



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON  
POLÍMEROS DE IMPRONTA MOLECULAR PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA  
DE METOTREXATO**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

**PRESENTA**

**LETICIA ANTONIO GUTIÉRREZ**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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: JESÚS GRACIA MORA**  
**VOCAL: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON**  
**SECRETARIO: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS**  
**1er. SUPLENTE: VICTOR BARRERA GUZMÁN**  
**2° SUPLENTE: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 100, DE LA UNIDAD DE POSGRADO, DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR Y EN LOS LABORATORIOS 001-003 DEL EDIFICIO F DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. JESÚS GRACIA MORA**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**SUSTENTANTE:**

---

**LETICIA ANTONIO GUTIÉRREZ**

## ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	11
1.0 ANTECEDENTES.....	13
1.1 El cáncer.....	13
1.1.2 Tratamiento.....	14
1.2 Metotrexato.....	15
1.2.1 Uso terapéutico.....	16
1.2.2 Mecanismo de acción.....	16
1.2.3 Propiedades biofarmacéuticas.....	16
1.3 Sistemas de liberación de fármacos.....	17
1.3.1 Sistemas de liberación modificada.....	17
1.3.2 Los sistemas liberación modificada en la terapia del cáncer.....	19
1.4 Cinéticas de liberación de fármacos.....	20
1.5 Nanotecnología en farmacia.....	22
1.6 Nanopartículas magnéticas: Aplicaciones biológicas de los materiales magnéticos.....	23
1.6.1 Nanopartículas magnéticas como agentes teragnósticos.....	24
1.6.2 Nanopartículas magnéticas para el tratamiento del cáncer.....	25
1.7 Características de materiales magnéticos.....	26
1.7.1 Clasificación.....	26
1.7.2 Teoría de dominios.....	30
1.8 Magnetita.....	30
1.8.1 Toxicidad.....	31
1.8.2 Estrategias para la síntesis de nanopartículas de magnetita.....	32
1.8.3 Diseño y estabilidad.....	33
1.8.4 Funcionalización.....	34

1.9 Polímeros de impronta molecular .....	35
1.9.1 Proceso de impresión molecular por radicales libres .....	36
1.10 Polímeros de impronta molecular con partículas magnética .....	37
2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	41
3.0 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo general. ....	42
3.2 Objetivos particulares. ....	42
4.0 HIPÓTESIS.....	42
5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	43
5.1 MATERIALES.....	43
5.2 METODOLOGÍA.....	43
5.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofílicas (NPM) .....	43
5.2.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (NPM-HFB).....	43
5.2.3 Funcionalización con ácido metacrílico.....	43
5.2.4 Recubrimiento polimérico mediante la técnica de impronta molecular utilizando metotrexato como molécula molde.....	44
5.2.5 Recubrimiento polimérico sin molécula molde (NIP).....	44
5.2.6 Caracterización. ....	44
5.2.7 Estudios de adsorción .....	45
5.2.8 Estudios de liberación .....	46
6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita (NPM) .....	47
6.1.2 Síntesis de nanopartículas de magnetita hidrofóbicas (NPM-HFB).....	47
6.2 Caracterización de NPM y NPM-HFB.....	48
6.2.1 Tamaño de partícula y potencial z.....	48
6.2.2 Espectrometría de infrarrojo y análisis elemental.....	50

6.2.3 Difracción de rayos x.....	52
6.3 Síntesis y caracterización de NIP-HFL y NIP-HFB .....	53
6.3.1 Recubrimiento polimérico sin el uso de la molécula molde (NIP).....	53
6.3.2 Tamaño de partícula y potencial z.....	55
6.3.3 Espectrometría de infrarrojo y análisis elemental.....	57
6.3.4 Difracción de rayos x.....	58
6.4 Síntesis y caracterización de MIP-HFL y MIP-HFB .....	59
6.4.1 Impronta molecular con metotrexato como molécula molde .....	59
6.4.2 Tamaño de partícula y potencial z.....	60
6.4.3 Espectrometría de infrarrojo y difracción de rayos x .....	61
6.5 Estudios de adsorción de los sistemas NIP-HFB, NIP-HFL, MIP-HFB Y MIP-HFL .....	63
6.6 Estudio de las cinéticas de liberación.....	67
6.6.1 Sistema NIP-HFB .....	69
6.6.2 Sistema NIP-HFL .....	70
6.6.3 Sistema MIP-HFB.....	72
6.6.4 Sistema MIP-HFL .....	73
7.0 CONCLUSIONES .....	76
8.0 PERSPECTIVAS .....	77
9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

## Índice de figuras

Figura 1. Estructuras del ácido fólico y del metotrexato .....	15
Figura 2 Concentraciones plasmáticas a través del tiempo, dado por distintas formas de administración, así como de formas farmacéuticas de liberación modificada. <sup>11</sup> .....	18
Figura 3. Ilustración esquemática de la estrategia terapéutica de las nanopartículas magnéticas como teragnósticos. Las nanopartículas magnéticas son inyectadas en torrente sanguíneo y son dirigidas al tumor utilizando un gradiente magnético, sirviendo al mismo tiempo como agente de contraste en RMI. El fármaco es entonces liberado por distintos mecanismos o bien, se puede inducir la hipertermia de las partículas con ayuda de un campo magnético alterno. <sup>28</sup> .....	25
Figura 4 Representación de las modalidades de direccionamiento de las nanopartículas magnéticas al tumor. (a) efecto EPR. (b) direccionamiento molecular. (c) direccionamiento magético. <sup>25</sup> .....	26
Figura 5. Dipolos magnéticos y su comportamiento en presencia y ausencia de un campo magnético externo. <sup>32</sup> .....	28
Figura 6. Magnetización de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas bajo un campo magnético externo; (a) bajo un campo magnético externo, los multidominios de una nanopartícula ferromagnética se alinean con el campo aplicado al igual que el momento magnético de los monodominios en las nanopartículas superparamagnéticas.(b) En ausencia de un campo externo, las nanopartículas ferromagnéticas tendrán una magnetización neta y las nanopartículas superparamagnéticas no tendrán magnetización neta debido a la rápida inversión del momento magnético <sup>34</sup> .....	29
Figura 7. Ilustración esquemática de la relación coercitividad-tamaño de partículas pequeñas. <sup>34</sup> .....	29
Figura 8. Organización de los dominios magnéticos. ....	30
Figura 9 Organización de la red cristalina de magnetita. <sup>37</sup> .....	31
Figura 10. Representación del esquema general de la impresión molecular no covalente. ...	36
Figura 11. Esquema de la síntesis de NPM.....	47
Figura 12. Esquema de la síntesis de NPM-HFB. ....	48
Figura 13. Tamaño de partícula de las partículas NPM obtenido por DLS. ....	49
Figura 14. Tamaño de partícula de las partículas NPM-HFB obtenido por DLS.....	50

Figura 15. Prueba preliminar para la determinación de la hidrofobicidad de las nanopartículas de acuerdo a la síntesis. ....	50
Figura 16. Espectros de infrarrojo obtenidos para el ácido oleico, NPM y NPM-HFB .....	52
Figura 17. Interacción quelante bidentada entre el grupo COO- del ácido oleico y el átomo de hierro.....	52
Figura 18. Difractogramas de rayos x obtenidos para NPM y NPM-HFB .....	53
Figura 19. Modificación de la superficie de las nanopartículas con ácido metacrílico. a) NPM y b) NPM-HFB .....	54
Figura 20. Esquema del procedimiento utilizado para el recubrimiento polimérico. ....	55
Figura 21. Tamaños de partícula de los sistemas NIP-HFL y NIP-HFB obtenidos por DLS...55	
Figura 22. Micrografía obtenida por TEM de las nanopartículas NIP-HFL. a) nanopartículas aglomeradas. b) nanopartícula aislada donde se puede observar el recubrimiento polimérico. ....	56
Figura 23. Micrografía TEM de las nanopartículas NIP-HFB. a) nanopartículas aglomeradas. b) nanopartícula aislada. Se observa el recubrimiento polimérico y la red cristalina de la magnetita.....	56
Figura 24. Espectros de infrarrojo obtenidos para los sistemas NIP-HFL, NIPHFB y para el polímero que recubre la superficie de las nanopartículas.....	58
Figura 25. Difractograma de rayos x obtenido para los sistemas NIP-HFL y NIP-HFB comparados con el de la magnetita sintetizada inicialmente. ....	59
Figura 26. Esquema de la síntesis de los polímeros de impronta molecular usando MTX como molécula molde. a) NPM y b) NPM-HFB.....	60
Figura 27. Tamaños de partícula de los sistemas MIP-HFL y MIP-HFB obtenidos por DLS. .60	
Figura 28. Micrografía TEM obtenida para a) MIP-HFB y b) MIP-HFL. Se observan para ambos sistemas, aglomeraciones de las nanopartículas. c) nanopartícula aislada. Se observa la red cristalina de la magnetita y un tamaño de partícula real de aproximadamente 10 nm..61	
Figura 29. Espectros de infrarrojo obtenidos para los sistemas MIP-HFB, MIP-HFL y para el polímero.....	62
Figura 30. Difractogramas de rayos x obtenidos para los sistemas MIP-HFB, MIP-HFL y para NPM.....	63
Figura 31. Curva de calibración y espectros de absorción del metotrexato (MTX).....	63
Figura 32. Solubilidad del metotrexato en función del pH.....	64



Figura 33. Distribución de microespecies de metotrexato (%) en función del pH. ....	65
Figura 34. Cinéticas de adsorción de MTX por los sistemas a) MIP-HFB, b) MIP-HFL, c) NIP-HFB y d) NIP-HFL. Promedios de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar. .	66
Figura 35. Comparación de las cinéticas de adsorción de cada sistema. ....	68
Figura 36. Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema NIP-HFB a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Pepas-Sahlin y e) Hopfenberg .....	69
Figura 37. Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema NIP-HFL a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Pepas-Sahlin y e) Hopfenberg .....	71
Figura 38. Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema MIP-HFB a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Pepas-Sahlin y e) Hopfenberg .....	72
Figura 39. Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema MIP-HFL a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Pepas-Sahlin y e) Hopfenberg .....	74

## Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del metotrexato.....	15
Tabla 2.Mecanismo de liberación de fármaco en función del valor de n. ....	22
Tabla 3. Principales trabajos relacionados al proyecto hasta 2017. ....	40
Tabla 4. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos. ....	70
Tabla 5. Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema NIP-HFL al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos. ....	71
Tabla 6. Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema MIP-HFB al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos. ....	73
Tabla 7. Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema MIP-HFL al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos. ....	74
Tabla 8. Parámetros calculados para el ajuste no lineal Peppas-Sahlin de los diferentes sistemas.....	75

## Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
SLF	Sistema de liberación de fármacos
RMI	Resonancia Magnética de Imágen
EPR	Efecto Permeación y Retención
NPMs	Nanopartículas magnéticas
RES	Sistema Retículo Endotelial
MIP	Polímeros improntados molecularmente.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
EGDMA	Dimetilacrilato de etilenglicol
DLS	Dispersión dinámica de luz
AIBN	Azobisisobutironitrilo
NPM	Nanopartículas magnéticas hidrofílicas
NPM-HFB	Nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido oleico.
NIP-HFB	Nanopartículas magnéticas hidrofóbicas sin impronta molecular
NIP-HFL	Nanopartículas magnéticas hidrofílicas sin impronta molecular
MIP-HFB	Nanopartículas magnéticas hidrofóbicas con impronta molecular
MIP-HFL	Nanopartículas magnéticas hidrofóbicas sin impronta molecular
MTX	metotrexato
Rsqr	Coefficiente de correlación
SS	Desviación estándar
AIC	Criterio de Akaike
MSC	Criterio de selección de modelo

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 <sup>1</sup>.

La mortalidad por cáncer se puede reducir si los casos se detectan y tratan a tiempo. Un porcentaje importante de cánceres pueden tratarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia principalmente, siendo esta última la más empleada. Sin embargo, la quimioterapia no solo destruye las células cancerosas, sino que también destruye o hace lento el crecimiento de células sanas que normalmente se dividen con rapidez, causando efectos secundarios como llagas en la boca, náuseas y caída del cabello <sup>2</sup>.

El metotrexato es un fármaco análogo del ácido fólico utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer y en la artritis reumatoide. Actúa inhibiendo la enzima dihidrofolato reductasa, la cual se encarga de reducir dihidrofolatos a tetrahidrofolatos, los cuales intervienen en la síntesis de bases púricas y pirimídicas y, subsecuentemente, en la síntesis y reparación de ADN y en la síntesis de ARN <sup>3</sup>. Los tejidos en proliferación activa, como las células malignas, médula ósea, células fetales, mucosa bucal e intestinal y células de la vejiga son más susceptibles a la acción del metotrexato y es por ello que este fármaco causa los efectos secundarios típicos al ser utilizado en la quimioterapia.

Los sistemas de liberación modificada buscan reducir estos efectos mediante el tratamiento dirigido, es decir, transportando el fármaco directamente en la zona tumoral disminuyendo de esta forma sus interacciones con sitios no deseados. Para lograr esto, se han investigado diversas alternativas, siendo de especial interés el uso de partículas magnéticas (que deben ser además biocompatibles y biodegradables) a las que se les carga un fármaco, generalmente mediante el uso de polímeros.

El mayor potencial terapéutico de las partículas magnéticas está probablemente asociado con la aplicación que involucra partículas inteligentes con un centro magnético y una capa con la carga terapéutica. Las partículas cargadas con el fármaco pueden ser dirigidas con ayuda de un campo magnético externo hasta un sitio específico del cuerpo, y entonces, el fármaco es liberado (usualmente de forma lenta) debido a la afinidad del fármaco por la matriz polimérica o por un estímulo externo (como un campo magnético alterno, causando hipertermia magnética) y absorbido por el órgano o células afectadas. El porcentaje de

fármaco liberado puede ser controlado modificando directamente el campo magnético, lo que puede ser efectivo para reducir los efectos tóxicos y mejorar los efectos terapéuticos<sup>4</sup>.

Los óxidos de hierro (especialmente la magnetita) son los materiales magnéticos más utilizados en nanotecnología. Estas partículas tienen un tamaño pequeño y una baja capacidad de adsorción, por lo que es necesario funcionalizarlas para mejorar esto último; esto puede ser con muy diversos materiales.

El recubrimiento con polímeros es la vía más usada para resolver los problemas de estabilidad de las partículas. En general, los polímeros pueden ser anclados químicamente o adsorbidos por las nanopartículas; como resultado se obtiene una buena dispersión y una alta estabilidad ante la oxidación, además de que una gran cantidad de fármaco puede ser cargado en la capa polimérica. El tamaño de las partículas recubiertas con polímeros, por lo general, no rebasa los 100 nm de diámetro, lo cual es muy conveniente pues se ha demostrado que las partículas con tamaños inferiores a 100 nm logran evadir el sistema retículo endotelial.

Una forma muy útil de lograr el recubrimiento polimérico de las nanopartículas magnéticas y la carga del fármaco, es utilizando la técnica de impronta molecular. Los polímeros molecularmente impresos son preparados utilizando una plantilla (fármaco) que sirve como molde durante la polimerización. Los polímeros obtenidos por esta técnica poseen afinidad selectiva por la molécula o fármaco (por medio de interacciones covalentes o no covalentes de sitios específicos), una buena interacción con la plantilla, aumenta su tiempo de residencia dentro de la matriz polimérica. La liberación del fármaco, además de depender de la afinidad fármaco-polímero, puede ser inducida por hipertermia de las nanopartículas magnéticas usadas como núcleo<sup>5</sup>. De esta forma, se obtienen materiales híbridos que permiten el direccionamiento al sitio deseado y la liberación puede ser activada en el momento que se requiera.

Por lo anterior en el presente trabajo se diseñaron caracterizaron sistemas híbridos compuestos de nanopartículas de magnetita cubiertos de polímeros de impronta molecular selectivos a metotrexato. Los materiales preparados se evaluaron *in vitro* como sistemas de liberación modificada de metotrexato.

## 1.0 ANTECEDENTES

### 1.1 El cáncer

«Cáncer» es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso que se conoce como metástasis y el cual es la principal causa de muerte por cáncer<sup>1</sup>.

El cáncer es causado por cambios en los genes que controlan la forma cómo funcionan las células, especialmente, cómo crecen y se dividen. Inicia como una alteración celular que provoca un aumento descontrolado de células anormales que, en etapas avanzadas, crecen de forma invasiva y se propagan a través de los tejidos, lo que perturba el funcionamiento normal del organismo.<sup>2</sup>

Normalmente, toma tres o cuatro décadas a un tumor incipiente acumular todas las mutaciones necesarias para su crecimiento maligno, Weingberg, R.A, clasifica el desarrollo del cáncer en cinco etapas <sup>6</sup>: la primera inicia con la alteración genética de una célula, posteriormente ocurre el crecimiento descontrolado de células (hiperplasia), seguido de un cambio en la forma y el comportamiento de las células (displasia), la cuarta etapa se refiere al cáncer in situ, donde las células aún no atraviesan ninguna frontera entre los tejidos, y finalmente, la quinta etapa corresponde al cáncer invasivo, en el que las células afectadas viajan a otras partes del organismo, pudiendo provocar metástasis.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; con 14.1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer en 2012. Alrededor del mundo, se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas<sup>7</sup>.

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades del corazón y de la diabetes mellitus. Solo en 2016 hubo 40,612 defunciones por tumores malignos de un total de 291, 637 <sup>8</sup>.

Si el cáncer se diagnostica tempranamente, es más probable que el tratamiento sea eficaz, la probabilidad de supervivencia aumenta, la morbilidad disminuye y se reducen los costos en el tratamiento.

Existe una gran diversidad de pruebas diagnósticas que pueden ser utilizadas como apoyo para el diagnóstico de cáncer. Los métodos se pueden clasificar en diferentes grupos, según las técnicas en que se basan, siendo los principales: las pruebas analíticas, los estudios de imagen y los estudios de tejidos.

### **1.1.2 Tratamiento**

El objetivo principal del tratamiento es curar el cáncer o prolongar en lo posible la vida del paciente<sup>1</sup>. Generalmente, el tratamiento del cáncer implica la utilización de distintas modalidades de terapias que se combinan para extender la probabilidad de curar la enfermedad. El tipo de tratamientos que se den a un paciente depende de varios factores como el tipo de tumor y que tan avanzado se encuentra, su localización y tamaño, la edad del paciente, su condición física, entre otras cosas.

