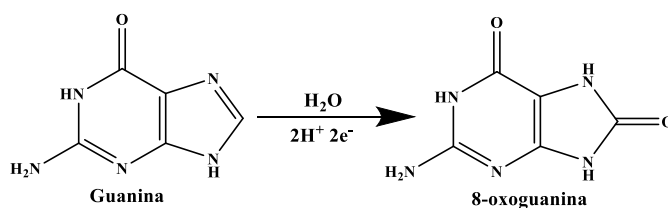


Figura 6. Esquema del mecanismo de oxidación de la GUA en un sistema acuoso con NaCl 0.1M y aforado con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 4.5.

En este caso en específico, la GUA es oxidada por lo que da lugar a la formación de un producto de oxidación de la base sobre la superficie del electrodo, favoreciendo la electro-atractividad para interactuar con otras especies. A partir de la oxidación de la molécula en el sistema es posible elucidar como interactuara con las demás especies, llámese ADE o MET, a través de sus grupos funcionales.

3.2.1. Caracterización de la Guanina

Para caracterizar el proceso de oxidación vía electroquímica, se realizó la lectura de GUA de forma individual en el sistema (Figura 7) esto con el fin de obtener el pico característico en las condiciones especificadas en la metodología, cabe aclarar que para mejor análisis en la cuantificación del pico anódico se sustrajo la línea base la curva original, lo que permitió llevarla a 0, y así obtener el valor de la corriente GUA a la concentración de estudio.

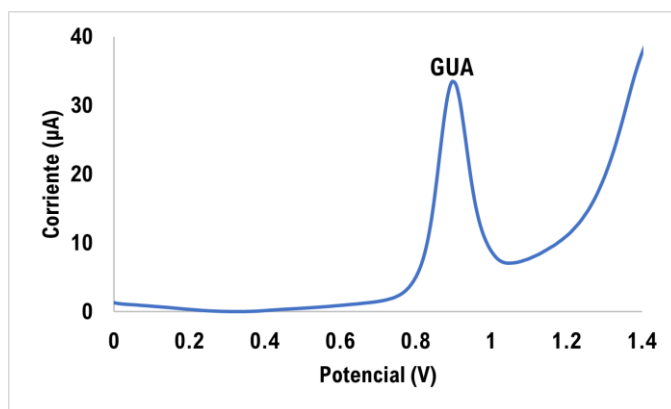


Figura 7. VDP de GUA 10.1 $\mu\text{g/mL}$, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

La señal de GUA obtenida se usó como referencia para visualizar las interacciones que se presentan con relación al aumento de concentración de MET. El pico máximo de GUA se observa en 0.896 V y a 33.441 μA aproximadamente, esto cuando la concentración es de 10.1 $\mu\text{g/mL}$.

3.2.2. Curva de calibración de guanina

Para construir la curva de calibración se obtuvieron las corrientes de pico anódico característico asociadas a cada concentración de GUA.

La Figura 8 exhibe la curva de calibración para GUA, abarcando concentraciones entre 6.06 y 14.14 $\mu\text{g/mL}$, con cada medición realizada en triplicado y presentada como promedio. El coeficiente de correlación evidencia la linealidad del método, siendo de 0.99 en todos los casos, con una sensibilidad de 3.0503 $\mu\text{A}/(\mu\text{g/mL})$ para GUA.

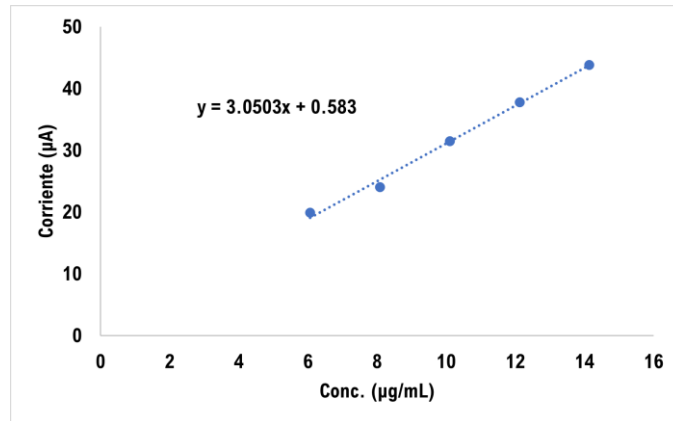


Figura 8. Curva de calibración de GUA en soluciones con concentraciones de 6.06, 8.08, 10.1, 12.12 y 14.14 µg/mL de GUA, preparadas en un medio conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevadas a cabo en una celda electroquímica convencional de 3 electrodos, con un rango de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

3.2.3. Análisis guanina-metformina

Ahora bien, la Figura 9 muestra el sistema de trabajo para GUA en la cual se observan desplazamientos de las curvas con respecto a la concentración de MET. Como se puede percibir a mayores concentraciones de MET, hay una mayor interacción.

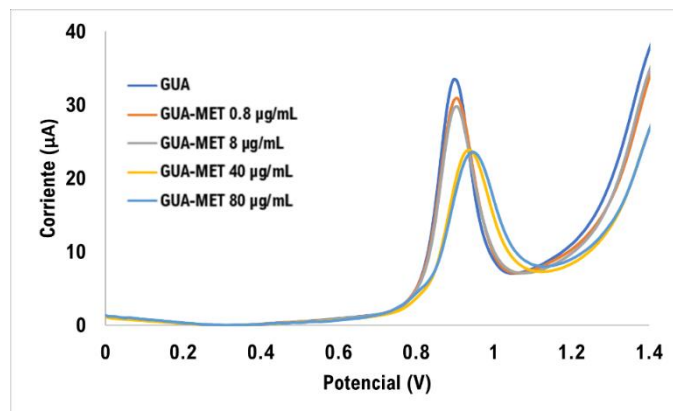


Figura 9. VDP de los efectos de GUA a 10.1 µg/mL en interacción con MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL, preparadas en un medio conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevado a cabo en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

A medida que aumenta la concentración de MET, se produce un desplazamiento positivo en el potencial. Como se percibe, mientras que la GUA sola se registra a 0.896 V, la GUA que interactúa con una concentración de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ de MET aparece a 0.906 V, teniendo un desplazamiento de 0.010 V representando el 1.12% de variación. Por otro lado, la concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ de MET se sitúa en 0.947 V, lo que representa alrededor de 0.050 V de desplazamiento simbolizando el 5.62% de variación. Este desplazamiento observado es importante para el análisis, ya que indica una influencia clara de la concentración de MET en el potencial observado. Por otra parte, también va disminuyendo gradualmente la altura del pico anódico (μA). Estos comportamientos se asocian con una posible interacción entre GUA y MET a través de la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo NH_2 (MET) y $\text{C}=\text{O}$ (GUA).

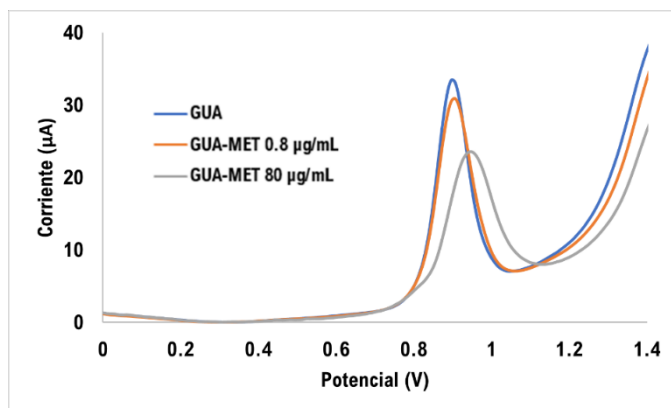


Figura 10. VDP de los efectos de GUA a 10.1 $\mu\text{g/mL}$ en interacción con MET a 0.8 y 80 $\mu\text{g/mL}$. preparados en medios conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con una solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevadas a cabo en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

En la Figura 10, se observa el desplazamiento que tienen los picos representativos de cada muestra GUA (curva azul), GUA-MET (naranja) en donde la relación molar es 1:1 y GUA:MET (curva gris) con una relación molar de 1:4.

Con base a los resultados electroquímicos se determinó el efecto de la concentración de MET sobre la concentración total de GUA, considerando el 100% cuando no hay interacción (en ausencia de MET). La cuantificación de las concentraciones de GUA se realizó usando la curva de calibración de GUA.

En la Figura 11, las barras azules muestran el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 9, el tratamiento de los datos arroja una disminución en la concentración de GUA donde el máximo de GUA corresponde a 33.441 μA y conforme se hay presencia de MET comienza a disminuir esa altura de pico anódico dando valores como 30.886 μA para la concentración de MET más baja (0.8 $\mu\text{g/mL}$ =6.2 μM) y 23.565 μA para la concentración de MET más alta (80 $\mu\text{g/mL}$ = 62 μM).

