



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Química

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR
PARA LIBERACIÓN PROLONGADA DE
IVERMECTINA.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
HÉCTOR MANUEL TAFOYA OLIVOS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Norma Trinidad González Monzón

VOCAL: Carolina Muñoz Padilla

SECRETARIO: Jesús Gracia Mora

1er. SUPLENTE: María Kenia Zamora Rosete

2° SUPLENTE: Juan Carlos García Ramos

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 100 del Departamento de Química Inorgánica, Unidad de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria.

ASESOR

SUSTENTANTE

Dr. Jesús Gracia Mora

Héctor Manuel Tafoya Olivos

Dedicada a mis papás: Rubén y Guille y a mis hermanos: Omar y Jeanine...

...ellos que son el motor de mi vida.

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”.
Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios

Por darme la voluntad y la vida para seguir siempre adelante y permitirme llegar a este momento.

Gracias a mis padres: Rubén y Guillermina

Por su cariño, apoyo, comprensión, incondicionales y sus consejos. Muchas gracias porque nunca han dudado en darme todo para que no me falte nada.

Gracias a mis hermanos: Omar y Jeanine.

A mi hermano por su apoyo, sus acertados consejos y su amistad.
A mi hermanita por compartir conmigo su inagotable alegría y su cariño.

Gracias a mi asesor: “el Doc.” Jesús Gracia Mora.

Por abrirme las puertas de su laboratorio, por iniciarme en el interesante mundo de los MIPs, por su guía, sus consejos, su paciencia, y su apoyo durante la tesis, además porque literalmente rescató todo mi trabajo (de un colapso informático ¡muchísimas gracias Doc!), por su confianza y sobre todo por su amistad.

Gracias a “la Doc. Fina” Josefina Bernard Bernard.

Por contactarme con “el Doc.”, por recibirme en su laboratorio y prestarme su equipo cada vez que lo necesitaba, por sus acertados comentarios para los cálculos y al igual que el Doc, por brindarme su amistad.

A mis profesores.

Por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, ser la base de mi formación personal y profesional.

A mis amigos.

Porque regalarme recuerdos y vivencias tan agradables, que han crecido conmigo y me han ayudado a ser mejor persona cada día.

SIGLAS.

AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrilo.

DLS: *Dynamic Light Scattering*, Difusión Dinámica de Luz.

EGDMA: Dimetacrilato de Etilen Glicol.

EPA: *Environmental Protection Agency*. Agencia de Protección Ambiental.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas.

FTIR: Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier

GABA: Ácido Gama-Aminobutírico.

HEMA: 2-hidroximetimetacrilato

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

IR: Infrarrojo.

MIP: *Molecular Imprinted Polymer*, Polímero de Impresión Molecular.

MIP 1:1:20, MIP 1:1: MIP que indica que el polímero se sintetizó utilizando un equivalente del templado, uno de MMA y veinte de PETA, respectivamente a 65°C.

MIP-UV 1:1:20, MIP-UV 1:1: MIP con las mismas proporciones molares del anterior y la terminación –UV indica que la polimerización se inició con luz ultravioleta, a 4°C.

MIP 1:4:20, MIP 1:4: MIP donde 1 corresponde a la proporción molar de ivermectina, 4 la proporción molar de MMA y 20 la proporción molar de PETA, sintetizado a 65°C.

MMA: Ácido Metacrílico.

NIP: *No Imprinted Polymer*, Polímero no Impreso.

PETA: Triacrilato de Petraeritrol.

PIM: Proceso de Impresión Molecular.

PLA: Ácido Poliláctico.

PLGA: Ácido Poliláctico-Glicólico.

SLM: Sistema de Liberación Modificada.

ÍNDICE

1.RESUMEN.....	1
2.INTRODUCCIÓN.....	3
3.ANTECEDENTES.....	5
3.1. LA GARRAPATA.....	5
3.1.1. Resistencia de la Garrapata.....	7
3.1.2. Control de la Garrapata.....	7
3.1.2.1. Control Químico:.....	7
<u>3.1.2.1.1. Ivermectina.....</u>	<u>9</u>
3.1.2.2. Control Genético y Natural.....	10
3.1.2.3. Control Biológico.....	10
3.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA (SLM).....	11
3.2.1. Modelos para el Estudio de Liberación <i>In vitro</i>.....	13
3.2.1.1. Modelo de Noyes y Whitney.....	15
3.2.1.2. Modelo de Korsmeyer-Peppas.....	16
3.2.1.3. Modelo de Peppas-Sahlin.....	17
3.2.1.4. Modelo de Peppas-Fassihi.....	18
3.2.2. SLM de Uso Veterinario.....	19
3.2.2.1. SLM Poliméricos de Uso Veterinario.....	20
3.3. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIP).....	22
3.3.1. Proceso de Impresión Molecular (PIM).....	23
3.3.2. Aplicaciones de los Polímeros de Impresión Molecular.....	27
3.3.2.1. MIPs en SLM.....	27
3.3.3. Caracterización de los Sitios de Reconocimiento de los MIPs.....	30
3.3.3.1. Modelos de Adsorción.....	33
<u>3.3.3.1.1. Isoterma de Langmuir.....</u>	<u>34</u>
<u>3.3.3.1.3. Isoterma de Jovanovic.....</u>	<u>35</u>
<u>3.3.3.1.4. Modelo de Langmuir-Freundlich.....</u>	<u>36</u>
<u>3.3.3.1.5. Modelo de Jovanovic-Freundlich.....</u>	<u>36</u>
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	38
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	38

6. EXPERIMENTAL.....	39
6.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	39
6.2. METODOLOGÍA.....	40
6.2.1. Síntesis de Polímeros de Impresión.....	40
6.2.1.1. MIP 1:4:20.....	40
6.2.1.2. MIP 1:1:20.....	40
6.2.1.3. MIP-UV 1:1:20.....	40
6.2.2. Remoción de Ivermectina de los Polímeros.....	42
6.2.3. Distribución del Tamaño de Partícula de los Polímeros.....	42
6.2.4. Caracterización de los Sitios de Reconocimiento.....	42
6.2.4.1. Espectroscopia de Infrarrojo (IR).....	42
6.2.4.2. Isotermas de Adsorción.....	43
6.2.5. Estudios de Liberación <i>in vitro</i>.....	43
6.2.5.1. Cargado de Ivermectina en el Polímero.....	43
6.2.5.2. Cinéticas Liberación de Ivermectina.....	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS IMPRESOS Y NO IMPRESOS DE IVERMECTINA.....	45
7.1.1. Remoción de Ivermectina.....	47
7.1.2. Distribución del Tamaño de Partícula.....	49
7.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO.....	50
7.2.1. Espectroscopia de IR.....	50
7.2.2. Isotermas de Adsorción.....	55
7.2.2.1. Selección del Modelo de Isotherma de Adsorción.....	55
7.2.2.2. Análisis de Isotherma de Freundlich.....	59
7.2.2.3. Análisis de Isotherma de Langmuir-Freundlich.....	62
7.3. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN.....	68
7.3.1. Cargado de Polímero.....	69
7.3.2. Cinéticas de Liberación.....	69
7.3.2.1. Selección de Modelo de Cinética de Liberación.....	72
7.3.2.2. Análisis de Cinética de Liberación.....	74
8. CONCLUSIONES.....	76
9. PERSPECTIVAS.....	78
10. BIBLIGRAFÍA.....	79

1. RESUMEN.

La infestación por garrapatas es uno de los principales problemas que afectan al ganado bovino en regiones tropicales y subtropicales, donde las garrapatas, así como los agentes que transmiten, afectan la economía del sector ganadero siendo una de las mayores dificultades; la resistencia que presentan las garrapatas frente a la variedad de ixodíidas utilizados en los tratamientos comunes.

Ante el inconveniente que involucra el diseño de nuevos fármacos debido a sus altos requerimientos de tiempo y dinero, se ha presentado en años recientes como alternativa, el desarrollo de formas farmacéuticas “inteligentes” que controlen la liberación de su activo para mejorar la eficiencia del mismo, con el objetivo de darle un valor agregado a los fármacos ya existentes, es una alternativa que pretende mejorar la relación costo-beneficio en el desarrollo de medicamentos.

La tecnología de impresión molecular ha demostrado gran potencial para el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos y aunque su aplicación en este campo es reciente, está llamando la atención de muchos grupos de investigadores.

Como respuesta ante la problemática de desarrollar nuevos medicamentos para el tratamiento contra la garrapata, en este ensayo se propone utilizar la tecnología de impresión molecular para el desarrollo de un sistema de liberación controlada de ivermectina que satisfaga las necesidades del sector ganadero en este ámbito.

Así es que para el desarrollo de este trabajo se sintetizaron tres variedades de polímeros de impresión; MIP 1:4:20, MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20, para la liberación prolongada de ivermectina, utilizando la técnica de impresión molecular por el método de bloque. Se obtuvieron estos polímeros utilizando triacrilato de petraeritrol (PETA) como agente entrecruzador, ivermectina como templado y diferentes proporciones molares de ácido metacrílico (MMA) que es el monómero funcional.

Una vez que se obtuvieron los polímeros se retiró la ivermectina, que fungió como templado, mediante agitación con etanol y recirculación del mismo disolvente mediante el

sistema soxhlet. La eliminación del templado fue seguida mediante espectroscopia de UV-Visible.

Se examinaron diferentes variedades de polímeros analizando distribución del tamaño de partícula. Para evaluar el efecto de la cantidad de MMA y la temperatura de síntesis en el proceso de impresión; se analizaron los espectros infrarrojos de los diferentes polímeros y se llevaron a cabo estudios de adsorción de ivermectina a los cuales se les aplicaron modelos de isothermas que permitieron valorar la capacidad de reconocimiento molecular de los polímeros hacia su horma. Se encontró que las diferencias en la capacidad de reconocimiento son causadas principalmente por la cantidad de MMA mientras que las variaciones en la temperatura durante la síntesis no afectan en forma significativa la habilidad de reconocimiento de los polímeros molecularmente impresos.

Finalmente se determinó el mecanismo de liberación de ivermectina *in vitro* aplicando el modelo cinético de Peppas-Sahlin, a los perfiles de liberación obtenidos, donde resultó que en el polímero MIP 1:4:20 gobierna la capacidad de reconocimiento y no desarrolló un perfil de liberación deseado y que el polímero MIP-UV 1:1:20 es capaz de prolongar la liberación por más tiempo que el MIP 1:1:20. Además se concluyó que ambos polímeros (MIP-UV 1:1:20 y MIP 1:1:20) son candidatos potenciales para el desarrollo de un SLM de liberación prolongada de ivermectina.

2. INTRODUCCIÓN.

Las garrapatas figuran como uno de los ectoparásitos de mayor importancia en la economía mundial, esto debido a las pérdidas que ocasiona en la producción y desarrollo del ganado bovino, caprino, lanar y equino. Provocando graves alteraciones en el ganado, disminuyendo su productividad y la calidad de sus productos afectando de manera importante la economía ganadera¹.

Además de los daños a la piel, las garrapatas pueden transmitir otras enfermedades asociadas como babesiosis o anaplasmosis. Ha sido estimado, que el costo global y enfermedades relacionadas a infecciones con garrapatas se encuentra entre 13.9 y 18.7 billones de dólares anuales².

La detección de cepas de garrapatas resistentes a los acaricidas comercializados para su control es uno de los principales problemas sobre todo en países con ambientes propicios para el desarrollo del parásito ya que requieren tratamientos bien controlados y prolongados para que su control sea efectivo. Los tratamientos prolongados y en ocasiones mal controlados son los principales factores para el desarrollo de resistencia por parte del parásito. La resistencia incrementa gravemente el riesgo de difusión del parásito en zonas controladas y además complica su control y erradicación en zonas que aún se encuentran infestadas.

La relación entre el descubrimiento de nuevas moléculas insecticidas y la aparición de especies resistentes a estas nuevas moléculas, se caracteriza por que la resistencia se presenta cada vez en periodos más cortos al paso de los años, además considerando que el desarrollo de nuevos fármacos involucra costos de tiempo y dinero muy altos, el diseño de medicamentos que permitan una liberación prolongada del principio activo ofrecen una alternativa interesante al darle un valor agregado a las moléculas activas ya existentes, lo que disminuye los costos de manera importante y permite reducir efectos de toxicidad y resistencia.

La impresión molecular es una técnica que consiste en la síntesis de un polímero que contiene una molécula llamada: *molécula horma*, que tiene la capacidad de reconocimiento molecular. Este tipo de materiales se ha aplicado a diferentes áreas como la cromatografía como fases estacionarias, como anticuerpos artificiales, como

catalizadores y una de sus más recientes y atractivas aplicaciones se ha presentado en el área farmacéutica como sistemas de liberación prolongada de fármacos, permitiendo modificar el perfil de liberación del principio activo en función de la composición de la matriz polimérica³.

Así que en el desarrollo de este trabajo, se propone utilizar la técnica de impresión molecular, para obtener polímeros impresos o estampados, que contengan ixodicidas (también llamados acaricidas) que permita proponer un sistema de liberación prolongada, capaz de aplicarse de manera efectiva en el tratamiento contra las garrapatas que infestan el ganado bovino.

3. ANTECEDENTES.

3.1. LA GARRAPATA.

A nivel mundial, las garrapatas representan uno de los ectoparásitos de gran impacto económico, debido a las pérdidas que provoca a la industria ganadera, ya que al momento de alimentarse, la garrapata lesiona la piel de su anfitrión disminuyendo así la calidad de la piel; y al chupar su sangre, los animales infestados presentan disminución de peso y/o anemia disminuyendo la producción de carne y leche provocando incluso la muerte de los animales. Adicionalmente, las heridas causadas en la piel, pueden atraer moscas causantes de la miasis⁴.

Además, las garrapatas pueden transmitir enfermedades asociadas como son; babesiosis (causada por los protozoarios *Babesia bigemina* y *Babesia Boris*) o anaplasmosis (causada por el protozoario *Anaplasma marginale*). Éstos agentes se ubican en el interior del glóbulo rojo y al destruirlo, originan la anemia⁵.

La infección por garrapatas se originó en Asia, donde se desarrolló en el ganado cebuino (*Bos indicus*)⁶, debido a que evolucionaron de manera conjunta los bovinos índicos desarrollaron cierto grado de resistencia, por lo que la infección es más abundante en bovinos de especies europeas (*Bos taurus*), que resultan más susceptibles.

La garrapata está distribuida por todo el mundo, puede ser encontrada en regiones tropicales y subtropicales, dentro de las que se encuentran muchos países de Centro y Sudamérica incluyendo a México⁷.

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) menciona que las pérdidas económicas atribuidas a *B. microplus* (figura 1) por disminución en la ganancia de peso se ha estimado en 7.3 US dólares/animal/año y se estima que en México las garrapatas y enfermedades que transmiten producen pérdidas a la ganadería bovina de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales⁸.



Figura 1. Garrapata *Rhipicephalus (Boophilus), microplus* (tomada de: <http://www.inta.gov.ar>)

El ciclo de vida se presenta en cuatro fases; huevo, larva, ninfa y adulto; como se muestra en la Figura 2. Inicia con el desprendimiento de la hembra fecundada y repleta de sangre se cae del animal huésped y deposita en lugares protegidos en el suelo entre 2,000 y 3,000 huevecillos. La hembra muere después de la ovoposición. Mientras que los machos no se repletan, sino que siguen comiendo y apareándose en forma sucesiva hasta su muerte⁹.

Cuando nacen las larvas colonizan al animal huésped preferentemente en el lomo donde se alimentan por 4 ó 5 días, la larva repleta de sangre se deja caer, muda a ninfa. Las ninfas colonizan a un segundo huésped, se alimentan de 10 a 15 días y luego vuelven a abandonarlo para transformarse en machos y hembras adultas. Después busca otro huésped para cumplir con la última fase de su vida.

Las dos especies del género *Boophilus spp*, reportadas en México. (*B. annulatus* y *B. microplus*), son garrapatas de un huésped, dura generalmente tres semanas, incluyendo sus dos mudas (de larva a ninfa, de ninfa a adulta), realiza todas sus mudas en el mismo animal¹⁰.

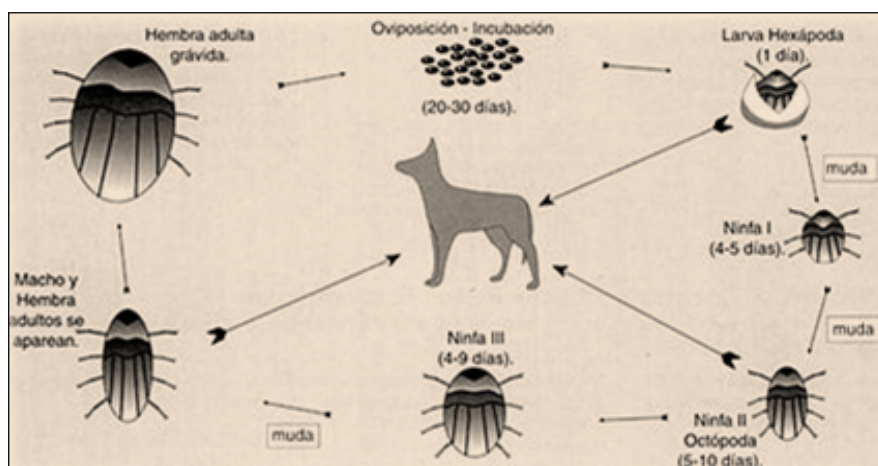


Figura 2. Ciclo Biológico de la Garrapata. (tomado de: http://www.basf.cl/agro/programas/cont_gar.html)¹¹

3.1.1. Resistencia de la Garrapata.

El control de la garrapata a través del uso de sustancias químicas, ha sido la principal herramienta en el tratamiento contra este parásito. Se han empleado productos pertenecientes a diversas familias químicas, como son compuestos arsenicales, clorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides. Sin embargo, el uso frecuente de estos productos genera una selección genética en las garrapatas, dando como resultado cepas de garrapatas resistentes.

Existe un patrón de desarrollo exponencial entre el descubrimiento de nuevos insecticidas y el desarrollo de especies resistentes a estos nuevos productos, que se caracteriza por ocurrir a través de los años en un período de tiempo cada vez menor. Éste fenómeno conlleva a la búsqueda de estudios epidemiológicos sobre el fenómeno de resistencia de la garrapata, además de crear la necesidad de encontrar otras alternativas que permitan su control¹².

El desarrollo de nuevos acaricidas implica gastos económicos importantes y estudios cada vez más complejos, lo que indica que es necesario alargar al máximo la vida útil de los acaricidas desarrollados, es por esta razón que son importantes estudios que permitan la aplicación de productos efectivos y con las concentraciones adecuadas de modo que se retrase la aparición de resistencia.

3.1.2. Control de la Garrapata.

Las razones principales del control de la garrapata, son para proteger el ganado y a su vez las pérdidas de producción, por lesiones e infecciones. Tiene como objetivo evitar la propagación de los parásitos hacia aquellas zonas no afectadas o controladas. De acuerdo a su naturaleza, están clasificados como químicos, biológicos, genéticos y naturales¹.

3.1.2.1. Control Químico:

Hasta el momento el uso de sustancias acaricidas es el método más difundido en el mundo, el control químico está dirigido a las etapas de vida libre del parásito para evitar reinfecciones por las larvas que se encuentran en las pasturas.

En México, actualmente se utilizan 6 grupos químicos para el control de la garrapata, que se dividen en: Organofosforados, Piretroides, Amidinas, Endectocidas, Fenilpirazolonas, e

Antecedentes

inhibidores de desarrollo, además de las mezclas cuyo uso debe ser cuidadoso, ya que aumentan el riesgo de incrementar la velocidad del efecto de resistencia⁸. En la tabla siguiente se ilustran algunos de los productos autorizados para el control de la garrapata en México.

Tabla 1. Productos autorizados para el control de la garrapata en México.

FAMILIA	PRINCIPIO ACTIVO	PRODUCTO COMERCIAL	LABORATORIO	FORMA DE APLICACIÓN.
Amidinas	Amitraz	Bombard	Fort Dodge	Aspersión/Inmersión
		Gamitraz	Pfizer	
Endectocidas	Ivermectina	Baymec prolong	Bayer	Inyectable
		Coopermec	Schering-Plough	
	Moxidectina	Cyductin NF	Fort Dodge	
	Doramectina	Dectomax	Pfizer	
Fenilpirazolonas	Fipronil	Ectoline Pour On	Merial	Epicutánea
Organofosforados	Coumafos	Co-Ral Flotable	Bayer	Aspersión/Inmersión
	Clorpirifos	Dursban 24E	Elanco	
	Clorfenvinfos	Supona CE	Fort Dodge	
Piretroides	Cipermetrina	Barricade CE	Fort Dodge	Aspersión/Inmersión
	Zeta Cipermetrina	Elantik 62.5	Elanco	
	Flumetrina	Bayticol P.O.	Bayer	Epicutánea
	Lamdacyalotrina	Ectiban L Pour On	Schering-Plough	
	Deltametrina	Batestop	Intervet	
	Alfa Cipermetrina	Ultimate Pour On	Pfizer	
Inhibidores del desarrollo	Fluazurón	Acatlak	Novartis	Epicutánea
Mezclas	Flumetrina +Cyflutrina	Bayticol Plus P.O.	Bayer	Epicutánea
	Cymiazol +Cipermetrina	Ectogan	Novartis	Aspersión/Inmersión
	Permetrina +Clorpirifos	Garra ban Mo 29	Lapisa	
	Clorfenvinfos +Cipermetrina	Supocade CE	Fort Dodge	
*Vacuna	Antígeno recombinante Bm86 de <i>Boophilus microplus</i>	Gavac	Revetmex	Inyectable

*El tema de las vacunas se tratará en el punto 3.1.2.3 control biológico

Las *Endectocidas*, son lactonas macrocíclicas que incrementan la producción de ácido gama-aminobutírico (GABA) en el sistema nervioso de los insectos, presentan dos grupos

importantes: las avermectinas que incluyen la avermectina, ivermectina, doramectina y eprinomectina; y las milbemicinas que incluye a la moxidectina. Las *Fenilpirazolonas* se relacionan con las avermectinas por el modo de acción pues bloquea el paso de iones cloro a través del receptor GABA⁸.

3.1.2.1.1. Ivermectina.

La Ivermectina (5-O-dimetil-22-23-dihidroavermectina A_{1a}) es un antiparasitario de amplio espectro, el cual se utiliza tradicionalmente contra gusanos pero recientemente ha demostrado eficacia contra ácaros. Grandes cantidades son donadas por Merck para combatir la ceguera de río (oncocercosis) en países de bajos recursos. Usada en medicina veterinaria a veces mezclada con otros fármacos para cubrir un amplio espectro de parásitos. Contiene al menos 80% de 22,23-dihidroavermectina B_{1a} y 20% de 22,23-dihidroavermectina B_{1b}.

IVERMECTINA

Peso molecular: 875.1g/mol

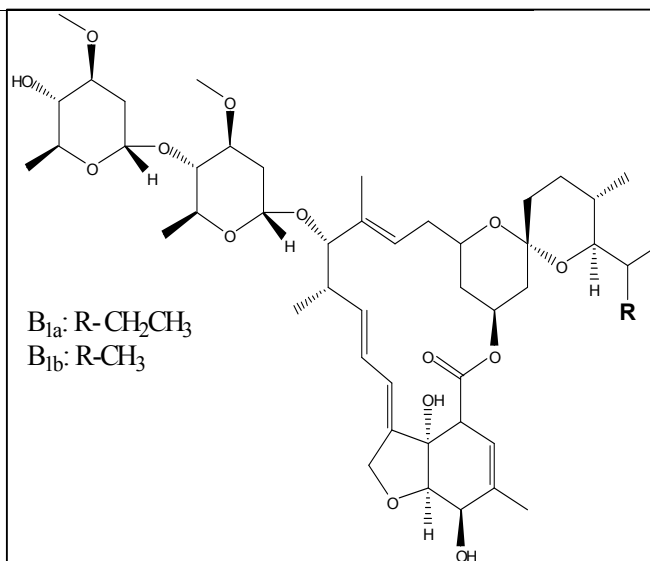
Aspecto: cristales incoloros

Fórmula Molecular:

C₄₈H₇₄O₁₄ (B_{1a}) , C₄₇H₇₂O₁₄ (B_{1b})

Solubilidad en Agua: 4mg/L

Punto de Fusión: 155°C



Se emplea en diversas formulaciones y modos de administración. En inyecciones subcutáneas con dosis de 0.2mg/Kg, la persistencia de la ivermectina en plasma animal presenta una vida media de tres días. La dosis es mayor en formulaciones pur-on no acuosa, 0.5mg/Kg. La administración en formulación acuosa en bolo intestinal que libera más de cuatro meses es de 12.7 mg/día¹.

3.1.2.2. Control Genético y Natural.

Como se mencionó anteriormente, las razas europeas de bovinos son más susceptibles a la infestación por garrapatas que los bovinos de razas índicas, por lo que las cruces entre ellos resultan en biotipos menos propensos a la infección en relación a los bovinos europeos. Sin embargo, en aquellas áreas muy favorables para el desarrollo de la garrapata no es posible obtener una ganadería competitiva sin la implementación de métodos de control del parásito⁴.