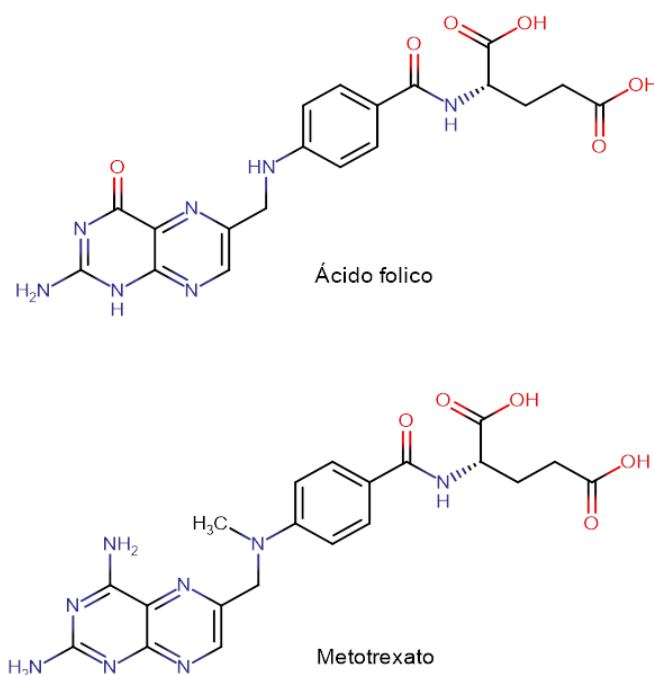
Actualmente, existen nuevas terapias que, aunque con menor frecuencia, se emplean en el tratamiento del cáncer. Algunas de estas son: la hormonoterapia (terapia con hormonas), la inmunoterapia (utiliza células del sistema inmune para atacar células cancerosas), la crioterapia (destrucción del tumor por frío) y la terapia vectorizada (enfocada en actuar sobre los cambios que promueven el crecimiento y división celular). Generalmente están indicados en tumores o circunstancias de la enfermedad muy específicas, o cuando se tiene más claro el tipo de cáncer que se trata.

Sin embargo, a pesar de lo anterior los tratamientos más utilizados siguen siendo la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia, siendo esta última la de mayor eficiencia y al mismo tiempo, la que mayores efectos adversos produce debido a la poca especificidad de los fármacos usados.

El cáncer es una enfermedad cuyo impacto no se limita al estado físico de la persona, también lo afecta en la esfera emocional; asimismo, el alto costo de su atención representa no solo una carga financiera para sus familias, sino que incluso puede mermar la economía de los países, por lo cual la prevención, diagnóstico y atención oportuna son fundamentales para enfrentar este problema de salud <sup>9</sup>.

## 1.2 Metotrexato

Entre los fármacos utilizados en la quimioterapia del cáncer, se encuentra el metotrexato (figura 1), el cual es un análogo del ácido fólico con propiedades citotóxicas, que pertenece al grupo de los antimetabolitos.



**Figura 1.** Estructuras del ácido fólico y del metotrexato

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas del metotrexato.

<b>Fórmula química</b>	<b>C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>5</sub></b>
<b>Peso molecular</b>	454.447 g/mol
<b>Nombre IUPAC</b>	Ácido (2S)-2-((4-(2,4-diaminopteridin-6-il) metilmetilamino)benzoil]amino)pentanodioico
<b>Punto de fusión</b>	195 °C
<b>Solubilidad en agua</b>	2600 mg/L
<b>log P</b>	-1.85
<b>Permeabilidad en línea celular Caco2</b>	-5.92
<b>pKa</b>	3.41



### 1.2.1 Uso terapéutico

El metotrexato está indicado en el tratamiento de la meningitis leucémica y en la profilaxis, solo o combinado con radiación. Se utiliza también para el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda, la leucemia mielocítica aguda, linfomas no de Hodgkin, coriocarcinoma y osteosarcoma. Tratamiento del carcinoma de diversos tejidos. También se usa en el tratamiento de la artritis reumatoide grave.

Puede usarse solo o en combinación con otros agentes anticancerígenos en el tratamiento del cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el linfoma cutáneo de células T y en los cánceres de cabeza y cuello.

### 1.2.2 Mecanismo de acción

Actúa principalmente sobre la fase S del ciclo celular. Su efecto citotóxico se debe a que se une de forma irreversible a la enzima dihidrofolato-reductasa, acción que impide la formación del ácido tetrahidrofólico a partir del ácido dihidrofólico. Por este mecanismo inhibe la síntesis de ADN, ARN, timidilato y proteínas y, en consecuencia, la duplicación celular.

### 1.2.3 Propiedades biofarmacéuticas

**Absorción:** La absorción oral es dependiente de la dosis en adultos y pacientes leucémicos pediátricos. En adultos, los niveles séricos máximos se alcanzan en una o dos horas. A dosis de 30 mg/m<sup>2</sup> o menos, el metotrexato generalmente se absorbe bien con una biodisponibilidad media del 60%. A dosis superiores a 80 mg/m<sup>2</sup>, la absorción de las dosis es significativamente menor debido a la saturación de los receptores.

**Distribución:** Inicial: 0,18 L/kg y de 0,4 - 0,8 L/kg en el estado estacionario. El metotrexato compete con folatos reducidos para el transporte activo a través de las membranas celulares mediante transporte activo mediado por un transportador. No atraviesa la barrera hematoencefálica.

**Metabolismo:** El metotrexato se metaboliza en el hígado y de forma intracelular, dentro de las células, es transformado a poliglutamatos, los cuales pueden convertirse de nuevo en metotrexato por enzimas hidrolasas. Los poliglutamatos actúan como inhibidores de la dihidrofolato reductasa y de la timidilato sintetasa.

**Vida media:** a bajas dosis: de 3 a 10 horas; a dosis altas: de 8 a 15 horas.

**Eliminación:** La excreción renal es la ruta primaria de eliminación, y es dependiente de la dosis y la vía de administración. De 80-90% se elimina las primeras 24 horas sin metabolizar y el 10% por excreción biliar.

**Efectos adversos:** El efecto citotóxico es más evidente en los tejidos de rápida proliferación celular, como el maligno, y los de la médula ósea, el epitelial del tubo digestivo, el respiratorio, y el del folículo piloso. También tiene propiedades inmunosupresoras moderadas.

### 1.3 Sistemas de liberación de fármacos

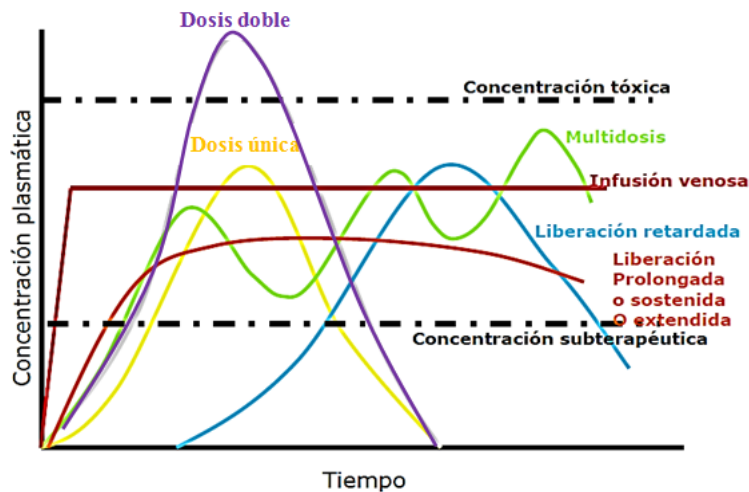
Por muchas décadas, el tratamiento de una enfermedad aguda o crónica ha sido realizado usando varias formas de dosificación farmacéutica, incluyendo tabletas, capsulas, supositorios, cremas, ungüentos, líquidos, aerosoles, e inyectables. Aun hoy, esos sistemas de entrega convencionales son los productos farmacéuticos primarios que comúnmente son prescritos por los médicos y los que se encuentran mayoritariamente en el mercado farmacéutico.

Estas formas de dosificación son conocidas por proveer una rápida liberación del fármaco. De esta forma, para conseguir y mantener la concentración del fármaco en el rango de la concentración terapéutica efectiva necesaria para el tratamiento, es a menudo necesario tomar este tipo de sistema muchas veces al día, lo que resulta en una fluctuación significativa en los niveles del fármaco en el organismo.

#### 1.3.1 Sistemas de liberación modificada

Los sistemas convencionales de suministro de fármacos vienen a menudo acompañados de efectos secundarios sistémicos atribuibles principalmente a su biodistribución inespecífica y características de liberación de fármaco incontrolables.<sup>10</sup>

Por esta razón, recientemente se han hecho muchos avances técnicos, que han resultado en el desarrollo de nuevas técnicas para la entrega de fármacos. Estas técnicas son capaces de controlar el porcentaje del fármaco que se libera, sostener la duración de la actividad terapéutica, y/o dirigir la entrega del fármaco a un tejido en específico, por lo que se conocen como sistemas de liberación controlada de fármacos.



**Figura 2** Concentraciones plasmáticas a través del tiempo, dado por distintas formas de administración, así como de formas farmacéuticas de liberación modificada.<sup>11</sup>

En comparación con las formas farmacéuticas convencionales, los sistemas de liberación controlada pueden reducir eficazmente la frecuencia de dosificación (con lo cual se evita que el paciente deje el tratamiento), mientras que se mantiene la concentración de fármaco en órgano/tejido blanco durante un período de tiempo más largo. En este sentido, los sistemas de liberación controlada proporcionan amplias percepciones y propiedades fascinantes para disminuir la fluctuación de la concentración de fármacos, reduciendo su toxicidad y mejorando la eficacia terapéutica por la disminución de la dosis.

### 1.3.1.1 Clasificación de los sistemas de liberación controlada de fármacos

Basados en su sofisticación técnica, los sistemas de liberación de fármacos (SLF) han sido clasificados en cuatro categorías<sup>12</sup>:

**1.- SLF de velocidad preprogramada:** la liberación del fármaco del sistema es impuesta por el diseño del sistema, que controla la difusión molecular del fármaco hacia el medio circundante. Estos sistemas pueden a su vez ser clasificados de la siguiente manera:

- ✓ liberación controlada por permeación de membranas poliméricas: el fármaco es parcial o totalmente encapsulado en un reservorio que a su vez está recubierto por una membrana polimérica con permeabilidad específica.
- ✓ liberación controlada por difusión a través de membranas poliméricas: este sistema es preparado dispersando el fármaco en una matriz polimérica. El fármaco entonces es liberado por erosión o degradación del polímero.

**2.- SLF modulados por activación:** en este grupo de sistemas, la liberación del fármaco se da por la aplicación de estímulos físicos (presión osmótica, presión hidrodinámica, activados magnéticamente, activados mecánicamente, activados por sonoforesis o iontoforesis, etc), químicos (pH, iones o hidrólisis) o bioquímicos (activados por enzimas). La cantidad de fármaco liberado es controlado por la presencia o ausencia de dichos estímulos.

**3.- SLF regulados por retroalimentación:** estos sistemas son activados por un agente desencadenante (como una sustancia bioquímica) y son regulados por las concentraciones de estos mediante distintos mecanismos de retroalimentación (bioerosión, biorespuesta o autorregulados).

**4.- SLF dirigidos al sitio:** Sistemas vectorizados mediante el uso de moléculas de reconocimiento molecular y/o sensibles a estímulos que reconozcan características de la enfermedad.

### 1.3.2 Los sistemas liberación modificada en la terapia del cáncer

El panorama del tratamiento del cáncer ha mejorado significativamente en las últimas cuatro décadas. Para una terapia eficaz, es necesario mejorar y desarrollar nuevas estrategias para la administración de agentes quimioterapéuticos a las células cancerosas, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, estos agentes se acumulan tanto en las células normales como en las tumorales debido a la falta de especificidad, lo que se traduce en un aumento de la toxicidad en el organismo.

Los sistemas de liberación modificada, buscan reducir estos efectos, liberando el fármaco en un sitio específico y/o en un tiempo más apropiado para evitar toxicidad. La administración dirigida de fármacos, entonces, puede ser más efectiva en el tratamiento del cáncer y minimizar la toxicidad sistémica.

El direccionamiento de estos sistemas puede conseguirse utilizando la sobreexpresión de transportadores y receptores en la membrana de las células cancerígenas, o bien, haciendo uso de estímulos externos o internos. Estos últimos tipos de sistemas son atractivos, ya que permiten la activación o desactivación remota, repetible y confiable de la liberación de fármacos dependiendo de la necesidad.

Un sistema de administración de fármacos controlado por activación no invasiva completo comprende un fármaco, un estímulo externo o interno, materiales sensibles al estímulo y portadores que responden al estímulo. El estímulo externo puede ser un campo magnético, luz, ultrasonido o radiofrecuencia, mientras que el estímulo interno puede ser el pH, la temperatura o enzimas celulares. Cabe mencionar que con la ayuda de estos sistemas se puede lograr la entrega de agentes terapéuticos y, en algunos casos, controlar la duración y el grado de liberación del fármaco en células tumorales <sup>13</sup>.

#### **1.4 Cinéticas de liberación de fármacos**

El propósito de los sistemas de liberación controlada es mantener la concentración de fármaco en la sangre o en los tejidos diana a un valor deseado tanto como sea posible. Con este fin, en general, estos sistemas inicialmente liberan parte de la dosis contenida para alcanzar rápidamente la concentración terapéutica eficaz del fármaco.

El análisis cuantitativo de los valores obtenidos en ensayos de disolución/liberación es más fácil cuando se utilizan modelos que expresan los resultados de disolución como función de algunas de las características de las formas de dosificación. El uso de modelos resulta muy útil ya que este enfoque permite, la predicción de la cinética de liberación antes de que se realicen los sistemas de liberación, además de que permite medir algunos parámetros físicos importantes, como el coeficiente de difusión de fármacos.

La disolución in vitro ha sido reconocida como un elemento importante en el desarrollo de fármacos. Bajo ciertas condiciones, pueden ser usadas como un sustituto para la evaluación de la bioequivalencia. <sup>14</sup>

Existen una serie de modelos cinéticos, que describen la liberación general del fármaco de las formas de dosificación. Los métodos de aproximación para investigar la cinética de la liberación de fármaco de formas farmacéuticas de liberación controlada se pueden clasificar en tres categorías: métodos estadísticos, métodos dependientes del modelo y métodos independientes del modelo.

Los métodos dependientes del modelo se basan en funciones, que describen el perfil de disolución. Una vez que se ha seleccionado una función adecuada, se evalúan los perfiles de disolución dependiendo de los parámetros derivados del modelo. Estos modelos incluyen:

orden cero, primer orden, Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg, Gompertz y otros modelos de regresión.<sup>15,16</sup>

**Modelo de orden cero:** La disolución de fármaco a partir de formas de dosificación que no disgregan y liberan el fármaco lentamente (asumiendo que el área no cambia que no se alcanzan condiciones de equilibrio) puede representarse mediante la ecuación:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (1)$$

Donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco disuelto al tiempo  $t$ ,  $Q_0$  es la cantidad inicial de fármaco en disolución (la mayoría de las veces  $Q_0 = 0$ ) y  $K_0$  es la constante de liberación de orden cero expresada en unidades de concentración/tiempo.

**Modelo de primer orden:** Este modelo establece una dependencia de la velocidad de liberación del fármaco con su concentración. La liberación del fármaco que sigue la cinética de primer orden puede ser expresada por la ecuación adaptada de Hixson y Crowell como sigue:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C) \quad (2)$$

Donde  $C$  es la concentración del soluto al tiempo  $t$ ,  $C_s$  es la concentración de saturación del soluto en el medio y  $K$  es la constante de primer orden expresada en unidades de tiempo<sup>-1</sup>.

La ecuación (2) puede ser expresada en logaritmos decimales como:

$$\log C = \log C_0 - Kt/2.303 \quad (3)$$

Donde  $C_0$  es la concentración inicial del fármaco,  $K$  es la constante de proporcionalidad, y  $t$  es el tiempo. De esta forma, una gráfica del logaritmo decimal de la cantidad liberada de fármaco contra el tiempo, será lineal.

**Modelo Korsmeyer-Peppas:** este modelo establece una liberación exponencial del fármaco con el paso del tiempo.

$$f_t = M_t/M_\infty = at^n \quad (4)$$

Donde  $M_t/M_\infty$  es una fracción de fármaco liberado al tiempo  $t$ ,  $a$  es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica y  $n$  es el exponente de liberación, que es indicativo del mecanismo de liberación como se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Mecanismo de liberación de fármaco en función del valor de n.

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte de fármaco	Tasa de liberación en función del tiempo
<0.5	Difusión (Ley de Fick)	$t^{-0.5}$
0.5 < n < 1.0	Transporte anómalo	$t^{n-1}$
1.0	Transporte de caso II*	Liberación de orden cero
> 1.0	Súper transporte de caso II*	$t^{n-1}$

\* El proceso de liberación es controlado por la relajación de las cadenas poliméricas, la difusión se produce a velocidad constante si no cambia la geometría del sistema durante el proceso de liberación<sup>17</sup>.

**Modelo Peppas-Sahlin:** Este modelo es utilizado cuando se desea investigar si el mecanismo se está llevando a cabo por hinchamiento, en este caso, las cadenas poliméricas se separan dando un aumento en el área de contacto con el medio, aumentando la movilidad del fármaco. Este proceso se representa con la siguiente ecuación:

$$f_t = k_1 t^n + k_2 t \quad (5)$$

Donde  $k_1$  corresponde a la difusión y  $k_2$  a la relajación del polímero y se consideran fenómenos aditivos. El exponente n corresponde al tipo de difusión tomando valores similares a los de Korsmeyer-Peppas y  $f_t$  es la fracción de fármaco al tiempo t. <sup>18</sup>

**Modelo Hopfenberg:** Es un modelo matemático que correlaciona la liberación del fármaco de una superficie polimérica erosionable. Siempre y cuando el área de la superficie permanezca constante durante el proceso de degradación.