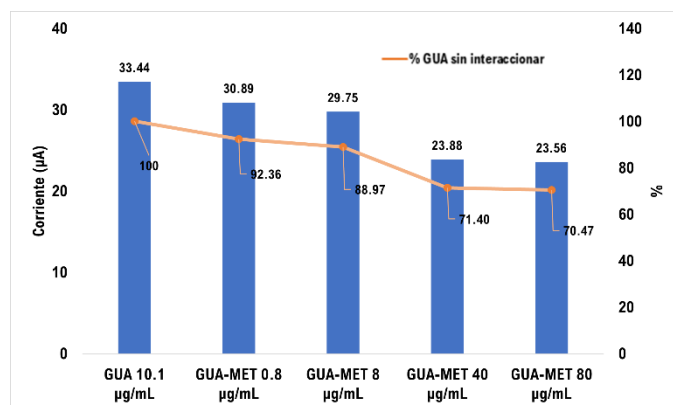


Figura 11. Altura de pico anódica y porcentaje de GUA sin interaccionar, preparadas en medios conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevadas a cabo en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

Conforme a la línea naranja, representa en porcentaje la cantidad de GUA inalterada. Para la primera concentración de MET (0.8 $\mu\text{g/mL}$) se observa que disminuye al 92.36%, valor muy cercano al parámetro establecido como interacción. Por otra parte, el valor más alto de concentración de MET (80 $\mu\text{g/mL}$) casi llega a una disminución del 70.00% sobre la señal de GUA.

Además, es importante destacar el impacto que tiene la MET en la GUA. En la Figura 12, las barras azules reflejan el efecto que presenta la MET en la corriente (disminución de pico anódico), además muestra los porcentajes del efecto de la MET sobre la GUA en la línea naranja.

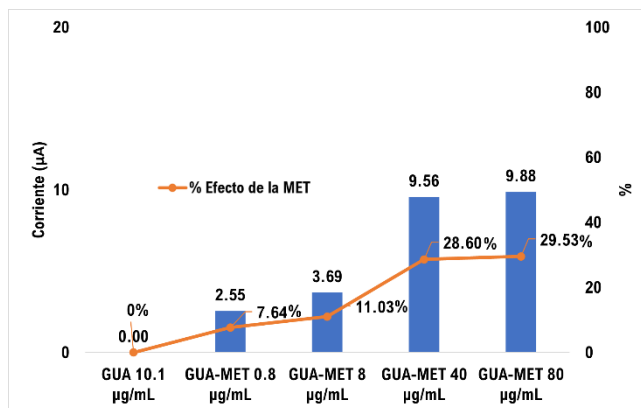


Figura 12. Cantidad de disminución de pico anódico de GUA a 10.1 µg/mL y porcentaje de interacción de MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL, preparadas en medios conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevadas a cabo en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

A diferencia de la Figura 11, la Figura 12 muestra el valor que disminuyó conforme a la corriente (µA) según su interacción con la MET. Para solamente GUA, tenemos 0.000 µA puesto que aquí la MET no ha tenido algún efecto ya que no se encuentra en sistema y por ende ninguna disminución. Para la segunda concentración de MET (8 µg/mL), hay un 3.688 µA de disminución de curva respecto a la de GUA representando así 11.03% de interacción, además de cómo se evidenció en el desplazamiento de la corriente eléctrica en la Figura 9 y se confirmó numéricamente en la Figura 11, este porcentaje cumple con la especificación del parámetro, siendo mayor al 10%. En cuanto a las demás concentraciones, el efecto de la MET sobre GUA es aún más significativo. Es relevante señalar que, en la concentración más alta de MET (80 µg/mL) casi alcanza el 30% de efecto sobre GUA, disminuyendo así 9.876 µA.

3.3. Adenina

La oxidación de la Adenina es un proceso químico que implica cambios en la estructura molecular, debido a la transferencia de electrones, se lleva a cabo mediante el siguiente mecanismo propuesto en la Figura 13, resultado como producto de la oxidación la 2,8-dioxoadenina. (Papavasileiou et. Al, 2022).

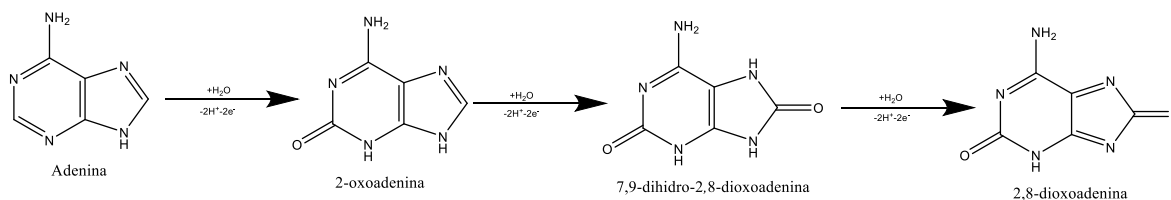


Figura 13. Esquema del mecanismo de oxidación de ADE en un sistema acuoso con NaCl 0.1M y aforado con solución amortiguadora de acetatos 0.1 M pH 4.5.

En esta situación específica, el producto de esta oxidación, que se forma en la superficie del electrodo, da lugar a especie más electro-atractivas, lo que le permite interactuar de manera más efectiva con otras moléculas presentes en el sistema.

3.3.1. Caracterización de la Adenina

Al igual que para MET y GUA, se corrió el VDP de la ADE sola en el sistema (Figura 14) esto con el fin de conocer cuál es su pico característico bajo las condiciones experimentales antes mencionadas.

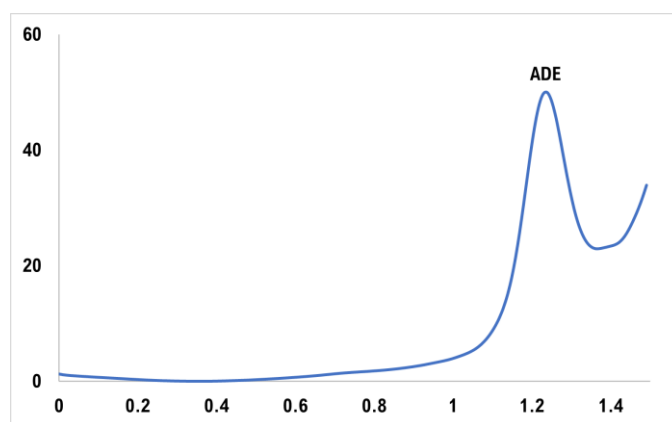


Figura 14. VDP de ADE a 13.5 $\mu\text{g/mL}$, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevado a cabo en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, en un pulso de potencial de 0.06 V, a un tiempo de pulso de 75 ms y una velocidad de barrido de 32 mV/s.

A partir del VDP, se encontró que el pico máximo de ADE se observa en 1.239 V con 49.996 μA aproximadamente cuando la concentración es de 13.5 $\mu\text{g/mL}$. Así mismo, es útil como referencia para captar las interacciones con relación a MET.

3.3.2. Curva de calibración de adenina

En la Figura 15, se muestra la curva de calibración para ADE, la cual se realizó por triplicado, tomado solo los promedios, donde se encontró que el método es lineal. En todos los casos el R^2 fue de 0.99, con una sensibilidad de $5.6978 \mu\text{A}/(\mu\text{g}/\text{mL})$ para ADE.

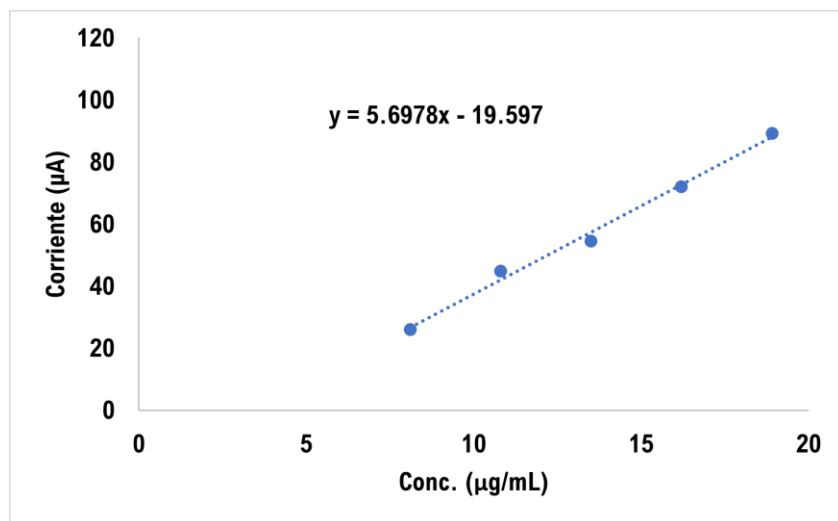


Figura 15. Curva de calibración de ADE, elaborada en soluciones con concentraciones de 8.1, 10.8, 13.5, 16.2 y 18.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADE, preparadas en un medio conteniendo NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, llevado a cabo en una celda electroquímica convencional de 3 electrodos, con un rango de potencial de 0 a 1.5 V, aplicando un pulso de potencial de 0.06 V, con un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

3.3.3. Análisis adenina-metformina

Los sistemas de la interacción para ADE y MET se observan en la Figura 16, en la cual se visualizan los desplazamientos de las curvas en función de las concentraciones de MET.