La alteración del medio ambiente mediante la eliminación de ciertos tipos de vegetación ha sido utilizada en el control de la garrapata, al igual que la rotación de pasturas y pastizales que ha sido utilizado en el control de *B. microplus*¹³. Otra de las alternativas que ha utilizado el ganadero, es la introducción de depredadores naturales de la garrapata, como algunas especies de hormigas que han demostrado poseer cierto grado de eficacia para el control de las garrapatas^{8, 13}.

3.1.2.3. Control Biológico.

La disponibilidad de productos químicos para el control de garrapatas es cada vez menor debido a los altos costos de desarrollo y los problemas de resistencia que involucra, lo que hace necesario el correcto uso de los acaricidas disponibles para prolongar su vida útil. Ante tal situación y sumado al impacto ambiental que implica la eliminación de estos productos al medio, resulta necesario el desarrollo de nuevos métodos de control, destacándose el empleo de vacunas recombinantes contra las garrapatas.

Como se puede observar en la parte final de la tabla 1 que contiene los productos autorizados para el control de la garrapata en México, se encuentra disponible la vacuna Gavac® (Revetmex) que contiene el antígeno Bm86 que es producido artificialmente (antígeno recombinante rBm86) y se aplica de forma inyectable⁸. La vacuna ha mostrado una efectividad que oscila entre 50 y 82% permitiendo una disminución de la población de *B. microplus*, por lo que este medio de control debe tenerse presente como un elemento coadyuvante, su utilización plantea la disminución del uso de tratamientos garrapaticidas con compuestos químicos, mas no su eliminación.

3.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA (SLM).

Un sistema de liberación modificada (SLM) es una formulación o dispositivo diseñado para modificar el sitio o la velocidad de liberación de un fármaco. Los SLM permiten que los medicamentos con una duración de acción corta puedan ser administrados con menor frecuencia. Está generalmente aceptado que, para la mayoría de los pacientes, reducir el número de dosificaciones mejora la adherencia al tratamiento. Sin embargo, esta posología puede tener algunos inconvenientes como: sobredosificación; en donde los pacientes pueden olvidar que han tomado su dosis y repetirla a lo largo del día. Infra dosificación: la pérdida de dosis es particularmente problemática en preparados de administración única semanal o diaria, porque se pueden producir niveles plasmáticos subterapéuticos de forma prolongada.

Los SLM son capaces de disminuir las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas, con la reducción de picos plasmáticos elevados puede minimizar los efectos adversos, especialmente en medicamentos de absorción rápida y a su vez con la reducción de los valles, también evitarían los niveles plasmáticos subterapéuticos al final del intervalo posológico con la consiguiente pérdida de eficacia.

De igual manera con los SLM se puede controlar el sitio de liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal. Este es el caso de las formas con cubierta entérica liberan el fármaco directamente en el intestino delgado, esto permite proteger al fármaco de la degradación por el ácido gástrico¹⁴.

De acuerdo a su liberación, los SLM pueden mantener niveles plasmáticos de un fármaco de manera constante. La figura 3 ilustra la concentración plasmática que se obtiene tras diferentes formas de dosificación, así puede verse que la infusión venosa es la forma de administración que mantiene niveles plasmáticos constantes durante el todo el tiempo de tratamiento, pero requiere condiciones de hospitalización que complica la administración y la limita a ciertos fármacos y condiciones especiales.

Puede observarse que con una dosis única el efecto del fármaco pasa rápidamente y si se aplica una dosis doble se corre el riesgo de llegar a condiciones tóxicas que agravan los efectos secundarios que pueda ocasionar el fármaco. Se ha practicado también la aplicación de multidosis con las cuales se logra mantener niveles plasmáticos constantes,

pero este tipo de aplicación resulta engorroso por que necesita de varias administraciones en corto tiempo lo que resulta incomodo para el paciente y después de cierto tiempo se corre el riesgo de llegar a concentraciones tóxicas. Finalmente se tienen las formas farmacéuticas capaces de mantener liberaciones sostenidas o prolongadas, estos tipos de liberación mantienen los niveles plasmáticos constantes dentro de la ventana terapéutica por largo tiempo, e incluso las formas farmacéuticas de liberación prolongada pueden alcanzar una cinética que asemeja la cinética de la administración por infusión venosa, con la ventaja de que las formas farmacéuticas no requieren condiciones de hospitalización.

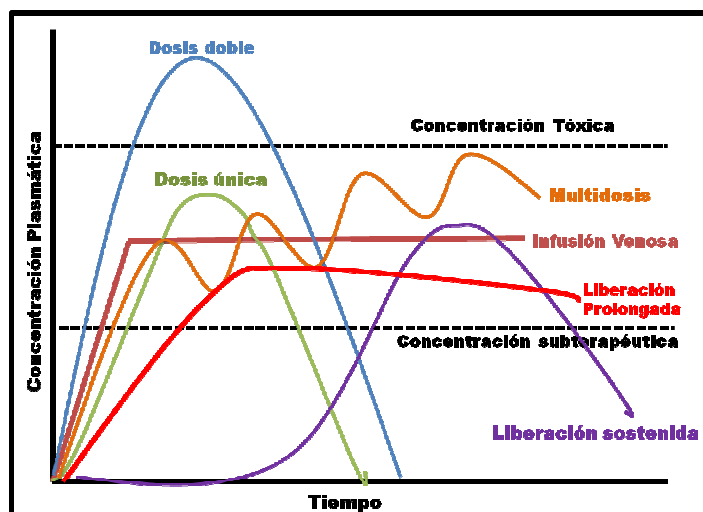


Figura 3. Concentraciones plasmáticas en el tiempo debidas a diferentes formas de administración y formas farmacéuticas de liberación modificada.

Desde el punto de vista tecnológico los SLM están constituidos por una plataforma o soporte que contiene el o los principios activos que modula la velocidad o sitio de liberación. Dicha plataforma puede tomar diversas formas y tamaños. De acuerdo a la forma de liberación, pueden clasificarse como se indica en la tabla 2:

Tabla 2. Clasificación de SLM de acuerdo a su tipo de liberación.

TIPO DE LIBERACIÓN ¹⁴
<p>Liberación Retardada: El principio activo es liberado en un momento distinto al de la administración, pero no se prolonga el efecto terapéutico (no hay cambios en ningún otro parámetro terapéutico). Son formas con cubierta entérica, en las que el principio activo es liberado en una zona concreta del intestino delgado.</p>

Liberación Prolongada: Es aquella que reduce por lo menos a la mitad la frecuencia de administración, en comparación con una forma farmacéutica convencional (liberación inmediata o retardada). Dentro de los sistemas de liberación prolongada se pueden clasificar:

- *Liberación sostenida:* Están diseñadas para liberar con rapidez una fracción predeterminada del fármaco para obtener la respuesta terapéutica normal y, a partir de ese momento, continuar con la liberación para mantener la acción por un periodo de tiempo prolongado. El objetivo de este mecanismo es reducir la frecuencia de administración del medicamento.
- *Liberación Controlada:* Considera no solo el liberar al fármaco en forma lenta, también denota la posibilidad de predicción y mayor reproducibilidad de la cinética de liberación en un periodo específico, de tal manera que se obtengan niveles plasmáticos uniformes, con la clara ventaja de reducir las dosis para lograr el efecto terapéutico esperado, y con ello minimizar los efectos secundarios.

Liberación Programada: Mientras que los productos de liberación sostenida o controlada están diseñados por mecanismos que responden ante estímulos del medio ambiente al que se exponen (pH, motilidad intestinal, etc.), la velocidad de liberación del fármaco en forma programada está determinada por el mismo sistema, independientemente del medio que lo rodea. Pueden emplearse para alcanzar efectos locales o sistémicos, lo que permite su administración por diferentes vías. Estos sistemas se clasifican en tres categorías:

- *Pasivos pre-programados:* Tienen un elemento como una membrana o matriz, que programa el modelo de liberación para obtener esencialmente una cinética de orden cero, independientemente de los procesos físicos, químicos o biológicos que ocurren una vez administrado.
- *Activos con control externo:* Poseen un elemento de control y otro que es capaz de recibir una señal externa al organismo (electromagnética), para controlar y modular la liberación del fármaco a partir del sistema.
- *Activos auto – programados:* Son sistemas terapéuticos que contienen un elemento sensor que responde a estímulos del medio ambiente biológico (por ejemplo incremento de glucosa en sangre, en pacientes diabéticos), para modular la liberación del fármaco.

3.2.1. Modelos para el Estudio de Liberación *In vitro*.

La disolución de fármacos *in vitro* ha sido un elemento muy importante en el desarrollo de medicamentos, incluso ha sido usada para validar estudios de bioequivalencia.

La liberación del fármaco desde una matriz polimérica, como es el caso de los polímeros de impresión; puede verse afectada por diferentes factores como son; la cantidad de fármaco que contiene la matriz, las características de disolución del fármaco, las interacciones entre la matriz y el medio de disolución que pueden provocar hinchamiento

o erosión del polímero, el tipo y geometría de la forma farmacéutica, entre otros^{15,16}. En general, se han clasificado cuatro mecanismos principales de liberación de un fármaco a partir de un SLM: difusión, degradación, hinchamiento seguido de difusión, y eflujo activo. Cualquiera de ellos e incluso todos los mecanismos se pueden presentar en un SLM¹⁷.

Existen diversos modelos cinéticos que proporcionan parámetros que permiten describir los perfiles de liberación de formas farmacéuticas convencionales y de liberación modificada, de acuerdo al mecanismo de liberación.

Cuando el mecanismo de liberación es por degradación, generalmente los materiales del sistema se degradan en el cuerpo como resultado de un proceso metabólico, y eliminan la necesidad de remover el SLM después de que el fármaco ha ejercido su efecto terapéutico¹⁷. Para describir la liberación por degradación, se deben tomar en cuenta, la degradación superficial que tiene lugar en las capas más externas y la degradación en masa que se presenta en las capas internas de la matriz cuando el medio de disolución penetra en el sistema. Dependiendo de la composición del SLM, diversos factores pueden afectar el perfil de liberación; algunos de ellos son: velocidad de degradación de la matriz, penetración del medio en el sistema, disolución del fármaco, aumento de la porosidad en la matriz, variaciones debidas a los productos de degradación, efectos osmóticos, hinchamiento del polímero. Esta serie de factores hacen que el desarrollo de modelos de liberación de este tipo de sistemas sea muy complejo. Sin embargo, se han desarrollado modelos que consideran transporte de masa e incluso reacciones químicas, como los propuestos por Siepmann y Gopferich en 2001 y Arifin, *et al* en 2006¹⁸.

Cuando el mecanismo de liberación se presenta por difusión, se considera que la superficie de la matriz permanece constante y que el fármaco comienza a disolverse en la interfase sólido-líquido con lo que forma una capa fina de difusión alrededor de la matriz, este primer paso es seguido por la formación de una capa saturada del fármaco en la interfase, como se ilustra en la figura 4.

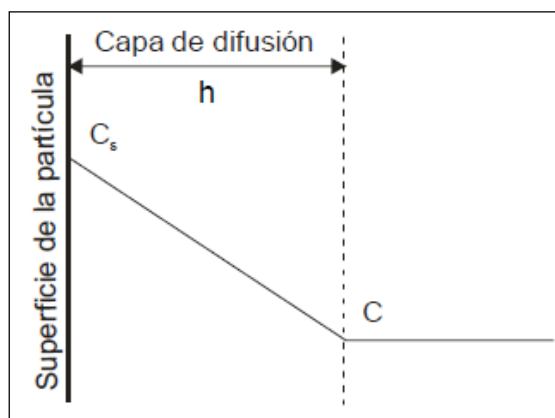


Figura 4. Modelo de la capa de difusión. Donde C_s es la concentración del fármaco en la superficie de la matriz, C es la concentración del fármaco en el medio de disolución y h es el espesor de la capa de difusión (Tomado de Viseras, 2008¹⁸).

Para los polímeros impresos que se sintetizaron para este trabajo, se considera que el mecanismo de liberación corresponda a fenómenos de difusión o incluso de hinchamiento seguido de difusión. Por lo que se ejemplifican los modelos correspondientes a la liberación por difusión e hinchamiento en los apartados siguientes.

Entre los modelos derivados de análisis teóricos del mecanismo difusional, se encuentran los de orden cero, orden uno, modelo de la raíz cuadrada (o de Higuchi), modelo de la raíz cúbica (Hixon Crowell) o el modelo de Korsmeyer-Peppas, además de las ecuaciones derivadas de ésta última han sido ampliamente utilizadas para describir el fenómeno¹⁶.

3.2.1.1. Modelo de Noyes y Whitney

El planteamiento de modelos que explican el control de la liberación de un fármaco desde un SLM se fundamenta en los mecanismos de transporte de masa que tienen lugar durante la dilución, que indican que *la velocidad de disolución de un sólido en medio líquido es proporcional a la diferencia que hay entre la concentración de sólido disuelta en cada instante y su solubilidad en el medio de disolución*, esta afirmación puede expresarse como sigue:

$$\frac{dC}{dt} = k(C_s - C)$$

Esta ecuación fue desarrollada en 1897 por Noyes y Whitney¹⁶, donde dC/dt es la variación de concentración del soluto por unidad de tiempo, k es una constante de velocidad dependiente de las condiciones experimentales, C_s es la concentración de saturación del soluto en el medio de disolución y C es la concentración del soluto en el

tiempo t , Noyes y Whitney plantearon que la disolución se presentaba en dos fases: disolución del sólido en la interface sólido-líquido formando una capa saturada del soluto en la interface, seguido de un paso lento limitado por la velocidad de disolución del sólido¹⁸.

La ecuación de Noyes y Whitney fue modificada por Brunner *et al.*¹⁸, para incorporar el valor del área del sólido accesible a la disolución, S , con lo que obtuvo:

$$\frac{dC}{dt} = K_1 S (C_s - C)$$

Donde K_1 es una nueva constante de proporcionalidad. Utilizando la primera ley de Fick para establecer una relación para la constante K_1 , llegó a la ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh} (C_s - C)$$

Donde $D/Vh = K_1$, D es el coeficiente de difusión, h es el espesor de la capa de difusión y V el volumen de disolución del medio. Esta ecuación y las bases teóricas de la capa de difusión de Noyes y Whitney han sido utilizadas por numerosos autores para el desarrollo de diversos modelos de ajuste^{16, 19}.

3.2.1.2. Modelo de Korsmeyer-Peppas.

Korsmeyer *et al.* Desarrolló un modelo semi-empírico simple, relacionando exponencialmente la liberación del fármaco con el tiempo transcurrido (t), como se muestra en la ecuación siguiente:

$$f_t = at^n$$

Donde a es una constante que incorpora las características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica, n es el exponente de liberación que indica el mecanismo de liberación y la función de $t(f_t)$ es M_t/M_∞ que representa la fracción del fármaco liberado al tiempo t ¹⁶. Este modelo es generalmente usado para analizar la cinética de liberación formas farmacéuticas a base de polímeros, cuando el mecanismo de liberación es desconocido o bien cuando se presenta más de un mecanismo de liberación¹⁶.

En 1985, Nicholas A. Peppas usó el valor de n para determinar el mecanismo de liberación, cuando $n=0.5$ el mecanismo es por difusión de Fick, para valores de n superiores a 0.5 el mecanismo es no-Fickiano o anómalo, si $n=1.0$ la ecuación es de cinética de orden cero, considerado como límite de transporte no Fickiano (denominado por N. Peppas como transporte Caso-II), que corresponde a la cinética obtenida a partir de matrices poliméricas en las que el frente de hinchamiento del polímero avanza constantemente. Cuando el valor del exponente es mayor a uno corresponde a tiempos de liberación muy elevados, es un tipo de difusión anómalo no-Fickiano denominado "supercaso-II". Finalmente, cuando el valor de n es menor a 0.5 , indica la presencia de poros en la matriz polimérica asociado con una difusión simultánea por los poros a través de la matriz hinchada.

Es importante destacar que; para que la determinación del exponente n sea válida, la proporción M_t/M_∞ debe ser menor a 0.6 . Además, el uso de la ecuación es adecuado solamente cuando el experimento se encuentra en condiciones sink, la liberación es por vía unidimensional, y que el sistema sea laminar con una relación largo/espesor o ancho/espesor de al menos $10/1$ ^{16, 18}.

3.2.1.3. Modelo de Peppas-Sahlin.

El empleo de polímeros hinchables para el diseño de SLM permite obtener mayor control durante la liberación, sobre todo cuando el coeficiente de difusión del fármaco es bajo. Los polímeros hinchables son generalmente sistemas que al contacto con el disolvente (generalmente agua), originan un coloide, alejando las cadenas poliméricas que hinchan la matriz polimérica aumentando el área de contacto entre las fases lo que aumenta la movilidad del fármaco. Al hincharse el polímero la liberación no está controlada solamente por la difusión del fármaco, sino por el frente de hinchamiento del polímero por lo que presenta desviaciones a la ley de difusión de Fick¹⁸.

Entre 1987 y 1997, N. Peppas, Estudió la disolución de fármacos a partir de polímeros hinchables, junto con colaboradores como Shalin, estudiaron la aplicación de la ecuación de Korsmeyer-Peppas, planteando que el exponente difusional daría información del mecanismo de liberación del fármaco desde el sistema polimérico hinchable; basados en la premisa de que la disolución del fármaco es el resultado de dos fenómenos: la penetración del disolvente en la matriz y la disolución del fármaco por difusión. Durante

sus investigaciones se encontraron dificultades debidas al desplazamiento del frente de difusión por el hinchamiento del sistema. Así entonces, plantearon soluciones numéricas a partir de la ecuación inicial; hasta llegar a la siguiente:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$$

Donde el fenómeno de difusión corresponde al primer sumando y el fenómeno de relajación al segundo, asumiendo que ambos efectos son aditivos, teniendo en cuenta la difusión de Fick y la relajación del polímero (Caso II). El coeficiente m es el exponente de difusión tipo Fick válido para cualquier geometría del sistema de liberación. K_1 es la constante correspondiente a la difusión y K_2 corresponde a la relajación polimérica¹⁸.

De esta manera, la liberación desde cualquier sistema polimérico se describe como la suma de los mecanismos de difusión de Fick y relajación polimérica¹⁸. Los valores del exponente m para los distintos casos se sitúan en la siguiente tabla¹⁸:

Tabla 3. Interpretación de los mecanismos de liberación de difusión de acuerdo al exponente m.

Valor de m	Mecanismo de liberación
0.5	Difusión tipo Fick
>>0.5	Transporte no-Fick (transporte anómalo)
1	Transporte caso II

El modelo desarrollado por Peppas y Sahlin ha sido utilizado ampliamente para ajustar a diferentes perfiles de liberación desde matrices poliméricas de distinta naturaleza, tanto hinchables como no hinchables.

3.2.1.4. Modelo de Peppas-Fassihi.

Otra modificación a la ecuación de Korsmeyer-Peppas, desarrollada en 1997 por Kim y Fassihi¹⁶ cuando existe la posibilidad de un “efecto de estallido”, es decir, que el fármaco tiene una cinética de liberación inicialmente rápida, seguida de una liberación más lenta y constante²⁰;

$$\frac{M_t}{M_\infty} = at^n + b$$

Donde el parámetro b , indica la magnitud del “efecto de estallido” en la liberación, cuando no se tiene este efecto, b tiende a cero quedando el modelo solamente como $M_t / M_\infty = at^n$. El modelo de Peppas Fassih es también conocido como “Power Law” o Ley de potencia y tiene las mismas restricciones ya mencionadas para el modelo Korsmeyer-Peppas¹⁶.

3.2.2. SLM de Uso Veterinario.

En un principio el desarrollo de los SLM estaban orientados hacia el tratamiento en pacientes humanos, sin embargo al paso de los años, el uso de la tecnología de SLM en el campo veterinario ha ofrecido numerosos beneficios y oportunidades sobre todo al cubrir la necesidad de controles prolongados en los animales disminuyendo con esto la frecuencia de la administración y la consecuente manipulación de los mismos.

La aplicación tecnológica de los SLM en el área veterinaria, consiste en la prevención y control de enfermedades, mediante el uso de antibióticos, agentes antiparasitarios, hormonas, promotores de crecimiento, complementos nutricionales o vitamínicos, etc. Algunos de los beneficios que ofrecen los SLM en uso veterinario, adicionales a los mismos que ofrece en humanos, se encuentran la disminución del estrés ocasionada por las constantes manipulaciones durante la administración, disminuyen el riesgo de la persona encargada de la aplicación del medicamento y además de la reducción de costos de tiempo y dinero que puede representar el manejo de los animales.

En medicina veterinaria es importante saber si el tratamiento es para animales de compañía o para animales de ganadería, que son las principales áreas del mercado veterinario. Los animales de ganado comprenden principalmente bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y aves de corral, además de peces y otros animales de consumo humano.

El diseño de los SLM para aplicación veterinaria dependerá de la eficacia y potencia del fármaco, así como de la especie, debido a las variaciones anatómicas, por ejemplo las observadas entre rumiantes y animales monogástricos. Existen SLM orales, tales como los bolos ruminales, que son estructuras cilíndricas o cápsulas diseñadas para asegurar el fármaco contra degradaciones químicas y procesos de fermentación bacteriana. Los pellets (pequeñas porciones de material aglomerado o comprimido), son SLM que se

mezclan con el alimento y presentan una alternativa para la administración de nutrientes, la ventaja del uso de pellets radica en su fácil administración por lo que tienen alta aceptación entre los ganaderos²¹.

Cuando la administración por vía oral es difícil, la vía parenteral es la siguiente vía de elección para la administración de SLM. Los SLM utilizados actualmente para la administración parenteral logran efectos terapéuticos por largos periodos de tiempo. Existen diversas ventajas que justifican el la aplicación de SLM por vía parenteral; la elevada biodisponibilidad alcanzada. La ausencia del efecto de primer paso, acceso directo del fármaco a la circulación, y en caso de productos de uso veterinario permite superar la variabilidad interespecies²².

3.2.2.1. SLM Poliméricos de Uso Veterinario.

La incorporación de fármacos dentro de materiales poliméricos, impulsó de manera importante el desarrollo de SLM parenterales, con una velocidad de liberación predecible y modificable²¹⁻²². Considerando que los polímeros sirven de plataformas de liberación dentro del organismo por un extenso periodo, deben ser biocompatibles y biológicamente inertes²². La mayoría de los SLM de uso veterinario son fabricados con polímeros no degradables como silicona, poliuretano o copolímeros de vinílacetato y etileno, los cuales resultan económicos, biocompatibles, biológicamente inertes y han sido aprobados por las autoridades sanitarias²³.

Un ejemplo de SLM polimérico, se encuentra en los implantes con base en polímeros, cuya mayor desventaja es la necesidad de un proceso quirúrgico para su introducción, sin embargo; resultan muy seguros, efectivos y altamente recomendados para tratamientos largos; son comúnmente preparados de hidrogeles, silicones y además algunos con matrices biodegradables que están siendo introducidas al mercado²².

Recientemente un producto basado en SLM con polímeros biodegradables ha sido aprobado y está disponible para el tratamiento de la dirofilariasis canina en Australia, Estados Unidos e Italia. La moxidectina, derivado de la ivermectina, fue incorporada en microesferas de PLGA (ácido poliláctico glicólico) para el tratamiento contra dirofilariasis, logrando una protección hasta por 12 meses²³.

Uno de los puntos importantes de la farmacia veterinaria, es el control de ectoparásitos, tales como moscas, mosquitos, garrapatas y ácaros. Las infecciones del ganado con ectoparásitos conducen a la disminución en la producción e incluso a la muerte de los animales. El desarrollo de SLM aporta un valor agregado a las moléculas ya existentes, disminuyendo los costos en el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad ixodícida, por ejemplo; un grupo de investigadores ha elaborado microesferas inyectables de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) (copolímeros 50:50 y 90:10) o ácido poliláctico (PLA) conteniendo ivermectina obtenidas por evaporación de disolvente, cuya aplicación disminuyó la población de garrapatas en las pasturas. Además de la utilización de ivermectina y closantel que han brindado magníficos resultados contra garrapatas resistentes^{1, 23}.

La aplicación de pellets conteniendo ivermectina ha sido utilizada en animales salvajes de vida libre, con el objetivo de obtener una liberación sostenida por largos periodos. Este tipo de administración se ha estudiado clínicamente mostrando excelentes resultados¹. Este estudio se realizó al Este de los Estados Unidos, donde Johnson *et al*²⁴, demostraron que el venado de cola blanca que vive libre en los bosques es el principal vector de la garrapata, agente causante de la ehrlichiosis monocítica humana y además que la aplicación sistemática de acaricidas sobre el venado disminuye la población de las garrapatas, posteriormente Pound, *et al*²⁴ administraron pellets de ivermectina, que es un ixodícida de amplio espectro, en venados de cola blanca de la reserva ecológica del departamento de Texas, y observaron que la concentración sérica de ivermectina aún era detectable después de 14 días y concluyeron que el tratamiento resultó eficaz para reducir la población de garrapatas en el venado de cola blanca.