La fracción acumulativa del fármaco liberado al tiempo t fue descrita como:

$$M_t / M_\infty = 1 - [1 - k_{HB} t / C_L a]^n \quad (6)$$

Donde  $k_{HB}$  es la constante de orden cero que describe el proceso de la degradación del polímero (erosión de la superficie),  $C_L$  es la carga inicial del fármaco en el sistema, a es la mitad del espesor del sistema (radio de la esfera) y n es un exponente que varía con la geometría del sistema evaluado, siendo 1 para placas, 2 para cilindros y 3 para esferas.

### 1.5 Nanotecnología en farmacia

La nanotecnología es la creación y utilización de materiales y sistemas mediante el control de la materia en escala nanométrica ( $10^{-9}m$ ), es decir, a nivel de átomos, moléculas, y estructuras supramoleculares.<sup>19</sup> Las aplicaciones más importantes en el cuidado de la salud

son en el diagnóstico, bioimagen, entrega de fármacos, y en el desarrollo de nuevas terapias relacionadas con el cáncer.<sup>20</sup>

Las ventajas de la nanotecnología en la entrega de fármacos, es que el uso de materiales con distintas propiedades fisicoquímicas, pueden ayudar a aumentar la velocidad de solubilidad del fármaco, mejorar su estabilidad, y maximizar el tiempo del mismo en circulación, asimismo, se puede lograr una entrega selectiva en el sitio de acción y un decremento de la resistencia a la permeación celular. Entre los diferentes sistemas nanoparticulados que se han desarrollado se incluyen liposomas, nanopartículas poliméricas<sup>21</sup>, lipídicas y de auto ensamblaje. Al modular el tamaño, la carga superficial y el tipo de material, se puede modular la eficiencia del direccionamiento específico.<sup>22</sup>

Para asegurar el uso potencial en la clínica de estos sistemas, hay varios puntos esenciales que deben tomarse en cuenta al llevar a cabo la elección del material, principalmente, el material que constituya el sistema debe tener: I) biocompatibilidad y biodegradabilidad suficientes; (II) buena estabilidad en condiciones fisiológicas; y (III) alta capacidad de carga de fármacos y baja toxicidad. <sup>10</sup>

## **1.6 Nanopartículas magnéticas: Aplicaciones biológicas de los materiales magnéticos**

El interés en la utilización de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas ha incrementado considerablemente en las últimas dos décadas, esto es debido principalmente a su tamaño pequeño y a sus propiedades magnéticas únicas.

Las nanopartículas magnéticas pueden ser de diferentes composiciones químicas. Las partículas de óxido de hierro tales como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) o la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , su forma oxidada) son por mucho los óxidos más comúnmente empleados para aplicaciones biomédicas al ser biocompatibles y tener una buena estabilidad química. Por el contrario, las nanopartículas metálicas (como el cobalto y el níquel) aunque son más poderosas desde el punto de vista de sus propiedades magnéticas, resultan ser tóxicas y por lo tanto no pueden emplearse para aplicaciones clínicas. El hierro metálico podría ser utilizado, sin embargo, debido a la gran área superficial de las nanopartículas, es espontáneamente convertido a oxihidróxido de hierro en medio acuoso.<sup>23</sup>



Los sistemas de entrega de fármacos se pueden beneficiar en términos de direccionamiento y liberación controlada con la introducción de este tipo de nanopartículas, ya que sus propiedades magnéticas, hace posible usarlas en numerosas aplicaciones, por lo cual pueden pertenecer a uno o más de los siguientes grupos:<sup>24</sup>

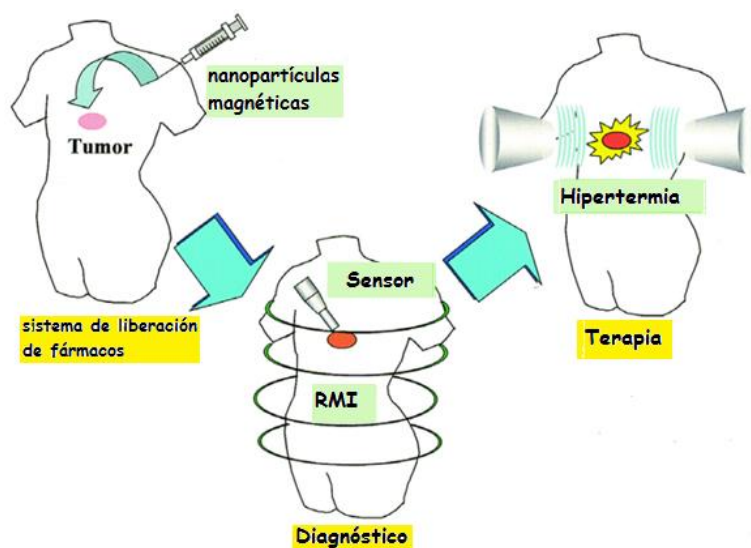
- ❖ Agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI).<sup>25</sup>
- ❖ Agentes de hipertermia, donde las partículas magnéticas son calentadas selectivamente mediante la aplicación de un de campo magnético alterno<sup>26</sup>.
- ❖ Vectores magnéticos, que pueden ser dirigidos por medio de un gradiente magnético hacia un sitio específico, como en el caso de la entrega dirigida de fármacos.<sup>27</sup>

La aplicación principal de las nanopartículas magnéticas dentro de la salud es quizás, en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, así como de otras enfermedades localizadas.

### **1.6.1 Nanopartículas magnéticas como agentes teragnósticos**

La palabra *teragnóstico* o *teracnóstico* es la combinación de los términos terapia y diagnóstico<sup>28</sup>. De esta forma, los sistemas teragnósticos a nanoescala combinan las modalidades de terapia y diagnóstico, permitiendo la entrega del fármaco y al mismo tiempo, el diagnóstico en tiempo real.

Como se ya se mencionó, las nanopartículas magnéticas pueden tener una o más aplicaciones en el campo de la medicina, por lo que pueden ser consideradas como un sistema teragnóstico debido a que pueden ser utilizadas para el diagnóstico, los casos más frecuentes son; como agente de contraste en resonancia magnética de imagen y en el tratamiento al acoplárseles fármacos a la superficie para tener una terapia específica.



**Figura 3.** Ilustración esquemática de la estrategia terapéutica de las nanopartículas magnéticas como teragnósticos. Las nanopartículas magnéticas son inyectadas en torrente sanguíneo y son dirigidas al tumor utilizando un gradiente magnético, sirviendo al mismo tiempo como agente de contraste en RMI. El fármaco es entonces liberado por distintos mecanismos o bien, se puede inducir la hipertermia de las partículas con ayuda de un campo magnético alterno.<sup>29</sup>

### 1.6.2 Nanopartículas magnéticas para el tratamiento del cáncer

Las nanopartículas pueden actuar a nivel tisular o celular, esto último implica que pueden ser endocitadas o fagocitadas (por células dendríticas o macrófagos) resultando en la internalización de las partículas.<sup>24</sup>

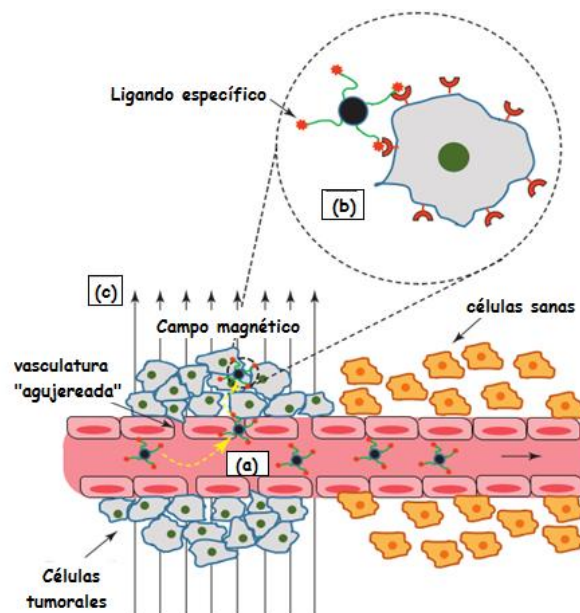
El direccionamiento hacia un tumor usando nanopartículas puede usar estrategias pasivas o activas.

El direccionamiento pasivo se basa en el efecto de permeación y retención (EPR)<sup>30</sup> que ocurre como resultado de la extravasación de las nanopartículas al sitio deseado (tumor). El efecto EPR está facilitado en ciertas condiciones patológicas como en los tumores sólidos, en los que la permeabilidad de la vasculatura del tejido incrementa hasta el punto que las partículas pueden extravasarse y localizarse en el espacio intersticial del tejido. El crecimiento del tumor induce, por la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis), brechas en los mismos tan grandes como de 400 a 800 nm dependiendo del tipo de tumor.

El direccionamiento activo, por otro lado, está basado en la expresión exclusiva de diferentes epítopos o receptores en las células tumorales y en características físicas específicas, de modo que distintos ligandos pueden ser anclados a las partículas, permitiendo mejorar la

acumulación de las mismas en el tumor y en algunos casos, su internalización por endocitosis.

En el caso de los acarreadores magnéticos, como ya se ha mencionado, se puede llevar a cabo el direccionamiento por la acción de un campo magnético externo en la región del tumor, lo cual produce un gradiente magnético a través del tumor. La fuerza magnética producida por el gradiente, atrae a las partículas dentro del espacio tumoral (a través de la vasculatura comprimida) y ayuda en su subsecuente retención.<sup>31</sup>



**Figura 4** Representación de las modalidades de direccionamiento de las nanopartículas magnéticas al tumor. (a) efecto EPR. (b) direccionamiento molecular. (c) direccionamiento magnético.<sup>26</sup>

## 1.7 Características de materiales magnéticos

### 1.7.1 Clasificación.

El origen del magnetismo radica en los movimientos orbitales y de espín de los electrones y de cómo interactúan los electrones entre sí. La mejor manera de introducir los diferentes tipos de magnetismo es describir cómo los materiales responden a los campos magnéticos. La principal diferencia es que en algunos materiales no hay interacción colectiva de los momentos magnéticos atómicos, mientras que en otros materiales existe una interacción muy fuerte entre los mismos.

El comportamiento magnético de los materiales se puede clasificar en los siguientes cinco grupos principalmente:<sup>32</sup>

- Diamagnetismo
- Paramagnetismo
- Ferromagnetismo
- Antiferromagnetismo
- Ferrimagnetismo

#### **1.7.1.1 Diamagnetismo.**

El diamagnetismo se debe al comportamiento no cooperativo de los electrones en órbita cuando se exponen a la acción de un campo magnético. Las sustancias diamagnéticas están compuestas de átomos que no tienen momentos magnéticos netos (es decir, todas las capas orbitales están llenas y no hay electrones desapareados). Sin embargo, cuando se expone a un campo, se produce una magnetización negativa y, por lo tanto, la susceptibilidad es negativa. La otra propiedad de los materiales diamagnéticos es que la susceptibilidad es independiente de la temperatura.

#### **1.7.1.2 Paramagnetismo.**

Esta clase de materiales, algunos de los átomos o iones en el material tienen un momento magnético neto debido a electrones desapareados en orbitales parcialmente llenos. Uno de los átomos más importantes con electrones desapareados es el hierro. Sin embargo, los momentos magnéticos individuales no interactúan magnéticamente, y como el diamagnetismo, la magnetización es cero cuando el campo es removido. En presencia de un campo, existe ahora una alineación parcial de los momentos magnéticos atómicos en la dirección del campo, dando como resultado una magnetización positiva neta y una susceptibilidad positiva y dependiente de la temperatura.

#### **1.7.1.3 Ferromagnetismo**

A diferencia de los materiales paramagnéticos, los momentos atómicos en estos materiales muestran interacciones muy fuertes. Estas interacciones son producidas por fuerzas de intercambio electrónico y dan como resultado una alineación paralela o antiparalela de los momentos atómicos. Las fuerzas de intercambio son muy grandes, equivalentes a un campo del orden de 1000 Teslas. La fuerza de intercambio es un fenómeno mecánico cuántico debido a la orientación relativa de los espines de dos electrones.

Los materiales ferromagnéticos exhiben una alineación paralela de los momentos que da como resultado una magnetización neta grande incluso en ausencia de un campo magnético.

### 1.7.1.4 Ferrimagnetismo

En compuestos iónicos, tales como óxidos, pueden producirse formas más complejas de ordenación magnética como resultado de la estructura cristalina. Un tipo de ordenamiento magnético es llamado ferrimagnetismo. La estructura magnética está compuesta por dos subredes magnéticas que están separadas por oxígenos. Las interacciones de intercambio están mediadas por los aniones de oxígeno. Cuando esto pasa, las interacciones son llamadas indirectas o de superintercambio. La fuerza de estas interacciones resulta en un alineamiento antiparalelo de los espines entre ambas subredes.

En los ferrimagnetos, los momentos magnéticos de las dos subredes no son iguales y como resultado se tiene un momento magnético neto. El ferrimagnetismo es entonces, similar al ferromagnetismo, sin embargo, los ferro y ferrimagnetos tienen un ordenamiento magnético muy distinto.

### 1.7.1.5 Antiferromagnetismo

El antiferromagnetismo también es debido al ordenamiento magnético. Si los momentos de ambas subredes son exactamente iguales pero opuestos, el momento neto es cero.

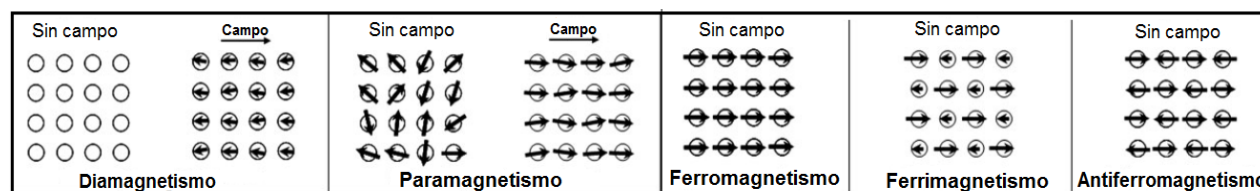
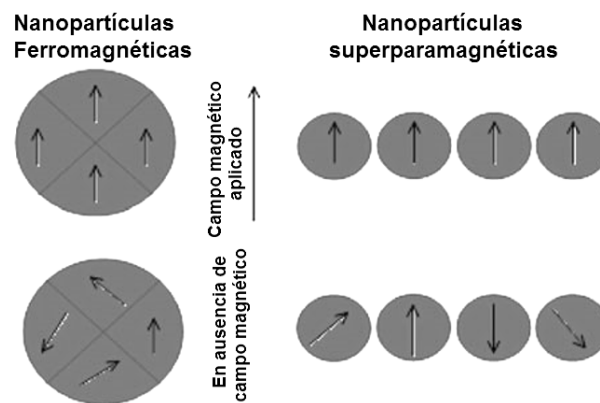


Figura 5. Dipolos magnéticos y su comportamiento en presencia y ausencia de un campo magnético externo.<sup>33</sup>

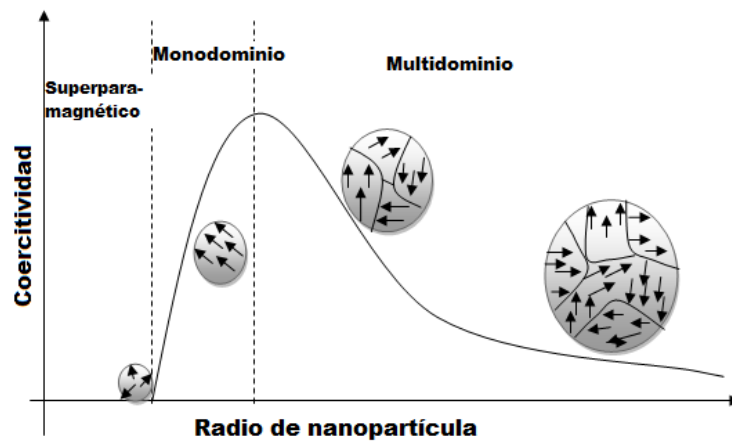
### 1.7.1.6 Superparamagnetismo

El superparamagnetismo es un caso especial de los materiales ferri- y ferromagnéticos. A tamaños pequeños (del orden de decenas de nanómetros), las partículas se convierten en monodominios magnéticos y se alcanza otro umbral crítico, en el que la remanencia y la coercitividad llegan a cero. Cuando esto sucede, la partícula se convierte en superparamagnética (figura 7).