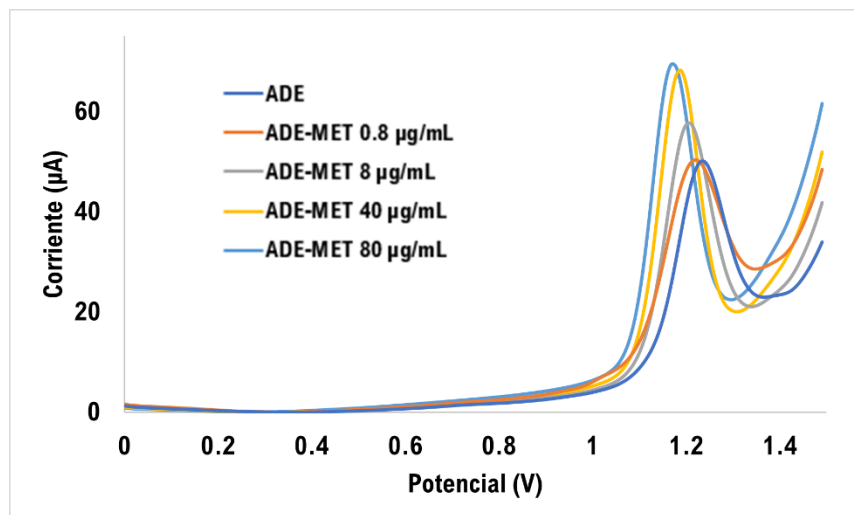


Figura 16. VDP de los efectos de ADE a 13.7 $\mu\text{g/mL}$ con MET a 0.8, 8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$, en medios con NaCl 0.1 M y aforados con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, en una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, a tiempo de pulso de 75 ms y con velocidad de barrido de 32 mV/s.

La figura anterior, sigue un comportamiento similar a la Figura. 9 de GUA, ya que a mayor concentración de MET hay un mayor desplazamiento del pico. Lo que la diferencia de la interacción con GUA es el potencial en el que se presenta el pico anódico, el tipo de desplazamiento que hubo (negativo) y el tipo de interacción del que se trata, ya que aquí se observa cómo es desplazado a la izquierda del potencial, asimismo tiende a aumentar su pico de oxidación gradualmente. Este comportamiento que presenta el complejo ADE-MET se relaciona con una posible interacción electrostática entre los grupos NH_2 de MET y ADE.

Lo antes mencionado se muestra con mayor claridad en la Figura 17.

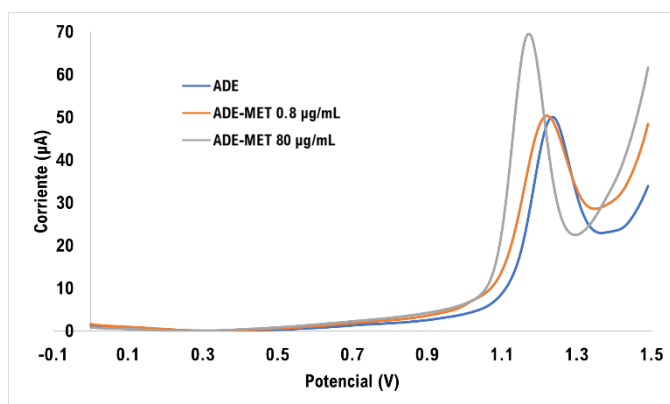


Figura 17. VDP de los efectos de ADE a 13.7 $\mu\text{g/mL}$ con MET a 0.8 y 80 $\mu\text{g/mL}$, en medios con NaCl 0.1 M y aforados con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, en una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, a tiempo de pulso de 75 ms y con velocidad de barrido de 32 mV/s.

Es evidente observar que a una mayor concentración de MET hay una mayor interacción con la ADE (curva gris), ya que muestra una mayor altura de pico anódico y un desplazamiento respecto a la de menor concentración de MET (curva naranja) que de igual manera está muestra una menor interacción. A una concentración de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ de MET se observa que el potencial se desplaza negativamente 0.020 V, lo que representa una variación del 8.70% con base a la curva de referencia (curva azul/ADE). Para la concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ de MET se muestra un potencial más desplazado, puesto que se desplaza 0.071 V de la referencia, simbolizando así un 30.44% de la variación.

Con base a estos resultados se evaluó tanto la ADE inalterada como la interaccionada, a través del cambio, expresado en porcentaje para la concentración, que produce efecto MET a ADE.

En la Figura 18, las barras azules, muestran el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 16, reflejando el incremento en la señal electroquímica de ADE. Se observa que el pico anódico máximo de ADE, sin alteraciones (correspondiente al 100%), aumenta a medida que aumenta la presencia de MET. Para la primera concentración de MET (0.8 $\mu\text{g/mL}$) aumenta a 50.312 μA de corriente, mientras que para la concentración más alta de MET (80 $\mu\text{g/mL}$) aumenta a 69.405 μA de corriente. A partir de los resultados, se observa que la interacción de MET con ADE alcanza su máximo cuando la relación molar es 5:1 MET:ADE.

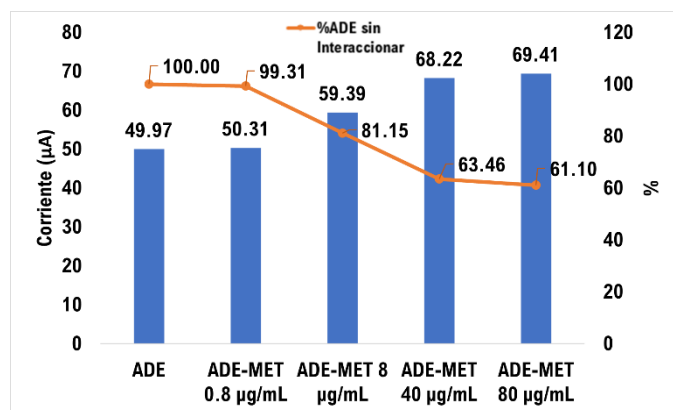


Figura 18. Altura de pico anódica y porcentaje de ADE a 13.5 µg/mL sin interaccionar, en medios con NaCl 0.1 M y aforados con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, en una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, a tiempo de pulso de 75 ms y con velocidad de barrido de 32 mV/s.

Respecto a la línea naranja, indica el porcentaje de ADE que se encuentra sin el efecto de MET en el sistema, tomado como el 100% al valor máximo de pico anódico ya que se encuentra sola en el sistema y por ende no existe algo con lo que interaccionar. Ahora bien, al ir aumentando la concentración de MET va disminuyendo este porcentaje, puesto que la MET interacciona con la ADE. Para la primera concentración de MET (0.8 µg/mL), se observa una disminución significativa al 99.31%. Por otra parte, la segunda concentración de MET (8 µg/mL), indica que el 84.70% del sistema está compuesto por ADE sin el efecto de MET, este desplazamiento observado es importante para el análisis, ya que indica una influencia clara de la concentración de MET en la corriente observada. Para el valor más alto de concentración de MET (80 µg/mL) desciende a cerca del 60% de ADE sin efecto, siendo así este el que tiene un mayor efecto de interacción.

Mientras tanto, el efecto que produce la MET a ADE también es preciso de analizar. En la Figura 19, las barras azules indican el valor que disminuyó el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 16, además en la línea naranja se muestran los porcentajes del efecto de la MET ejercido sobre ADE.

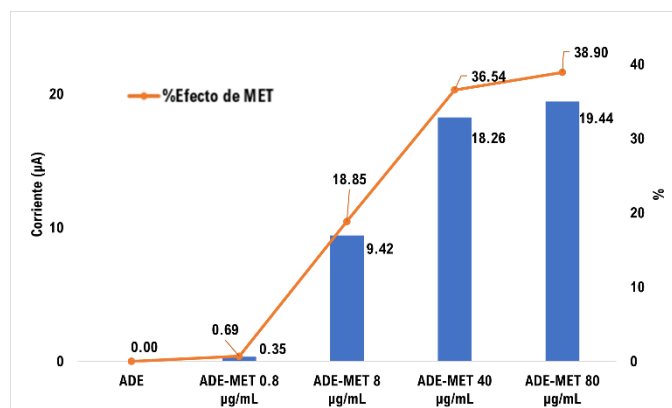


Figura 19. Altura de pico anódica máxima y porcentaje de ADE a 13.5 µg/mL sin interaccionar y porcentaje de interacción de MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL, en medios con NaCl 0.1 M y aforados con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, en una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, a tiempo de pulso de 75 ms y con velocidad de barrido de 32 mV/s.