En el desarrollo de este tema, se ha hecho notar que uso de los SLM ha tenido grandes avances en años recientes y con estos avances los tratamientos se han mejorado al mejorar el esquema de dosificación comparados con las formas farmacéuticas convencionales, utilizando fármacos ya existentes en el mercado disminuyendo la demanda de moléculas activas nuevas. Se puede destacar también, que la aplicación de formulaciones de SLM conteniendo ivermectina para diversos tratamientos veterinarios a largo plazo ha tenido resultados óptimos, así entonces un SLM basado en Polímeros Molecularmente Impresos conteniendo ivermectina representa una opción prometedora como tratamiento antigarrapaticida del ganado bovino.

3.3. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPs).

El reconocimiento molecular es un fenómeno que se presenta cuando una molécula (sustrato) se une a otra de manera específica (receptor), debido a varios eventos, de los cuales destacan que su geometría sea complementaria y la posibilidad de interacciones específicas. Este fenómeno es muy importante en la naturaleza y se presenta en procesos biológicos tales como respiración, diferenciación celular, respuesta inmune, nutrición, receptores hormonales, entre otros²⁵.

Desde su descubrimiento, el reconocimiento molecular ha sido de gran interés para los investigadores, que se han esforzado en explicar e imitar el fenómeno, pues tiene gran potencial de aplicación en diferentes campos de investigación química, analítica, ambiental, farmacéutica, clínica, etc.

En 1884 Emil Fischer empleó la analogía de “llave-cerradura”, para referirse al modo en que interaccionan las enzimas con sus sustratos. Fischer indicaba que las enzimas tienen “depresiones” superficiales complementarias a su sustrato de manera que encajan tal como las llaves lo hacen en una cerradura. Aún con los grandes avances que ha tenido la bioquímica en estos años, con algunas modificaciones, la idea original acuñada hace más de cien años sigue siendo vigente²⁶ y además en años recientes y como resultado de las investigaciones y propuestas para imitar el proceso biológico de reconocimiento molecular dio pie al desarrollo de los materiales biomiméticos, definidos por la IUPAC como *aquellos que se refieren a un procedimiento de laboratorio diseñado para imitar un proceso químico natural*. Una de las más populares propuestas de biomiméticos en la actualidad, es la técnica de *impresión ó estampado molecular*³.

El proceso de impresión inicia cuando una molécula que servirá de molde, interacciona con uno o más monómeros funcionales para formar un complejo o prearreglo, una vez que se ha formado el complejo, es copolimerizado con entrecruzadores generando de esta forma una matriz. Cuando se remueve el templado o molécula molde, la cavidad resultante tiene las características espaciales y preferencia de enlace hacia la molécula contenida inicialmente, por lo que pueden ser utilizadas después como receptores selectivos de tal molécula en una mezcla de especies^{3, 27}. El proceso de impresión se esquematiza en la figura 5.

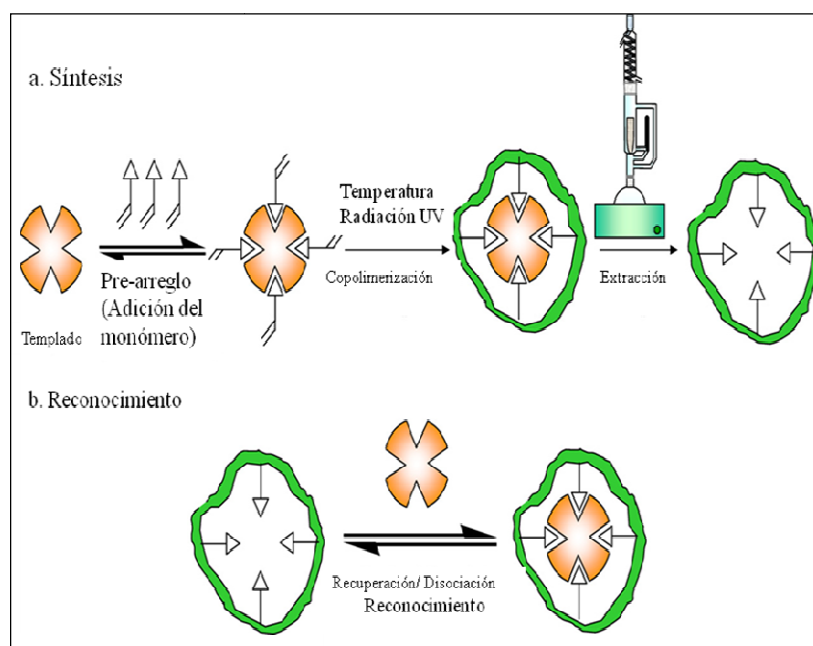


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de impresión molecular.

El objetivo de la técnica de impresión molecular, es la creación de polímeros capaces de reconocer una molécula de manera específica, de forma similar al modo en que lo hacen los anticuerpos u otros receptores moleculares biológicos, que además sean más accesibles y más estables que los receptores biológicos.

3.3.1. Proceso de Impresión Molecular (PIM).

Se han desarrollado *Polímeros de Impresión Molecular*, generalmente conocidos por las siglas *MIP* (Molecular Imprinted Polymer), para una amplia variedad de analitos, en general se utilizan moléculas molde de bajo peso molecular, puesto que entre mayor es el tamaño de la molécula menor es la rigidez del compuesto, lo que disminuye las posibilidades de crear una cavidad bien definida y selectiva hacia la molécula, además; los procesos de reconocimiento y extracción de la molécula implican difusión de la misma a través de la matriz donde una molécula voluminosa encuentra impedimento estérico. Sin embargo, la solución al problema de las moléculas de gran tamaño, ha sido encontrada emulando nuevamente sistemas biológicos, como lo son los anticuerpos, que no reconocen a su antígeno en su totalidad, solamente una porción llamada epítipo; de esta manera un polímero impreso puede reconocer solamente una zona característica de la molécula voluminosa. Con esta solución, se han desarrollado polímeros capaces de reconocer macromoléculas e incluso células en disolución³.

Los métodos de impresión molecular pueden ser clasificados dependiendo del tipo de interacción que exista entre la molécula que sirve de molde o “templado” y los monómeros funcionales; la interacción puede ser mediante enlaces covalentes o mediante enlaces no-covalentes, en términos generales, para sistemas no-covalentes, se incluyen interacciones como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o de Van der Waals²⁷.

Los sistemas con interacciones covalentes fueron iniciados por Wulff y su grupo de colaboradores²⁸, algunas ventajas que presentan son la producción de sitios de reconocimiento más homogéneos y con una alta afinidad hacia el templado. No obstante, la remoción del templado resulta problemática, debido a las interacciones covalentes, subsecuentemente la recuperación resulta lenta porque es necesaria la formación de enlaces covalentes.

El grupo de Wulff^{27, 29}, sintetizó MIPs para la separación de mezclas racémicas de azúcares utilizando ácido 4-(fenil-vinil) bórico como monómero funcional y dimetacrilato de etilen glicol (EGDMA) como entrecruzador. Bajo este enfoque, los polímeros de unión covalente resultaban de gran utilidad para la selección de uno de los monómeros ya que los sitios generados eran más homogéneos y con una afinidad muy fuerte entre el polímero y su horma. A pesar de que la selectividad mostrada por los polímeros es alta en la literatura en la mayor parte de las investigaciones se utilizan MIPs de interacciones no-covalentes empero de generar sitios heterogéneos y de menor afinidad, debido a su simplicidad y mayor velocidad de reconocimiento, además que la formación y ruptura de enlaces covalentes requiere generalmente condiciones muy particulares que limitan la aplicación de los sistemas covalentes.

En procesos de impresión no-covalente, el disolvente elegido tiene un importante papel, ya que gobierna la fuerza de interacción. Los disolventes que tienden a acentuar la fuerza de las interacciones no covalentes, son aquellos con una baja constante dieléctrica, ya que si el disolvente interacciona fuertemente con la molécula horma va a competir con los monómeros dando como consecuencia que el complejo se rompa y de origen a un polímero con baja capacidad de reconocimiento molecular. Además, el disolvente también tiene influencia sobre la región superficial y el tamaño de poro generado en el polímero;

así que entre menor sea el tamaño del poro, mayor será la dificultad de las moléculas para difundir al interior y generar el espacio de reconocimiento^{3, 27}.

En general, el monómero funcional se selecciona en función de la naturaleza del templado, por ejemplo si la molécula tiene grupos funcionales básicos será adecuada para interacciones iónicas o enlaces de hidrógeno el empleo de monómeros con grupo funcional ácido.

Una vez que se tiene definido el complejo molécula molde-monómero(s), sigue la copolimerización del complejo con agentes entrecruzadores, los más utilizados son: dimetacrilato de etilenglicol o trimetacrilato de trimetil propano, así como divinil benceno y triacrilato/ tetra acrilato de pentaeritrol.

Para iniciar la polimerización, los compuestos más empleados son los de tipo azo-, tales como el 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) o el 2,2'-azobis (2,4-dimetil-valeronitrilo), con los cuales se consigue una velocidad de descomposición adecuada calentando la mezcla de reacción entre 50 y 60°C. En caso de que la molécula molde sea termolábil, es posible generar radicales libres a temperaturas menores a 4°C mediante radiación UV empleando un foto-iniciador como la dimetoxifenil acetofenona³.

En años recientes, se han incrementado los reportes de impresión molecular mediante compuestos inorgánicos fundamentados en la tecnología sol-gel, que involucra la fabricación de materiales cerámicos a través de hidrólisis y condensación de alcóxidos metálicos. Una de las ventajas de resultado de la inserción de un centro metálico para alterar la selectividad y las cinética de unión de los MIPs es, por ejemplo, que en el caso de MIPs con interacciones no-covalentes, las interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno son afectadas por la polaridad del medio de disolución que las rodea en cambio, la interacción con metales de coordinación no se ve afectada por el disolvente.

Además, el uso de centros metálicos aumenta la especificidad de reconocimiento entre la matriz y la horma lo que reduce la necesidad de utilizar un exceso de horma al momento de la recuperación. Este tipo de interacciones resultan atractivas para el reconocimiento de sustratos que se manejan en bajas concentraciones o de sustratos de origen biológico

que en ocasiones requieren condiciones especiales de temperatura, fuerza iónica del medio, concentraciones plasmáticas (que pueden ser muy bajas), etcétera.

El PIM no-covalente, ofrece la posibilidad de desarrollar MIPs destinados a la gran variedad de analitos existentes, una producción y mantenimiento de menor costo y tiempo de vida más largo comparados con sistemas de reconocimiento biológicos. Sin embargo, presenta algunas desventajas como las bajas constantes de afinidad entre el MIPs comparadas con los sistemas biológicos, además de requerir altas concentraciones de analito (al menos cuatro veces más cantidad de analito-horma que de monómero funcional) para lograr la impresión, y esto puede derivar sitios con afinidades diferentes a lo largo de la matriz.^{3, 27},

Existen diferentes configuraciones en los MIPs de acuerdo al método utilizado para su preparación. Cuando se efectúa la mezcla de reactivos para la polimerización en un recipiente adecuado se obtiene un polímero en bloque que puede ser fragmentado por molienda o tamizado para su uso posterior. Las desventajas de este proceso son la pérdida de material durante el tamizado y la amplia distribución del tamaño de partícula. A pesar de sus desventajas, gracias a su simplicidad resulta un método muy utilizado para la impresión de polímeros.

Es posible preparar polímeros impresos en láminas delgadas por inmersión de un soporte (placa de vidrio, placa de oro, electrodos, etc.) en la mezcla de reacción. Las cavidades obtenidas por éste método no sufren alteraciones debido a que no son necesarios procesos posteriores de molienda o tamizado. La configuración en láminas delgadas es la más utilizada en sensores.

Los polímeros impresos también pueden obtenerse en forma de pequeñas esferas de tamaño bien definido. En esta configuración, una capa del polímero impreso recubre la superficie de una esfera previamente activada. Se utilizan soportes como perlas de sílice, poliestireno o trimetacrilato de politrimetilolpropano. Los grupos funcionales de estas perlas permiten el anclaje del polímero logrando un recubrimiento superficial efectivo. Con esta configuración los sitios de reconocimiento son más accesibles para el templado, aumentando la velocidad de liberación³.

3.3.2. Aplicaciones de los Polímeros de Impresión Molecular.

Los polímeros de impresión molecular han sido utilizados en gran número de aplicaciones. Por ejemplo; como fases estacionarias en separaciones cromatográficas con alta eficiencia en el reconocimiento permitiendo incluso separaciones de analitos en mezclas racémicas³. También, ahí se han descrito procedimientos de MIPs utilizados como fases estacionarias para adsorción, preconcentración y purificación de compuestos³. La compañía *MIP Technologies* comercializa un cartucho para extracción en fase sólida con un MIP para cloranfenicol, cuya tolerancia en alimentos es cero debido a sus efectos cancerígenos^{3, 30}.

Otra de las aplicaciones es la aplicación de los MIPs como sensores para el desarrollo de inmunoensayos y diagnósticos clínicos funcionando como anticuerpos³¹. Varios autores han diseñado y sintetizado MIPs que pueden ser empleados como catalizadores basados en la obtención de MIPs para moléculas similares al estado de transición en una reacción química³¹.

La capacidad de reconocimiento de los MIPs y la posibilidad de predecir la permeabilidad que tienen en la liberación de su templado, han conducido investigaciones para utilizarlos en sistemas de liberación modificada de fármacos³¹.

3.3.2.1. MIPs en SLM.

Los polímeros de impresión molecular son atractivos como excipientes para fármacos, porque pueden actuar como reservorios de moléculas de bajo peso molecular y tienen la capacidad de regular la difusión del principio activo en función de la composición el polímero empleado. En casos donde el fármaco tiene márgenes terapéuticos estrechos, los MIPs podrían mantener concentraciones adecuadas dentro de la ventana terapéutica.

El primer reporte de MIP en sistemas de liberación publicado en 1998 por Norell y colaboradores³², describe en su estudio sobre la cinética de liberación de un MIP que contenía teofilina. La teofilina es una xantina que se utiliza en el tratamiento del asma y presenta una ventana terapéutica estrecha (30-100 μ M). La principal conclusión de este estudio, es que disminuye la velocidad de liberación a medida que disminuye la carga de teofilina en el polímero³².

La biodisponibilidad de agentes terapéuticos administrados en la superficie de la cornea es solamente del 1-7% por lo que es necesaria la aplicación de altas dosis para lograr concentraciones efectivas, esto incrementa los efectos adversos como hinchazón e irritación en el área de aplicación. Para mantener la biodisponibilidad del fármaco administrado por vía ocular es necesario incrementar el tiempo de retención en la cornea lo que requiere repetidas administraciones que irritan y causan molestia al paciente. Los MIPs tienen el potencial de controlar y mantener la liberación del fármaco por extensos periodos de tiempo, por ejemplo Hiratani, Fujiwara, Tamiya y Alvarez-Lorenzo²⁹ probaron hidrogeles impresos con timolol *in vivo*, en fluidos de conejo. Utilizando ácido metacrílico (MAA) como monómero funcional, dimetacrilato de etilenglicol (EDGMA) y timolol como templado. El hidrogel impreso mostró tiempos de liberación tres y dos veces más largos que los lentes de contacto tradicionales en el tratamiento contra el glaucoma (producto comercial disponible) y el polímero no impreso (NIP), respectivamente. Lo que indica que el MIP desarrollado puede ser utilizado como vehículo para extender y mantener la dosis del fármaco, disminuyendo los efectos adversos por las múltiples administraciones.

El grupo de Suedde *et al*²⁹, hicieron estudios *in vitro* de un MIP basado en MAA y propanolol como horma, demostraron la selectividad que presentan los MIPs hacia el isómero S del propanolol para la liberación durante su aplicación transdérmica en piel de rata, independientemente de la proporción de los dos isómeros. El resultado es importante, pues el S-propanolol tiene 100-130 veces más actividad como beta-bloqueador en el tratamiento de hipertensión que el enantiómero R²⁹. En este caso los MIPs no solo actúan como un sistema de liberación, si no que al reconocer específicamente al isómero con actividad biológica, se aumenta por mucho la potencia del fármaco lo que aumenta en gran medida la efectividad del fármaco y con ello una mejora impresionante en el esquema de dosificación.

En un estudio reciente, Byrne y colaboradores³³, investigaron la eficacia de los MIPs en sistemas de liberación prolongada mediante la impresión por fracciones. En contraste con la impresión tradicional donde el fármaco es impreso en el polímero, en esta técnica solamente se moldea una molécula sencilla que después se une covalentemente a una molécula más compleja que es de interés, de esta manera, el polímero reconoce a la molécula más sencilla que a su vez sirve para anclar a una estructura más complicada y de mayor tamaño. Byrne y sus grupo lograron la impresión de D-glucosa para el

subsecuente reconocimiento de una molécula más larga que contiene fracciones de glucosa, 2-(N-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino)-2-deoxi-glucosa. La impresión tradicional requiere altas concentraciones del templado durante la polimerización que después tiene que ser removido, por lo que este enfoque resulta muy interesante cuando los compuestos utilizados como templados resultan costosos o lábiles.

Al igual que el grupo de Byrne, actualmente se están llevando a cabo investigaciones para aplicar la técnica de impresión molecular con características que permiten desarrollar sistemas inteligentes de liberación de fármacos. Como los MIPs fotosensitivos desarrollados por Gong et al²⁹. Usando azobenceno como monómero funcional. La fotoisomerización trans-cis del azobenceno produce cambios significativos en la geometría de la molécula, lo que permitiría utilizarlo como una especie de interruptor de reconocimiento/no-reconocimiento.

Por otra parte Gong y colaboradores²⁹, han publicado investigaciones sobre MIPs termosensitivos como posibles plataformas para la liberación inteligente de fármacos utilizando azobenceno como monómero funcional. La fotoisomerización trans-cis del azobenceno provoca cambios significativos en la geometría, que en teoría puede utilizarse como un sistema de apagado-encendido de reconocimiento específico. En otro estudio realizado por el mismo grupo, mezclaron ácido 4-[(4-metacriloxi)-fenilazo] bencensulfónico (monómero funcional) y *N-N'*-hexilanobismetacrilamida (entrecruzador) fueron disueltos en dimetilformamida/agua con paracetamol, un analgésico común, como templado. Después de una radiación a 353 nm por 120 minutos, cerca del 84% del fármaco contenido en la matriz fue liberado y una subsecuente exposición a una luz con longitud de onda de 440 nm durante 90 minutos, causó que más del 94% del paracetamol fuera reabsorbido. Con estos estudios han demostrado que el reconocimiento molecular utilizando polímeros fotosensitivos tiene gran potencial para desarrollar sistemas inteligentes de liberación de fármacos.

La aplicación de MIPs como SLM es un área cuyo desarrollo es muy reciente y por tal motivo poco estudiada, ya que hasta ahora se han publicado menos de 80 trabajos de este ámbito y todos estos son de los últimos 5 años. No obstante, en esta sección se ha visto que el uso de MIPs como sistemas inteligentes de liberación de fármacos es un área

muy prometedora, las posibilidades que ofrecen para adecuarse de acuerdo a los requerimientos de cada fármaco alterando la composición del polímero son ilimitadas.

3.3.3. Caracterización de los Sitios de Reconocimiento de los MIPs.

Los polímeros de impresión molecular han demostrado gran capacidad de enlace y afinidad hacia su molécula molde, lo que sugiere un sitio de unión de distribución homogénea. Sin embargo, los resultados experimentales han expuesto que la distribución heterogénea de monómeros es una situación común, sobre todo en MIPs con interacciones no-covalentes. Existen diferentes hipótesis que intentan explicar la formación heterogénea de sitios de reconocimiento:

- i. Naturaleza amorfa del polímero. Durante la copolimerización, las cadenas del entrecruzador alrededor del complejo (templado-monómero) se unen de manera aleatoria, lo que provoca diferencias en los sitios templados que tienen diferentes grados de afinidad al templado.
- ii. Disociación del complejo templado-monómero en solución. En teoría para cada complejo presente en la mezcla de reacción se produce un sitio de unión en la matriz polimérica, sin embargo, al disociarse el complejo, se producen sitios de unión con monómeros libres orientados en la matriz de manera aleatoria.
- iii. Formación de Aglomerados. Durante el proceso de reconocimiento existe la posibilidad de que dos o más complejos cercanos queden dentro de la matriz formando un solo sitio de reconocimiento el cual tiene baja afinidad al momento de reconocer al templado.
- iv. Sitios de reconocimiento colapsados. El sitio impreso puede encoger una vez que se ha removido el templado. En la figura 6 se ejemplifican sitios de reconocimiento con diferentes grados de afinidad hacia su molécula molde. Resultado de la heterogeneidad de sitios de reconocimiento en polímeros impresos utilizados como fase sólida.

Este tipo de heterogeneidades dan como resultado en un experimento de HPLC, si se utiliza al MIP como adsorbente, que el pico del cromatograma no se sea simétrico, se ilustra en la figura 6, la forma del pico y las estructuras posibles de los sitios moldeados en el polímero³⁴.

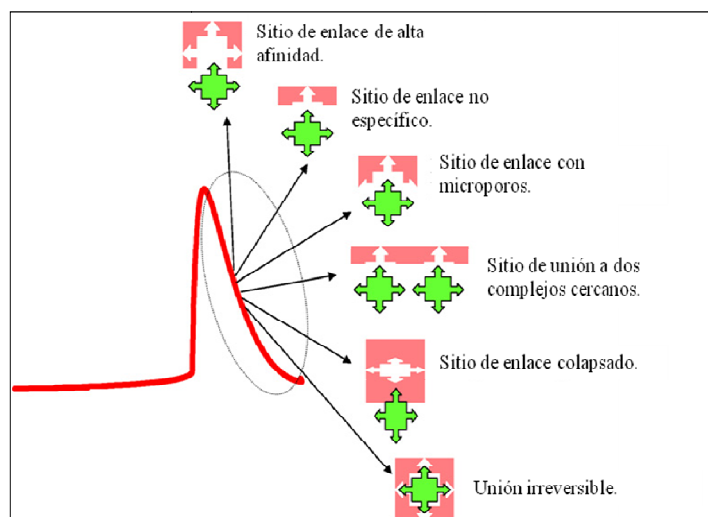


Figura 6. Pico de Cromatograma.

La caracterización de los sitios de reconocimiento mejora el entendimiento de la afinidad del complejo formados por el monómero y la molécula molde para crear mejores matrices poliméricas capaces de unir más fuertemente al sustrato y además de mostrar una selectividad más específica, es decir, que el fenómeno de reconocimiento molecular sea mayor. Con este conocimiento es posible modular la interacción sustrato-polímero y controlar el fenómeno opuesto a la unión, que es la liberación.

Una forma de evaluar la selectividad y formación de sitios de reconocimiento en el polímero estampado es mediante isotermas de adsorción, que indican la capacidad de unión entre una superficie que en este caso es el polímero impreso y un material de unión que corresponde al templado. La información que ofrecen las isotermas, es importante, ya que con ellas se pueden conocer la características principales de los sitios de unión, indican la distribución de las afinidades en los sitios generados durante el proceso de impresión, la cantidad de sitios; y con ello se puede optimizar la composición del polímero de acuerdo a los requerimientos de la aplicación.

Un estudio realizado por Wei y Mizaikoff²⁹ buscando la heterogeneidad de los sitios de reconocimiento usando la metodología de isoterma de unión de Freundlich donde probaron tres formas de MIP (bloque, microsferas, y submicroesferas) con la misma molécula molde. La isoterma de Freundlich describe la relación entre la concentración del templado recuperado y la cantidad libre usando una asociación constante y un índice de

heterogeneidad para cada distribución de afinidad que después de ser calculado puede determinarse el número de sitios con afinidades altas y bajas.

En 2007, Corton et al.³⁵ Estudiaron dos diferentes polímeros de impresión para cloranfenicol, utilizando diferentes concentraciones del templado (MIP1 y MIP2 preparados con 323mg y 32mg de cloranfenicol respectivamente), evaluaron sus cinéticas de adsorción y las isotermas de unión. La capacidad y equilibrio de las isotermas de unión se estimó utilizando tres modelos de equilibrio: Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich. Los resultados que obtuvieron, demostraron la importancia que tiene la cantidad de templado utilizada durante la síntesis del polímero, la cual repercute de manera importante en la selectividad y la afinidad.

Sing, B. et al.³⁶ y su grupo de investigadores han sintetizado y caracterizado MIPs durante el 2008, en un estudio preliminar sintetizaron hidrogeles impresos utilizando 2-hidroximetimetacrilato (HEMA) y ácido acrílico en un modelo de liberación de glucosa. Estudiaron las características de unión, y de liberación *in vitro* de los polímeros impresos y no-impresos. El polímero impreso mostró mayor adsorción y mejor perfil de liberación. Realizaron posteriormente estudios semejantes pero sustituyendo el modelo de glucosa por 5-fluorouracilo, y en este estudio encontraron que altas concentraciones de la molécula molde durante la síntesis, mejora las características de enlace y perfil de liberación del fármaco³⁷.