Para las partículas superparamagnéticas, el momento magnético neto en campo cero y en  $T > 0K$ , tendrá una media de cero. En un campo aplicado, habrá una alineación estadística neta de los momentos magnéticos (figura 6). A temperaturas suficientemente altas, la energía térmica es suficiente para inducir la rotación libre de la partícula dando como resultado una pérdida de magnetización neta en ausencia de un campo externo. Esta propiedad, permite a las partículas mantener su estabilidad coloidal y evitar la agregación lo que hace factible su uso en aplicaciones biomédicas. Además, las interacciones de acoplamiento dentro de estos dominios magnéticos únicos resultan en susceptibilidades magnéticas mucho más altas que los materiales paramagnéticos.<sup>32,34</sup>



**Figura 6.** Magnetización de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas bajo un campo magnético externo; (a) bajo un campo magnético externo, los multidominios de una nanopartícula ferromagnética se alinean con el campo aplicado al igual que el momento magnético de los monodominios en las nanopartículas superparamagnéticas. (b) En ausencia de un campo externo, las nanopartículas ferromagnéticas tendrán una magnetización neta y las nanopartículas superparamagnéticas no tendrán magnetización neta debido a la rápida inversión del momento magnético<sup>35</sup>



**Figura 7.** Ilustración esquemática de la relación coercitividad-tamaño de partículas pequeñas.<sup>35</sup>

### 1.7.2 Teoría de dominios

Aunque un material ferromagnético debe tener todos sus momentos magnéticos apuntando en la misma dirección, una pieza macroscópica del material no puede tener esta configuración porque la cantidad de energía magnetostática almacenada debe ser enorme. La forma en que un sólido puede reducir esta enorme energía magnetostática es romperse en regiones llamadas dominios magnéticos. Dentro de un monodominio todos los momentos magnéticos permanecen paralelos, pero cada dominio está orientado al azar de modo que el momento magnético neto de la muestra es casi cancelado. Esta situación genera interfaces entre dominios llamadas paredes de dominio, donde los momentos magnéticos adyacentes están en una configuración no favorable, de modo que estas paredes de dominio son altamente energéticas. Aunque una cierta energía se almacena dentro de las paredes del dominio, la disminución en la energía magnética total favorece la configuración de multi dominio.<sup>36</sup>

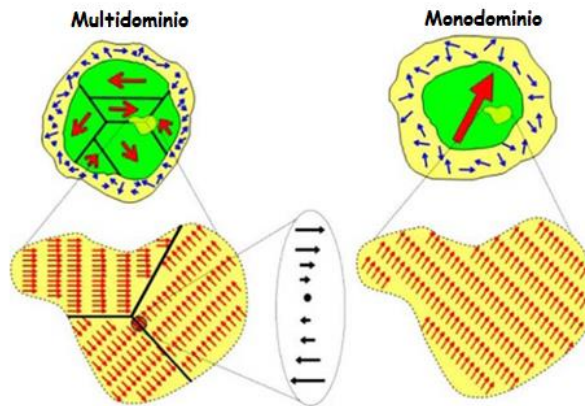


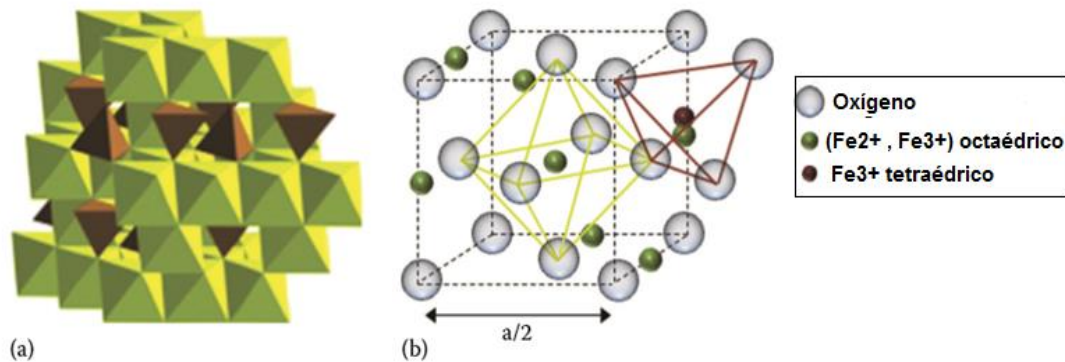
Figura 8. Organización de los dominios magnéticos.

### 1.8 Magnetita

La magnetita es un mineral ferrimagnético color negro formado de óxidos de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  y con fórmula química  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Su dureza mineral es de 5.5 a 6.5 Mohs, tiene una densidad de  $5.2 \text{ g/cm}^3$  y se disuelve lentamente en ácido clorhídrico.

La magnetita tiene una estructura de espinela inversa cúbica con una celda cúbica centrada en la cara compuesta por 32 aniones de oxígeno, 16 cationes de  $\text{Fe}^{3+}$  y 8 de  $\text{Fe}^{2+}$ . La mitad de los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  están coordinados tetraédricamente, mientras que la otra mitad y todos los iones  $\text{Fe}^{2+}$  están coordinados octaédricamente. La magnetita puede estar sujeta a oxidación debido a la reducción de hierro en la red cristalina. En presencia de oxígeno, la

magnetita se oxida a maghemita. En este proceso,  $\text{Fe}^{2+}$  oct se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$  oct, dando lugar a vacantes confinadas a los sitios octaédricos.<sup>37</sup>



**Figura 9** Organización de la red cristalina de magnetita.<sup>38</sup>

### 1.8.1 Toxicidad

El hierro es un metal que es esencial para la vida, principalmente debido a su capacidad para aceptar y donar electrones fácilmente cambiando entre los iones ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Esta reacción de reducción-oxidación desempeña un papel crítico en la producción de energía y en muchas otras vías metabólicas como la síntesis de ADN, la fosforilación oxidativa mitocondrial, el transporte de oxígeno y la función del citocromo P450. Después de la internalización intracelular mediada por endocitosis de las nanopartículas magnéticas (NPMs), estas se agrupan dentro de los lisosomas y se degradan en iones de hierro mediante una serie de enzimas hidrolizantes. El hierro liberado se metaboliza en el sistema retículo-endotelial (RES por sus siglas en inglés) y posteriormente se utiliza para formar glóbulos rojos o se excreta a través de los riñones.

La cantidad total de hierro en el cuerpo está estrictamente regulada, porque el exceso de hierro (20-60 mg/kg) puede ser extremadamente tóxico. Los altos niveles de iones de hierro libre de las NPMs pueden causar un desequilibrio en la homeostasis corporal y conducir a respuestas celulares aberrantes, incluyendo daño al ADN, y el estrés oxidativo.

Muchos estudios in vitro han demostrado que las composiciones de NP a base de Ag y Zn son tóxicas, mientras que las que están basadas en  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  son menos tóxicas. Esta tendencia es apoyada por otros estudios comparativos que se han llevado a cabo. De hecho,



varios estudios han demostrado que el potencial tóxico de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> es bajo comparado con el de SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> y NiO en concentraciones de 1-100 µg/ml.<sup>39</sup>

## 1.8.2 Estrategias para la síntesis de nanopartículas de magnetita

A continuación, se describen algunos de los distintos métodos por los que se puede obtener magnetita.<sup>38,39</sup>

### 1.8.2.1 Método de co-precipitación

El método de co-precipitación es la técnica mayormente utilizada para sintetizar magnetita, el método se lleva a cabo precipitando una solución acuosa que contiene una mezcla de sales férricas y ferrosas (en una relación estequiométrica 2:1) usando una base, a temperatura ambiente o elevada (70-90°C) y en ausencia de oxígeno.



Este método de síntesis conduce a partículas cuasi esféricas y tiene la ventaja de ser rápido, simple, económico y fácilmente escalable; Sin embargo, las partículas obtenidas presentan un alto índice de polidispersidad y a menudo se requiere un procedimiento adicional para la selección del tamaño.

### 1.8.2.2 Método hidrotérmico

En el método hidrotérmico, se basa en la reducción parcial de un compuesto de hierro (III), se utiliza un reductor suave como acetato de sodio, el producto es el Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Los cloruros de hierro se disuelven en una solución acuosa junto con tensoactivos, y se sellan en una autoclave revestido con Teflón, donde se mantienen alta temperatura y alta presión para sintetizar NPMs con tamaños y formas definidas. Finalmente, se deja enfriar la autoclave a temperatura ambiente y la solución sobrenadante resultante se lava para eliminar residuos e impurezas. Los parámetros tales como las temperaturas de calentamiento, los tiempos de reacción y la relación de los precursores a los revestimientos de superficie se manipulan para obtener NPMs biocompatibles con diversos tamaños, formas y propiedades magnéticas.

### 1.8.2.3 Método de microemulsión

Se usan dos fases inmiscibles, por ejemplo tolueno como fase orgánica y una disolución de  $\text{FeCl}_3$  y  $\text{FeCl}_2$  como fase acuosa, para formar NPMs bajo la presencia de agentes estabilizadores (como bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y n- butanol) formando una monocapa en la interfase de las fases inmiscibles. En el método de microemulsión de W/O (agua en aceite), los agentes estabilizantes en fase continua protegen inicialmente las gotitas formadas de reactivos de óxido de hierro, los cuales reaccionan después para formar las NPMs. Los tamaños y formas son controlables variando las concentraciones de los precursores, el surfactante y/o los disolventes. Esta técnica requiere grandes cantidades de surfactante (hasta 20-30%), que es difícil de eliminar, y por ello se limita a la escala de laboratorio.

### 1.8.2.4 Método sonoquímico

Este proceso se basa en el paso de ondas sonoras de alta frecuencia (20 kHz a 10 MHz) a través de una solución que contiene los precursores ( $\text{FeCl}_3$  y  $\text{FeCl}_2$ ) dando lugar a la formación, crecimiento e implosión de burbujas en el líquido a temperatura ambiente. El rápido estallido de burbujas también limita el mecanismo de crecimiento cristalino de los nucleones, por lo que las nanopartículas son generalmente de un tamaño pequeño. Los tensoactivos o polímeros pueden añadirse durante o después de la etapa de sonicación para asegurar la formación de una dispersión estable de las nanopartículas. Las principales ventajas de esta técnica son el uso de pocos reactivos y el requerimiento de menos etapas de purificación.

Además de los métodos mencionados anteriormente, existen otros más como el método sol-gel, el asistido por microondas, el método de polioles, los métodos pirolíticos o de descomposición térmica que son un poco más complejos (en cuanto a método y equipos) y que son utilizados cuando se buscan características específicas del producto.

## 1.8.3 Diseño y estabilidad

En general, se asume que, en la superficie de las nanopartículas, el cristal de magnetita tiene grupos hidroxilo en su superficie, que interactúan fuertemente con las capas de agua

adsorbidas mediante puentes de hidrógeno. Tales grupos hidroxilo presentan propiedades ácidas y básicas que conducen a la protonación a valores de pH bajos y la desprotonación a altos valores de pH, dando como resultado superficies positivas y negativamente cargadas respectivamente. En ambas condiciones, las superficies de la nanopartículas se repelen, previniendo o retardando su agregación (estabilización electrostática).

Las dispersiones acuosas son estables durante largos períodos, sin embargo, a pH fisiológico, la densidad de carga superficial es demasiado baja (punto isoeléctrico a pH 7 para los óxidos de hierro) y por lo tanto las nanopartículas se agregan en forma de floculados. Por lo tanto, la única manera de estabilizar las nanopartículas de óxido de hierro en el agua es asegurar su estabilización estérica decorando su superficie con macro moléculas hidrófilas que actúen como un recubrimiento repelente.<sup>23</sup>

#### 1.8.4 Funcionalización

Un recubrimiento de superficie adecuado permite que las NPMs de óxido de hierro se dispersen en ferrofluidos homogéneos y mejoren su estabilidad. Varios grupos de materiales de recubrimiento se usan para modificar la superficie química de las NPM:<sup>40</sup>

- a. **Metales inorgánicos:** Metales preciosos tales como el oro, han sido usados para proteger los núcleos de óxido de hierro contra la oxidación, debido a que forman partículas altamente estables de baja reactividad. Sin embargo, este recubrimiento es difícil de lograr debido a la naturaleza disímil de las dos superficies.
- b. **Óxidos inorgánicos:** Las NPMs recubiertas con sílice son redispersables y estables en condiciones acuosas, tienen tiempos de circulación más largos y su superficie hidrófila cargada negativamente proporciona un anclaje ideal para la unión covalente a ligandos.
- c. **Moléculas y estructuras bioactivas:** Las NPMs se han funcionalizado con péptidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas y a veces anticuerpos para aplicaciones biomédicas específicas.
- d. **Polímeros orgánicos:** Las preparaciones clínicas de las NPMs se han basado tradicionalmente en derivados biodegradables orgánicos de dextran, sin embargo, actualmente también se utilizan polímeros como el polietilenglicol, polisorbato y polianilina. Mediante la creación de repulsión estérica, los polímeros pueden estabilizar a las NPMs en la suspensión. Las NPM recubiertas con polímeros, pueden

ser internalizadas eficientemente por las células a través de endocitosis debido a la afinidad anfifílica a las bicapas lipídicas en las membranas plasmáticas, por lo que son ampliamente usados como acarreadores de fármacos.

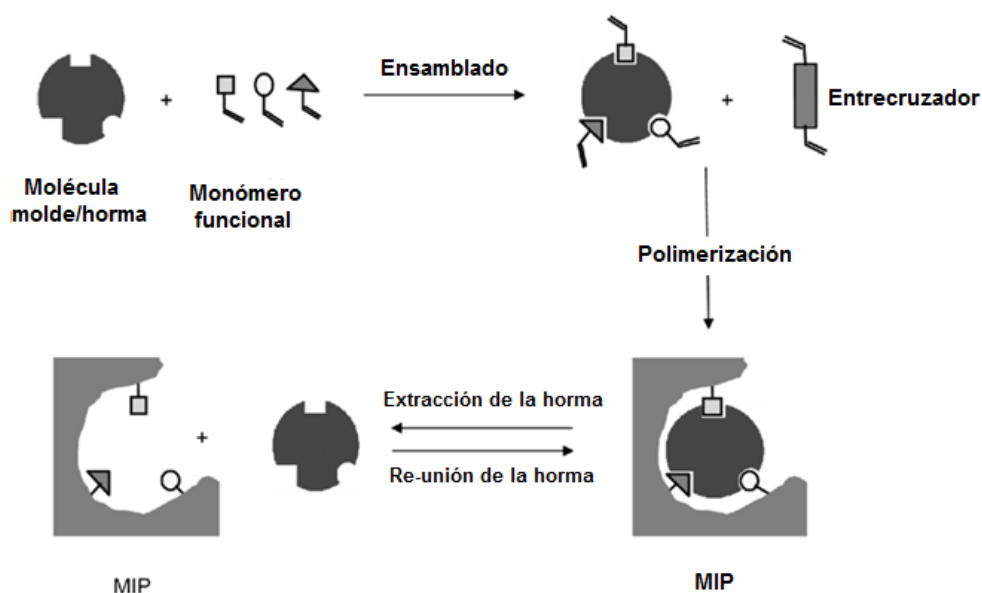
### 1.9 Polímeros de impronta molecular

Todos los sistemas vivos están basados en interacciones entre moléculas, y el reconocimiento que toma lugar entre ellas. Las interacciones moleculares son, de esta forma, la base de la información química y biológica.

El concepto de interacciones moleculares es muy viejo, en 1894, Emil Fisher presentó su famosa teoría de llave-cerradura, metáfora que describe la forma en la que un sustrato interactúa con una enzima en un sitio específico. El estudio de la química supramolecular (más allá de la molécula), ha llevado a los científicos a estudiar entidades sintéticas que imitan la acción de enzimas o anticuerpos.

Una atractiva aproximación sintética para imitar a la naturaleza es la *impronta molecular*, que es el concepto de la preparación de sitios de reconocimiento selectivos a un sustrato en una matriz polimérica utilizando una molécula como molde o plantilla.

La molécula molde forma interacciones con uno o varios elementos funcionales en disolución en una etapa de prearreglo y el posterior bloqueo de estas interacciones conduce a la formación de una matriz que acomoda sitios de reconocimiento selectivos para la plantilla. Mediante este procedimiento, los sitios de unión naturales se pueden imitar sintéticamente de una manera sencilla pero efectiva y los materiales impresos molecularmente resultantes se caracterizan a menudo por tener una estabilidad química y física muy alta.



**Figura 10.** Representación del esquema general de la impresión molecular no covalente.

En el contexto de la metáfora de Fischer, la impresión molecular puede describirse como una forma de hacer cerraduras artificiales para las *llaves moleculares*.

La “plantilla” o “molécula molde” suele ser una molécula pequeña, tal como los fármacos. Los "bloques de construcción de la cerradura" se llaman monómeros funcionales. El "pegamento molecular" utilizado para unir los complejos de bloques se conoce como entrecruzador. Todo el procedimiento de impresión se realiza en un disolvente, que se denomina porógeno. Los protocolos de impresión más usuales hacen uso de un proceso de polimerización por radicales, en el que un agente iniciador de radicales libres también se añade.

Por lo general, las interacciones intermoleculares como enlaces de hidrógeno, dipolo-dipolo e interacciones iónicas entre la molécula molde y los grupos funcionales presentes en la matriz polimérica impulsan los fenómenos de reconocimiento molecular. Por lo tanto, el polímero resultante reconoce y se une selectivamente sólo a las moléculas molde.

### 1.9.1 Proceso de impresión molecular por radicales libres

Cuando se emplea la polimerización por radicales libres, la polimerización puede iniciarse térmicamente o fotoquímicamente, iniciando así la escisión del iniciador para generar radicales libres. Esta formación de radicales inicia entonces la polimerización de los monómeros funcionales y el entrecruzador, lo que conduce a la formación de una red polimérica reticulada. Obsérvese que la polimerización se lleva a cabo en presencia de las

moléculas molde, por lo que estas quedan "atrapadas" dentro de la red polimérica al final de este proceso.

Para extraer la molécula molde, se utilizan varios métodos, en el método no covalente, un disolvente polar, puede interrumpir electrónicamente los enlaces iónicos o de hidrógeno, compitiendo así las moléculas molde de sus sitios de unión. Un lavado uniforme con un disolvente volátil tal como metanol facilita la eliminación de los reactivos y el secado del polímero, sin embargo, la remoción del molde puede ser complicada.

La mayor ventaja de los polímeros molecularmente impresos (MIP) es su alta selectividad y afinidad por la molécula blanco usada en el proceso de impresión. Los polímeros impresos, comparados con sistemas biológicos como las proteínas, tienen una alta robustez física, mayor fuerza, resistencia a temperaturas y presiones elevadas, así como a muchas interacciones con diversas sustancias. Además, son menos costosos en cuanto a la síntesis y tienen una larga vida de almacenamiento, conservando su capacidad de reconocimiento durante varios años también a temperatura ambiente.<sup>41</sup>

Los óxidos inorgánicos como la magnetita, han sido utilizados como matrices para la impronta molecular y han recibido una creciente atención en los últimos años debido en gran parte a su rigidez estructural extrema, que es crucial para la retención de los sitios impresos, ya que proporciona el andamio que sustenta mecánicamente la organización del grupo funcional.<sup>42</sup>

### **1.10 Polímeros de impronta molecular con partículas magnética**

Debido al gran interés clínico que tienen las nanopartículas de magnetita por sus propiedades magnéticas, la gran mayoría de los trabajos publicados se ha enfocado en su estudio para distintos fines, de esta forma, se tienen más de 3000 publicaciones que hacen referencia al uso de las nanopartículas de magnetita con distintas aplicaciones (principalmente en la nanotecnología), siendo usadas en la clínica como agente de contraste en resonancia magnética de imagen principalmente<sup>43,44</sup>

Los polímeros de impronta molecular (MIP) han sido también ampliamente investigados en la última década, debido a sus variadas aplicaciones en distintas áreas, habiendo hasta la fecha poco más de 1300 publicaciones al respecto, sin embargo, la mayoría de las publicaciones se enfocan en su uso como captador de ciertas moléculas contaminantes<sup>45</sup> y en la extracción de otros más para su análisis<sup>46</sup>. En general, los estudios de los polímeros de

impronta molecular han tenido un enfoque más que nada analítico y una minoría evalúan su posible aplicación como sistemas liberación.