Se observa que para ADE sola en el sistema no muestra un valor específico puesto que no hay alguna interacción que mostrar ya que se en cuenta sola en el sistema. Para la primera concentración de MET interacciona un 0.69%, siendo este un valor razonable con lo observado anteriormente y este simplemente nos indica que si hay una posible interacción gracias al desplazamiento significativo que tuvo en la Figura 16. Secuencialmente, la segunda concentración de MET (8 µg/mL) muestra un porcentaje de efecto de MET sobre ADE de 18.85% siendo este el valor que confirma todo lo anterior con base a la interacción entre la MET y ADE, ya que, por lo observado, se visualiza un desplazamiento de corriente eléctrica en la Figura 16, además numéricamente en la Figura 18 muestra este cambio y por último porcentualmente cumple con la especificación del parámetro siendo este mayor al 10%. Conforme a las demás concentraciones se tiene un mayor porcentaje de efecto de MET sobre ADE, aunque es preciso denotar que la concentración de 80 µg/mL de MET está cerca de alcanzar un 40% de interacción, por lo que estarían mayormente interaccionadas las moléculas de ADE a concentraciones más altas.

3.4. Bases púricas-Metformina

En esta parte del estudio, para obtener un mejor análisis de la interacción entre MET-GUA-ADE se decidió realizar dos metodologías experimentales con una variable de cambio la cual consta solamente en el orden de adición de GUA o ADE.

Además, en esta misma parte del estudio se optó por realizar todos los sistemas juntos (se añadieron secuencialmente las soluciones en un mismo sistema electroquímico), esto con el fin de analizar los cambios que existen. Cabe aclarar que las metodologías si se hicieron por separado. Para recalcar, al añadir más solución en un sistema previamente aforado aumentara el volumen por lo que también fue considerado en el estudio para los cálculos pertinentes.

Por otro lado, se continuó haciendo el protocolo de limpieza solamente del electrodo. Dicha limpieza fue absolutamente la misma que en la parte anterior del estudio, y con la misma finalidad, de mantener el mismo sistema a analizar.

Conforme al parámetro de interacción, se considerará que se está en presencia de una interacción cuando el desplazamiento, ya sea de potencial o de corriente eléctrica, sea igual o mayor al 10% con base a la referencia (base púrica en un sistema inicial), o la aparición de una nueva señal electroquímica, esta para mayor confiabilidad y validez del estudio.

3.1. Guanina-Adenina-Metformina

Para la metodología 1 (adición inicial de GUA) y de la misma manera que para las partes anteriores de este estudio, se realizó la caracterización de GUA sola en el sistema (Figura 20) esto con el mismo fin de mostrar cuál es su pico anódico específico en las mismas condiciones del estudio.

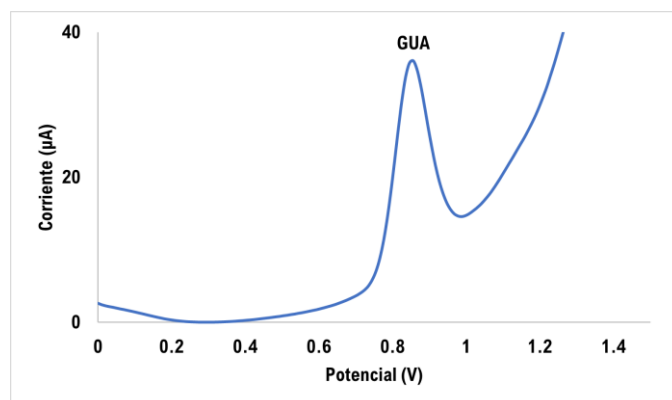


Figura 20. VDP de GUA 10.1 $\mu\text{g/mL}$, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

Al igual que los demás, nos sirvió de referencia para observar las interacciones que se tuvo con relación al aumento de las concentraciones de las soluciones de MET. El pico máximo de GUA se muestra en 0.856 V y a 36.059 μA aproximadamente.

Para esta parte del estudio no solo se haría lectura de la GUA sino también de la ADE, en la cual se realizó la lectura de GUA y ADE juntas en el mismo sistema (Figura 21) esto con la finalidad de demostrar cuáles son sus picos característicos antes de interactuar con cualquier producto oxidado de la MET. Es preciso recordar que al adicionar más soluciones previstas en el estudio aumentaría el volumen del sistema, ya que se estuvo trabajando en el mismo medio por lo que se realizó un ajuste de volumen a la hora de realizar todos los cálculos pertinentes con base en la relación estequiométrica.

La GUA y ADE en un solo sistema tienden a oxidarse de distintas formas por lo que el orden de adición llega a ser crucial para el estudio.

En presencia de solo GUA-ADE en el sistema (Figura 21), se observa que el pico anódico de GUA fue desplazado significativamente a la izquierda en el potencial, pero aumentado en la altura del pico anódico.

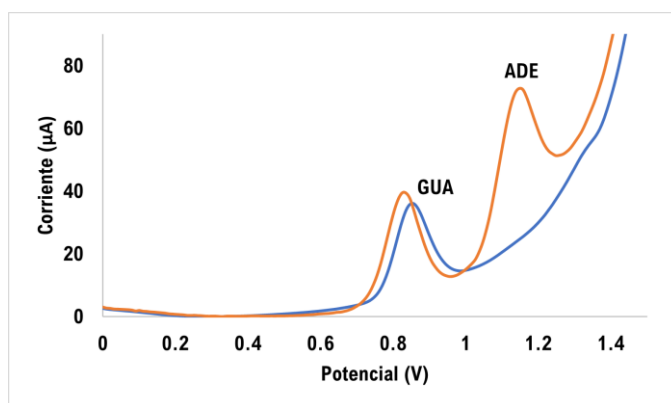


Figura 21. VDP de los efectos de GUA a 10.1 $\mu\text{g/mL}$ y de ADE a 13.5 $\mu\text{g/mL}$, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3

electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

Para este caso en particular, GUA aparece en 0.826 V de potencial y a 39.532 μA de corriente, observando así en que la ADE también ejerce una conexión sobre la GUA. Este comportamiento se asocia con una posible interacción entre GUA y ADE a través de la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos funcionales NH (GUA) y N=C (ADE), y C=O (GUA) y NH₂ (ADE). Por otra parte, ADE aparece a 1.148 V de potencial y a 72.778 μA de corriente, resultando diferente a comparación de la Figura 14, puesto que la GUA en este sistema está involucrada en dichas interacciones.

Por otro lado, en la Figura 22 se observan todos los desplazamientos de las curvas con respecto a las concentraciones de MET.

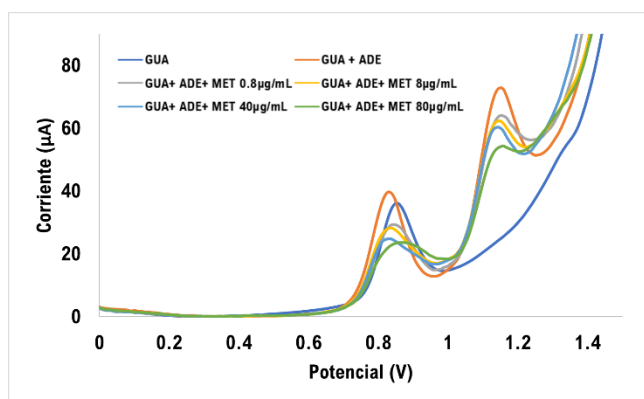


Figura 22. VDP de los efectos de GUA a 10.1 $\mu\text{g/mL}$; de ADE a 13.5 $\mu\text{g/mL}$ y de MET a 0.8, 8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

En presencia de MET en el sistema, se observa que el pico anódico de GUA y ADE es desplazado tanto en el potencial como en la altura de pico anódico. Respecto a la GUA, conforme hay mayor concentración de MET surge un desplazamiento significativamente positivo del potencial y una disminución en la altura de pico anódica. Con base a la concentración más baja de MET (0.8 $\mu\text{g/mL}$) en este sistema ternario, la curva indicativa de GUA aparece en 29.327 μA de corriente y en 0.846 V de potencial, mientras que para la concentración más alta de MET (80 $\mu\text{g/mL}$) en este sistema ternario surge en 23.587 μA de

corriente y a 0.866 V de potencial. Con base a estos datos, se observa que en comparativa a la GUA-ADE con la GUA-ADE-MET a gran concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ se desplaza 0.040V, representando un 14.22% de variación en el potencial.