Otro ejemplo característico de las aplicaciones de los MIPs, son los trabajos que durante el 2009, Singh Dhruv y Mishra Shraddha³⁸ hicieron; en particular informan de dos estudios acerca de la síntesis y caracterización de polímeros impresos para la extracción y remoción de UO_2^{2+} y Cd (II). Los cuales son metales muy tóxicos que generan preocupación al interactuar en el medio ambiente. El uranio provoca daño renal irreversible y progresivo que en casos extremos lleva a insuficiencia renal e incluso la muerte, en el primer estudio Dingh y Mishra sintetizan un MIP con interacciones iónicas para el ión uranilo, realizaron estudios de caracterización, selectividad y optimización del MIP comparados con un polímero control (CP₃) reportado previamente. Los MIP ofrecieron resultados de recuperación en muestras de agua del ión uracilo más efectivos que el polímero CP₃ reportado anteriormente.

De manera semejante sintetizaron MIP para recuperación de Cadmio II, el cual es uno de los metales tóxicos más importantes según la lista de la EPA (Environmental Protection Agency). En este estudio, el polímero fue caracterizado mediante FTIR (Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier), análisis elemental y determinación del área superficial. Los polímeros sintetizados exhibieron buenas propiedades de adsorción en disolución acuosa con recuperaciones del 97-99%.

3.3.3.1. Modelos de Adsorción.

El proceso de adsorción se presenta cuando una especie química (adsorbato) se une a una superficie (adsorbente) mediante diferentes interacciones, de acuerdo al tipo de interacciones entre el adsorbato y el adsorbente, existen dos clases de adsorción: la primera, cuando las interacciones son débiles (por ejemplo fuerzas de Van der Waals) la adsorción se considera física o fisisorción, y cuando las interacciones son fuertes (covalentes) la adsorción es química o quimisorción. Este fenómeno generalmente es descrito mediante isotermas, donde la cantidad de la especie que se adsorbe (B) está en función de de la concentración del adsorbato (C) (o de la presión cuando es gas) a una temperatura constante. La expresión general es:

$$B = Ck$$

Donde k es una constante de adsorción. Cuando la isoterma no es lineal existen otras aproximaciones para describir el fenómeno; las más utilizadas son las de Langmuir y Freundlich³⁹.

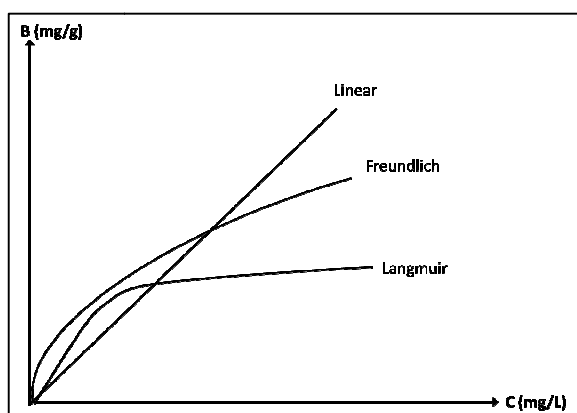


Figura 7. Isotermas de Adsorción de Langmuir y Freundlich.

3.3.3.1.1. Isoterma de Langmuir.

La teoría de Langmuir asume sitios de enlace homogéneos, energéticamente equivalentes y una vez que el adsorbato ha ocupado un sitio no existe interacción entre otras moléculas adsorbidas en sitios vecinos. Este modelo asume solo una clase de sitios de enlace, pero existen otros modelos como bi-Langmuir para dos clases de sitios. Para determinar los parámetros de unión con los modelos de Langmuir se utiliza la representación de Scatchard, para obtener el gráfico de la ecuación Langmuir:

$$\frac{B}{C} = KN_t - KB$$

Donde B es la cantidad adsorbida del adsorbato al equilibrio, C es la concentración del adsorbato al equilibrio, K es la constante de adsorción de Langmuir y N_t el número de sitios de reconocimiento accesibles. Al graficar B/C contra B es posible obtener el valor de K de la pendiente y N de la intercepción en el eje de las abscisas. En sistemas heterogéneos, la representación de Scatchard es no lineal por lo que y la ecuación de Langmuir tiene dos términos:

$$B = \frac{N_1 K_1 C}{1 + K_1 C} + \frac{N_2 K_2 C}{1 + K_2 C}.$$

El gráfico B/C vs B está compuesto de dos líneas rectas correspondientes a cada uno de los dos términos de la ecuación. La línea con la pendiente más inclinada corresponde a los sitios de alta afinidad, mientras que la línea con el valor de pendiente menor indica los sitios de menor afinidad³⁵. La figura 8 ilustra la aplicación del modelo de bi-Langmuir que informan Cursio y colaboradores⁴⁰, al estudio de unión de polímeros de impresión sintetizados por fracciones para el reconocimiento de glucosa que después se unirá a diferentes analitos.

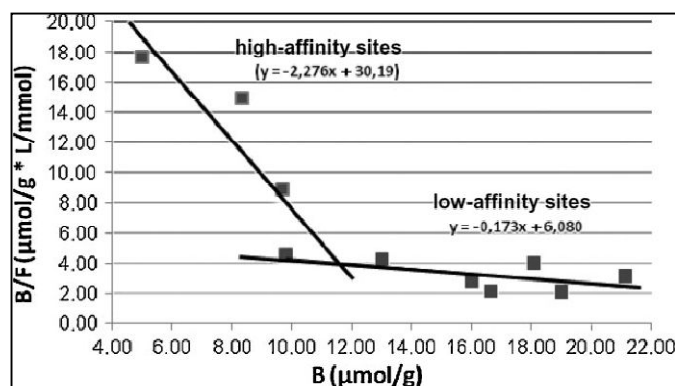


Figura 8. Isotherma de Bi-Langmuir (tomado de Curcio P. *et al*, 2007⁴⁰)

3.3.3.1.2. Isotherma de Freundlich.

Es una función empírica para adsorciones no ideales en superficies heterogéneas es buena para describir fenómenos de adsorción multicapa, se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$B = aC^m$$

Donde B es la cantidad de adsorbato adsorbida al equilibrio, a es el coeficiente de adsorción de Freundlich (relacionado con la capacidad de adsorción N_t , y el promedio de la afinidad, K_0), m es la constante de Freundlich que representa el índice de heterogeneidad y tiene valores entre 0-1 (valores cercanos a cero indican incremento en la heterogeneidad y valores cercanos a uno indican mayor homogeneidad), C es la concentración del al equilibrio. El término B es calculado mediante un balance de masa utilizando la siguiente ecuación:

$$B = V \frac{C_0 - C}{M}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de adsorbato, C es la concentración al equilibrio, V es el volumen de la disolución y M la masa del polímero impreso³⁵.

3.3.3.1.3. Isotherma de Jovanovic

La isoterma de Jovanovic ha sido derivada a partir de datos de cinéticas y en contraste con el modelo de Langmuir, esta toma en cuenta las interacciones entre el adsorbato adsorbido y el libre. Esta isoterma se representa con la ecuación:

$$B = N(1 - e^{-KC})$$

Donde B y C son la cantidad de adsorbato adsorbido y libre, respectivamente. N es el número total de sitios de reconocimiento (la densidad de sitio de unión o de la capacidad de saturación de monocapa) y K es la constante de adsorción³⁴.

3.3.3.1.4. Modelo de Langmuir-Freundlich.

Este modelo fue introducido en el estudio de los polímeros de impresión por Shimizu et al. Y Guiochon et al³⁵. El modelo describe la relación entre la cantidad de adsorbato unida al polímero (B) y la cantidad de adsorbato libre (C) al equilibrio, mediante la siguiente ecuación:

$$B = \frac{N_t K_0^m C^m}{1 + K_0^m C^m}$$

Donde N_t es el número total de sitios de reconocimiento y K_0 es media de la afinidad de enlace. La variable a se relaciona con K_0 mediante $K_0 = a^{1/m}$. El parámetro de ajuste, m , es idéntico al índice de heterogeneidad de sitios de la isoterma de Freundlich. Cuando m se aproxima a la unidad, indica una superficie homogénea. Este modelo híbrido es aplicable para datos de altas y bajas concentraciones así como superficies homogéneas y heterogéneas³⁴⁻³⁵.

3.3.3.1.5. Modelo de Jovanovic-Freundlich.

El modelo híbrido de Jovanovic-Freundlich describe el fenómeno de adsorción en superficies heterogéneas. El modelo puede expresarse como:

$$B = N_t (1 - e^{-K C^m})$$

Donde m es el índice de heterogeneidad, varía entre cero y uno, y K es una constante que solo depende de la temperatura y su magnitud indica una medida entre la energía de interacción energética entre adsorbente-adsorbato³⁴.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como ya se ha mencionado en este trabajo, la infección del ganado bovino por garrapatas es un problema de salubridad que tiene alto impacto en la economía ganadera al provocar graves alteraciones en el ganado. Además con la aparición de cepas resistentes sobre todo de la especie *Boophilus microplus* a los acaricidas comercializados; exige el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que permitan tratamientos más eficaces. Cabe recordar que el desarrollo de nuevas moléculas activas contra parásitos implica altos costos de tiempo y dinero. Tomando en cuenta que la aparición de especies resistentes a estas nuevas moléculas, se caracteriza por que la resistencia se presenta cada vez en periodos más cortos. La vía para el desarrollo de nuevos tratamientos, no debe recaer en el desarrollo de nuevas moléculas activas, si no de formulaciones alternativas que den un valor agregado a las moléculas ya existentes.

La tecnología de Impresión Molecular ofrece la posibilidad de crear sistemas de liberación prolongada de fármacos de manera sencilla y rápida. Los sistemas de liberación controlada que consiguen tiempos de liberación prolongados y han demostrado ser muy seguros para el manejo de animales. Y se ha comprobado que sistemas de liberación prolongada que contienen ivermectina tienen resultados favorables en el tratamiento contra cepas resistentes de garrapatas y su aplicación de ha sido utilizada en animales salvajes de vida libre, con el objetivo de obtener una liberación sostenida por largos periodos con excelentes resultados. Así, que de contar con polímeros molecularmente impresos, es posible desarrollar una forma farmacéutica que cumpla con las exigencias antes expuestas. Para lograr esto previamente debemos contar con estudios de síntesis y caracterización de los polímeros que permitan profundizar en las interacciones del polímero y el adsorbato de ivermectina, para lograr la formulación eficiente.

En el desarrollo de este trabajo se proponen diferentes polímeros, a partir de ácido metacrílico y PETA como entrecruzador, se estudiarán variaciones en la proporción molecular de MMA:ivermectina y también variaciones en la temperatura utilizada durante la síntesis del polímero, todo esto, para determinar cómo influyen estas variables en la capacidad de unión fármaco-polímero lo que conlleva a un mejor entendimiento de estos sistemas y así desarrollar una forma farmacéutica de liberación prolongada eficaz en el tratamiento del ganado vacuno contra la garrapata.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL.

- Síntesis y caracterización de polímeros de impresión (estampados) derivados de triacrilato de pentaeritrol (PETA) y ácido metacrílico (MMA) conteniendo ivermectina (adsorbato) para la liberación prolongada de la misma .

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Sintetizar polímeros molecularmente impresos de ivermectina por el método de bloque o monolito.
- Estudiar el efecto que tiene la relación estequiométrica del ácido metacrílico (monómero funcional) en la adsorción y liberación de ivermectina por parte del polímero, para lo cual se sintetizarán polímeros con proporciones 1:4 y 1:1 de ivermectina:MMA.
- Determinar las condiciones de temperatura y proporción molar (Ivermectina:MMA) para la síntesis del polímero deseado.
- Estudiar el efecto de la temperatura durante la síntesis en el comportamiento del polímero, para tal efecto se sintetizarán polímeros a 65°C y a 4°C, para lo cual será necesario cambiar el método de polimerización de térmica a fotoquímica.
- Caracterizar los sitios de reconocimiento en los polímeros sintetizados mediante isothermas de adsorción.
- Estudiar la cinética de liberación *in vitro* de ivermectina de los polímeros impresos preparados.
- Determinar cuál polímero permitirá desarrollar un sistema óptimo de liberación prolongada de ivermectina.

6. EXPERIMENTAL.

6.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.

Espectrofotómetro UV-Visible, Agilen Tech 95.

Calorímetro Diferencial de Barrido DSC, Shimadzu 60.

Zetasizer nano DLS, Malvern 5.0.

Rotaevaporador Buchi.

Baño Regulador de Temperatura, Thermo Electron Corporation.

Balanza Analítica, Explorer Ohaus.

Parrilla con agitación magnética y termostato.

Ivermectina, Moléculas Finas de México S. A. de C. V.

Ácido Metacrílico (MMA), Sigma-Aldrich.

Triacrilato de Pentaeritrol (PETA), Sigma-Aldrich.

2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) AKZO Nobel Chemicals S. A. de C. V.

Cloroformo.

Etanol grado técnico destilado, Reactivos y Productos Químicos Finos.

6.2. METODOLOGÍA.

6.2.1. Síntesis de Polímeros de Impresión.

La síntesis de los polímeros impresos fue realizada de acuerdo al método por bloques descrito en la parte final de la sección 3.3.1 (Proceso de Impresión Molecular). Utilizando MMA como monómero funcional en diferentes relaciones estequiométricas respecto a la ivermectina de 4:1 y 1:1. Se utilizó triacrilato de pentaeritrol; PETA como entrecruzador, ivermectina como templado y AIBN como iniciador de la polimerización. Se sintetizaron polímeros con estequiometría 1:1 (ivermectina:MMA) a temperaturas de 65°C y 4°C.

6.2.1.1. *MIP 1:4:20.*

Para la síntesis del Polímero Molecularmente Impreso; MIP 1:4:20 (donde 1 corresponde a la proporción molar de ivermectina, 4 la proporción molar de MMA y 20 la proporción molar de PETA), se pesaron aproximadamente 875.1mg (1mmol) de Ivermectina y se añadieron 340µL (4 mmol) de ácido metacrílico y 5.11mL (20mmol) de PETA, se disolvieron todos los reactivos en 10mL de cloroformo, se agregaron 7.2mg de AIBN previamente disueltos en 1mL de cloroformo. La mezcla de reacción se colocó en un tubo de ensayo tapado. Se burbujeó N₂ al tubo y se selló. Se colocó el tubo de reacción en baño de aceite a 65°C por 24 horas. El polímero de referencia no impreso, NIP; se sintetizó con las mismas condiciones a excepción de la adición de Ivermectina.

6.2.1.2. *MIP 1:1:20.*

Para la síntesis del MIP 1:1:20, se disminuyó la cantidad de MMA a 85µL, dejando una proporción molar ivermectina-MMA-PETA de 1:1:20 respectivamente. De igual manera se sintetizó un polímero sin presencia de ivermectina; NIP correspondiente.

6.2.1.3. *MIP-UV 1:1:20.*

Utilizando las equivalencias molares del polímero anterior, se sintetizó otro tipo de polímero sustituyendo el baño de aceite de 65°C, por uno de 4°C en presencia de luz ultravioleta como forma de iniciar la polimerización.

- Reacción de Polimerización

La reacción de polimerización se esquematiza en la siguiente figura 9, donde la ivermectina que tiene grupos OH que la hacen capaz de interactuar con el ácido metacrílico formando puentes de hidrógeno, lo que se conoce como pre-arreglo, que

después se copolimeriza con el PETA formando de esta manera una cavidad que contiene la ivermectina; éste es el sitio de reconocimiento. Se puede modificar la afinidad de los sitios hacia la ivermectina al aumentar o disminuir la cantidad de MMA. En teoría; la afinidad de cada sitio hacia su templado está en función de la cantidad de interacciones (no-covalentes) que presenté, y a su vez la cantidad de interacciones depende de la porción de monómero funcional en el polímero.

Otra de las variaciones se encuentra en la forma de iniciar la polimerización, la forma tradicional indica que se coloque la mezcla de reacción en temperaturas mayores a la temperatura ambiente, como lo es el baño de aceite a 65°C, pero también se puede iniciar la polimerización a bajas temperaturas, por ejemplo a 4°C e induciendo la polimerización mediante luz ultravioleta. Al polimerizar a menor temperatura, los sitios generados se moldean de manera más homogénea sobre el templado, aunque también lo hacen más lento, lo que probablemente disminuya la cantidad de sitios.

En la figura 9 se muestra la reacción general de síntesis de un polímero de impresión de ivermectina con ácido metacrílico, PETA y diferentes condiciones de iniciación de polimerización una con temperatura elevada de 65°C; y otra con baja temperatura a 4°C y radiación ultravioleta.

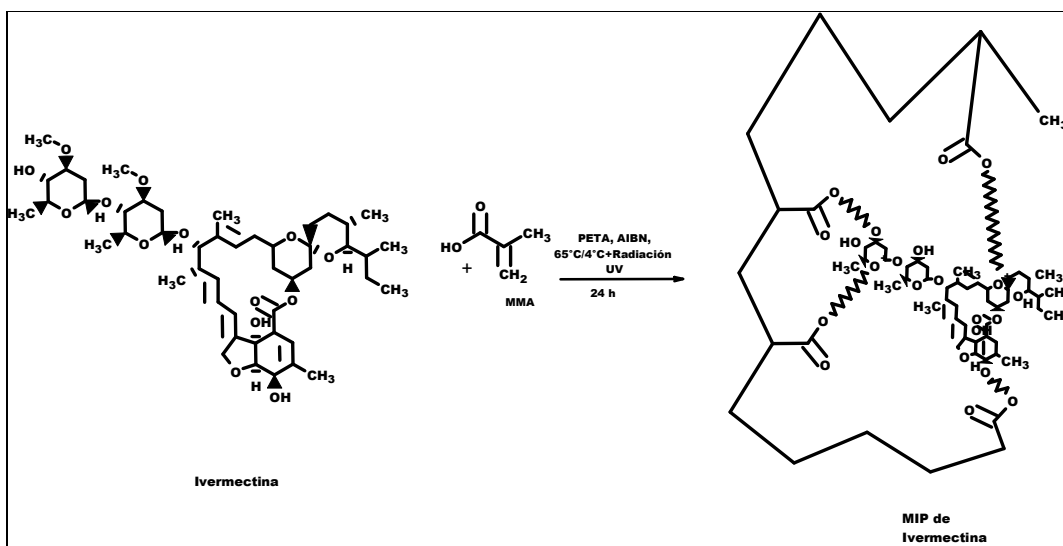


Figura 9. Reacción de Polimerización.

6.2.2. Remoción de Ivermectina de los Polímeros.

Después de la síntesis, los polímeros obtenidos se muelen y se lavan con el fin de eliminar la Ivermectina de los polímeros impresos. El polímero molido se deja en agitación con etanol durante 2 horas, pasado este tiempo se deja en reposo para que sedimente el polímero y se decanta el etanol. Se repitió este procedimiento 3 veces. Terminados los enjuagues se colocan los polímeros en el extractor Soxhlet con etanol durante 48 horas. Terminado el lavado con Soxhlet, se filtra. Para comprobar que los polímeros quedaron libres de Ivermectina, se corrieron espectros UV del etanol residual de los últimos lavados.

6.2.3. Distribución del Tamaño de Partícula de los Polímeros.

Para determinar la distribución del tamaño de partícula de los polímeros; se prepararon suspensiones de 1mg de polímero en 10mL de etanol. Se colocó una muestra en el equipo de difusión dinámica de luz Zetasizer Nano DLS (Dynamic Light Scattering), a 25°C.

El equipo Zetasizer Nano DLS mide la difusión a un ángulo de 173°; la medición se fundamenta en la detección del movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño: Cuanto mayor sea la partícula menor será el movimiento Browniano y viceversa⁴¹.

Se realizaron tres medidas de 15 repeticiones cada una para cada tipo de polímero, después se dejó la muestra en reposo durante 10 minutos y se repitió la serie de medidas dos veces más. Se repitió este ciclo para cada polímero.

6.2.4. Caracterización de los Sitios de Reconocimiento.

6.2.4.1. Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Los estudios de espectroscopia infrarroja se realizaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación [USAI] de la Facultad de Química, las muestras fueron preparadas en pastillas de bromuro de potasio (KBr) en el equipo de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) Spectrum RXI Perkin Elmer, con el apoyo de la Química Maricela Gutiérrez Franco.

6.2.4.2. Isotermas de Adsorción.

Se preparó una disolución madre de ivermectina 25 mili molar (mM). A partir de esta disolución, se hicieron las diluciones necesarias para obtener las concentraciones requeridas.

Diluciones teóricas preparadas (mM).		
Concentraciones Bajas	Concentraciones Medias	Concentraciones Altas
0.02	0.1	1
0.04	0.2	2
0.08	0.4	5
0.1	0.6	15
	0.8	25

Después de preparar las diluciones, se determinaron sus concentraciones reales mediante espectroscopia UV a 245nm en el espectrofotómetro uv-visible Agilen Tech 95 a temperatura de 25°C.

Para determinar la capacidad de recuperación de los polímeros sintetizados, se realizaron isotermas de adsorción, para esto se pesaron muestras de 15mg de cada uno de los polímeros y se colocaron en tubos Eppendorf, cada muestra se puso en contacto con 1mL de la dilución correspondiente. Las muestras se colocaron en agitación y temperatura constante de 200rpm y 25°C respectivamente, durante 48 horas, con el fin del que el sistema de adsorción de ivermectina llegara al equilibrio.

Al término de este periodo, se determinó la concentración de ivermectina en cada muestra y se determinó la cantidad de ivermectina adsorbida en la muestra de polímero, es decir la capacidad de retención (mg de ivermectina/mg de polímero). Para realizar la curva isotermas se graficó la capacidad de retención contra la concentración de ivermectina utilizada.

6.2.5. Estudios de Liberación *in vitro*.

6.2.5.1. Cargado de Ivermectina en el Polímero.

Con los polímeros limpios, se colocó una cantidad conocida de polímero (250mg) en el desecador a 50°C y aproximadamente 30 mmHg por una hora y después se pusieron en contacto con 25mL de una disolución saturada de ivermectina en matraces sellados con agitación constante durante 48 horas. Terminado este periodo, los polímeros ya cargados

de ivermectina; se filtraron, se secaron y se pesaron. Este procedimiento se repitió para todos los polímeros preparados

Se determinó la concentración de ivermectina antes y después de la reacción de adsorción mediante espectroscopia UV; extrapolando las absorbancias obtenidas a 245nm en una curva patrón de Ivermectina. Al multiplicar la diferencia entre las concentraciones antes y después de la adsorción por el volumen utilizado durante el experimento, y dividirla entre la masa de polímero utilizado, se obtuvo la carga del polímero, quedando como:

$$\text{Carga de Polímero} = \frac{\text{mg}_{\text{ivermectina_recuperada}}}{\text{mg}_{\text{polímero}}}$$

6.2.5.2. **Cinéticas Liberación de Ivermectina.**

Se pesaron 20mg de cada uno de los polímeros cargados; MIPs y NIPs, se les añadieron 25mL de etanol con temperatura y agitación constantes 37°C y 260rpm, durante 48 horas. En cada tiempo se realizaron tomas de 500µL de la disolución y se reemplazaron por 500µL de etanol puro cada vez. Cada muestra fue diluida en 10mL de etanol y posteriormente se determinó la cantidad de ivermectina liberada en cada tiempo correspondiente, mediante espectroscopia UV y la curva patrón previamente hecha.

Cinética de Liberación de Ivermectina

Muestreo	Tiempo (horas)	Muestreo	Tiempo (horas)
1	0.5	7	12
2	1	8	24
3	2	9	26
4	3	10	30
5	5	11	32
6	8	12	48

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. SÍNTESIS DE POLÍMEROS IMPRESOS Y NO IMPRESOS DE IVERMECTINA.

Para cada polímero impreso sintetizado, es decir MIP, se sintetizó un polímero no impreso, NIP, que contenía todos los componentes del polímero con excepción de la molécula de Ivermectina. El fin de cada NIP es comprobar la afinidad y la formación de sitios de reconocimiento que presentan los MIPs como resultado de la impresión o moldeado que se generó durante la polimerización, es decir funcionaron como blancos.

Se sintetizaron tres tipos de polímeros que se nombran de acuerdo a la proporción molar Ivermectina: MMA: PETA, y la forma de iniciar la polimerización, se tienen entonces: MIP 1:4:20, MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20. El primero se refiere al polímero sintetizado utilizando un equivalente molar de ivermectina, cuatro equivalentes de MMA y 20 de PETA, el segundo indica que el polímero se sintetizó utilizando un equivalente del templado, uno de MMA y veinte de PETA, y el último se sintetizó con las mismas proporciones molares que el anterior, con la diferencia de que la polimerización se inició con luz ultravioleta, que es lo que indica la terminación (-UV).

En la primera síntesis; MIP 1:4:20, los polímeros obtenidos eran sólidos de color blanco y al molerlos se obtenía un polvo muy fino tanto del polímero impreso como el no impreso. Se procedió a remover la ivermectina y realizar estudios de liberación. Sin embargo, al realizar los estudios de liberación *in vitro* de la ivermectina, el comportamiento observado no era el esperado, como se describirá más adelante.