Los MIP difieren en cuanto a afinidad con las moléculas dependiendo del monómero funcional utilizado, por lo que se han realizado estudios para conocer las condiciones óptimas para realizar su síntesis; en este sentido, Curcio, *et al.* (2009) polímeros de impronta molecular altamente selectivos a metotrexato. Se compararon dos tipos de monómeros funcionales: ácido metacrílico, 2-(dimetilamino)etil metacrilato y una mezcla de ellos con el fin de optimizar la impronta. Se probó la selectividad y la especificidad del sistema mediante experimentos de adsorción en agua a pH 7.4, obteniendo los mejores resultados al emplear la mezcla de monómeros funcionales, demostrando que, por esta vía, cada monómero interactúa con funcionalidades complementarias en la molécula molde, estabilizando el complejo de prearreglo y minimizando los efectos repulsivos.<sup>47</sup>

Por otro lado, en cuanto a las investigaciones realizadas del sistema híbrido compuesto por nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros de impronta molecular, se tienen aún menos trabajos informados en la literatura (409 artículos publicados hasta este año), aunque es evidente que ha habido un crecimiento considerable en los últimos años.

Los polímeros de impronta molecular han sido investigados como sorbentes altamente selectivos para la extracción en fase sólida para concentrar y limpiar las muestras antes del análisis. De esta forma, los MIPs son empacados en columnas o cartuchos y son incubados junto con la muestra. Ahmadi *et al.* (2015), reportaron un trabajo en el que utilizaban nanoesferas de magnetita recubiertas poliméricamente utilizando metacrilamida como monómero funcional, EGDMA como entrecruzador, AIBN como iniciador de radicales libres y doxorubicina como molécula molde.

Este sistema fue estudiado principalmente con fines analíticos, comparando la capacidad de adsorción de un sistema no improntado y uno improntado, siendo este último aquel que presentó una mayor adsorción del fármaco. El método propuesto fue aplicado exitosamente para el análisis de doxorubicina en muestras de orina y los resultados mostraron una mayor sensibilidad en comparación a métodos reportados con anterioridad.<sup>48</sup>

La utilización de polímeros de impronta molecular como modificadores de superficie de nanopartículas magnéticas, ha permitido el desarrollo de sistemas híbridos que permiten un

control de la terapia vectorizada, principalmente, en el tratamiento del cáncer. La evaluación de estos sistemas híbridos como sistemas de liberación modificada, se han hecho con distintos fármacos, enfocándose en aquellos con propiedades antineoplásicas y con una alta toxicidad como la doxorubicina. Este tipo de sistemas, ofrece una solución para el principal problema que se tiene cuando se utiliza la quimioterapia en un paciente con cáncer: los efectos secundarios de los fármacos administrados.

Griffete *et al.* (2015) propusieron la síntesis de un sistema que consiste en nanopartículas de magnetita recubiertas poliméricamente por impronta molecular para la terapia del cáncer. En la síntesis utilizaron doxorubicina como molde, acrilamida como monómero funcional, EGDMA como Entrecruzador y AIBN como iniciador. Se realizaron isotermas de adsorción del sistema y se realizaron estudios de liberación *in vitro* para evaluar su potencial aplicación como sistema de entrega de fármaco. Las liberaciones se llevaron a cabo en presencia y ausencia de un campo magnético alterno, encontrando que la cantidad de doxorubicina liberada era mayor en presencia de este, debido a que un campo magnético alterno propicia la hipertermia de las nanopartículas de magnetita.

La liberación de doxorubicina también fue probada en células cancerígenas, mismas por las que las nanopartículas fueron muy eficientemente capturadas. Se observó que la sola internalización de las nanopartículas no provocaba la muerte de las células, demostrando así que el fármaco unido en la impronta molecular es inactivo. Al aplicar un campo magnético alterno, fue que se observó que la viabilidad de las células fue afectada, reduciendo al 60% 1h 30 min después del tratamiento.<sup>5</sup>

Hashemi-Moghaddam *et al.* (2016) también trabajaron con un sistema de nanopartículas de magnetita molecularmente impresas con 5-fluorouracil como molécula molde. El sistema fue evaluado en un modelo espontáneo de adenocarcinoma de mama en ratones utilizando un campo magnético externo. La eficiencia antitumoral de dicho sistema se evaluó en términos del retraso del crecimiento del tumor, radio de inhibición e histopatología. Los resultados mostraron una mayor eficacia del 5-fluorouracilo para suprimir el tumor en presencia del campo magnético que sin él.<sup>49</sup>

La tabla 3 resume los principales trabajos relacionados con polímeros de impronta molecular magnéticos con fármacos



**Tabla 3.** Principales trabajos relacionados al proyecto hasta 2017.

Referencia	¿MIP's?	¿Incluye NPM's?	Aplicación	Molde de impronta
Kaamyabi et al. <sup>50</sup>	Si, polímero pH y termosensible.	Si	Entrega de fármaco en terapia del cáncer.	Doxorubicina
Kazemi et al. <sup>3</sup>	Si	Si	Liberación controlada en terapia del cancer	Letrozol
Kubo et al. <sup>51</sup>	Si, polímero termo sensible.	No	Optimización del prearreglo de la impronta.	Metotrexato
Liu et al. <sup>52</sup>	Si	No	Preconcentración, purificación y determinación en suero por cromatografía de líquidos.	Metotrexato
Parisi et al. <sup>53</sup>	Si	Si	Liberación en terapia dirigida del cáncer.	Carbazol
Türkmen et al. <sup>54</sup>	Si	Si	Liberación controlada para terapia del cáncer.	Mitomicina C
Zamora-Gálvez et al. <sup>55</sup>	Si	Si	Separación y reconcentración del analito	Sulfonamida

Como se observa en la tabla anterior, se tienen pocos trabajos enfocados al estudio de los sistemas híbridos (magnetita-polímeros de impronta) como sistemas de liberación para terapia del cáncer. Es debido a esto que el trabajo que se presenta a continuación tiene una gran importancia debido a que no se han realizado estudios de este sistema donde se utilice al metotrexato como fármaco modelo y por lo tanto, no se tienen precedentes acerca del comportamiento del sistema obtenido que den evidencias para su posible aplicación como sistema de liberación modificada.

## 2.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un padecimiento que afecta a toda la humanidad, siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial y la tercera en México. Actualmente se tiene un poco más de información de la enfermedad, sin embargo, a pesar de esto, no ha sido posible lograr un avance significativo para evitar los efectos secundarios, también es deseable incrementar la especificidad de los tratamientos.

Los métodos más utilizados en el tratamiento del cáncer siguen siendo la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia. Si bien esta última es de las más empleadas por llegar a todo el organismo, tiene una gran desventaja, y es que los fármacos administrados no discriminan entre las células cancerosas de las sanas, causando los efectos adversos típicos.

Con el fin de reducir dichos efectos adversos y aumentar la supervivencia del paciente, se han desarrollado sistemas de liberación modificada que permiten la entrega del fármaco directamente en el sitio deseado (tumor) gracias a distintos estímulos.

Uno de estos sistemas se basa en el uso partículas magnéticas de tamaño nanométrico, las cuales son recubiertas por un polímero mediante la técnica de impronta molecular, generando sitios de reconocimiento específico para cierta molécula. De esta forma, se mantienen las propiedades magnéticas de las nanopartículas, además de que se carga el fármaco y es posible el direccionamiento mediante un gradiente magnético.

En el presente trabajo, nanopartículas de magnetita fueron sintetizadas y recubiertas por impresión molecular utilizando metotrexato como molécula molde. Las partículas se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojo (IR), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión dinámica de luz con la posterior evaluación de su eficiencia como sistema de liberación de fármacos mediante el estudio de las cinéticas de liberación *in vitro*.

## 3.0 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general.

Sintetizar partículas superparamagnéticas de magnetita y de tamaño inferior a 20 nm, cubiertas con un polímero de impronta molecular utilizando metotrexato como molécula molde, caracterizarlas y evaluar su posible aplicación como un sistema de liberación modificada para el tratamiento del cáncer.

### 3.2 Objetivos particulares.

- Realizar la síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (NPM-HFB) e hidrofílicas (NPM) mediante el método de co-precipitación.
- Funcionalizar las partículas con una capa de polímero de impronta molecular sobre la superficie de nanopartículas utilizando metotrexato como molde y remover este último del sistema.
- Caracterizar los sistemas con ayuda de distintas técnicas analíticas (espectroscopía de infrarrojo, análisis elemental, microscopía electrónica de transmisión, rayos x de polvos, análisis elemental).
- Evaluar la capacidad de adsorción de metotrexato de cada sistema y analizar la cinética de adsorción.
- Realizar los estudios de liberación *in vitro* imitando condiciones fisiológicas y analizar la cinética evaluando los modelos pertinentes.

## 4.0 HIPÓTESIS

Se sintetizarán partículas magnéticas de tamaño nanométrico mediante coprecipitación, las cuales se recubrirán utilizando la técnica de impronta molecular, dando como resultado una mayor afinidad por el metotrexato (molécula molde), siendo estos sistemas los que presenten una cinética de liberación más lenta y por consiguiente tendrán el potencial de evaluarse como un sistema de liberación prolongada de fármacos.

## 5.0 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 MATERIALES

Todos los disolventes utilizados fueron grado reactivo analítico. El acetonitrilo, el metanol y la acetona fueron marca J.T Baker. Mientras que los reactivos  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ácido oleico, dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA), y el ácido acrílico se compraron en Aldrich Co. El azobisisobutironitrilo (AIBN) fue donado por Akzonobel y el metotrexato fue comprado a laboratorios Pisa.

### 5.2 METODOLOGÍA

#### 5.2.1 Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofílicas (NPM)

La síntesis de las nanopartículas de magnetita se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación<sup>56</sup>. Se pesaron 0.50 g de  $\text{FeCl}_2$  y 1.296 g de  $\text{FeCl}_3$ , los cuales se encuentran en una relación estequiométrica 2:1 y se disolvieron en 24.5 mL de agua. La mezcla se calentó a 80°C en atmósfera de  $\text{N}_2$  y agitando constantemente. Finalmente, se agregaron 10 mL de NaOH 2M para precipitar la magnetita y una vez finalizada la síntesis, se realizaron enjuagues con agua hasta neutralizar el pH del medio, separando las partículas magnéticamente con ayuda de un imán de neodimio de 14000 Gauss.

#### 5.2.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas (NPM-HFB)

Se pesaron 0.506 g de  $\text{FeCl}_2$  y 1.296 g de  $\text{FeCl}_3$  (relación estequiométrica 2:1) y se disolvieron en 24.5 mL de agua, se calentó la mezcla a 80°C bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y agitando constantemente. Posteriormente, agregó 1 mL de ácido oleico a la mezcla agitando fuertemente. Finalmente, se agregaron 10 mL de NaOH 2M para precipitar la magnetita y una vez finalizada la síntesis, se lavaron las partículas con acetona cuantas veces fue necesario separándolas magnéticamente con el fin de remover el medio básico.

#### 5.2.3 Funcionalización con ácido metacrílico.

Las partículas sintetizadas (tanto hidrofóbicas como hidrofílicas) se secaron a 37°C con vacío durante una hora y luego por 24h a temperatura ambiente. Una vez secas las partículas, se pesaron 250 mg de cada lote y se resuspendieron por separado en 100 mL de acetonitrilo.

Se sonicó por 10 minutos y se agregaron 100µL de ácido metacrílico agitando muy bien. Por último, la mezcla se calentó a 45°C durante 3 horas con agitación constante.

Pasado este tiempo, se realizaron lavados con acetonitrilo para remover los residuos de la reacción separando las partículas magnéticamente.

#### **5.2.4 Recubrimiento polimérico mediante la técnica de impronta molecular utilizando metotrexato como molécula molde.**

Una vez que las partículas (hidrofóbicas e hidrofílicas) se recubrieron con ácido metacrílico, se resuspendieron por separado en 200mL de acetonitrilo, se sonicaron durante 10 min y posteriormente se agregaron 500 µL de EGDMA, 50 µL más de ácido metacrílico, 227mg de metotrexato ( $1.01 \times 10^{-3}$ mol) y al final 15 mg de AIBN ( $1.01 \times 10^{-5}$ mol) agitando muy bien.

La polimerización se llevó a cabo calentando la mezcla a 65°C en atmósfera de N<sub>2</sub> durante 24h y agitando constantemente.

Una vez transcurridas las 24 h, las partículas se separaron magnéticamente y se realizaron enjuagues con acetonitrilo para remover los residuos de la polimerización. Posteriormente, se hicieron enjuagues con agua para remover el exceso de metotrexato, ya que el fármaco es muy soluble en agua.

Las partículas se secaron a 37°C con vacío y posteriormente 24h a temperatura ambiente.

#### **5.2.5 Recubrimiento polimérico sin molécula molde (NIP)**

En este caso, 250 mg de NPM's tanto hidrofóbicas como hidrofílicas recubiertas con acrilatos, se resuspendieron por separado en 200mL de Acetonitrilo, se sonicaron por 10 minutos y se agregaron 500 µL de EGDMA, 50 µL de ácido metacrílico y los 15 mg de AIBN agitando muy bien para llevar a cabo el recubrimiento polimérico. Para estos lotes no se adicionó el fármaco, por lo que no se formarán los sitios específicos para el mismo.

Las partículas se secaron a 37°C con vacío y luego a temperatura ambiente.

#### **5.2.6 Caracterización.**

Los cuatro diferentes sistemas (MIP-HFB; MIP-HFL, NIP-HFB y NIP-HFL) se caracterizaron mediante las siguientes técnicas:

### **5.2.6.1 Morfología y tamaño de partícula**

Para elucidar de forma general el tamaño que presentan las partículas sintetizadas, se midió el tamaño promedio de estas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz en el equipo Zetasizer Nano Zen 3600; para lo cual se utilizó una muestra de las partículas en suspensión acuosa.

La morfología de las partículas, así como un tamaño más aproximado de las mismas, se obtuvo mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), la cual se realizó con un microscopio modelo JEOL JEM -2010 a 200 kV utilizando como muestras una dilución de las partículas suspendidas en acetonitrilo y montadas en rejillas de carbono.

### **5.2.6.2 Difracción de rayos X**

Para la identificación de la magnetita, 500 mg de partículas secas de los diferentes sistemas se analizaron mediante la técnica de difracción de rayos x de polvos en un difractor de rayos x de la marca Bruker, modelo D2 Phaser, con fuente de cobre, detector Lynxeye y una longitud de onda de 1.54184 Å.

### **5.2.6.3 Espectroscopía Infrarroja y análisis elemental**

La espectroscopía infrarroja se realizó en un espectrofotómetro de FTIR/FIR modelo Spectrum 400 de Perkin-Elmer, mientras que el análisis elemental se llevó a cabo en un Analizador Elemental Perkin Elmer 2400 para CHNS, utilizando cistina como compuesto de calibración. En ambas técnicas se utilizaron los sistemas en polvo.

### **5.2.7 Estudios de adsorción**

En viales por separado, se pesaron 10 mg de cada uno de los distintos sistemas y se adicionaron 10 mL de una solución de metotrexato  $1.1 \times 10^{-3}$  M (0.5 mg/mL). La mezcla se agitó en un agitador orbital de la marca dragon scientific, modelo DSR-10 a 250 rpm y a temperatura ambiente. Para determinar la cantidad de fármaco adsorbido por las nanopartículas, se tomaron muestras de 40  $\mu$ L a distintos intervalos de tiempo y se midió la absorbancia a 302 nm hasta que no hubo cambio en la misma. Este proceso se realizó por triplicado para cada uno de los sistemas.

### 5.2.8 Estudios de liberación

Para los estudios de liberación, se utilizó como medio buffer de fosfatos a pH=7.4. Se colocaron 50 mL del medio en vasos termostatados manteniendo la temperatura a 37°C para simular condiciones fisiológicas. Posteriormente, se agregaron a vasos por separado, 10 mg de cada uno de los sistemas y se agitó a 250 rpm. Para determinar la cantidad de fármaco liberada por cada sistema, se tomaron 2 mL del medio, se precipitaron las partículas con ayuda de un imán de neodimio y se midió la absorbancia a 302 nm, regresando la muestra a la mezcla al terminar cada medición. El muestreo se realizó a distintos intervalos de tiempo hasta que no se observó un cambio en la absorbancia.

## 6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Síntesis de nanopartículas de magnetita (NPM)

La síntesis de las nanopartículas de magnetita se realizó utilizando el método de co-precipitación como se describió anteriormente en la metodología (figura 11).

La síntesis se llevó a cabo de acuerdo a la siguiente reacción:



Se obtuvo un polvo de color negro con un rendimiento de aproximadamente 80%.

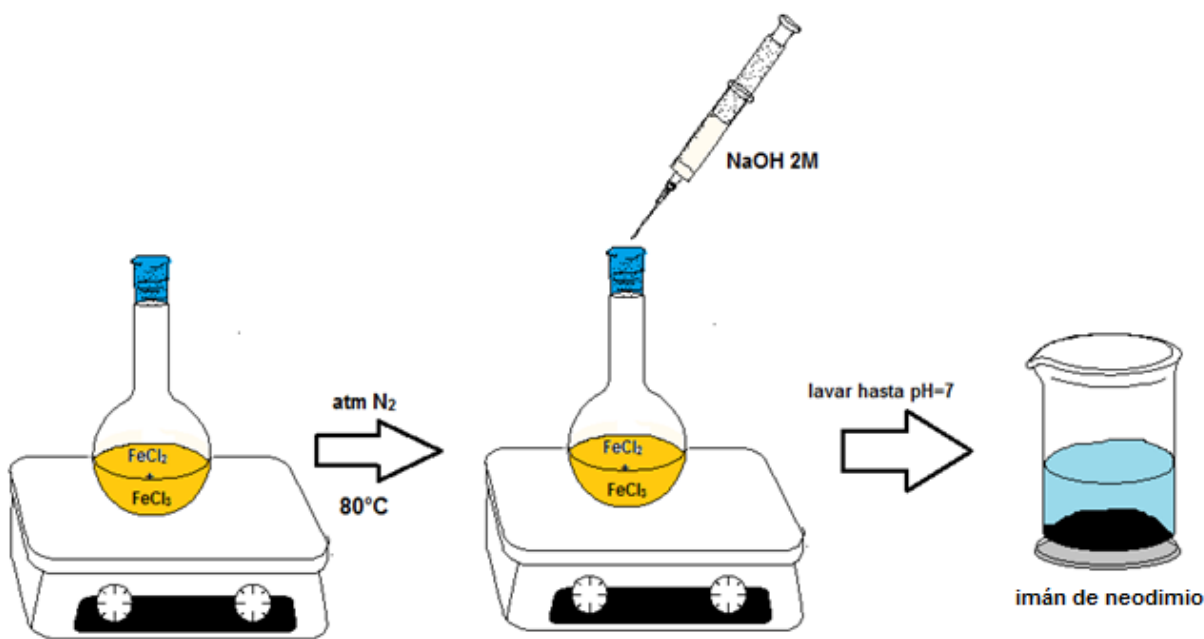


Figura 11. Esquema de la síntesis de NPM.