En cuanto a ADE, conforme hay mayor concentración de MET surge un desplazamiento significativamente negativo del potencial y una disminución en la altura de pico anódica. En base a la concentración más baja de MET (0.8 $\mu\text{g/mL}$) en este sistema ternario, la curva indicativa de ADE aparece en 63.965 μA de corriente y en 1.148 V de potencial, mientras que para la concentración más alta de MET (80 $\mu\text{g/mL}$) en este sistema ternario surge en 54.309 μA de corriente y a 1.158 V de potencial. Con base a estos datos, se observa que en comparativa a ADE-GUA con la GUA-ADE-MET a gran concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$ se desplaza 0.010V, representando un 0.88% de variación en el potencial.

Este comportamiento se asocia con una posible interacción y formación de un complejo entre GUA-ADE-MET a través de la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos funcionales NH (GUA) y N=C (ADE), y C=O (GUA) y NH₂ (ADE), además de que también llega existir mayor unión gracias a las especies oxidadas que se encuentra ya en el sistema.

Puesto que en esta parte del estudio se tienen ambas bases púricas en sistema se decidió analizarlas por separado.

Anteriormente, se observó visualmente el efecto que presenta MET a las bases púricas en un sistema ternario (sistema en el que se encuentran las 2 bases púricas y la MET en un mismo sistema) y con base a estos resultados se obtuvieron sus porcentajes tanto de GUA sin interaccionar como del porcentaje del efecto que produce MET a GUA.

Dicho lo anterior, las barras azules en la Figura 23 muestran el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 22, esto indica de la misma forma una disminución, pero ahora de este modo numérico (μA). Se muestra que el pico máximo de GUA aparece a 36.059 μA y conforme se haya presencia de MET comienza a disminuir esa altura de pico anódico dando valores como 29.327 μA para la concentración de MET más baja (0.8 $\mu\text{g/mL}$) y 23.587 μA para la concentración de MET más alta (80 $\mu\text{g/mL}$). Cabe mencionar que hay una excepción en el sistema, ya que al adicionar ADE este no tiende a disminuir y, por el contrario, aumenta

su corriente eléctrica a 39.532 μA . Esto sucede gracias a que hay un posible enmascaramiento de la ADE sobre la GUA lo que tiende a aumentar su corriente eléctrica, pero sin perjudicar al sistema puesto que continua con una tendencia similar al del punto 3.2 de este estudio.

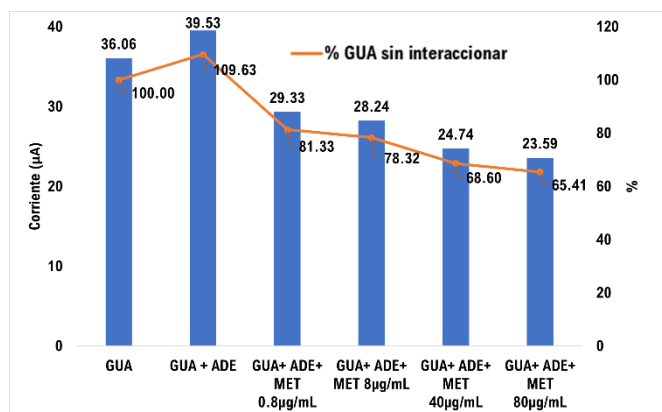


Figura 23. Altura de pico anódica y porcentaje de GUA sin interaccionar en un sistema ternario, con un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

Respecto a la línea naranja, representa el porcentaje de GUA que se encuentra sin el efecto de MET en el sistema, teniendo como el 100% a la GUA ya que al no tener nada más que GUA en el sistema, no existe algo con lo que interaccionar. Ahora bien, el aumento que se tuvo gracias a ADE se muestra como un porcentaje mayor al 100%, pero esto no fue considerado como una variabilidad ya que la ADE juega un papel crucial.

Por otra parte, al ir aumentando la concentración de MET va disminuyendo el porcentaje. Para la primera concentración de MET (0.8 $\mu\text{g/mL}$) se observa que disminuye al 81.33%, valor que es de suma utilidad para el análisis del estudio. Por otra parte, el valor más alto de concentración de MET (80 $\mu\text{g/mL}$) llega al 65.41% de GUA sin efecto de MET viendo así que tiene un mayor efecto de interacción a grandes concentraciones de MET, como en similitud a las partes anteriores del estudio.

En esta parte, la ADE juega un papel muy importante ya que al encontrarse otra especie química más en el sistema se convierte más competitiva la interacción y eso lo podemos observar en comparativa con los resultados del sistema binario de GUA con el sistema ternario de GUA, ya que para la concentración más alta de MET casi llega al 70% de GUA

sin efecto de MET en el sistema binario, en cambio en el sistema Ternario alcanzo a llegar al 65.41%.

Por otro lado, el efecto que produce la MET a la GUA también es considerado. En la Figura 24, las barras azules indican el valor de disminución del pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 22, además los porcentajes de la línea naranja son del efecto ejercido por la MET.

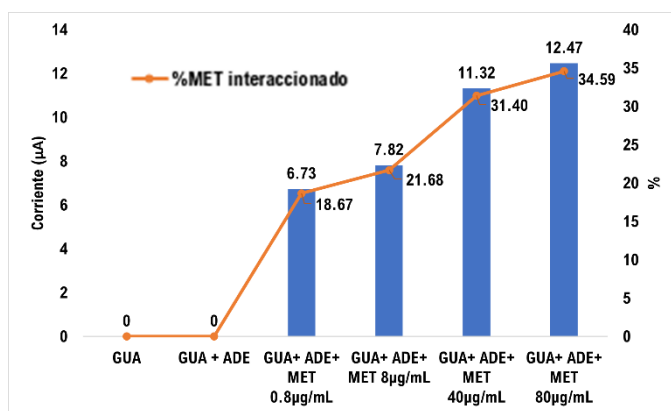


Figura 24. Valor de disminución de las alturas de pico y porcentaje de los efectos de GUA a 10.1 µg/mL y MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL en un sistema ternario, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

Puesto que no hay MET en los primeros dos sistemas, no hay fármaco con el cual interactuar por lo tanto se muestra en 0 esas dos columnas. Para la primera concentración de MET (0.8 µg/mL) se tiene el 18.67% del efecto, siendo este el valor que confirma todo lo anterior con base a la interacción entre la MET y GUA, puesto que como se vio, se observa un desplazamiento de corriente eléctrica en la Figura 22, además numéricamente en la Figura 24 muestra este cambio y por último porcentualmente cumple con la especificación del parámetro siendo este mayor al 10%. Conforme a las demás concentraciones se tiene un mayor porcentaje de efecto de MET sobre GUA, solo es claro mencionar que la concentración más grande de MET casi alcanza el 35% del efecto ejercido sobre la GUA.

Como se mencionó, ADE forjó una competencia de interacción contra GUA, puesto que los resultados en comparativa del sistema binario con el ternario son muy distintos. En el sistema

binario para la concentración mayor de MET casi se alcanza el 30% del efecto mientras que en este sistema ternario alcanzó el 34.59%, siendo mejor gracias a la presencia de la ADE en el sistema.

Por otra parte, para la ADE las barras azules en la Figura 25 siguen mostrando el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 22, pero ahora de forma numérico (μA). Observamos que el pico anódico máximo de ADE aparece a $72.778 \mu\text{A}$ y conforme se hay presencia de MET comienza a disminuir esa altura de pico anódico dando valores como $63.965 \mu\text{A}$ para la concentración de MET más baja ($0.8 \mu\text{g/mL}$) y $54.309 \mu\text{A}$ para la concentración de MET más alta ($80 \mu\text{g/mL}$). Es preciso mencionar que sigue existiendo una competitividad entre la ADE y GUA por lo que los valores son menores que en un sistema binario.

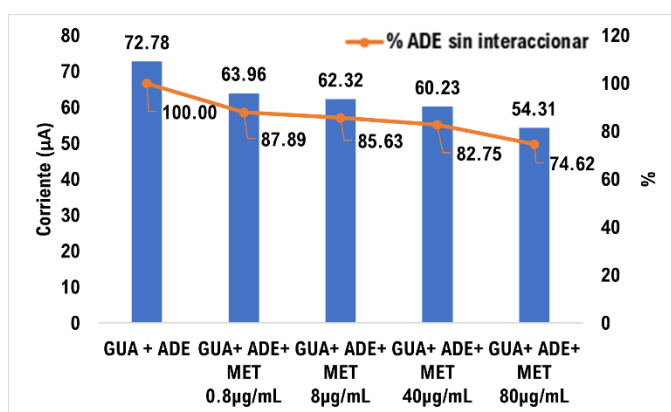


Figura 25. Altura de pico anódica y porcentaje de ADE a $13.5 \mu\text{g/mL}$ sin interaccionar en un sistema ternario, en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5 , con una concentración de 0.1 M , en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V , con un pulso de potencial de 0.06 V , en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s . Metodología 1.