Se decidió entonces disminuir la cantidad de monómero funcional, buscando modificar el comportamiento de liberación. Sintetizando los polímeros tipo 1:1:20, y se agregó además la otra variante en la temperatura de síntesis, se observaron claras diferencias macroscópicas entre los polímeros obtenidos con luz UV y los sintetizados por el método tradicional, lo que se ilustra en la figuras 10 y 11.

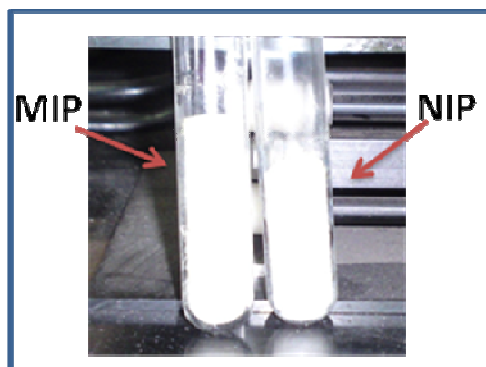


Figura 10. Polímeros Sintetizados con equivalencias 1:1:20 (Ivermectina: MMA: PETA) por el método tradicional.

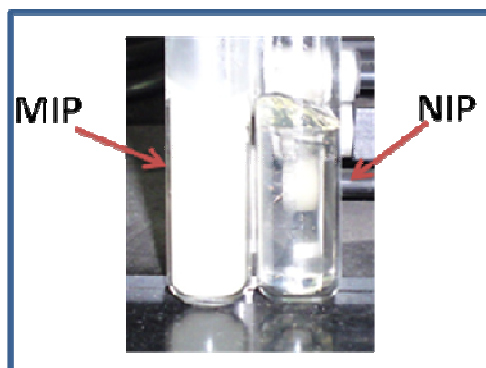


Figura 11. Polímeros Sintetizados con equivalencias 1:1:20 (Ivermectina: MMA: PETA) con luz ultravioleta.

Los polímeros obtenidos fotoquímicamente eran translúcidos, de textura suave y muy regular, mientras que los obtenidos por el método tradicional eran blancos, opacos y de textura ligeramente áspera. Este resultado puede ser producto de la micro estructura del polímero, cuando la temperatura de polimerización es mayor, se forman micro sitios capaces de dispersar la luz, de la misma forma que el MIP a baja temperatura. Sin embargo el NIP a baja temperatura es transparente lo que sugiere que no hay estos micrositios generados o bien por el desorden proveniente de la agitación térmica o por la molécula horma.

Los polvos obtenidos de la molienda de los polímeros, tanto los de UV como los del método tradicional en todos los casos impresos y no impresos resultaron en partículas más gruesas que los polvos finos obtenidos en la primera síntesis. En seguida se procedió al lavado de los polímeros para extraer la Ivermectina.

7.1.1. Remoción de Ivermectina.

La extracción de ivermectina de los polímeros impresos, es un proceso largo, puesto que es necesario desplazar la molécula horma de la matriz polimérica a través de muchas interacciones soluto-disolvente. Este proceso requirió al menos de 48 horas. Primero se colocaron los polímeros en etanol con agitación durante dos horas, después se retiró el etanol y se agregó etanol limpio con agitación durante dos horas más. Este ciclo se repitió tres veces para cada polímero. Se siguió la eliminación de ivermectina mediante espectroscopia ultravioleta, donde se determinó que el pico máximo de absorbancia de la ivermectina en 245nm de longitud. En el gráfico 1, se ilustran los espectros ultravioleta después los ciclos en agitación con etanol de los lavados de los polímeros MIP y NIP 1:4:20, del etanol limpio y de la ivermectina, éstos últimos se utilizaron para comprobar la presencia o ausencia de ivermectina en los polímeros.

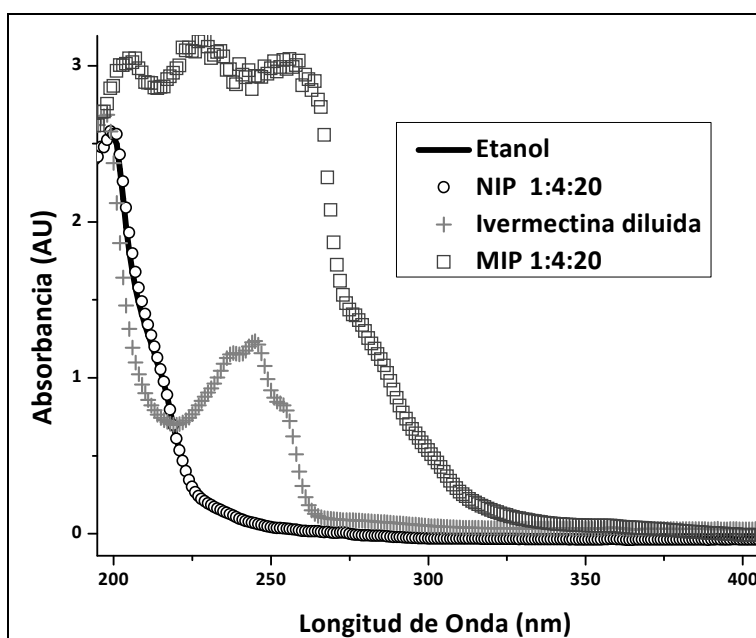


Gráfico 1. Muestras de etanol del primer lavado con etanol de los polímeros MIP y NIP 1:4:20.

Se puede observar que el polímero impreso MIP contiene altas concentraciones de ivermectina ya que el espectro se muestra saturado, mientras el espectro del polímero no impreso, NIP, se sobrepone al espectro del etanol limpio lo que indica que el polímero se encuentra libre de ivermectina. En el gráfico 2 se colocaron los espectros correspondientes al último ciclo de agitación con etanol al que se sometieron los polímeros. Se puede notar que la cantidad de ivermectina ha disminuido en el MIP ya que el espectro obtenido se asemeja al espectro de ivermectina que se utilizó para comparación.

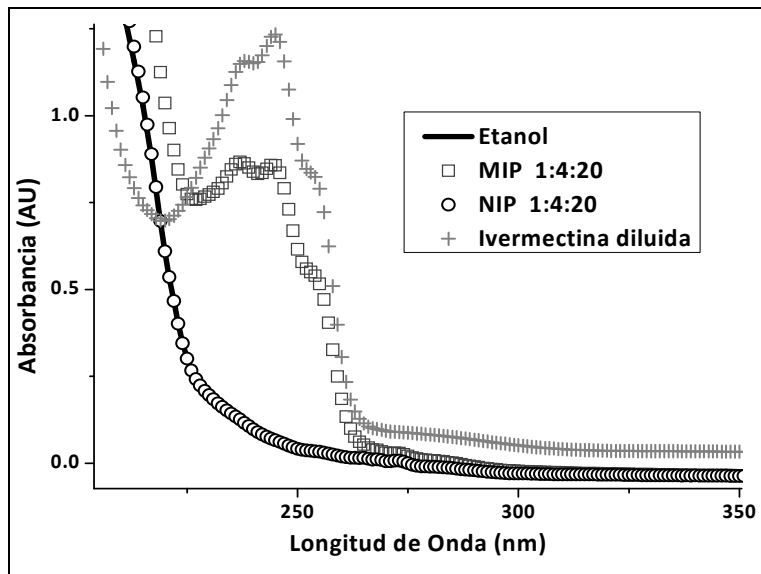


Gráfico 2. Muestras de etanol proveniente del lavado realizado después de 3 ciclos en agitación con etanol de los polímeros 1:4:20

Posteriormente con el sistema de reflujo de shoxlet se realizó un lavado de 48 horas y con ello se eliminó gran parte de la ivermectina restante en el polímero. Como se observa en el gráfico 3, muestra los espectros resultantes del lavado con el sistema shoxlet, el espectro del MIP es muy cercano a espectro de etanol. Posteriores lavados hicieron que el espectro de la disolución proveniente del lavado y del etanol se superpusieran sugiriendo que ya no hay ivermectina, ni oligómeros solubles o AIBN, cloroformo, etc.

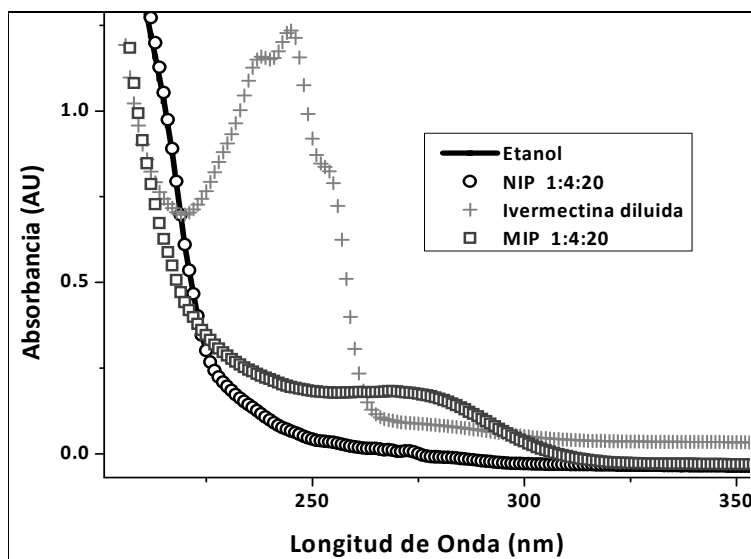


Gráfico 3. Muestras de etanol después de la extracción con Soxhlet.

Se muestran únicamente los espectros obtenidos durante el lavado de los polímeros 1:4:20, pero este procedimiento de remoción se aplicó también a los polímeros MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20, hasta eliminar la ivermectina.

7.1.2. Distribución del Tamaño de Partícula.

La determinación de la distribución de tamaño de partícula de un sólido, es importante en el área farmacéutica por estar relacionado con las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de una sustancia o forma farmacéutica. Puede afectar la liberación del fármaco en un SLM durante su administración, afecta las propiedades reológicas de polvo y como consecuencia impacta de manera importante durante la formulación y/o manufactura de las suspensiones, tabletas o emulsiones¹⁷. A continuación se presentan los resultados en forma de tabla.

Tabla 4. Distribución del Tamaño de Partícula de los polímeros molecularmente impresos.

Tipo de polímero	Promedio de tamaño de partícula (nm)	Promedio de tamaño de partícula con 20 minutos de reposo (nm)	Promedio de tamaño de partícula con 40 minutos de reposo (nm)
MIP 1:4:20	3496	106.2	385.7
NIP 1:4:20	5822	105.2	193.9
MIP 1:1:20	2955	449.6	439.7
NIP 1:1:20	1653	814	173.6
MIP-UV 1:1:20	1330	487	547.3
NIP-UV 1:1:20	2789	782.6	615.4

En la Tabla 4, los resultados indican que en el tamaño promedio de las partículas de todos los polímeros es grande, un resultado esperado después de un proceso de molienda mecánico simple. Se observa que existe gran variación en las distribuciones de tamaño de partícula pues se encuentran tamaños del orden de 100 nanómetros hasta casi 6000 nm, también es notorio como las partículas más grandes mayores a mil nanómetros sedimentan rápidamente y aquellas menores a los 900 nanómetros lo hacen más lentamente, pues las primeras son detectadas de inmediato y sedimentan tras veinte minutos de reposos mientras que las otras se observan después de veinte y de cuarenta minutos de reposo.

La diferencia más notoria se observa después de 20 minutos de reposo de las muestras, al comparar el polímero MIP 1:4:20 con su contraparte NIP 1:4:20 se observa que tienen

promedio de tamaño semejantes, así entonces no existe una diferencia notoria en la estructura de ellos.

Por otra parte, los polímeros MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 mostraron tamaños de partícula cuatro veces más grandes que los 1:4:20, lo que indica que la cantidad monómero funcional afecta la estructura del polímero, el mayor tamaño de partícula revela mayor resistencia en los polímeros impresos 1:1:20, esta mayor resistencia se puede relacionar con menor porosidad y por lo tanto menor cantidad de sitios de unión respecto a los polímeros 1:4:20. También es notorio el mayor tamaño de partícula de los NIPs tipo 1:1:20, de ello se concluye que la presencia de ivermectina (templado) también se ve reflejada en formación estructural del polímero, ya que al no tener templado, el polímero no genera sitios impresos lo que disminuye la porosidad del polímero y aumenta su resistencia al impacto. Finalmente el comportamiento de los polímeros de la variedad 1:1:20 no muestra una diferencia significativa debida a la temperatura utilizada durante la síntesis, es decir que los polímeros MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 tiene comportamientos semejantes entre sí, lo mismo que sus contrapartes no impresas; así entonces, como conclusión de este estudio, la temperatura no afecta la estructura del polímero.

Cabe aclarar que durante la molienda no se buscó un tamaño de partícula específico; y solo se realizó este proceso buscando una mejor manipulación de los polímeros. No obstante, es importante señalar que aunque los resultados de este estudio permitieron inferir diferentes cuestiones sobre la estructura de los polímeros, no son determinantes y la caracterización sobre los sitios de enlace se realiza más a detalle con los experimentos de isotermas de enlace en el punto 7.2.2 de este trabajo. Adicionalmente, se ha encontrado en la literatura que la capacidad de reconocimiento molecular de los MIPs depende fundamentalmente del centro de templado u hormado y no del tamaño de la partícula^{25, 29}.

7.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SITIOS DE RECONOCIMIENTO.

7.2.1. Espectroscopia de IR.

Para continuar con la caracterización de los polímeros, se hicieron estudios de espectroscopia de infrarrojo, con el fin de determinar la composición química del polímero y la presencia o ausencia de la ivermectina. En los cuales se pueden observar las bandas características de Ivermectina para compararlas con los espectros IR que presentan los

polímeros tanto impresos como no impresos que se encuentran libres o cargados de ivermectina.

En el gráfico 4 se ilustra el espectro infrarrojo de la ivermectina, en la cual se destacan las principales bandas que caracterizan esta molécula, que se presentan en forma de tabla a continuación.

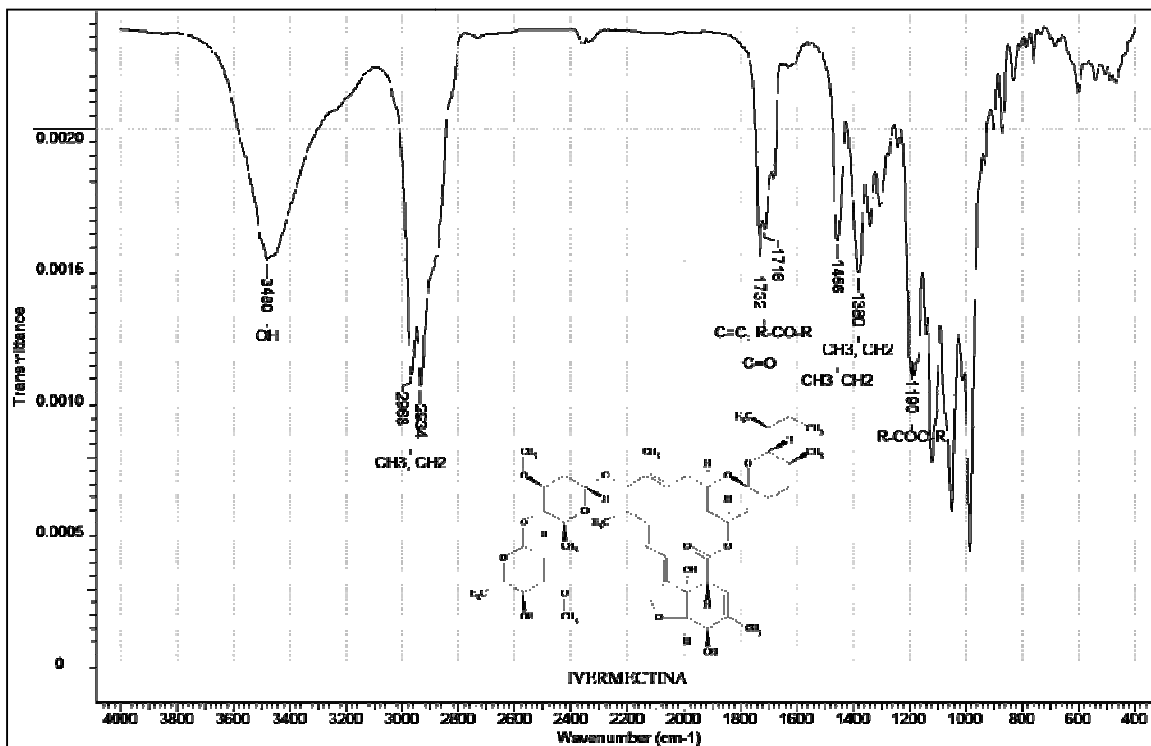


Gráfico 4. Espectro de Infrarrojo de la ivermectina.

Tabla 5. Grupos funcionales de IR de Ivermectina

Bandas Características de Ivermectina	
Grupo Funcional	Longitud de Onda (cm ⁻¹)
-CH ₃ , CH ₂	2988, 2934, 1456, 1380
-OH	3480
C=C	1732
C=O, RCOR	1716, 1190

En los gráficos 5 y 6 se superponen los espectros infrarrojos de Ivermectina con los polímeros, en el primero se encontró que la banda de absorción a 2988cm⁻¹ correspondiente a los grupos metilos y metilenos (-CH_x) así como la de 3480 correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH) de la molécula de Ivermectina, son de menor intensidad cuando ésta se encuentra contenida en el polímero y además la

Resultados y Discusión

presencia del polímero aumenta la intensidad de la banda en 1736cm^{-1} debida a la presencia de grupos carboxílicos no saturados del polímero ($\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$).

Mientras que en el gráfico 6, existen bandas a 1120 , 1050 y 986cm^{-1} que desaparecen al estar en presencia del polímero lo que también comprueba que la ivermectina está contenida en el polímero.

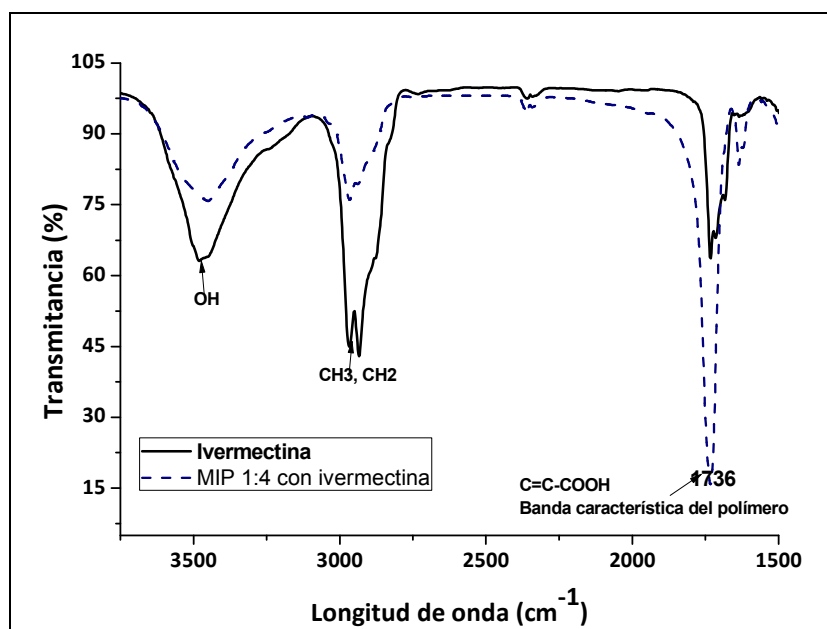


Gráfico 5. Espectros de Infrarrojo de Ivermectina y MIP 1:4:20 conteniendo ivermectina (4000 - 1500cm^{-1})

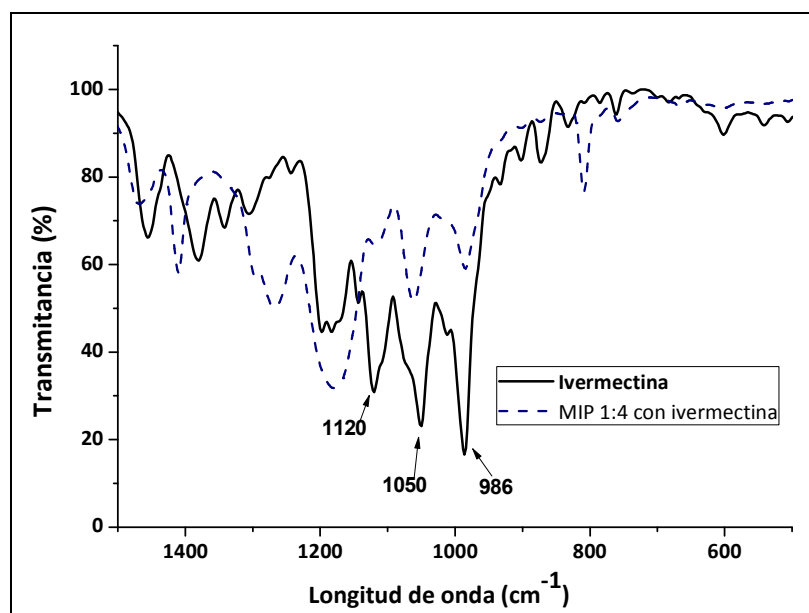


Gráfico 6. Espectros de Infrarrojo de Ivermectina y MIP 1:4:20 conteniendo ivermectina (1500 - 500cm^{-1})

El gráfico 7 ilustra los espectros del polímero MIP-UV con y sin ivermectina. La intensidad de las banda del hidroxilo (3500cm^{-1}) y metilos y metilenos ($2960, 2930\text{cm}^{-1}$), correspondientes a la ivermectina, se incrementa cuando ésta se encuentra contenida en el polímero. En cambio la intensidad en 1734cm^{-1} correspondiente al polímero, no cambia en el polímero libre o cargado de ivermectina. Esto indica la interacción existente entre el polímero y su templado.

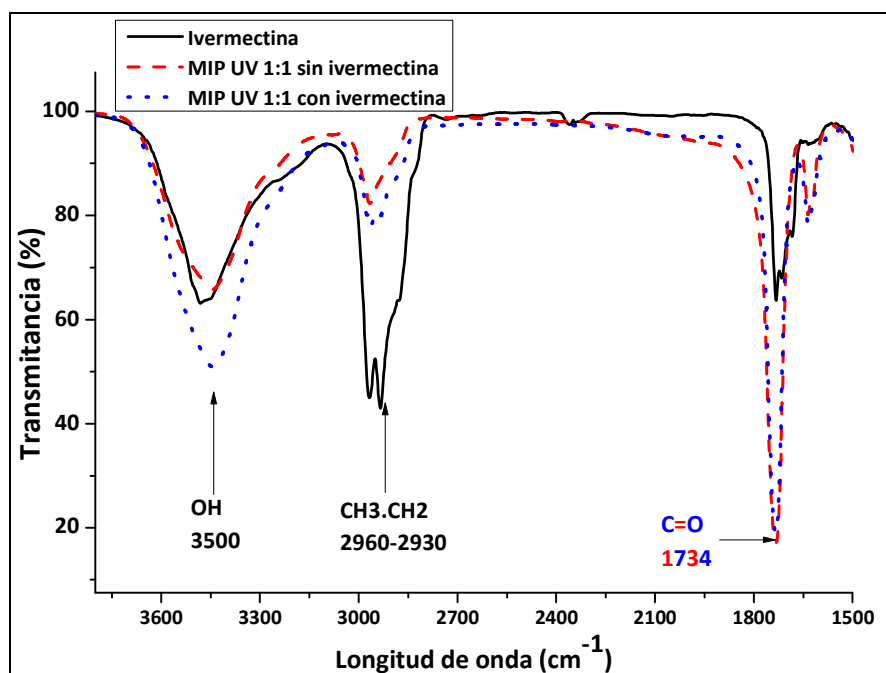


Gráfico 7. Comparación de Espectros IR para MIP-UV 1:1:20 libre y MIP-UV 1:1:20 cargado de ivermectina.

En el gráfico 8 se colocaron los espectros de los diferentes polímeros comparados con la ivermectina divididos en dos segmentos de longitud con el fin de mejorar la claridad de los espectros sobrepuestos. En la primera parte del espectro; que abarca desde 4000 hasta 1500nm^{-1} , en la longitud del oxidrilo a 3480nm^{-1} puede notarse que los polímeros MIP 1:1 y MIP-UV 1:1 tienen intensidades muy parecidas entre sí mientras que difieren un poco de la intensidad del polímero MIP 1:4. El mismo caso se presentan en las longitudes de 2988 y 2934cm^{-1} , la intensidad de la señal es menor para el MIP 1:4 que para los MIPs 1:1 y MIP-UV 1:1.

Las bandas anteriormente señaladas dependen de la presencia de ivermectina ya que la banda de 1734cm^{-1} cuya intensidad depende principalmente a los polímeros, se superpone con la misma intensidad y forma para todos los polímeros. Así que del análisis

de la primera parte se deduce que la interacción entre el templado y los polímeros MIP 1:1 y MIP-UV 1:1 es semejante mientras que el polímeros MIP 1:4 se comporta de manera diferente al interactuar con la ivermectina, lo que se ve reflejado en las diferencias que tienen las intensidades de las bandas de 3480 , 2988 y 2934cm^{-1} del MIP 1:4 y los otros dos.