#### 6.1.2 Síntesis de nanopartículas de magnetita hidrofóbicas (NPM-HFB)

La síntesis se llevó a cabo como se muestra en la figura 12, obteniéndose un polvo negro y un rendimiento del 80%.



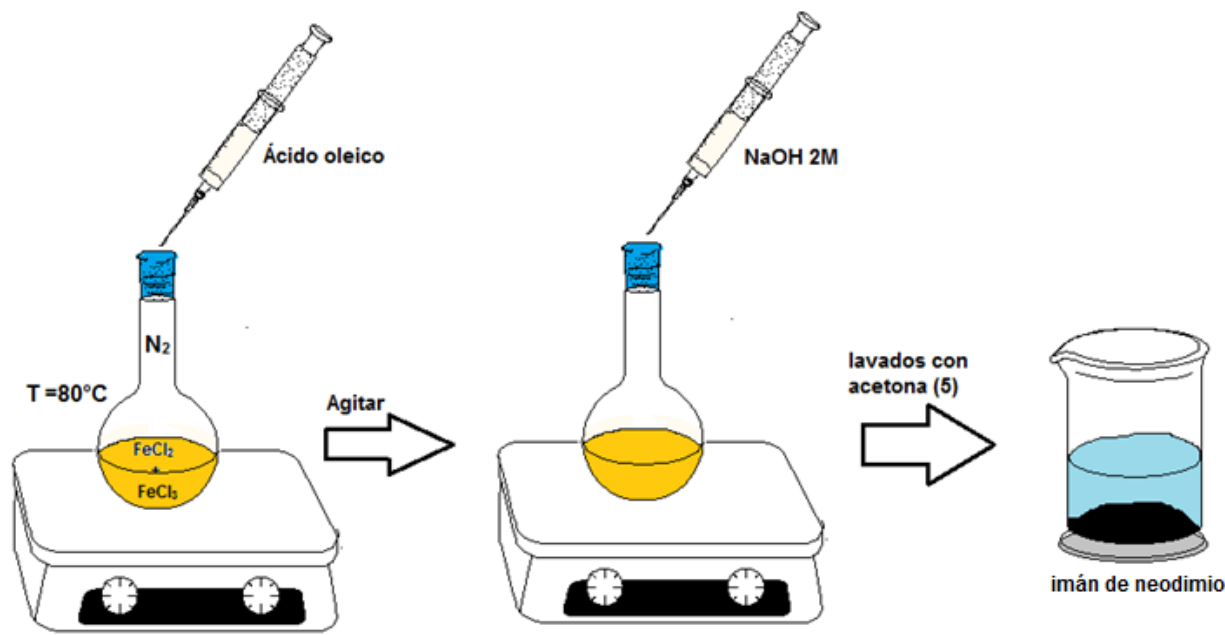


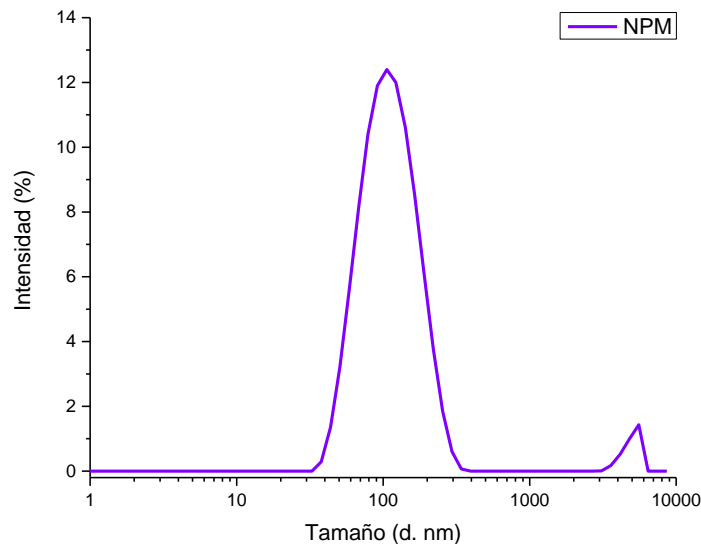
Figura 12. Esquema de la síntesis de NPM-HFB.

## 6.2 Caracterización de NPM y NPM-HFB

Para conocer algunas características de las partículas sintetizadas, se realizaron estudios de tamaño de partícula, potencial z, espectrometría de infrarrojo, análisis elemental y difracción de rayos x.

### 6.2.1 Tamaño de partícula y potencial z

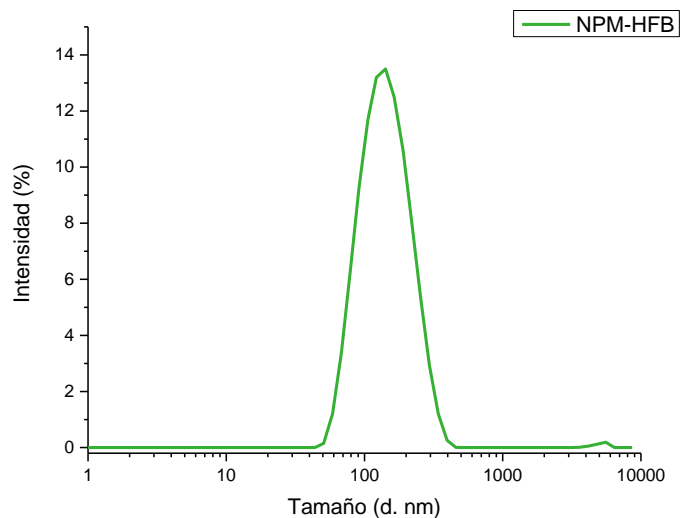
Para tener una primera aproximación del tamaño de las partículas obtenidas, se llevó a cabo la medición del mismo mediante la técnica de dispersión dinámica de luz a partir de una suspensión de nanopartículas de aproximadamente 1mg/mL. Los resultados obtenidos para las NPM, mostraron un tamaño de partícula promedio de  $68.27 \pm 32.4$  nm de diámetro, a pesar de que se esperaba de aproximadamente 10 nm de acuerdo a lo reportado en la literatura<sup>57</sup> esto es indicativo de la formación de aglomerados de nanopartículas, este fenómeno era de esperarse ya que se ha informado numerosas veces en la literatura<sup>58,59</sup>. Algunos autores sugieren que se forman cadenas o redes de partículas, y estas están unidas por interacciones no covalentes por lo que se consideran partículas independientes, pero en técnicas como dispersión dinámica de luz, los agregados se mueven juntos obteniéndose un radio hidrodinámico mucho mayor que el propio tamaño de la partícula (figura 13).



**Figura 13.** Tamaño de partícula de las partículas NPM obtenido por DLS.

El potencial z obtenido para estas partículas fue de  $-5.99 \pm 5.24$  mV, lo que corresponde a un radio de Stern negativo, sin embargo, debido a que la magnitud del potencial z fue  $>-10$  mV, se considera a las partículas prácticamente neutras, por lo que el sistema es inestable en suspensión y las partículas son muy propensas a aglomerarse.<sup>60</sup> Los valores de potencial zeta están acordes con el comportamiento de la aglomeración sugerida por dispersión dinámica de luz. El tamaño de partícula obtenido entonces se atribuye a la aglomeración de las nanopartículas, misma que no es posible observar con este método.

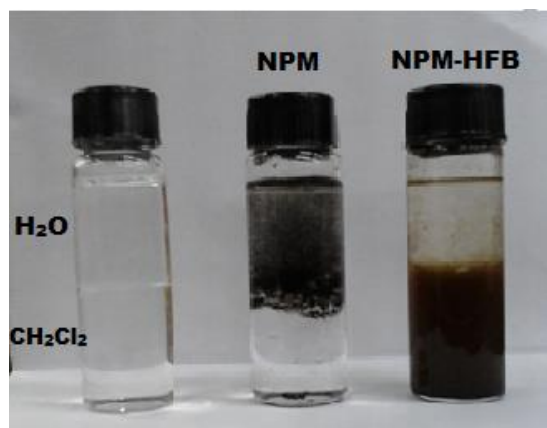
Por otro lado, para las NPM-HFB, se obtuvo un tamaño de partícula de  $130.8 \pm 61.14$  nm y potencial z de  $-9.66 \pm 7.4$  mV. Nuevamente, se encuentra que las nanopartículas no son lo suficientemente negativas como para repelerse entre ellas (se consideran prácticamente neutras) por lo que no son estables en suspensión y es por ello que se obtienen tamaños de partícula tan altos debido a la formación de aglomerados, este comportamiento ya se ha estudiado y se ha encontrado que nanopartículas de magnetita se unen para formar cadenas mono, bi y tridimensionales a través de interacciones débiles, principalmente puente de hidrógeno, formando agregados, estos forman estructuras cuyo radio hidrodinámico es mucho mayor que el propio radio de la nanopartícula y dado que DLS mide la distribución de tamaños según su radio hidrodinámico, los resultados por esta técnica no suelen concordar con el tamaño real de la nanopartícula.<sup>61-63</sup>



**Figura 14.** Tamaño de partícula de las partículas NPM-HFB obtenido por DLS

### 6.2.2 Espectrometría de infrarrojo y análisis elemental

Con el fin de determinar si las partículas NPM-HFB se recubrieron con ácido oleico correctamente, se realizó una prueba preliminar que consistió en observar su comportamiento hidrofóbico o hidrofílico poniendo las partículas en contacto con dos disolventes de distinta naturaleza, en este caso,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Como se observa en la figura 15, las nanopartículas NPM-HFB muestran un comportamiento hidrofóbico al tener preferencia por el diclorometano, en tanto que las NPM lo hacen por el agua. Este comportamiento es claramente indicativo de que el ácido oleico cubre la superficie de la nanopartícula y está de acuerdo con informes en la literatura para sistemas similares<sup>64,65</sup>.

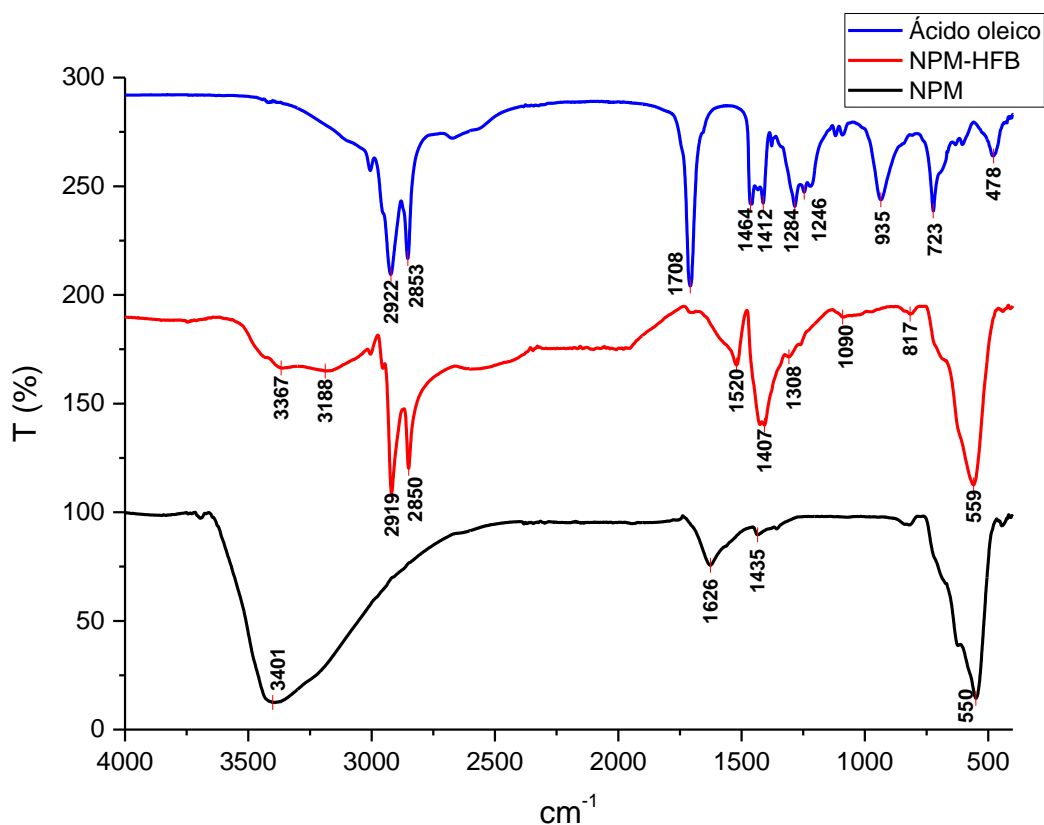


**Figura 15.** Prueba preliminar para la determinación de la hidrofobicidad de las nanopartículas de acuerdo a la síntesis.

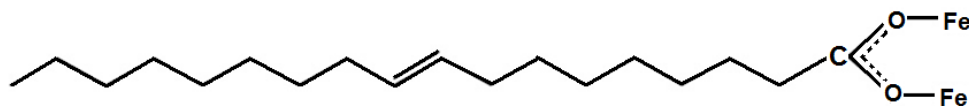
El análisis elemental para NPM mostró un menor porcentaje de carbono (3.81% en peso) en comparación con las NPM-HFB (14.5% en peso), lo cual era esperado, pues estas últimas partículas deben tener la contribución de carbono por parte del ácido oleico anclado a la superficie. Por otro lado, la pequeña cantidad de carbono observado en las partículas hidrofílicas puede ser atribuido a disolvente adsorbido en la superficie. Este fenómeno es normal, sobre todo al considerar que la superficie de la nanopartícula está compuesta por muchos sitios ácidos de Lewis y los disolventes con los que se lavó como etanol o acetona son bases, dando como consecuencia una adsorción fuerte del disolvente sobre la superficie.

El ácido oleico unido a las nanopartículas de magnetita, así como los grupos funcionales de las partículas hidrofílicas se puede observar al comparar los resultados de los espectros de infrarrojo obtenidos para ambas muestras (figura 16) donde se puede observar que, efectivamente, las NPM-HFB contienen ácido oleico en la superficie pues su espectro de infrarrojo presenta las bandas en 2919 y 2850  $\text{cm}^{-1}$ , que son atribuidas al estiramiento de  $\text{CH}_2$  asimétrico y simétrico respectivamente. Se tiene una desaparición de los picos en 1284 y 1708  $\text{cm}^{-1}$  (presente en el espectro del ácido oleico) en las NPM-HFB, estas bandas son atribuidas al estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  por lo que era de esperarse su desaparición, ya que es en este extremo donde el ácido oleico interacciona con la magnetita.

El estiramiento O-H en el plano y fuera del plano, se aprecia con las bandas en 1464 y 935  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, mismas que nuevamente desaparecen en el espectro de NPM-HFB, sin embargo, aparecen picos a 1520 y 1626  $\text{cm}^{-1}$ , lo que según la literatura, indica una unión quelante bidentada entre el ácido oleico y la magnetita al ser la distancia entre los picos menor a 110  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>65</sup> Se observa también un pico intenso en 559  $\text{cm}^{-1}$ , dicha banda se debe a la vibración del enlace Fe-O de la magnetita y es observado también en el espectro de NPM. Los resultados, en general, indican que el ácido oleico fue quimisorbido por la magnetita como un carboxilato (figura 17).