Con base a la línea naranja, representa el porcentaje de ADE que se encuentra sin el efecto de MET en el sistema, teniendo como base el 100% a ADE inicial. Al ir aumentando la concentración de MET va disminuyendo este porcentaje. Para la primera concentración de MET ($0.8 \mu\text{g/mL}$) se observa que disminuye al 87.89%, valor el cual es de gran utilidad para el estudio. Por otra parte, el valor más alto de concentración de MET ($80 \mu\text{g/mL}$) casi llega al 70% de ADE sin efecto de MET siendo así que tiene un mayor efecto de interacción a grandes concentraciones de MET, como en similitud a las partes anteriores.

Para esta parte, la ADE sigue jugando un papel muy importante puesto que la interacción esta competida y eso se observa en comparación con los resultados del sistema binario de ADE con el sistema ternario de ADE, ya que para la concentración más alta de MET casi llega al 60% de ADE sin efecto de MET para el sistema binario, en cambio en el sistema Ternario simplemente alcanzo a llegar al 74.62%.

Por otra parte, el efecto que produce la MET a la ADE también es analizado. En la Figura 26, las barras azules indican los valores de disminuciones que tuvieron las alturas máximas de picos anódicos de la Figura 22, además de que también se muestran los porcentajes del efecto de MET en la línea naranja.

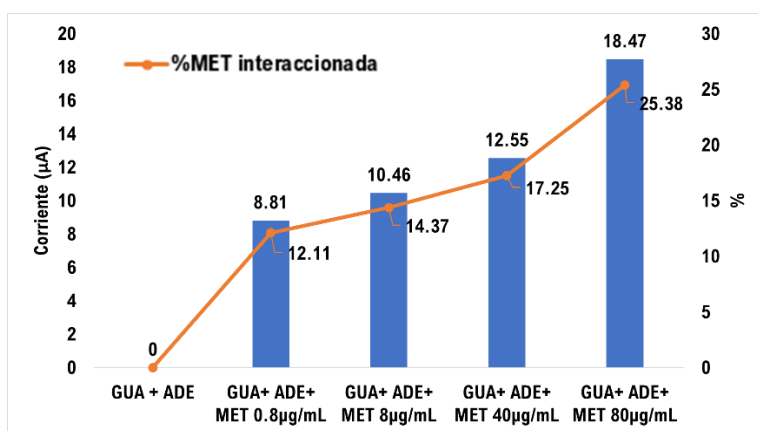


Figura 26. Valor de disminución de pico anódica máximo y porcentaje del efecto de MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL en un sistema ternario, con un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 1.

En la parte de GUA+ADE, no muestra algún valor ya que al no entrar MET al sistema, no hay forma en que este interaccione con algo puesto que todavía no hay. Para la primera concentración de MET (0.8 µg/mL) se tiene el 12.11% del efecto, siendo este el valor que confirmatorio de lo anterior respecto a la interacción entre la MET y ADE, ya que como se vio, se muestra un desplazamiento de corriente eléctrica en la Figura 22, además numéricamente en la Figura 25 muestra este cambio y por último porcentualmente cumple con la especificación del parámetro siendo este mayor al 10%. Conforme a las demás concentraciones se tiene un mayor porcentaje de efecto de MET sobre ADE, solo es preciso

mencionar que la concentración más grande de MET sobrepasa el 25% del efecto ejercido por MET sobre la ADE.

ADE al formar una competencia de interacción contra GUA, muestra que los resultados en comparativa del sistema binario con el ternario son muy distintos. En el sistema binario para la concentración mayor de MET casi se alcanza el 40% del efecto mientras que este sistema ternario solamente se alcanzó el 25.38%, aun así, siendo apto para el estudio mediante sus especificaciones de interacción.

3.2. Adenina-Guanina-Metformina

Para la segunda metodología 2 (adición inicial de ADE, Figura 27) también se realizó una caracterización, pero ahora de ADE. Además, se muestran los desplazamientos de las curvas con respecto a la concentración de MET.

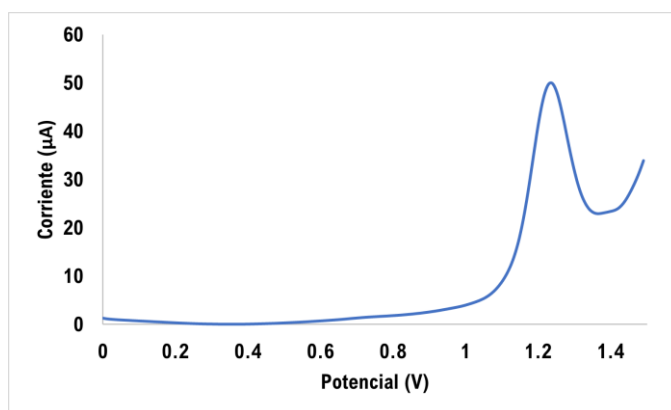


Figura 27. VDP de ADE a 13.5 µg/mL, en un medio con NaCl 0.1 M y aforada con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 2.

De la misma manera que en las partes anteriores, la Figura 27 ayudó de referencia para observar las interacciones que se tuvo con relación al aumento de las concentraciones de las soluciones de MET. El pico máximo de ADE se muestra en 1.239 V y a 49.957 µA aproximadamente.

De igual manera que para la metodología anterior se haría lectura de ADE y GUA juntas en el mismo sistema, con la finalidad de mostrar cuáles son sus picos característicos antes de interaccionar con cualquier producto oxidado de la MET. También, cabe recalcar, en este punto se realizó un ajuste de volumen por las mismas cuestiones que para el análisis de GUA.

Se observa que la ADE por si sola aparece en un potencial específico a una corriente anódica característica, pero conforme hay más especies químicas en el sistema, como la GUA, hay cambios en el sistema con respecto al inicial (Figura 28).

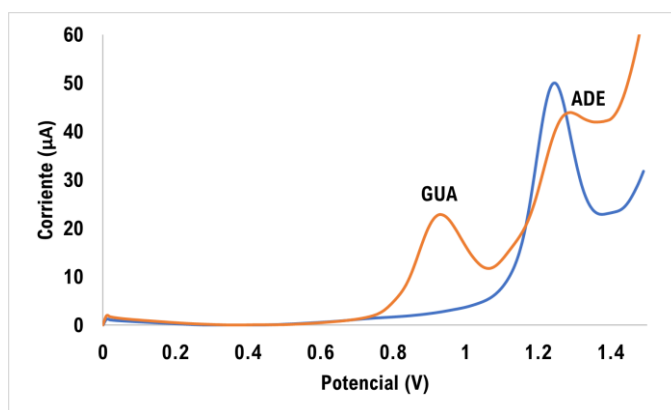


Figura 28. VDP de los efectos de ADE a 13.5 µg/mL y GUA a 10.1 µg/mL en un sistema ternario, con un medio con NaCl 0.1 M y aforada con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 2.

En presencia de solo ADE-GUA en el sistema, se observa que el pico anódico máximo de ADE fue desplazado a la derecha en el potencial (positivo), así como disminuyó en la altura del pico anódico. Este comportamiento se asocia con una posible interacción entre GUA y ADE a través de la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos funcionales NH (GUA) y N=C (ADE), y C=O (GUA) y NH₂ (ADE), además de que es asociado con el momento de oxidación inicial de ADE, por lo que la interacción no fue igual que la metodología anterior. Por otra parte, también se tienen residuos de ADE oxidados que también contribuyen en las interacciones.

La tendencia de a mayor concentración de MET hay una mayor interacción se sigue observando en esta parte del estudio (Figura 29) solamente que con algunas características adicionales.

En presencia de MET en el sistema, se observa que el pico anódico de ADE y GUA es desplazado tanto en el potencial como en la corriente de pico anódico.

En cuanto a ADE, conforme hay mayor concentración de MET surge un desplazamiento negativo en el potencial y una disminución en la corriente de pico anódica, la característica importante en esta parte del estudio fue que se encontró otra posible especie la cual fue asociada con ADE ya que es evidente la formación de un nuevo pico en el sistema (0.8 μA aprox.). Con base a las bibliografías, se podría estar hablando del posible avistamiento de la 2,8-oxoadenina ya que cumpliría con las características de potencial.