En la parte del espectro que abarca longitudes de 1600 a 400cm^{-1} , no se aprecia una diferencia considerable entre los polímeros. Lo destacable de esta parte es que todos los polímeros enmascaran las bandas de la ivermectina a 1120 , 1050 y 986cm^{-1}

El análisis de los espectros de infrarrojo demuestra que la ivermectina interacciona con los polímeros y que es contenida dentro de los polímeros impresos, también muestra que ésta interacción se modifica principalmente por la proporción molar de MMA:ivermectina, que marcó diferencias notorias en los espectros MIP 1:4 respecto a los MIP 1:1 y MIP-UV 1:1. Los espectros del MIP 1:1 y MIP-UV lucen similares, este hecho sugiere que el cambio de temperatura durante la síntesis del polímero no modifica profusamente la interacción polímero-ivermectina. Las interacciones entre la ivermectina y los sitios de unión de los polímeros se detallarán en las siguientes secciones correspondientes a la absorción y liberación de ivermectina.

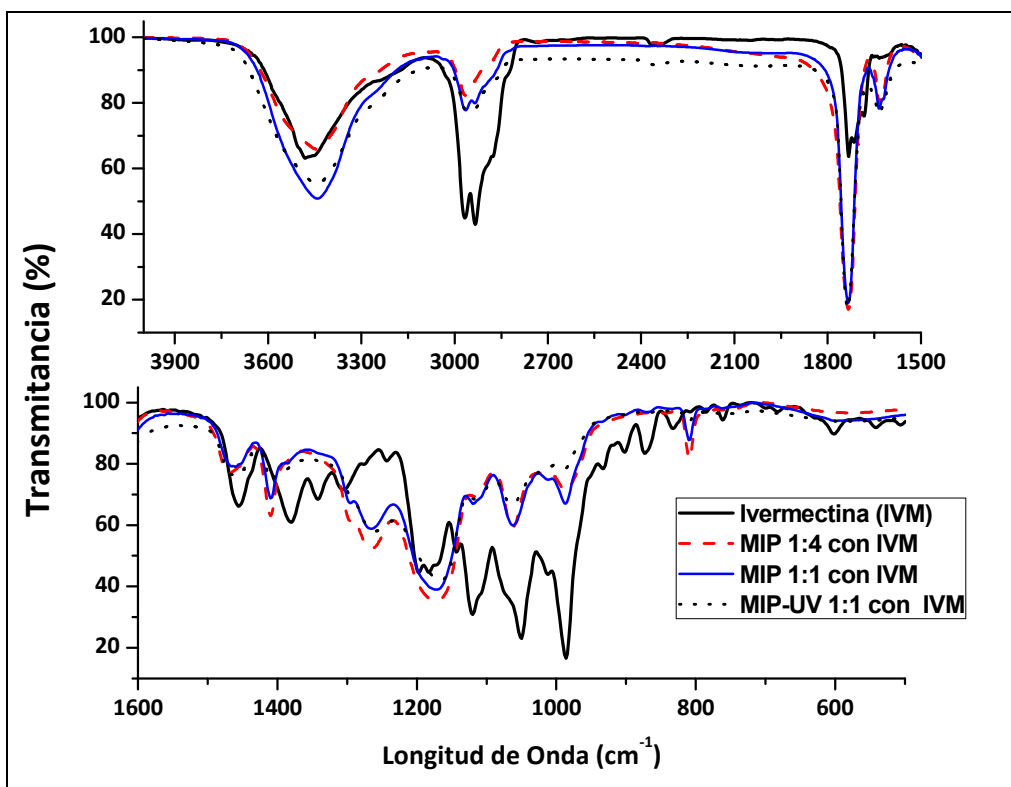


Gráfico 8. Espectros de IR de la ivermectina y de los polímeros MIP 1:4:20, MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 con ivermectina.

7.2.2. Isotermas de Adsorción.

La caracterización de los sitios de unión mediante isotermas de adsorción indica la eficiencia del proceso de impresión sobre los polímeros lo que es trascendental en la afinidad del polímero hacia su templado. Además, los parámetros obtenidos de los ajustes en los modelos contribuirán en la selección del tipo de polímero ideal para el desarrollo del sistema de liberación prolongada.

7.2.2.1. Selección del Modelo de Isotherma de Adsorción.

Después haber realizado los experimentos necesarios y obtener los datos experimentales, se seleccionaron los modelos de isoterma de adsorción que se ajustaron a los datos obtenidos. Existen diferentes maneras de analizar el ajuste de datos a un modelo seleccionado, siendo la más simple la linealización sobre todo para modelos que tienen dos parámetros. Y para aquellos modelos que tienen tres o más parámetros, es conveniente utilizar métodos no lineales. Para evaluar la bondad del ajuste, es común emplear funciones de error. El parámetro habitualmente usado es la función F de Fisher, definida por:

$$F_{cal} = \frac{n-l}{n-1} \frac{\sum_{i=1}^n (B_{exp,i} - \bar{B}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (B_{exp,i} - \bar{B}_{calc,i})^2}$$

Donde n es el número de puntos experimentales $B_{exp,i}$ son los puntos experimentales $B_{calc,i}$ son los valores calculados, \bar{B}_i y $\bar{B}_{calc,i}$ son el promedio de los resultados experimentales y calculados respectivamente, y l es el número de parámetros ajustables en el modelo de isoterma. En este caso el modelo que mejor se ajusta es aquel en el cual la F calculada tiene el valor más grande³⁴.

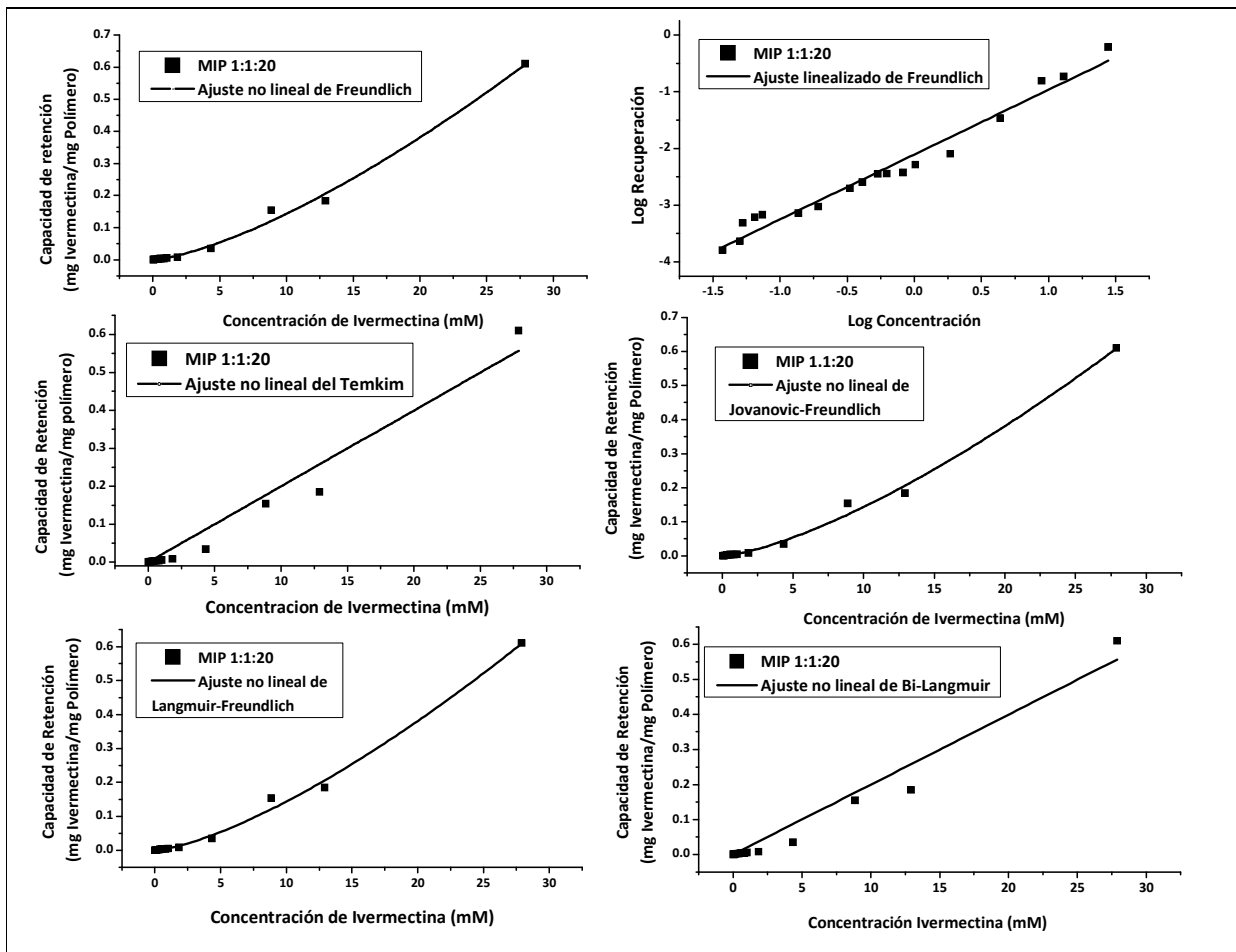


Gráfico 9. Ajustes de los diferentes modelos de isotermas de adsorción para el polímero MIP 1:1:20.

El gráfico 9 muestra los resultados que describen el fenómeno de unión del polímero MIP 1:1:20, se graficó la capacidad de retención (mg Ivermectina recuperada/mg de polímero) contra la concentración total de ivermectina utilizada (mM). Se efectuaron los ajustes de

los diferentes modelos de isothermas. A partir de éstos fueron calculados los valores estadísticos: Coeficiente de correlación al cuadrado (R^2), F de Fisher y Chi cuadrada (X^2).

Ya que el modelo de la isoterma de Freundlich cuenta con dos parámetros en la ecuación los parámetros pueden calcularse linealizando los datos. Para linealizar, se gráfica el logaritmo de la capacidad de retención contra el logaritmo de la concentración de ivermectina como se muestra en la figura 12, por lo que se calcularon los parámetros estadísticos del modelo no linealizado y linealizado de este modelo.

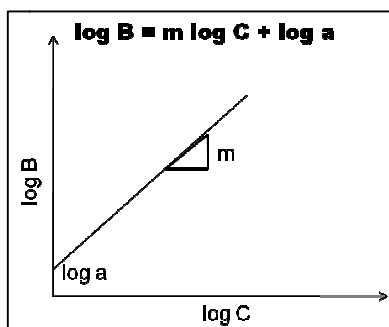


Figura 12. Modelo Linealizado de Freundlich

En la tabla 6 se puede ver que el modelo híbrido de Langmuir-Freundlich presenta los mejores coeficientes de correlación, pues son cercanos a la unidad. Los valores de F para éste modelo son los de mayor magnitud y adicionalmente se puede ver que estos modelos tienen los valores menores de Xi^2 . Los parámetros estadísticos indican que el modelo de Langmuir-Freundlich es el que mejor describe el comportamiento del polímero MIP 1:1:20 en la adsorción de ivermectina.

Tabla 6. Parámetros de ajuste a la isoterma del MIP 1:1:20 para cada modelo probado.

MIP 1:1:20	R^2	F	Xi^2
Temkin	0.9650	542.3505	7.71E-04
Langmuir Bi	0.9603	159.5248	8.74E-04
Lamngmuir- Freundlich	0.9951	2008.7623	1.07E-04
Jovanovic-Freundlich	0.9951	2008.5793	1.07E-04
Freundlich	0.9951	2008.4659	1.07E-04
Freundlich Linealizado	0.9693	539.21191	---

En la tabla 7 se muestran los ajustes realizados al polímero MIP-UV 1:1:20. Los valores estadísticos de R^2 , F y X^2 , muestran tendencias parecidas al polímero anterior; MIP 1:1:20. Los mejores ajustes son con los modelos de Freundlich, Jovanovic-Freundlich y Langmuir-Freundlich, donde éste último muestra una bondad de ajuste mucho mayor que

los dos anteriores, ya que la F de Fisher para este modelo es más de cuatro veces mayor que los otros modelos, la X_i^2 es diez veces menor y el coeficiente de correlación es el más cercano a la unidad. Por lo que se concluye que el comportamiento de las isothermas de los polímeros tipo 1:1:20 pueden ser descritas por el modelo de Langmuir-Freundlich.

Tabla 7. Parámetros de ajuste a la isoterma del MIP-UV 1:1:20 para cada modelo probado.

MIP-UV 1:1:20	R ²	F	X _i ²
Temkin	0.9888	887.4375	3.24 x10 ⁻⁴
Langmuir Bi	0.9872	388.1899	3.70 x10 ⁻⁴
Lamngmuir- Freundlich	0.9998	43320.276	3.43 x10 ⁻⁵
Jovanovic-Freundlich	0.9889	943.5304	3.10 x10 ⁻⁴
Freundlich	0.9888	887.7432	3.29 x10 ⁻⁴
Freundlich Linealizado	0.9650	469.3224	---

Esta prueba pone en evidencia que los comportamientos de adsorción de estos polímeros siguen el mismo modelo ya que las isothermas de los dos polímeros MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 ajustan de manera similar en los modelos probados. Este resultado es de esperarse, ya que el modelo de Langmuir Freundlich está basado en el fenómeno de adsorción en materiales con posibilidad de superficies heterogéneas con baja o alta afinidad y es por esta razón que en la literatura se encuentra que es el modelo más empleado para los MIPs.

Se prosiguió con la selección del modelo de isoterma para el polímero MIP 1:4:20. Los parámetros obtenidos muestran que el mejor ajuste de nuevo es con el modelo de Langmuir-Freundlich, sin embargo no es un ajuste tan bueno como lo fue para los otros polímeros, el valor de X^2 es de la misma magnitud que los valores obtenidos anteriormente, y también el coeficiente R² está más alejado de uno. Finalmente el valor estadístico de F, que es el parámetro al cual se le está dando mayor jerarquía en la selección del modelo, es un valor muy bajo comparado con los valores calculados en los otros polímeros, pero puede considerarse admisible ya que de los modelos utilizados es el que tiene mayor bondad de ajuste.

Tabla 8. Parámetros de ajuste a la isoterma del MIP 1:4:20 para cada modelo.

MIP 1:4:20	R ²	F	X _i ²
Temkin	0.8982	82.7751	7.67 x10 ⁻⁴
Langmuir Bi	0.87281	33.1110	9.58 x10 ⁻⁴
Lamngmuir- Freundlich	0.9526	122.6265	3.57 x10 ⁻⁴
Jovanovic-Freundlich	0.9280	119.0633	5.42 x10 ⁻⁴
Freundlich	0.9252	119.0620	5.42 x10 ⁻⁴
Freundlich Linealizado	0.9469	54.5448	---

7.2.2.2. Análisis de Isoterma de Freundlich.

Se realizó al ajuste de datos al modelo de Freundlich linealizado ya que el ajuste con datos linealizados resulta más sencillo e incluso puede servir de guía para los ajustes con el modelo de Langmuir-Freundlich.

Después de ajustar el modelo de Freundlich a los diferentes polímeros, se colocaron los parámetros obtenidos en la tabla 9. Para verificar la bondad de ajuste, se analizan los coeficientes de correlación. El modelo no muestra un buen ajuste a los datos del polímero MIP 1:4:20, también se observa que tampoco tiene un buen ajuste para los polímeros no impresos NIPs 1:4:20, NIP 1:1:20 y tampoco NIP-UV 1:1:20. Una de las razones por las que el modelo no ajusta debe ser porque una de las condiciones para aplicar el modelo de Langmuir; es tener sistemas de adsorción homogéneos y energéticamente equivalentes (como se menciona en la sección 3.3.3.1.1), el hecho de que el modelo no se ajuste a éstos polímeros puede ser indicativo de que se trata de sistemas heterogéneos.

La constante promedio de la afinidad (K_0), indica la fuerza de unión que presenta el polímero por la ivermectina. Se puede obtener a partir de la expresión³⁴: $K_0 = a^{1/m}$. Los polímeros sintetizados con cuatro equivalentes del monómero funcional muestran mayor afinidad que los sintetizados con un equivalente de monómero. Teóricamente, los polímeros impresos MIP's deben mostrar mayor afinidad que los NIP's; esta tendencia la muestran los polímeros tipo 1:1:20 y es posible observar que los valores de las afinidades de los polímeros impresos MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 son semejantes entre sí, sin embargo, los valores de K_0 que indican la fuerza de unión de la ivermectina al polímero son mayores, este resultado está acorde con algunos antecedentes de la literatura para MIPs con otros templados, además resulta lógico, a una más baja temperatura de polimerización la estructura del complejo resultante de la preorganización entre los monómeros funcionales y la ivermectina está mejor definido, dando como resultado sitios mejor moldeados.

Tabla 9. Constantes obtenidas a partir del modelo de isoterma de Freundlich.

Tipo de Polímero	a	m	K_0	R^2
MIP 1:4:20	0.0243	1.0350	0.0276	0.9252
NIP 1:4:20	0.0201	1.3953	0.0609	0.8947
MIP 1:1:20	0.0078	1.1416	0.0143	0.9694
NIP 1:1:20	0.0035	1.2047	0.0092	0.9572
MIP UV 1:1:20	0.0098	1.1427	0.0174	0.9650
NIP UV 1:1:20	0.0037	1.1261	0.0069	0.8836

La tabla 9 también indica que los polímeros tipo 1:4:20 mostraron mayor afinidad que los del tipo 1:1:20, debido a que los primeros son capaces de presentar más interacciones con la ivermectina. Un caso interesante se presentó con el polímero no-impreso, NIP 1:4:20, que mostró mayor afinidad que el polímero impreso, MIP 1:4:20. No obstante la mayor afinidad mostrada por el polímero no impreso NIP 1:4:20, al analizar los ajustes lineales en el gráfico 10 se puede observar como las líneas de ajuste se entrecruzan; esto indica que ha concentraciones más elevadas el NIP 1:4:20 presenta mayor afinidad y en cambio en concentraciones bajas el polímero impreso MIP 1:4:20 muestra mayor afinidad. Cabe señalar que mientras menor se la concentración de templado, los sitios capaces de interactuar con la ivermectina son más específicos y de mayor afinidad. Este análisis indica que el NIP 1:4:20 presenta gran cantidad de interacciones superficiales que se manifiestan en altas concentraciones de ivermectina; en cambio el polímero MIP 1:4:20 mostró sitios mejor definidos al presentar mayor afinidad en concentraciones muy diluidas.

Esto quiere decir que el MIP tiene sitios de reconocimiento molecular más específico aunque no necesariamente tiene mayor número de sitios totales en comparación con el NIP. Estructuralmente se puede interpretar como que los carboxilatos capaces de interactuar fuertemente con los grupos $-OH$ de la ivermectina están orientados libremente en la superficie del polímero aunque no formando sitios estructuralmente moldeados.

En general, los resultados advierten que, al tener una mayor proporción de equivalentes molares de MMA, los polímeros 1:4:20 que no estén moldeados (NIP), mostrarán una gran cantidad de interacciones a altas concentraciones pero poco específicas, mientras tanto a bajas concentraciones aumenta de forma importante el número de interacciones específicas, es decir, cuando se moldea el polímero hay un mayor número de sitios con mayor capacidad de reconocimiento molecular por la ivermectina.

Estos resultados son similares a los descritos por Hiratani y colaboradores⁴², que sintetizaron polímeros de impresión para la liberación controlada de timolol; concluyen que en los polímeros impresos, más equivalentes de MMA forman parte del sitio de unión y en consecuencia se forman menos cavidades por lo que la capacidad de recuperación se ve disminuida pero la afinidad de cada sitio es mayor comparada con los sitios de los polímeros no impresos.

El análisis de los gráficos del modelo de linealizado de Freundlich ilustrados en la gráfica 10, para los polímeros del tipo 1:1:20, confirma las afinidades mostradas en la tabla anterior. Ambos polímeros impresos, MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20; muestran mayor afinidad que sus contrapartes no impresas, y a diferencia del polímero 1:4:20, muestran mayor recuperación en todo el intervalo de las concentraciones trabajadas.

En general, los polímeros tipo 1:4:20 que tienen mayor cantidad de MMA tienen mayor promedio de afinidad que los tipo 1:1:20, debido a su capacidad para tener más interacciones con la ivermectina.

Finalmente del análisis del modelo de Langmuir aplicado a las isothermas se tiene que; los polímeros MIP 1:4:20, NIP 1:4:20, NIP 1:1:20 y NIP-UV 1:1:20 podrían ser sistemas heterogéneos, que el efecto de impresión aumenta la afinidad y uniformidad de los sitios aunque también disminuye la cantidad de los mismos, también se concluye que una mayor cantidad de MMA aumenta la cantidad de interacciones pero también aumenta la diversidad de sitios de los mismos.

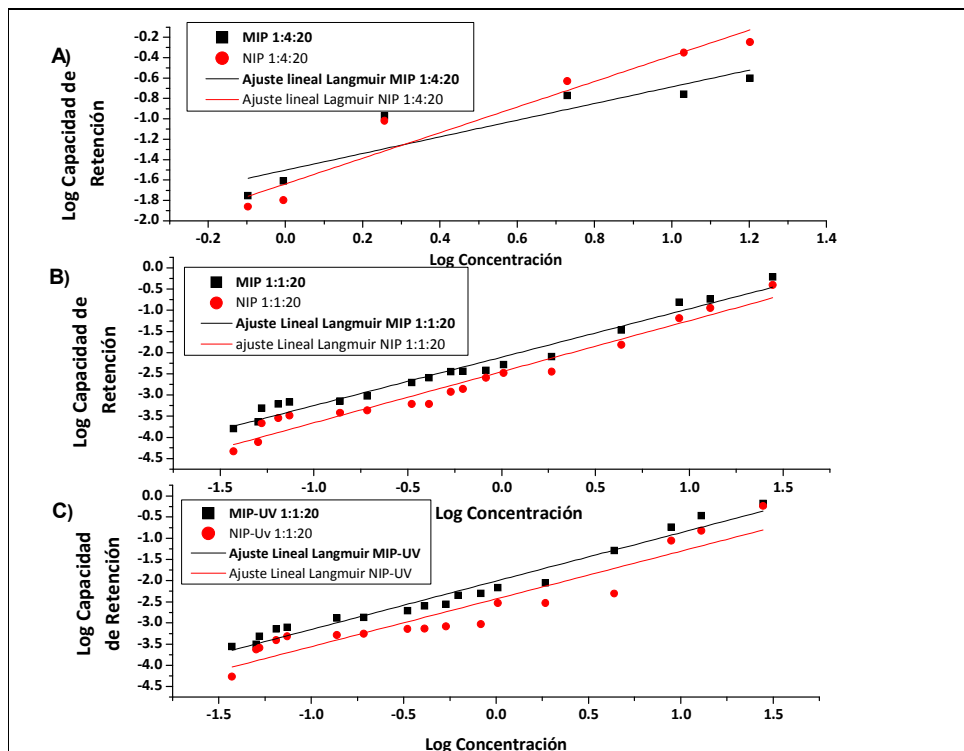


Gráfico 10. Ajustes de Freundlich en los diferentes polímeros. A) Polímeros MIP 1:4:20 y NIP 1:4:20. B) Polímeros MIP 1:1:20 y NIP 1:1:20 y C) Polímeros MIP-UV 1:1:20 y NIP-UV 1:1:20

7.2.2.3. *Análisis de Isotherma de Langmuir-Freundlich.*

Una de las ventajas que presenta este modelo híbrido es; que es capaz de describir comportamientos en concentraciones muy diluidas y saturadas del templado en forma conjunta o por separado⁴³, además de ser aplicable a superficies homogéneas y heterogéneas³⁴. Estas propiedades ayudarán en la descripción de las diferentes variedades de sitios impresas en los polímeros. Asimismo durante la selección del modelo, ha sido precisamente el modelo de Langmuir-Freundlich el que mostró mejores parámetros estadísticos: F, X^2 y R^2 .

Con el propósito de profundizar el análisis la isoterma, se llevaron a cabo ajustes del modelo por secciones de acuerdo a la concentración de ivermectina. Se plantean tres zonas de ajuste: concentraciones bajas, concentraciones medias y altas.

En la tabla 10, se muestran los parámetros derivados del ajuste de datos en altas concentraciones, en el intervalo de concentraciones altas se toman en cuenta concentraciones de ivermectina desde; 1mM, hasta 25mM. Cabe recordar que en esta zona se observan principalmente los sitios cuyo acceso es más fácil (sitios superficiales) y que generalmente son los de menor afinidad en el polímero en cuestión.

En cuestión de los polímeros MIP 1:4 y NIP 1:4, se observa que las constantes de afinidad (K_o) son de la misma magnitud, ligeramente mayor para el MIP lo que demuestra la presencia de sitios moldeados en el polímero impreso. Sin embargo, la cantidad de sitios (N) del NIP es mayor que los sitios del MIP, así es que la capacidad de recuperación se incrementa por la cantidad de MMA superficial y esto explica el hecho de que el polímero NIP retenga mayor cantidad de ivermectina en altas concentraciones a pesar de que las interacciones sean de menor afinidad, como se muestra en la gráfica 11.