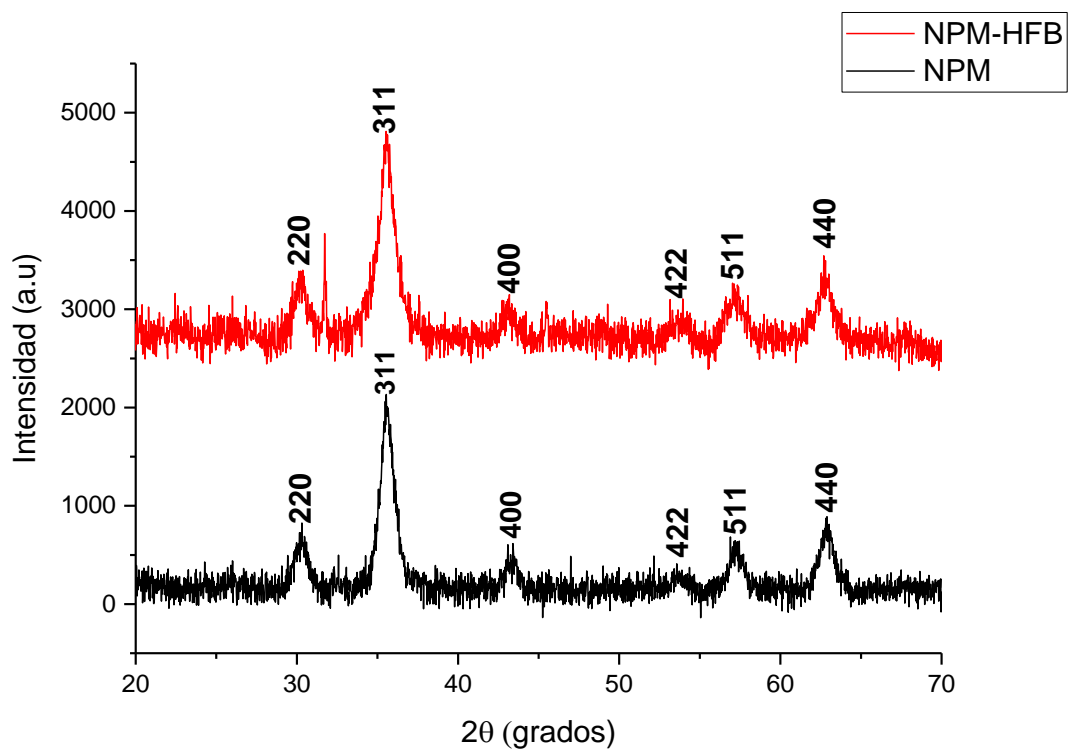
**Figura 16.** Espectros de infrarrojo obtenidos para el ácido oleico, NPM y NPM-HFB



**Figura 17.** Interacción quelante bidentada entre el grupo COO<sup>-</sup> del ácido oleico y el átomo de hierro.

### 6.2.3 Difracción de rayos x

Esta técnica es muy importante para la caracterización, pues con ella es posible decir si las partículas sintetizadas son en realidad magnetita debido a que esta posee un difractograma característico. Los resultados obtenidos mostraron que tanto para las NPM como para las NPM-HFB, se tiene una estructura de espinela cúbica, debido a la presencia de la reflexión más intensa en el plano 311 que es característica de esta fase. Los picos en los planos 220, 311, 400, 422, 511 y 440, cuyos valores en el ángulo de difracción  $2\theta$  son  $30.1801^\circ$ ,  $35.4938^\circ$ ,  $43.4125^\circ$ ,  $53.7280^\circ$ ,  $57.3043^\circ$  y  $62.9304^\circ$  respectivamente, corresponden a una unidad cúbica, característica de una estructura de espinela cúbica, geometría característica de la magnetita.<sup>66,67</sup>

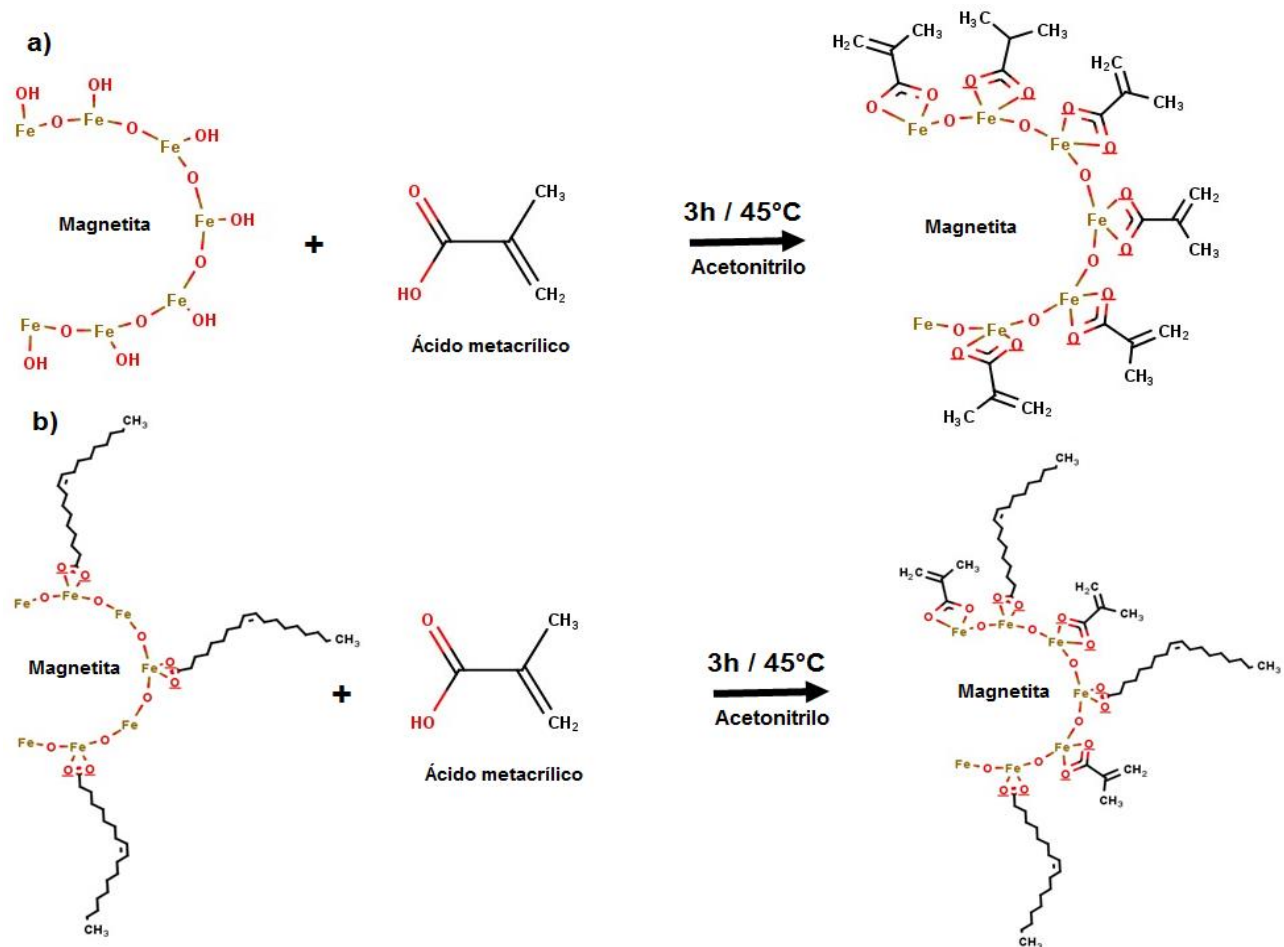


**Figura 18.** Difractogramas de rayos x obtenidos para NPM y NPM-HFB

### 6.3 Síntesis y caracterización de NIP-HFL y NIP-HFB

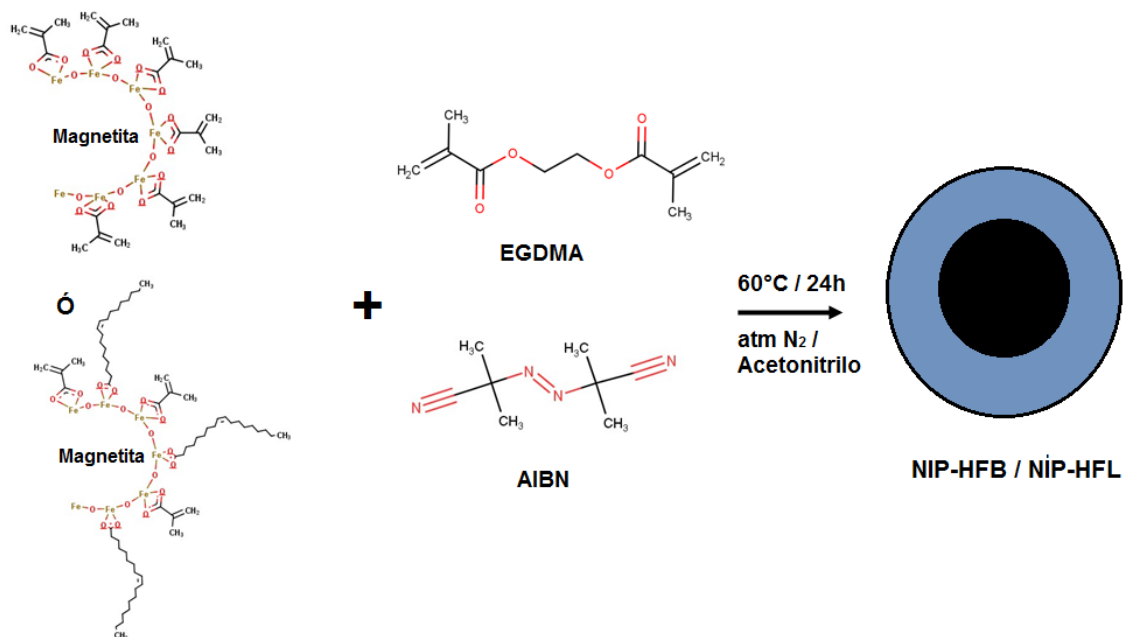
#### 6.3.1 Recubrimiento polimérico sin el uso de la molécula molde (NIP)

Una vez que se caracterizaron las nanopartículas NPM y NPM-HFB, se llevó a cabo la polimerización en la superficie para obtener las partículas no improntadas molecularmente (NIP), para ello, se resuspendieron las nanopartículas en acetonitrilo sonicando 10 minutos, y se dejaron reaccionar con ácido metacrílico de acuerdo al esquema de la figura 19, con el fin de unir el monómero funcional a las partículas.



**Figura 19.** Modificación de la superficie de las nanopartículas con ácido metacrílico. a) NPM y b) NPM-HFB

Posteriormente, se lavaron las partículas para remover el ácido metacrílico que no reaccionó y nuevamente se resuspendieron en acetonitrilo. Se añadió EGDMA a la suspensión de nanopartículas, el cual funciona como entrecruzador en la polimerización y finalmente se agregó AIBN como iniciador. La mezcla se dejó reaccionando por 24 h a 60°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> para evitar la competencia del oxígeno molecular por los radicales libres en la reacción de polimerización (figura 20). Los sistemas obtenidos de esta forma, no presentarán sitios de reconocimiento específico al no haber incluido la molécula molde (MTX) en el proceso de polimerización.

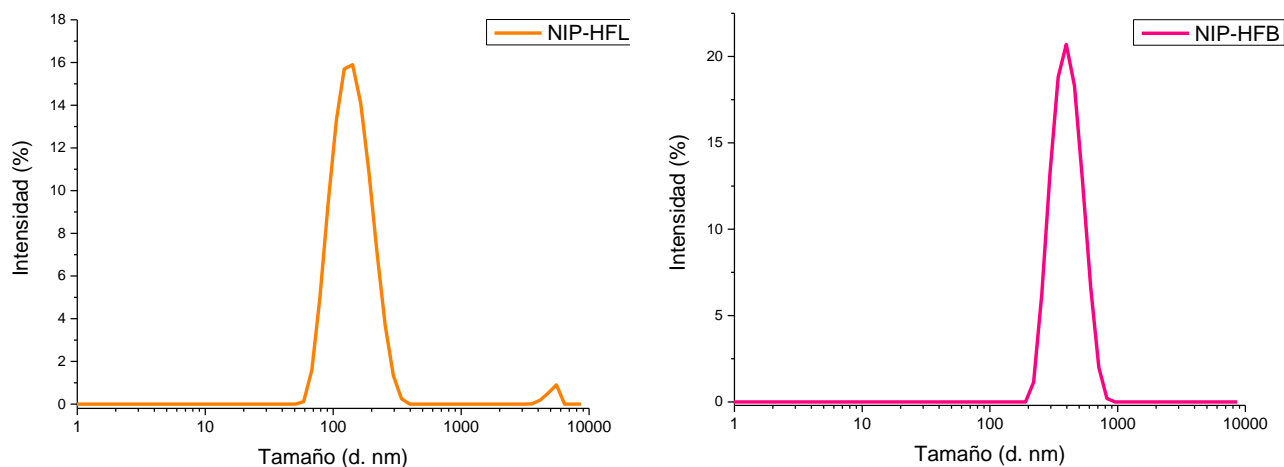


**Figura 20.** Esquema del procedimiento utilizado para el recubrimiento polimérico.

Al finalizar la polimerización, las partículas se lavaron para remover el medio de reacción y se secaron a 37°C a baja presión para poder llevar a cabo su caracterización.

### 6.3.2 Tamaño de partícula y potencial z

El tamaño de partícula encontrado para este sistema usando la técnica de DLS fue de 137.1 nm para las nanopartículas NIP-HFL, y de  $440.5 \pm 108.8$  para las NIP-HFB (figura 21), presentando un potencial z de  $13.3 \pm 5.29$  y  $8.79 \pm 5.91$  respectivamente.



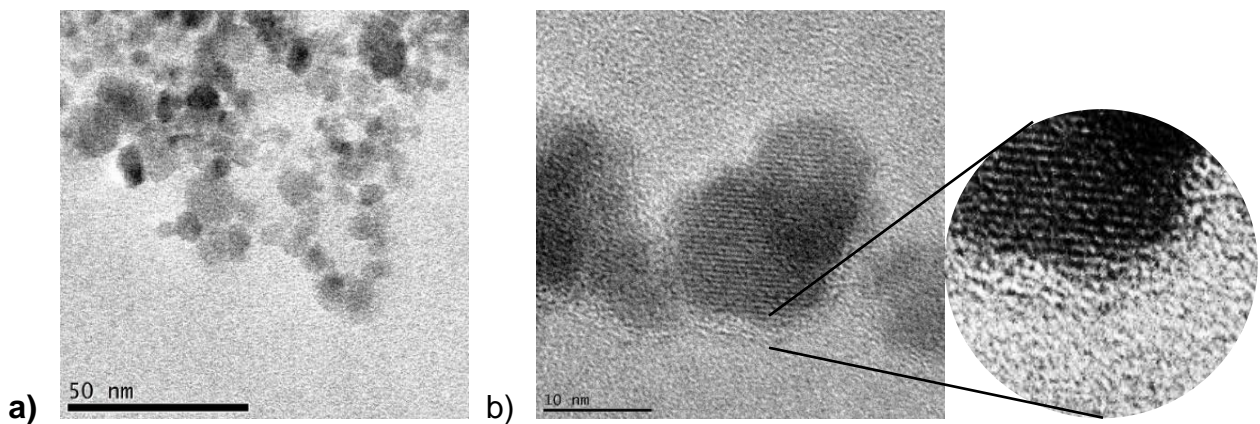
**Figura 21.** Tamaños de partícula de los sistemas NIP-HFL y NIP-HFB obtenidos por DLS.

El tamaño de partícula obtenido sugiere la formación de agregados de partículas para ambos sistemas, pues sobrepasan por mucho los 10nm esperados. El potencial z de ambos sistemas resultaron positivos, pero aún menores a +30mV, por lo que ambos sistemas

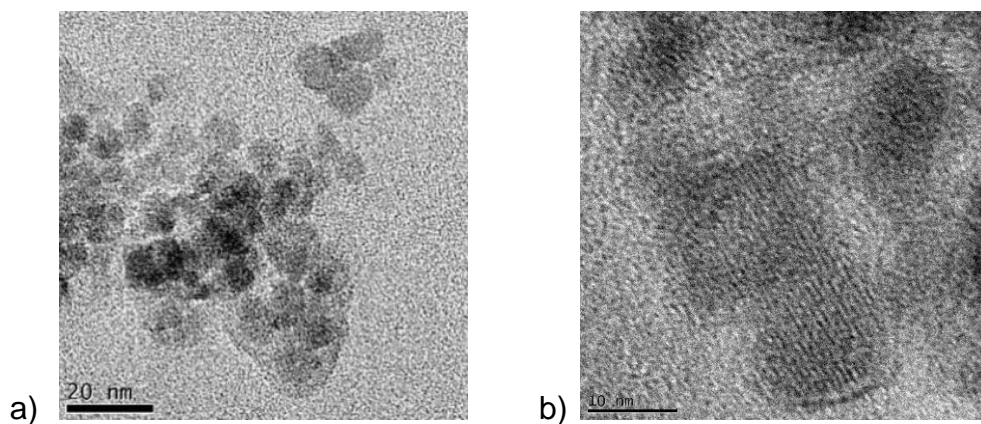


pueden considerarse aproximadamente neutros, con lo que se esperaría que las partículas formaran agregados al ser inestables en suspensión, de forma similar a lo observado en las partículas sin polímero.

Debido a que nuevamente los tamaños obtenidos por esta técnica no son congruentes con lo esperado, y al mismo tiempo, para comprobar la presencia del polímero en la superficie de las partículas, se analizaron ambos sistemas por TEM. Los resultados muestran que, efectivamente, las partículas formaron aglomerados, son fácilmente dispersables ya que se encuentran muchas partículas aisladas y que en realidad presentan un tamaño de aproximadamente entre 10 y 20 nm (figura 22) como se esperaba de acuerdo a lo reportado.<sup>57</sup> Además, se puede observar la capa de polímero que recubre las nanopartículas, siendo de entre 1.8-2 nm de espesor de acuerdo a la escala, esto se observa en la figura 22 b).



**Figura 22.** Micrografía obtenida por TEM de las nanopartículas NIP-HFL. a) nanopartículas aglomeradas. b) nanopartícula aislada donde se puede observar el recubrimiento polimérico.



**Figura 23.** Micrografía TEM de las nanopartículas NIP-HFB. a) nanopartículas aglomeradas. b) nanopartícula aislada. Se observa el recubrimiento polimérico y la red cristalina de la magnetita.

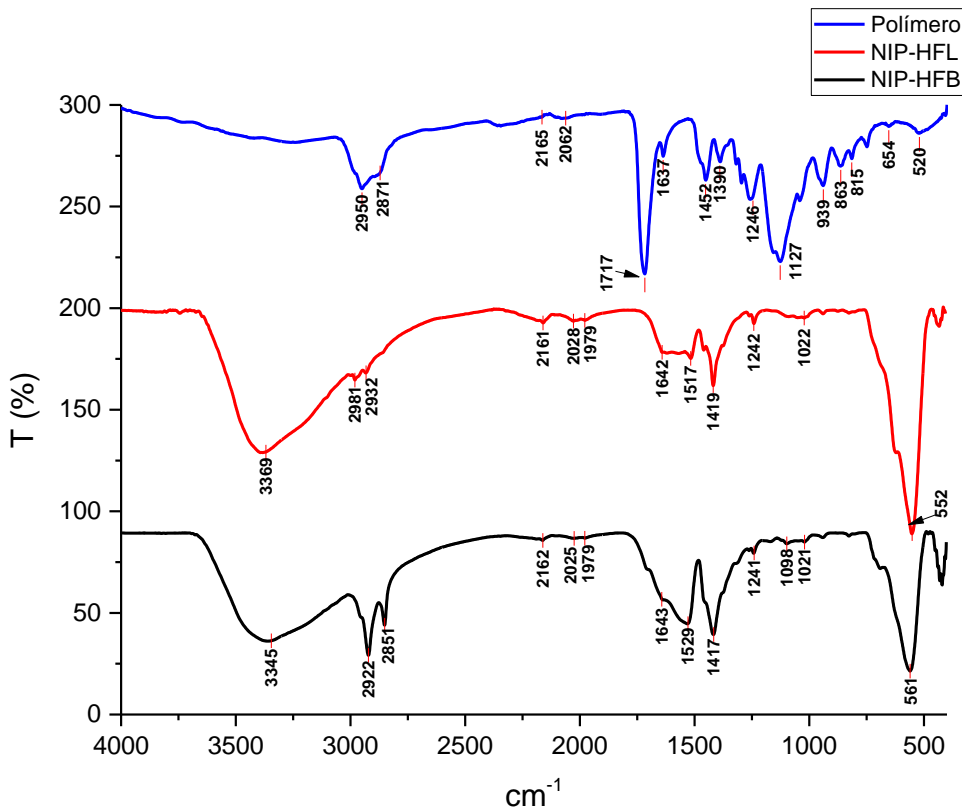
La presencia del polímero en la superficie de las nanopartículas se comprobó a partir de los resultados del análisis elemental y de los espectros de infrarrojo de cada lote.