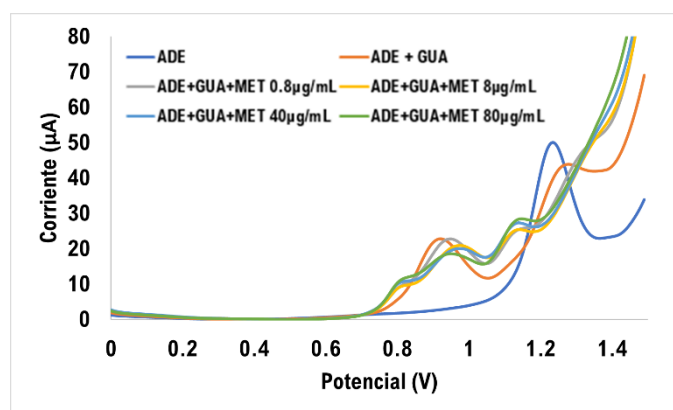


Figura 29. VDP de los efectos de ADE a 13.7 $\mu\text{g/mL}$; GUA a 10.1 $\mu\text{g/mL}$ y MET a 0.8, 8, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$ en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 2.

Respecto a la GUA, conforme hay mayor concentración de MET surge un desplazamiento positivo del potencial y una disminución en la corriente de pico anódica, con excepción de la lectura de la muestra ADE-GUA-MET 0.8 $\mu\text{g/mL}$, lo que se asocia con la posible interacción entre MET-GUA. Además, también se observó la aparición de una nueva especie química relacionada con la GUA y ADE puesto que, evidentemente, se observa un nuevo pico anódico junto al pico anódico de la GUA (1.15 μA aprox.). Estos comportamientos se asocian con

una posible interacción y formación de complejos entre ADE-GUA-MET a través de la formación de puentes de hidrogeno entre los grupos funcionales NH (GUA) y N=C (ADE), y C=O (GUA) y NH₂ (ADE). Además de que también la ADE está fungiendo como la especie más oxidada del sistema por lo que su desaparición en el VDP es coherente.

Con base a los potenciales (V) de GUA, cuando esta interaccionada con ADE en el mismo sistema aparece en 0.916 V, pero en presencia de 0.8 µg/mL de MET esta se desplaza a 0.947 V en el potencial resultando un cambio de 0.031 V, representando un 3.30% de variación, que en cambio cuando hay una concentración mayor (80 µg/mL) esta tiende a desplazarse más por el potencial dando un valor de 0.956 V obteniendo un cambio de 0.040 V, simbolizando el 4.40% de la variación. Estos valores son de gran utilidad ya que aportan datos para la evaluación del cambio en función de interactividad.

Respecto a ADE cuando se está sola en el sistema esta surge en 1.239 V mientras que cuando esta interaccionando con GUA aparece en un potencial de 1.279 V por lo que tiene un desplazamiento de 0.040 V, representando un 3.25% de la variación que se tiene. Para cuando hay concentraciones de MET no hay curvas características de ADE por lo que se sugiere que esta se encuentra interaccionada en su totalidad. Estos datos de gran importancia ya que nos evalúan el cambio que ha presentado la ADE en presencia de otras moléculas con actividad interactiva.

Conforme a estos resultados se obtuvieron sus porcentajes tanto de GUA sin interaccionar como del porcentaje del efecto que produce MET a GUA, respecto a sus corrientes. Además de que también se obtuvieron los resultados numéricos de ADE y sus porcentajes.

En la Figura 30, las barras azules muestran el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 29, esto indica de la misma forma una disminución, pero ahora de este modo numérico (µA o %).

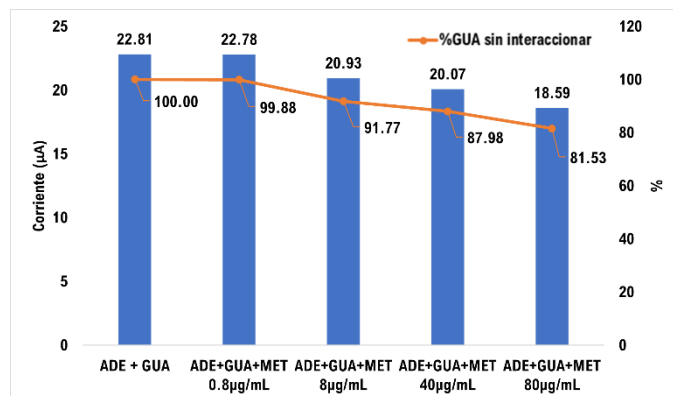


Figura 30. Altura de pico anódica y porcentaje de GUA sin interactuar en un sistema ternario en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 2.

Observamos que en la adición inicial de GUA aparece a 22.805 µA y conforme se hay presencia de MET comienza a disminuir esa altura de pico anódico dando valores como 22.778 µA para la primera concentración de MET (0.8 µg/mL), 20.930 µA para la segunda concentración de MET (8 µg/mL), 20.065 µA para la tercera concentración de MET (40 µg/mL) y 18.593 µA para la última concentración de MET (80 µg/mL).

Conforme a la línea naranja, representa el porcentaje de GUA que se encuentra sin el efecto de MET en el sistema, teniendo como el 100% a la GUA ya que esta fue la primera adición que se tuvo para el sistema.

Ahora bien, al ir aumentando la concentración de MET va disminuyendo este porcentaje. Para la primera concentración de MET (0.8 µg/mL) se observa que disminuyo a 99.88%, para la siguiente concentración de MET (8 µg/mL) llega al 91.77 % de GUA sin interactuar viendo así que no tiene un gran efecto de interacción de MET. Esto debido a que al oxidar en primera instancia a ADE se vuelve más electro-atractiva y competitiva con la GUA siendo más interactiva que esta y por ende menos activa. No fue sino hasta la tercera concentración de MET (40 µg/mL) que llego al 89.98%, valor el cual es referente para el estudio. Con esto se observó como la ADE tiene un mayor efecto de oxidación que la GUA, ya que necesita de concentraciones más elevadas de MET para obtener un cambio significativo.

Por otro lado, el efecto que produce la MET a la GUA también es representativo. En la Figura 31, las barras azules indican el valor de disminución del pico anódico máximo de la Figura 29, además los porcentajes de la línea naranja que se observan en esta ocasión son del efecto ejercido de la MET sobre la GUA.

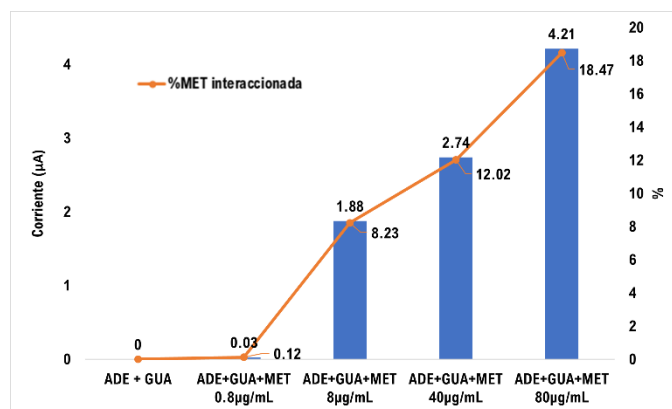


Figura 31. Valor de disminución de pico anódico máximo y porcentaje de los efectos de GUA a 10.1 µg/mL y MET a 0.8, 8, 40 y 80 µg/mL en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s. Metodología 2.

Como era visto al no estar en presencia de MET en el sistema este no puede interactuar y con ello no se evalúa algún efecto, es por esto por lo que la primera barra se encuentra en valor 0. Posterior, se visualiza que en la primera concentración de MET se tiene el 0.12% del efecto, siendo este un valor pequeño pero importante para la interacción entre la MET y GUA, puesto que, la ADE ejerce mayor efecto electro atractivo siendo oxidada primero. No fue sino hasta la concentración de 40 µg/mL que se tuvo un porcentaje más significativo ha tomado como una posible interacción, obteniendo un valor de 12.02% de interacción, siendo este el valor que confirma lo anterior respecto a la interacción entre la MET y GUA, ya que como se vio, se muestra un desplazamiento de corriente eléctrica en la Figura 29, además numéricamente en la Figura 30 muestra este cambio y por último porcentualmente cumple con la especificación del parámetro siendo este mayor al 10%. Conforme a la otra concentración se tiene un mayor porcentaje de efecto de MET sobre GUA, solo es preciso mencionar que la concentración más grande de MET sobrepasa el 15% del efecto ejercido por MET sobre GUA.

Los resultados en comparativa entre ambas metodologías para GUA son muy distintos. En la metodología 1 para la concentración mayor de MET se obtuvo un 25.38% del efecto mientras que en la metodología 2 se alcanzó el 18.47%, aun así, siendo apto para el estudio mediante sus especificaciones de interacción.