El índice de heterogeneidad (m) sugiere que si la superficie de los polímeros es homogénea ya que para el MIP 1:4 y NIP 1:4 se tienen valores cercanos a 1 para el índice de heterogeneidad, aunque para asegurar esto categóricamente, lo más conveniente es tener más puntos experimentales, entonces éste parámetro se revisará posteriormente con un ajuste general con todos los datos, con lo que se determinará el grado de heterogeneidad de éste y los demás polímeros.

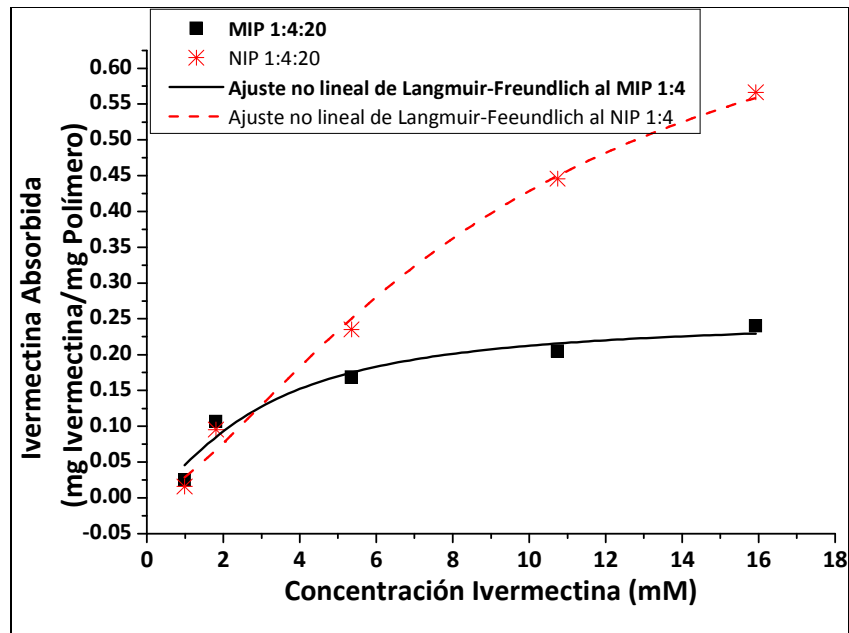


Gráfico 11. Ajuste no lineal del modelo de Langmuir-Freundlich sobre las isotermas MIP 1:4:20 y NIP 1:4:20 en altas concentraciones de ivermectina.

En el caso de los polímeros MIP 1:1:20 y NIP 1:1:20 se observa una mayor densidad de sitios en el polímero no impreso, pero el MIP 1:1 tiene más afinidad que el polímero no impreso. En este caso la cantidad de monómero funcional (MMA) es la mínima para lograr la impresión por lo tanto la captación de ivermectina será más influenciada por la afinidad de los sitios que por la cantidad de ellos, es por eso que; al contrario de los MIP y NIP 1:4, en los polímeros tipo 1:1 el polímero impreso recupera más ivermectina que su respectivo NIP, como se observa en el gráfico 11.

La comparación del polímero MIP-UV 1:1 con el NIP-UV 1:1 muestra la misma tendencia que los MIP y NIP 1:1, es decir, el NIP-UV tiene mayor cantidad de sitios que interaccionan con la ivermectina pero las interacciones son más débiles que el MIP-UV por que éste último fue moldeado, lo que formó menos sitios, fenómeno que ayuda a la mayor capacidad de recuperación por parte del MIP-UV.

Al confrontar las afinidades y la cantidad de sitios de los polímeros impresos con un equivalente, es decir MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20, se tiene que, el sintetizado con calor (MIP 1:1:20) tiene mayor cantidad de sitios que el sintetizado en baja temperatura (MIP-UV 1:1:20), pero al mismo tiempo la afinidad del MIP-UV es superior a la del MIP 1:1:20.

Aunque las diferencias de los parámetros N y K_o entre estos polímeros son mínimas, se ve reflejado ligeramente el efecto de la temperatura.

En términos generales los MIP (polimerizados con calor) tienen más sitios pero de menor fuerza, este fenómeno es lógico, ya que lo que genera sitios de estructura más parecida a la molécula molde es que la estructura del complejo preorganizado antes de la polimerización este bien definida y esto es mayor a más baja temperatura, por lo que los polímeros, polimerizados con UV, a 4°C, cumplirán este requisito. La menor temperatura en la síntesis también provoca una menor área o que los poros en el polímero sean más pequeños, por esta razón el número de sitios disminuye. No obstante, la diferencia en el reconocimiento del templado debida al cambio de temperatura de síntesis, no es considerable; por lo menos en condiciones de saturación.

Hay que señalar que el valor de N no es la cantidad física de sitios en toda la superficie del polímero, en realidad se refiere a la densidad de sitios de unión. Eso quiere decir que la cantidad de sitios por área en la superficie del polímero es baja comparada con la densidad de los polímeros tipo 1:1, pero son sitios de mayor afinidad por que tienen mayor cantidad de MMA en cada cavidad capaz de interactuar con la ivermectina. Otro hecho que se debe destacar es la forma de las isothermas que es semejante entre los polímeros MIP 1:1 y MIP-UV 1:1 pero estas difieren del MIP 1:4, con esto se evidencia el impacto que tiene la proporción molecular del monómero funcional con el templado en el fenómeno de reconocimiento molecular, como se ilustra en el gráfico 12.

Tabla 10. Parámetros obtenidos de los ajustes no lineales con el modelo de Langmuir-Freundlich en altas concentraciones.

Isoterma de Langmuir-Freundlich				
Tipo de Polímero	N	Ko	m	R²
MIP 1:4:20	0.252	3.39×10^{-1}	1.38	0.9188
NIP 1:4:20	0.806	1.09×10^{-1}	1.36	0.9920
MIP 1:1:20	40.324	1.89×10^{-3}	1.42	0.9919
NIP 1:1:20	103.375	8.06×10^{-5}	1.30	0.9836
MIP UV 1:1:20	20.723	2.31×10^{-3}	1.22	0.9952
NIP UV 1:1:20	92.204	2.64×10^{-4}	1.51	0.9925

La tabla 11 muestra los parámetros derivados del ajuste del modelo de Langmuir-Freundlich sobre los datos de isoterma en concentraciones medias de ivermectina que abarca desde 0.1mM hasta 1mM de ivermectina. En esta tabla se puede ver que la densidad de unión (N) de los polímeros 1:4:20 (MIP y NIP) ha aumentado en comparación

al parámetro calculado en altas concentraciones, y que las constantes de afinidad (K_o) mantienen magnitudes semejantes a las calculadas anteriormente. Estos valores indican sitios semejantes a los encontrados en condiciones de saturación.

La menor cantidad de ivermectina presente en concentraciones medias favorece la manifestación de los sitios de reconocimiento de alta afinidad con lo que debe manifestarse mayor cantidad de este tipo de sitios, que explica el aumento la densidad de sitios en los polímeros MIP y NIP 1:4.

El coeficiente de correlación (R^2) para los polímeros MIP y NIP 1:4:20 indica un buen ajuste del modelo sobre los datos utilizados. No obstante, los valores del índice de heterogeneidad (m) están muy alejados del intervalo indicado en la bibliografía antes citada que señala que va de cero a uno³⁴. Como se mencionó al inicio de esta sección, la determinación de este parámetro debe ser afectada por la cantidad de puntos experimentales, así entonces una mayor cantidad de puntos experimentales utilizando todos los puntos de las concentraciones de trabajo, permitirá una mejor aproximación de este valor. Y este caso se aplica para todos los polímeros.

Se puede notar que la constante del polímero MIP 1:1:20 aumenta en un orden de tres veces comparada con la anterior, pero al mismo tiempo la cantidad de sitios disminuye en mayor medida que la constante, esto es un indicativo de que los sitios en este polímero son similares en la mayor parte de la superficie del polímero, pero su densidad es baja a pesar de ello existe también un cantidad considerable de sitios de menor afinidad a la ivermectina debido a la mínima proporción de MMA utilizada. Al comparar el MIP 1:1 con el correspondiente NIP 1:1, se puede apreciar que el NIP 1:1 tiene mayor densidad de sitios, pero que éstos son de menor afinidad, hecho que corresponde al proceso de impresión, es decir menor cantidad de sitios pero de mayor afinidad en el polímero impreso.

En el caso del polímero MIP-UV 1:1, mantiene la misma afinidad, la densidad de sitios de unión disminuye, porque existe menos ivermectina en el medio. Con lo que se infiere la homogeneidad en la superficie del MIP-UV 1:1, en este caso los valores mostrados permiten apreciar que la síntesis a bajas temperaturas origina superficies más homogéneas como ya que la constante de asociación no cambia respecto a la cantidad

de ivermectina. El NIP-UV 1:1, por su parte, se ve disminuido tanto la cantidad de enlaces como la afinidad de ellos indicando una superficie de adsorción pobre en sitios de enlace. Adicionalmente es importante notar que en este intervalo de concentraciones, donde la fuerza de los sitios es mayor, la diferencia entre MIP y NIP es notoriamente más clara, lo que indica que el fenómeno de reconocimiento molecular en los MIPs es evidente.

Tabla 11. Parámetros obtenidos de los ajustes no lineales con el modelo de Langmuir-Freundlich en concentraciones medias.

Tipo de Polímero	N	Ko	R ²
MIP 1:4:20	1.1676	2.02 x10 ⁻¹	0.97227
NIP 1:4:20	2.5278	1.59 x10 ⁻¹	0.98131
MIP 1:1:20	0.3095	6.98 x10 ⁻³	0.90193
NIP 1:1:20	1.2564	1.06 x10 ⁻³	0.94074
MIP UV 1:1:20	2.7372	2.07 x10 ⁻³	0.9577
NIP UV 1:1:20	0.0178	4.45 x10 ⁻⁴	0.97696

Finalmente en el gráfico 12, es posible apreciar que las isotermas del MIP 1:1 y del MIP-UV 1:1 son muy parecidas además ambos recuperan más que sus respectivos NIP's demostrando su mayor afinidad. También se colocaron las isotermas de los polímeros tipo 1:4, en este gráfico se observa que el comportamiento de las isotermas del MIP 1:4 y el NIP 1:4 sigue la misma tendencia y en este intervalo de concentraciones el MIP 1:4 recupera más ivermectina que su respectivo NIP 1:4, aunque la diferencia no es tan marcada como en los polímeros tipo 1:1, ya que la mayor cantidad de MMA en la superficie aumenta la capacidad de adsorción del polímero incluso si éste no está impreso.

Resultados y Discusión

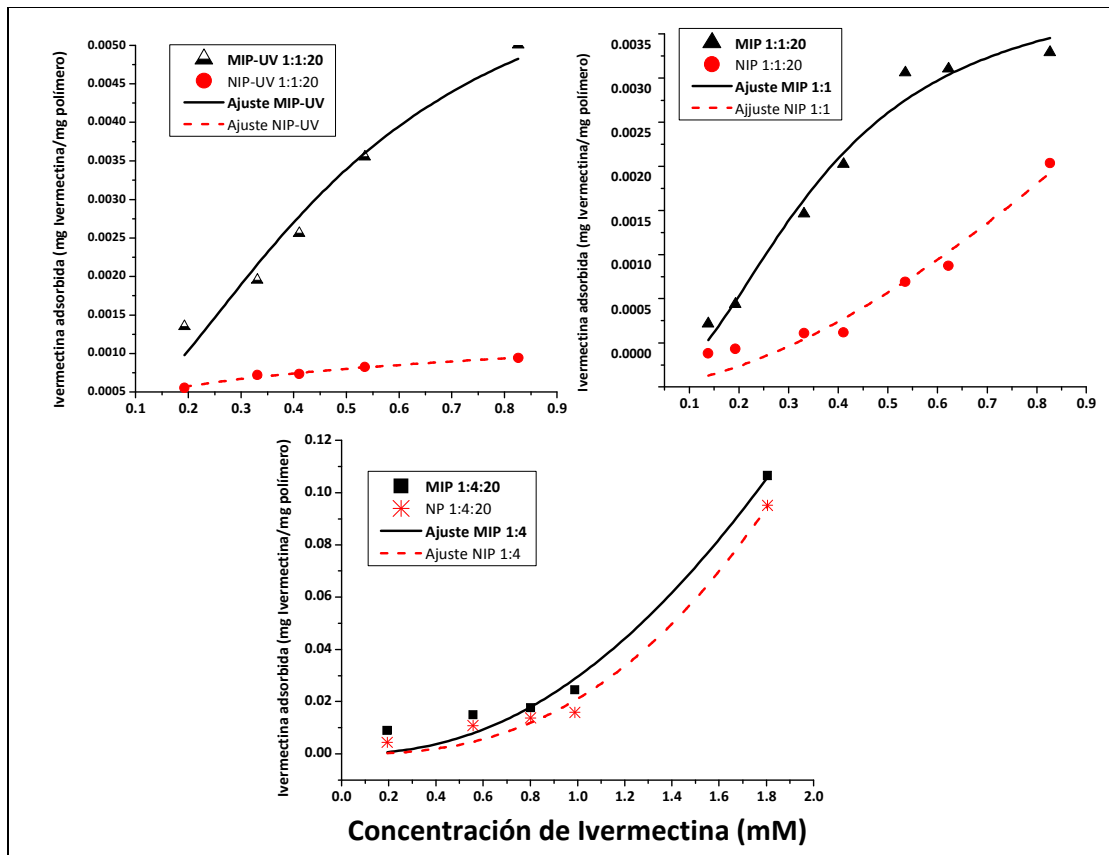


Gráfico 12. Ajustes no lineales del modelo de Langmuir-Freundlich sobre las isotermas de los polímeros en concentraciones medias.

Finalmente en la tabla 12 se muestran los parámetros derivados de a las isotermas en bajas concentraciones que abarcan desde 0.02 hasta 0.1mM de ivermectina para los polímeros tipo 1:1 y desde 0.1 hasta 0.6 para los polímeros 1:4, debido a que el tamaño de partícula de los polímeros MIP 1:4 y NIP 1:4 dificultó la detección de ivermectina en concentraciones menores a 0.1 ya que interferían la detección de ivermectina en el espectrofotómetro uv-vis utilizado.

El coeficiente de correlación indica un ajuste aceptable para los polímeros tipo 1:1. Cabe señalar que en el caso de los polímeros MIP 1:4 y NIP 1:4, no se pudo detectar la ivermectina; esto sugiere que existe una afinidad tal que adsorbe toda la ivermectina de la concentración, haciendo imposible su detección. Este resultado confirma el aumento de la afinidad debida a la mayor cantidad de monómero funcional. Las afinidades resultantes del ajuste en los polímeros tipo 1:1 (de calor y ultravioleta) en bajas concentraciones son muy elevadas en comparación con las encontradas en concentraciones mayores y de la

misma forma la cantidad de sitios disminuye, hecho que confirma la relación inversamente proporcional entre la cantidad de sitios y la afinidad.

Tabla 12. Parámetros obtenidos de los ajustes no lineales con el modelo de Langmuir-Freundlich en concentraciones bajas.

Tipo de Polímero	N	Ko	R ²
MIP 1:1:20	0.0007	21.29	0.99838
NIP 1:1:20	0.0003	20.33	0.99279
MIP UV 1:1:20	0.0008	24.45	0.98143
NIP UV 1:1:20	0.0006	17.90	0.98903

La principal afirmación derivada del análisis de isothermas es que dependiendo de la estequiometría ivermectina-monomero funcional la afinidad del templado por el polímero así como las constantes de unión, es posible modular el fenómeno de reconocimiento molecular del polímero.

Por último, se realizó un ajuste del modelo tomando los datos de todas las concentraciones de trabajo y el índice de heterogeneidad derivado de éste ajuste se promedió con los valores encontrados en todos los ajustes para cada polímero. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Índice de heterogeneidad promedio.

Tipo de Polímero	m (promedio)
MIP 1:4:20	1.72
NIP 1:4:20	1.74
MIP 1:1:20	1.35
NIP 1:1:20	1.44
MIP UV 1:1:20	1.10
NIP UV 1:1:20	1.20

La tabla 13 señala que todos los polímeros resultan ser sistemas homogéneos, ya que alcanzan valores de uno e incluso lo superan ligeramente.

7.3. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN.

Después de caracterizar los sitios de los polímeros y determinar su interacción con la ivermectina, se procedió a realizar estudios de liberación *in vitro* en etanol, medio en el que la ivermectina se disuelve fácilmente, que servirá para averiguar el mecanismo de liberación de la ivermectina desde la matriz de los polímeros molecularmente impresos.

Se colocaron 20mg de polímero cargado de ivermectina en 25mL de etanol a 37° y se tomaban 0.5mL de esta disolución y la determinación de ivermectina de cada tiempo muestreado se siguió mediante espectroscopia UV-Vis.

7.3.1. Cargado de Polímero.

Para los estudios de liberación, primero se saturaron (en una solución de ivermectina aproximadamente 145mM) los polímeros con ivermectina tanto impresos como no impresos. Como se demostró en los estudios de afinidad, los polímeros impresos adsorbieron mayor cantidad de ivermectina que sus respectivos polímeros no impresos. Se muestran los resultados de la recuperación a continuación en la tabla 14.

Tabla 14. Recuperación de ivermectina de los polímeros molecularmente impresos.

Polímero	%Ivermectina recuperada	Carga de polímero (mg/mg) [Ivermectina enlazada/Polímero]
MIP 1:4:20	28.426	3.554
NIP 1:4:20	20.371	2.445
MIP 1:1:20	32.567	3.974
NIP 1:1:20	27.625	3.317
MIP-UV 1:1:20	33.251	4.096
NIP-UV 1:1:20	22.054	2.659

Se observa en la tabla 14 que todos los polímeros impresos lograron recuperar mayor cantidad de ivermectina que sus correspondientes polímeros no-impresos, lo que corrobora el estudio de isotermas de adsorción (sección 7.2.2) que indica que el proceso de impresión favorece la recuperación del templado. También se observa que los polímeros tipo 1:1 (UV y calor) tiene un mayor porcentaje de recuperación que los tipo 1:4, los factores debieron influir en este resultado, es que la solución de ivermectina era sobre saturada (145mM aproximadamente) ya que la mayor cantidad de ivermectina incrementa la posibilidad de enlace al polímero a través de desplazar el equilibrio de adsorción.

7.3.2. Cinéticas de Liberación.

El gráfico 13 muestra los espectros uv-vis de diferentes muestreos de la cinética de liberación de ivermectina de los polímeros MIP 1:4 y NIP 1:4. En el cual se puede ver que al inicio de la cinética, los ambos polímeros liberan gran cantidad de ivermectina y después parece que la ivermectina desaparece de la disolución, esto puede ser debido a que comienzan a recuperarla después de la primera media hora, siendo este efecto más notorio en el MIP.

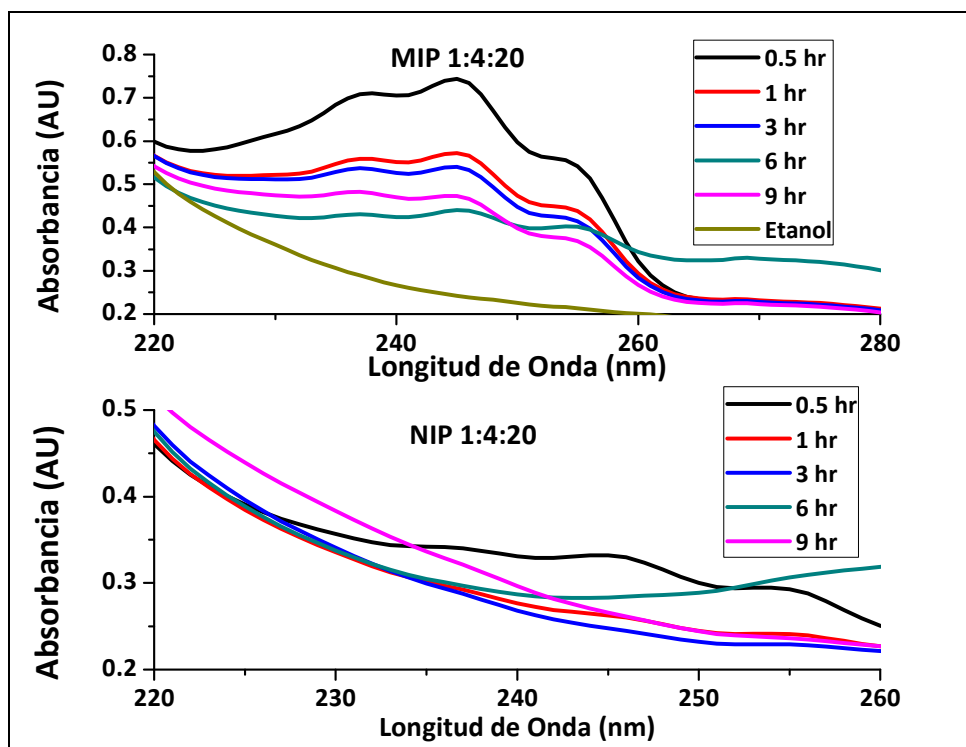


Gráfico 13. Cinéticas de liberación de los polímeros MIP 1:4:20 y NIP 1:4:20, respectivamente.

Este comportamiento se deba posiblemente a un fenómeno que se presenta en muchos sistemas poliméricos. Al estar en contacto con un disolvente, el polímero interactúa con el medio de disolución aumentando su tamaño lo que permite que el medio de disolución penetre en la matriz polimérica aumentando la velocidad de disolución de la sustancia que contiene, fenómeno conocido como “hinchamiento”.

Así entonces, la gráfica 13 indica dos procesos; en el primero, los polímeros sintetizados con cuatro equivalentes del monómero liberan la ivermectina que tiene unida en sitios no muy específicos y esa es quizá la razón de que la concentración de ivermectina libre en disolución aumente muy rápidamente. Posteriormente los polímeros se hinchan, dando como consecuencia que se abran poros, haciéndose accesibles sitios previamente colapsados por el proceso de secado, entonces la ivermectina en disolución ahora interactúa con estos sitios “regenerados” de esta manera el segundo proceso, la ivermectina comienza a ser adsorbida por el polímero que pone de manifiesto su capacidad de reconocimiento y alta afinidad a su templado con lo que la concentración ivermectina libre comienza a disminuir al ser reabsorbida por los polímeros.

Este fenómeno de readsorción se da en los polímeros con estequiometría 1:4 y con los polímeros 1:1 no es observable. Las interacciones fuertes de cuatro carboxilatos por ivermectina hacen que esta tenga una afinidad muy alta por el sustrato haciendo que este sistema sea malo para liberaciones, simplemente por el hecho de que la afinidad es tan alta que la ivermectina no sale en disolución en los tiempos estudiados.

Para corroborar esto se probaron las cinéticas de liberación con los polímeros con un equivalente del monómero funcional (MMA), asumiendo que la interacción con un solo equivalente del monómero resultará más débil haciendo que la competencia ivermectina-disolvente haga posible que el equilibrio de liberación se desplace hacia el disolvente, las interacciones se ilustran en la figura 14.

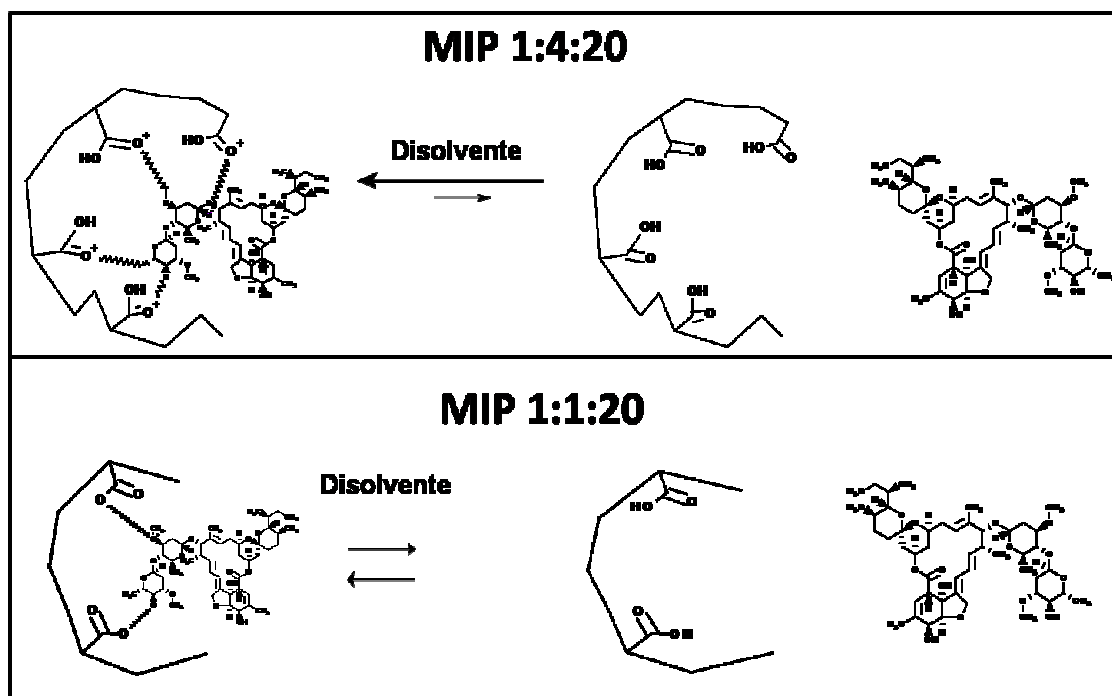


Figura 13. Interacciones Polímero-Ivermectina de los polímeros con uno y cuatro equivalentes de MMA.