En la Figura 32, las barras azules, muestran el pico anódico máximo de cada curva presente en la Figura 29, pero ahora de forma numérica (μA). Observamos que el pico anódico máximo de ADE aparece a $49.957 \mu\text{A}$ y conforme se hay presencia de MET comienza a disminuir esa altura de pico anódico dando valores como $43.936 \mu\text{A}$ para la adición de GUA.

Lo que es importante resaltar en esta parte es la fuerza electro-atractiva que muestra la ADE con mayor orden de oxidación, puesto que al interactuar con MET esta desaparece su curva por completo dejando en 0 esa parte.

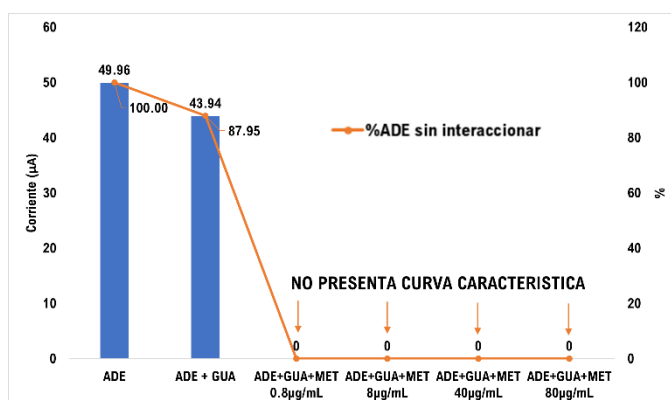


Figura 32. Altura de pico anódica y porcentaje de ADE a $13.5 \mu\text{g/mL}$ sin interaccionar en un sistema ternario en un medio con NaCl 0.1 M y aforada con solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5 , con una concentración de 0.1 M , en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V , con un pulso de potencial de 0.06 V , en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s . Metodología 2.

Respecto a la línea naranja, indica el porcentaje de ADE que se encuentra sin el efecto de MET en el sistema, tomado como el 100% al valor de pico anódico de ADE sola en el sistema. Al agregar GUA al sistema, la ADE interactúa con GUA transformando su pico anódico y cumpliendo con el parámetro del 10%. Pero, ahora bien, al agregar MET toda curva relacionada con ADE desaparece del sistema dejando nuevas curvas en el sistema que tienen cierta relación con la base púrica (ADE). Este fenómeno se asoció con la posible fuerza de

oxidación e interacción que tiene la ADE conforme a las demás moléculas químicas que hay en el sistema y también por su orden de oxidación en el sistema.

Por otra parte, el efecto de la MET fue del 100% sobre ADE ya que, al interaccionar con esta molécula, provoca un cambio en el sistema de gran escala. Estos resultados en relación con los resultados que se tuvieron para GUA indican que en realidad la ADE tiene un efecto electro atractivo más fuerte que la GUA y que la Metodología de inicio si importan gracias a la alta propiedad atractiva que tiene la ADE oxidada.

3.5. Relación Estequiométrica

Para un mejor analisis, se cuantifico cual es la relación estequimetrica que se presenta entre la MET vs GUA y entre la MET vs ADE.

Para GUA se muestra que tiene una relación 4:1 (Figura 33) con la MET, por lo que interaccionan 4 moléculas de MET con 1 molécula de GUA.

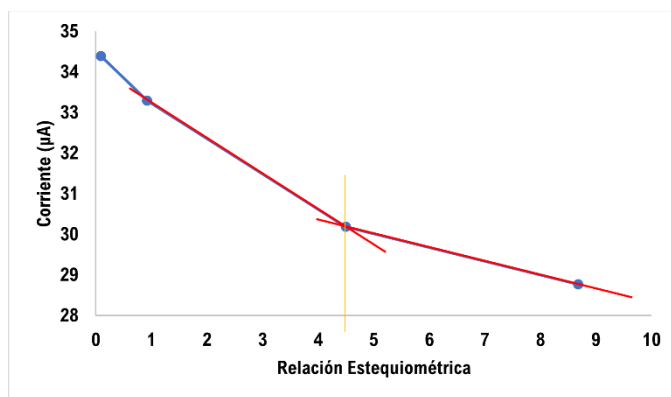


Figura 33. Relación estequiométrica de GUA-MET en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con una solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

Estas posibles interacciones se dan entre los grupos Amino de la MET y los grupos Carboxilo de la GUA oxidada.

Por otra parte, la ADE muestra que tiene una relación 3:1 (Figura 34) con la MET por lo que interaccionan 3 moléculas de MET con 1 molécula de ADE.

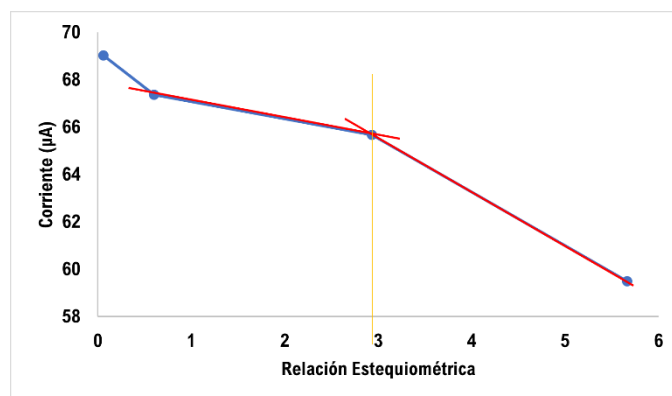


Figura 34. Relación estequiométrica de la ADE en un medio con NaCl 0.1 M y aforadas con una solución amortiguadora de acetatos a pH 4.5, con una concentración de 0.1 M, en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, con una ventana de potencial de 0 a 1.5 V, con un pulso de potencial de 0.06 V, en un tiempo de pulso de 75 ms y a una velocidad de barrido de 32 mV/s.

Estas posibles interacciones se dan entre los grupos Amino de la MET y los grupos Carboxilo de la ADE oxidada.

IV. Conclusión

Se ha logrado el objetivo de estudiar la interacción entre los productos de oxidación de la metformina con el ADN utilizando voltamperometría diferencial de pulso. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia sólida de la influencia de los productos de oxidación de la metformina en la respuesta electroquímica de las bases púricas del ADN. Estos hallazgos tienen implicaciones significativas en el ámbito de la farmacología, y sugieren la necesidad de futuras investigaciones para comprender la naturaleza y el alcance de esta interacción, lo que podría tener implicaciones importantes para la terapéutica de la diabetes y la farmacología en general.

V. Referencias

1. Balakrishnan, A., Sillanpää, M., Jacob, M. M., & Vo, D. V. N. (2022). Metformin as an emerging concern in wastewater: Occurrence, analysis and treatment methods. *Environmental Research*, 213, 113613. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113613>

2. Chiorcea-Paquim, A. (2022). 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC–ECD Determination. *Molecules*, 27(5), 1620. <https://doi.org/10.3390/molecules27051620>.
3. Chiorcea-Paquim, A.-M., Oliveira-Brett, A.M., 2021. DNA Electrochemical Biosensors for In Situ Probing of Pharmaceutical Drug Oxidative DNA Damage. *Sensors* 21, 1125.. <https://doi.org/10.3390/s21041125>
4. FID. (2019). *Atlas de la diabetes de la federación internacional de diabetes* (9.^a ed., Vol. 1).
5. *IDF Diabetes Atlas | Tenth Edition*. (s. f.). <https://diabetesatlas.org/>
6. INEGI. (2022, noviembre). *Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes* [Comunicado de prensa].
7. Kojdamanian V. (2022). *Guía NICE 2022: actualización en el manejo de la diabetes mellitus tipo 2 en personas adultas* (2.^a ed., Vol. 25). <https://doi.org/10.51987/EVIDENCIA.V25I3.7015>
8. Machini, W. B. S., Fernandes, I. P. G., & Oliveira-Brett, A. M. (2019). Antidiabetic Drug Metformin Oxidation and *in situ* Interaction with dsDNA Using a dsDNA-electrochemical Biosensor. *Electroanalysis*, 31(10), 1977-1987. <https://doi.org/10.1002/elan.201900162>
9. Oliveira-Brett, A. M., Diculescu, V. C., & Piedade, J. (2002). Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochemistry*, 55(1-2), 61-62. [https://doi.org/10.1016/s1567-5394\(01\)00147-5](https://doi.org/10.1016/s1567-5394(01)00147-5)
10. Papavasileiou, A. V., Trachioti, M. G., Hrbáč, J., & Prodromidis, M. I. (2022). Simultaneous determination of guanine and adenine in human saliva with graphite sparked screen-printed electrodes. *Talanta*, 239, 123119. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123119>
11. Trautwein, C., & Kümmerer, K. (2011). Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere*, 85(5), 765-773. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.057>.