En la gráfica 14 se muestran los espectros uv-vis de la cinética de liberación del polímero impreso con un equivalente MIP 1:1:20. El comportamiento mostrado por los polímeros MIP 1:1 corresponde a la liberación de ivermectina al medio por parte del polímero, el cual es el objetivo buscado en la síntesis de estos polímeros. Al igual que el polímero MIP 1:1:20, los polímeros MIP-UV 1:1:20, y los respectivos NIP's, también presentaron un comportamiento semejante. Con los datos obtenidos se procedió a determinar la fracción de ivermectina libre a cada tiempo (t) para poder graficar los perfiles de liberación de

ivermectina de cada polímero y seleccionar el modelo de ajuste de liberación, de forma semejante al trabajo realizado para las isotermas de adsorción.

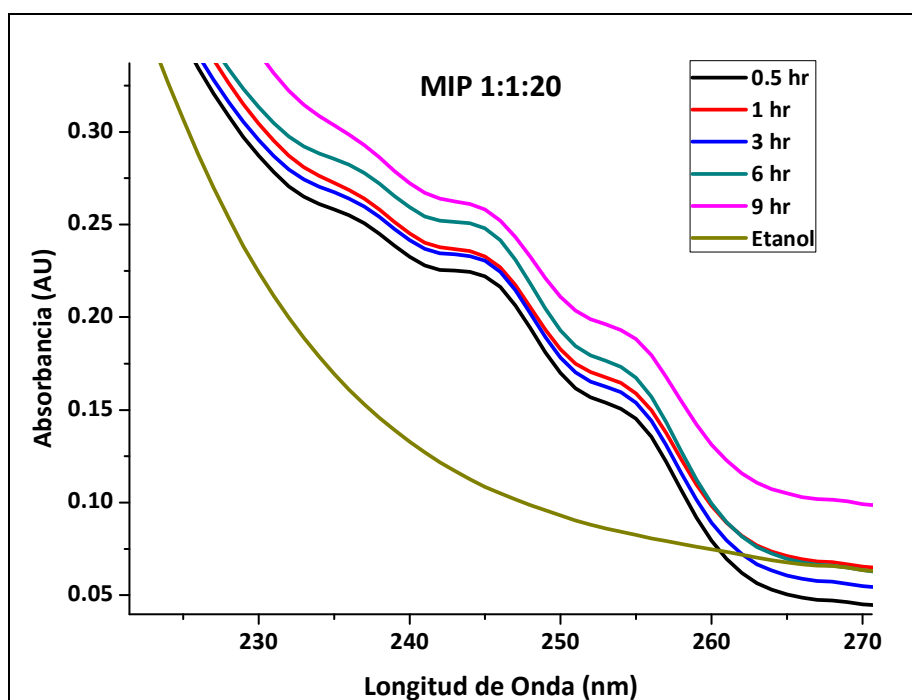


Gráfico 14. Cinética de liberación del Polímero MIP 1:1:20.

7.3.2.1. Selección de Modelo de Cinética de Liberación.

Entre los modelos con mayor aplicación y que mejor describen el fenómeno de liberación controlada se encuentran del modelo de Higuchi, el modelo de orden cero, el modelo empírico de Weibull y el modelo de Korsmeyer-Peppas. El criterio más usual para seleccionar el modelo que mejor ajusta a los datos experimentales es el coeficiente de correlación¹⁶, R^2 . Este criterio es válido cuando los modelos comparados tienen el mismo número de parámetros; en caso de que los modelos comparados tengan diferente número de parámetros, se debe ajustar el coeficiente de correlación ($R^2_{ajustado}$) de la siguiente manera:

$$R^2_{ajustada} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)} \times (1 - R^2)$$

Donde n es el número de puntos experimentales y p es el número de parámetros del modelo.

Los polímeros sintetizados con un equivalente fueron sometidos a estudios de liberación *in vitro* para obtener sus perfiles de liberación. Después de muestrear los diferentes tiempos de la cinética de liberación se obtuvieron los perfiles de liberación de cada uno de los polímeros, tanto impresos como no-impresos. Basándose en los resultados observados con los polímeros 1:4:20, se sugirió que el perfil de liberación este controlado por dos mecanismos que son; la difusión del fármaco y el hinchamiento del polímero.

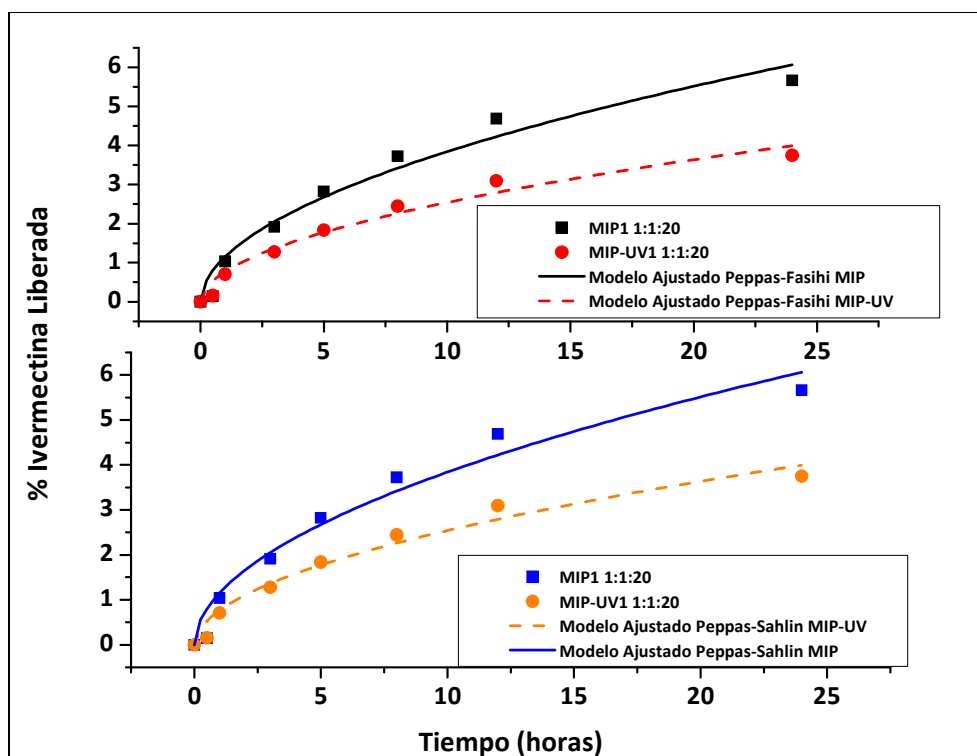


Gráfico 15. Modelos Ajustados de Peppas-Sahlin y de Peppas-Fassihi para los perfiles de liberación de los MIP-UV y MIP

Se seleccionaron dos modelos de liberación derivados de la ecuación de Korsmeyer-Peppas. En la literatura se citan los modelos de Peppas-Sahlin y de Peppas-Fassihi; para describir perfiles de liberación en sistemas poliméricos de liberación modificada (Peppas, N. A. et al, 1989⁴⁴, Peppas, N. A. et al, 1999⁴⁵, Fassihi, R., Kim, H., 1997²⁰). La gráfica 16 muestra el ajuste no lineal de los modelos en los perfiles de liberación de los polímeros impresos MIP-UV 1:1:20 y MIP 1:1:20. Después del ajuste para cada uno de los polímeros, se compararon los coeficientes de correlación (R^2) para determinar qué modelo tenía el mejor ajuste con los datos. Como las dos ecuaciones presentan el mismo número de parámetros, es posible comparar directamente los coeficientes de correlación sin necesidad de ajustarlos.

Tabla 15. Coeficientes de correlación (R^2) de todos los perfiles de liberación de los MIPs

Polímero/Modelo	Coeficiente de correlación (R^2)	
	Peppas-Sahlin	Peppas-Fassihi
MIP 1:1:20	0.96366	0.92715
NIP 1:1:20	0.95847	0.94289
MIP-UV 1:1:20	0.96902	0.93225
NIP-UV 1:1:20	0.96486	0.94144

En la tabla 15, se colocaron todos los coeficientes de correlación obtenidos del ajuste de los dos modelos seleccionados para cada polímero, puede observarse que el modelo de Peppas-Sahlin tiene el mejor ajuste en todos los casos, aunque hay que señalar que la diferencia con el modelo de Peppas-Fassihi no es tan amplia. Ambos modelos contemplan la suma de dos factores en su ecuación, el modelo desarrollado por Peppas y Sahlin toma en cuenta el efecto de difusión y el de hinchamiento del polímero mientras que el modelo de Peppas-Fassihi indicaría la presencia del “fenómeno de estallido” previamente a la difusión. Entonces, si se tienen ajustes semejantes es indicativo de que el fenómeno que rige la liberación es el de difusión mientras que el estallido o hinchamiento tienen poco impacto en ella, lo que hace que los modelos ajusten en forma semejante como se puede apreciar en la gráfica 15.

Dado que el modelo de Peppas-Shalin mostró el mejor ajuste, el análisis de la cinéticas de liberación con este modelo servirá para determinar el mecanismo de liberación de acuerdo a la clasificación establecida por el investigador Peppas N. A.

7.3.2.2. Análisis de Cinética de Liberación.

Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste no lineal al modelo de Peppas-Sahlin, se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Parámetros calculados a partir de los datos de los MIPs y NIPs con ajuste no lineal al modelo Peppas-Sahlin.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$$

Polímero	K_1	K_2	m	K_1/K_2	$t_{50\%}$ (días)
MIP 1:1:20	1.15617	0.00010	0.52138	11561.7	167.11
NIP 1:1:20	1.93303	0.00009	0.52491	19138.9	121.91
MIP-UV 1:1:20	0.77187	0.00008	0.51701	7718.7	268.59
NIP -UV 1:1:20	1.28971	0.00009	0.53512	12897.1	134.72

En la relación K_1/K_2 se observa que las constantes de liberación por difusión (K_1) son alrededor de diez mil veces mayores que las constantes de disolución debidas al hinchamiento, lo que lleva a suponer que la liberación de la ivermectina al medio de disolución es debida en su mayor parte a la difusión del fármaco. El valor del exponente, m , para todos los parámetros es cercano a 0.5 que, así que con base en la interpretación propuesta por Peppas, corresponde a un fenómeno de difusión de tipo Fick⁴⁴.

Finalmente los tiempos de vida media ($t_{50\%}$) revelan que los polímeros impresos son capaces de mantener la liberación prolongada de forma extendida, pues la mitad de la carga de los MIPs e incluso los NIPs requiere más de 100 días para liberarse. Puede verse claramente que los polímeros impresos, es decir el MIP 1:1 y MIP-UV 1:1, liberaron la ivermectina más lentamente que los polímeros no impresos, lo que demuestra que la impresión del polímero ayuda en la retención del fármaco incrementando el perfil de liberación. Por otro lado, a diferencia de los estudios de adsorción donde el MIP 1:1 y el MIP-UV 1:1 se comportaban de manera semejante; durante la liberación el MIP-UV 1:1 fue capaz de prolongar la liberación por lo menos cien días más que el MIP 1:1. Por lo tanto durante la liberación, el mayor orden estructural del MIP-UV 1:1 debido a la menor temperatura utilizada durante su síntesis, influye considerablemente el tiempo de liberación del fármaco.

Empero de que la liberación se realizó en etanol y no en condiciones que simularan algún medio biológico, el $t_{50\%}$ reportado para los polímeros tiene un patrón de liberación muy prometedor, y permite suponer que una formulación de ivermectina a base de polímeros será capaz de lograr perfiles de liberación semejantes al Sistema Terapéutico Ruminal (RUTS) de IVOMECS SR® que mantiene la liberación de ivermectina por 135 días^{46,47} por ejemplo; otro resultado con el cual podría ser equiparable son las microesferas probadas por Lifschitz *et al.*²³ en cabras españolas, que reportan que la liberación de ivermectina mantuvo niveles terapéuticos entre 10-12 semanas. Adicionalmente, como ya se comentó el fenómeno de reconocimiento molecular y liberación dependen fuertemente de la relación estequiométrica entre el templado (en este caso ivermectina) y el polímero, por lo que es de suponerse que las relaciones estequiométricas 1:2, 1:3 harán que la liberación sea aún más lenta, dando la posibilidad de que con estos materiales se puedan preparar sistemas de liberación modificados para obtener liberaciones muy lentas.

8. CONCLUSIONES.

Se sintetizaron los polímeros de impresión molecular MIP 1:4:20, MIP 1:1:20 y MIP-UV 1:1:20 derivados de triacrilato de pentaeritrol (PETA) y ácido metacrílico (MMA) conteniendo ivermectina con sus correspondientes blancos no impresos, empleando el método de bloque.

Se encontraron diferencias entre los polímeros preparados, estas dependen de las condiciones, es decir; cuando la temperatura de polimerización es mayor, es probable la formación de micro sitios capaces de dispersar la luz, de la misma forma que el MIP a baja temperatura. Sin embargo, el NIP a baja temperatura es transparente lo que sugiere que no existen estos micro-sitios, o bien, la opacidad sea por el desorden proveniente de la agitación térmica o por la presencia de la molécula horma.

Con el método de eliminación de ivermectina de los polímeros que se utilizó se logró la eliminación de la mayor parte de la ivermectina, hecho que se manifestó mediante espectroscopia ultravioleta, por lo que este proceso de remoción es eficiente.

La caracterización de los sitios de unión mediante las isothermas por zonas indica que se ajustan al modelo de adsorción de Langmuir-Freundlich, y que los polímeros MIP en comparación con los NIP muestran un mayor número de sitios con mayor capacidad de unión, debido a la presencia de sitios moldeados que reconocen específicamente a la ivermectina. Este fenómeno depende fuertemente de la relación estequiométrica monómero funcional-ivermectina, lo que hace posible modular la afinidad del polímero hacia su templado a través de la estequiometría monómero funcional-templado.

Las cinéticas de liberación *in vitro* en los polímeros con estequiometría 1:4 demostraron que la interacción del templado con cuatro equivalentes de monómero es muy fuerte y predomina su capacidad de retención, lo que hace que polímeros con estequiometría 1:4 son malos sistemas de liberación de ivermectina. Por el contrario los polímeros con un equivalente del monómero funcional (MMA) cuya interacción es más débil permite la difusión de la ivermectina hacia el disolvente lentamente.

Las constantes de liberación procedentes del análisis con el modelo de Peppas-Sahlin indican que el mecanismo de liberación desde los MIPs hacia el disolvente se da principalmente por difusión y finalmente; los tiempos de vida media de liberación ($t_{50\%}$) revelaron que la síntesis fotoquímica ofrece la posibilidad de incrementar el tiempo de liberación dado que el polímero MIP-UV 1:1:20 mantiene la liberación por lo menos 100 días más que el MIP 1:1:20. Por lo tanto, a diferencia del la capacidad de reconocimiento que no se ve afectada por la temperatura de síntesis, el fenómeno de liberación sí se ve afectado por esta variante. Sin embargo los $t_{50\%}$ sugieren que ambos polímeros de impresión con estequiometría 1:1; MIP-UV 1:1:20 y MIP 1:1:20, son candidatos potenciales para el desarrollo de un SLM de liberación prolongada de ivermectina.

9. PERSPECTIVAS.

Ahora que se tiene conocimiento de la capacidad de reconocimiento y el mecanismo de liberación de los polímeros sintetizados, el paso siguiente para la obtención de un sistema de liberación prolongada de ivermectina es desarrollar una formulación o una serie de formulaciones a base de MIPs y estudiar la capacidad que puedan presentar en el tratamiento de animales susceptibles de infestación por garrapatas, principalmente el ganado vacuno en México. Con el fin de disminuir el número de aplicaciones para optimizar el esquema de dosificación, con el cual se espera mejorar la relación costo-beneficio del tratamiento.

Adicionalmente, es posible realizar estudios de caracterización añadiendo otras variantes al polímero, por ejemplo en la literatura citada se menciona que la selección del disolvente donde se lleva a cabo la síntesis (en este caso se utilizó cloroformo) influye en la morfología del polímero; tamaño, distribución de poro y área superficial. Entonces un estudio de caracterización donde la variante sea el disolvente de síntesis ofrecería otras alternativas para el desarrollo de SLM.

Además, como se ha referido a lo largo del trabajo, la técnica de impresión molecular es aplicable en diferentes ramos y otra área importante es el saneamiento ambiental donde se puede aprovechar la alta capacidad de reconocimiento y recuperación de sistemas como el del polímero MIP 1:4.

Dado que la técnica de impresión molecular es relativamente nueva y que los polímeros impresos presentan muchas ventajas como son; sus bajos costos de producción, estabilidad, versatilidad, sencillez de preparación y la posibilidad de manipular su capacidad de reconocimiento. Esta técnica es una alternativa prometedora para el desarrollo de materiales de corte farmacéutico.

10. BIBLIGRAFÍA.

1. González, L. G. Formulación Inteligente de Ivermectina para el Control de la Garrapata evitando Efectos Adversos en el Equilibrio Ecológico. Experimental, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 2008.
2. Ghosh, S.; Azhahianambi, P.; Yadav, M. P., Upcoming and future strategies of tick control: A review. *Journal of Vector Borne Diseases* **2007**, *44* (2), 79-89.
3. Fernández, A.; Guardia, L., Reconocimiento Molecular mediante materiales biomiméticos: Impresión molecular. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* **2007**, *103* (2), 14-22.
4. Revista_idiaxxi_nro2.qxd. http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/carne/IDIA_2.pdf (acceso 22 de Septiembre de 2009).
5. Magona, J. W.; Walubengo, J.; Olaho-Mukani, W.; Jonsson, N. N.; Eisler, M. C., Diagnostic value of rectal temperature of African cattle of variable coat colour infected with trypanosomes and tick-borne infections. *Veterinary Parasitology* **2009**, *160* (3-4), 301-305.
6. Bravo, M.; Coronado, A.; Henríquez, H., Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical* **2008**, *26* (1), 41-46.
7. Health, *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus*. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/boophilus_microplus.pdf (acceso 25 de Agosto de 2009).
8. Veterinaria, C.-P. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. <http://www.veterinaria.uady.mx/cuerpos/SALUD-ANIMAL/doctos/Manual.pdf> (acceso 13 de Octubre de 2009).
9. Consasa <http://www.conasamexico.org/08comite19rodrigorosario.pdf> (acceso 6 de Octubre de 2009).
10. Protección de Cultivos. http://www.basf.cl/agro/programas/cont_gar.html (acceso 28 de Agosto de 2009).
11. BASF AG, L., Deutschland http://www.basf.cl/agro/programas/cont_gar.html. (acceso 22 de noviembre de 2009).
12. Alonso-Díaz, M. A.; Rodríguez-Vivas, R. I.; Fragoso-Sánchez, H.; Rosario-Cruz, R., Ixodicide resistance of the the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. *Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas* **2006**, *38* (2), 105-113.
13. Merck The Merck Veterinary Manual. <http://www.merckveterinarymanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/72120.htm> (acceso 29 de septiembre de 2009).
14. Navarra, Formas farmacéuticas de liberación modificada y estereoisómeros ¿Nos aportan algo en la práctica clínica? 2005; Vol. 13, p 9.
15. Grassi, M.; Grassi, G., Mathematical Modelling and Controlled Drug Delivery: Matrix Systems. *Current Drug Delivery* **2005**, *2* (1), 97-116.

16. Costa, P.; Sousa, J. M., Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **200**, *13*, 123 –133.
17. Sinko, P. J., *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences : physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences*. 5a ed.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2006; p 795.
18. Viseras, I. M. T. Desarrollo Galénico de Preparados Obtenidos por Interacción del ácido 5-amino salicílico con Halloisita Experimental, Universidad de Granada, Granada, 2008.
19. Introducción de Theileria annulata un protozoo parásito del ganado. **2006**.
20. Fassihi, R.; Kim, H., A New Ternary Polymeric Matrix System for Controlled Drug Delivery of Highly Soluble Drugs: I. Diltiazem Hydrochloride. *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1415-1421.
21. Rodríguez, G. V.; Melgoza, C. L. M., Sistemas de Liberación Modificada en rumiantes (parte 1). *Informacéutico* **2009**, *15* (4), 12-20.
22. Rodríguez, G. V.; Melgoza, C. L. M., Sistemas de Liberación Modificada en rumiantes (parte 2). *Informacéutico* **2009**, *16* (4), 10-19.
23. Winzenburg, G.; Schmidt, C.; Fuchs, S.; Kissel, T., Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (10), 1453-1466.
24. J. Mathews Pound; J. Allen Miller; Delbert D. Oehler, Depletion Rates of Injected and Ingested Ivermectin from Blood Serum of Penned White-Tailed Deer, *Odocoileus virginianus* (Zimmermann) (Artiodactyla: Cervidae). *Journal of Medical Entomology* **2004**, *41* (1), 65-68.
25. Sellergren, B.; Allender, C. J., Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (12), 1733-1741.
26. Behr, J.-P., *The Lock-and-Key Principle*. John Wiley & Sons: New York, Queensland, Rexdale, 1995; Vol. 1, p 336.
27. ACS, *Molecular and Ionic Recognition with Imprinted Polymers*. 2 ed.; American Chemical Society: Washington, DC 1998; p 352.
28. Figueiredo, E. C.; Dias, A. C. B.; Arruda, M. A. Z., Molecular imprinting: A promising strategy in matrices elaboration for drug delivery systems. *Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos* **2008**, *44* (3), 361-375.
29. Kryscio, D. R.; Peppas, N. A., Mimicking biological delivery through feedback-controlled drug release systems based on molecular imprinting. *AIChE Journal* **2009**, *55* (6), 1311-1324.
30. Fernández-González, A.; Guardia, L.; Badía-Laíño, R.; Díaz-García, M. E., Mimicking molecular receptors for antibiotics - analytical implications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25* (10), 949-957.

31. Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A., Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *804* (1), 231-245.
32. Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (12), 1836-1853.
33. Byrne, M. E.; Hilt, J. Z.; Peppas, N. A., Recognitive biomimetic networks with moiety imprinting for intelligent drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2008**, *84* (1), 137-147.
34. García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E., Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2007**, *123* (2), 1180-1194.
35. Corton, E.; García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E., Kinetics and binding properties of cloramphenicol imprinted polymers. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2007**, *353* (8-10), 974-980.
36. Singh, B.; Chauhan, N., Molecular imprinted polymers for use as drug delivery devices: Preliminary evaluation. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry* **2008**, *45* (9), 776-784.
37. Singh, B.; Chauhan, N., Preliminary evaluation of molecular imprinting of 5-fluorouracil within hydrogels for use as drug delivery systems. *Acta Biomaterialia* **2008**, *4* (5), 1244-1254.
38. Singh, D. K.; Mishra, S., Synthesis, characterization and removal of Cd(II) using Cd(II)-ion imprinted polymer. *Journal of Hazardous Materials* **2009**, *164* (2-3), 1547-1551.
39. wikipedia.org <http://en.wikipedia.org/wiki/Adsorption#Isotherms>. (acceso 6 de mayo de 2010).
40. Curcio, P.; Zandanel, C.; Wagner, A.; Mioskowski, C.; Baati, R., Semi-covalent surface molecular imprinting of polymers by one-stage mini-emulsion polymerization: Glucopyranoside as a model analyte. *Macromolecular Bioscience* **2009**, *9* (6), 596-604.
41. Instruments, M. Zetasizer Measurement of particle size and zeta potential. <http://www.malvern.com/zetasizer> (acceso 22 de Febrero de 2010).
42. Hiratani, H.; Mizutani, Y.; Alvarez-Lorenzo, C., Controlling drug release from imprinted hydrogels by modifying the characteristics of the imprinted cavities. *Macromolecular Bioscience* **2005**, *5* (8), 728-733.
43. Umpleby Ii, R. J.; Baxter, S. C.; Rampey, A. M.; Rushton, G. T.; Chen, Y.; Shimizu, K. D., Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *804* (1), 141-149.
44. Peppas, N. A.; Sahlin, J. J., A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, *57* (2), 169-172.
45. Peppas, N. A.; Keys, K. B.; Torres-Lugo, M.; Lowman, A. M., Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, *62* (1-2), 81-87.

Bibliografía

46. Rathbone, M. J.; Martinez, M. N., Modified release drug delivery in veterinary medicine. *Drug Discovery Today* **2002**, 7 (15), 823-829.
47. Rothen-Weinhold, A.; Gurny, R.; Dahn, M., Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. *Pharmaceutical Science and Technology Today* **2000**, 3 (7), 222-231.