### 6.3.3 Espectrometría de infrarrojo y análisis elemental

En cuanto al análisis elemental, se obtuvo un porcentaje de 3.88% de carbono para las partículas NIP-HFL, en tanto que para las NIP-HFB el porcentaje de carbono fue de 11.87%, lo anterior era de esperarse, debido a que las segundas contienen además del polímero, ácido oleico en la superficie, lo que contribuye con el porcentaje total de carbono.

Al comparar los espectros de infrarrojo del polímero con los de las nanopartículas recubiertas (figura 24), se tiene que los picos en para el caso del polímero, se observa una señal intensa en  $1717\text{ cm}^{-1}$ , que es debida al estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$  y que corresponde al grupo éster presente en el entrecruzador, las bandas en  $1246$  y  $1127\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los estiramientos simétrico y asimétrico de  $-\text{COO}-$ . Por otro lado, las señales en  $2871$  y  $2950\text{ cm}^{-1}$  se conservan en los tres espectros y corresponden al estiramiento de  $-\text{CH}_2-$  asimétrico y simétrico, respectivamente. Para los sistemas NIP-HFB y NIP-HFL, la señal presente entre  $550$  y  $560\text{ cm}^{-1}$ , corresponde al enlace  $\text{Fe-O}$  de la magnetita; del mismo modo, las señales en  $3340$ - $3360\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de los puentes de hidrógeno debidas a los grupos hidroxilo de la superficie.<sup>68</sup>

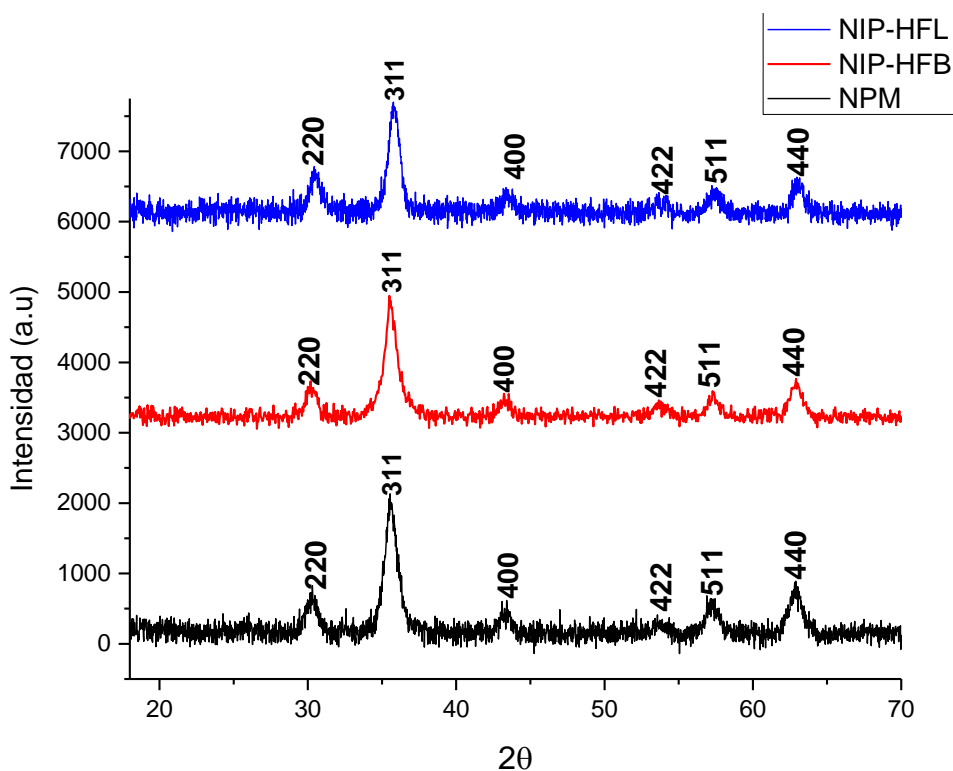
Cabe mencionar que no se observa una diferencia entre los espectros de infrarrojo de los sistemas NIP-HFB y NIP-HFL debido a que lo que se caracteriza son los grupos funcionales de la superficie de las nanopartículas, por lo que no se observan los picos característicos del ácido oleico.



**Figura 24.** Espectros de infrarrojo obtenidos para los sistemas NIP-HFL, NIPHFB y para el polímero que recubre la superficie de las nanopartículas.

### 6.3.4 Difracción de rayos x

Por último, el difractograma de rayos x muestra que la estructura cristalina de la magnetita se mantiene después de la polimerización pues, nuevamente, se pueden observar los seis picos característicos de la magnetita en los planos 220, 311, 400, 422, 511 y 440, siendo el de 311 el más intenso (figura 25). Asimismo, al haber realizado esta técnica con las partículas recubiertas con polímero, se puede decir que dicho polímero no presenta una forma cristalina, pues el difractograma no resulta alterado.<sup>69</sup>



**Figura 25.** Difractograma de rayos x obtenido para los sistemas NIP-HFL y NIP-HFB comparados con el de la magnetita sintetizada inicialmente.

## 6.4 Síntesis y caracterización de MIP-HFL y MIP-HFB

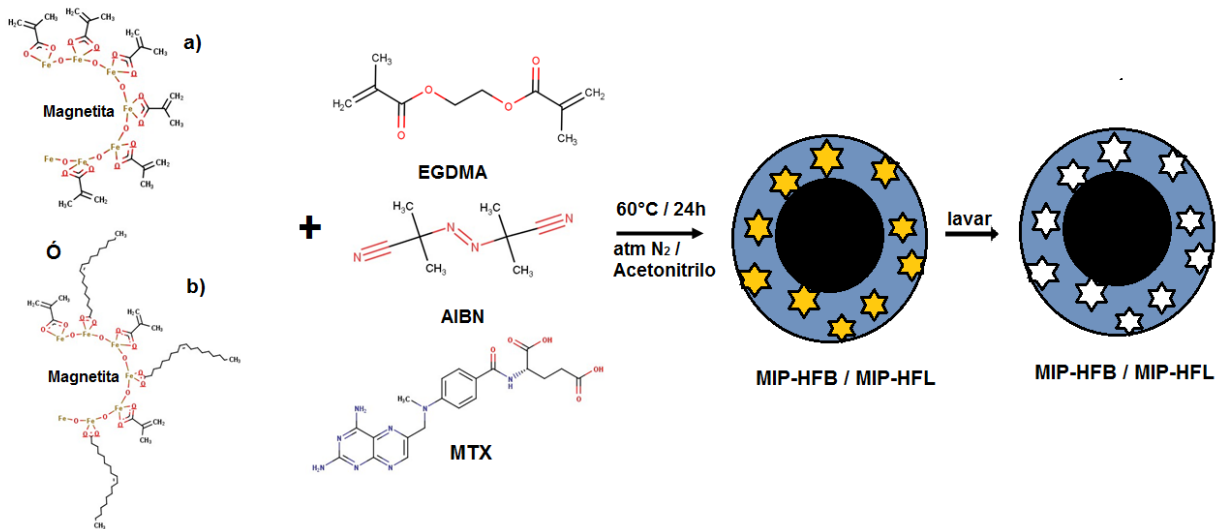
### 6.4.1 Impronta molecular con metotrexato como molécula molde

El recubrimiento polimérico por impronta molecular se llevó a cabo de una forma similar al de los sistemas NIP-HFB y NIP-HFL. Primeramente, las nanopartículas NPM y NPM-HFB se resuspendieron por separado en acetonitrilo, sonicando por 10 minutos, y se dejaron reaccionar con ácido metacrílico para unir el monómero funcional a las partículas.

Al finalizar la reacción, se removió el medio con los residuos y se lavaron las nanopartículas, se agregó un poco más de ácido metacrílico, además del metotrexato, que funcionará como molécula molde, EGDMA que será el entrecruzador y AIBN, que funciona como iniciador de radicales libres al romper las dobles ligaduras presentes en el ácido metacrílico y en EGDMA dando inicio a la polimerización.

La mezcla se dejó reaccionando por 24 h a 65°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> (figura 26), esto con el fin de asegurar que el AIBN se disociará homolíticamente para formar sus radicales libres y que dichos radicales no reaccionen con el oxígeno impidiendo la polimerización.

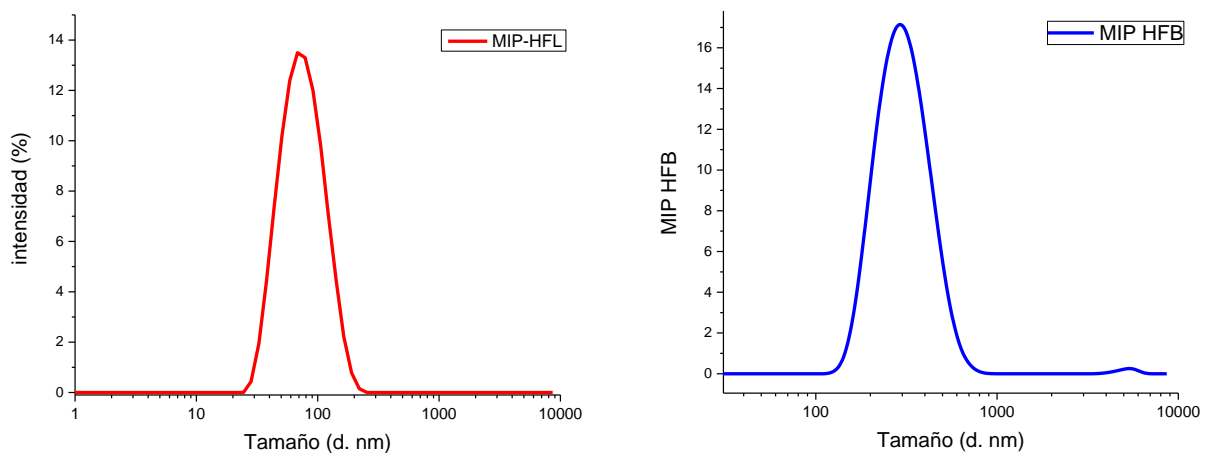
Al finalizar la polimerización, las partículas se lavaron para remover el medio de reacción y se secaron a 37°C a baja presión para posteriormente ser caracterizadas.



**Figura 26.** Esquema de la síntesis de los polímeros de impronta molecular usando MTX como molécula molde. a) NPM y b) NPM-HFB

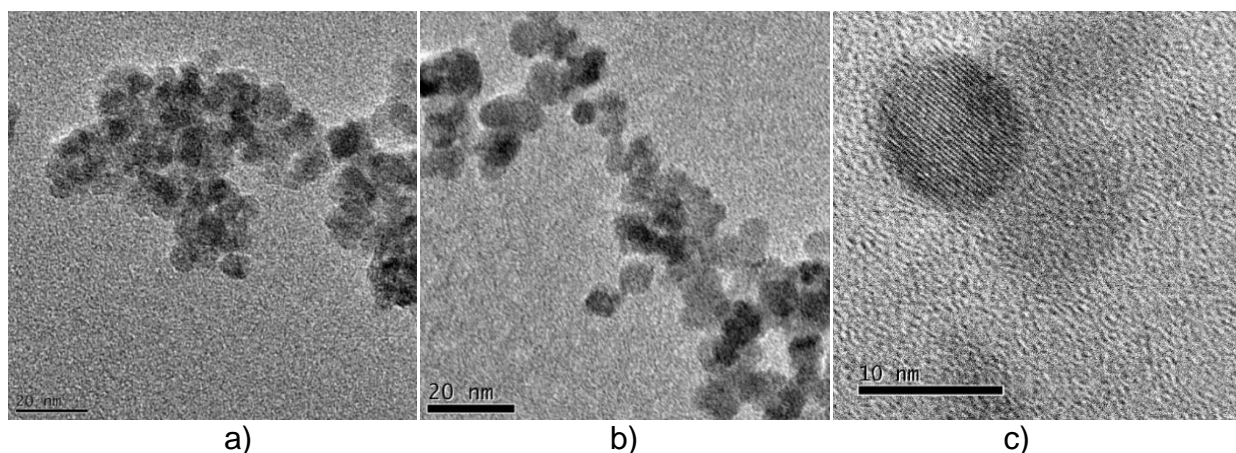
### 6.4.2 Tamaño de partícula y potencial z

Para las MIP-HFL se obtuvo un tamaño de  $107.6 \pm 50.06$  nm y potencial z de  $-2.97 \pm 5.08$ , en tanto que para las MIP-HFB el tamaño obtenido por DLS fue de  $308.0 \pm 99.67$  nm y el potencial z de  $-9.13 \pm 5.72$  mV.



**Figura 27.** Tamaños de partícula de los sistemas MIP-HFL y MIP-HFB obtenidos por DLS.

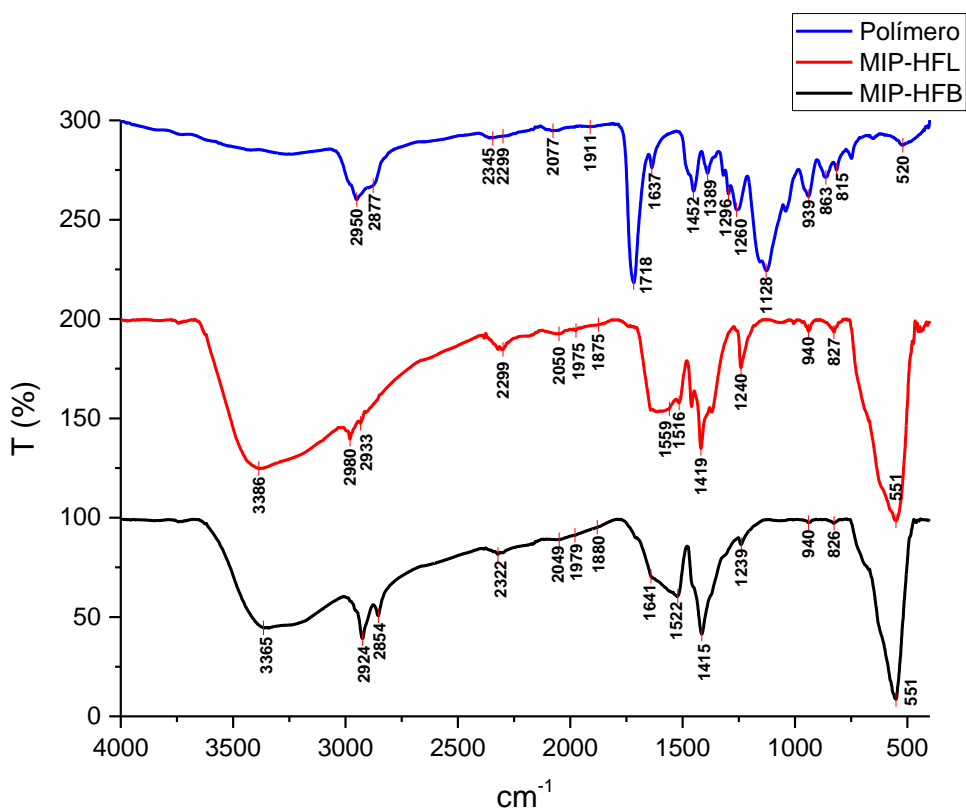
Al igual que en los casos reportados anteriormente para los sistemas NIP-HFB y NIP-HFL, se observan tamaños de partícula incongruentes con los que se reportan por este método de síntesis (figura 27), sin embargo, los potenciales z obtenidos, demuestran que ambos sistemas son inestables en solución, al tener un potencial entre -30 y +30 mV, lo que quiere decir que no son lo suficientemente positivas o negativas como para causar repulsión entre partículas.<sup>60</sup> Lo anterior hizo necesario el análisis de estos sistemas por TEM. La figura 28, muestran el verdadero tamaño de las nanopartículas de los sistemas MIP-HFB y MIP-HFL, demostrando que, efectivamente, dichas nanopartículas miden aproximadamente 10nm de diámetro.



**Figura 28.** Micrografía TEM obtenida para a) MIP-HFB y b) MIP-HFL. Se observan para ambos sistemas, aglomeraciones de las nanopartículas. c) nanopartícula aislada. Se observa la red cristalina de la magnetita y un tamaño de partícula real de aproximadamente 10 nm.

#### 6.4.3 Espectrometría de infrarrojo y difracción de rayos x

Lo espectros de infrarrojo de los sistemas MIP-HFB y MIP-HFL, así como el del polímero, (figura 29), mostraron que se observa una señal intensa en  $1717\text{ cm}^{-1}$  para el polímero, la que es debida al estiramiento del enlace  $\text{C}=\text{O}$  y que corresponde al grupo éster presente en el entrecruzador, las bandas en  $1246$  y  $1127\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los estiramientos simétrico y asimétrico de  $-\text{COO}-$ . Por otro lado, las señales en  $2871$  y  $2950\text{ cm}^{-1}$  se conservan en los tres espectros y corresponden al estiramiento de  $-\text{CH}_2-$  asimétrico y simétrico. Al comparar los sistemas MIP-HFB y MIP-HFL, nuevamente se observa la señal presente entre  $550$  y  $560\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al enlace  $\text{Fe}-\text{O}$  de la magnetita; del mismo modo, las señales en  $3340$ - $3360\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de los puentes de hidrógeno debidas a los grupos hidroxilo de la superficie.



**Figura 29.** Espectros de infrarrojo obtenidos para los sistemas MIP-HFB, MIP-HFL y para el polímero.

Por último, se realizaron los análisis de difracción de rayos x para comprobar la presencia de magnetita en los sistemas. Como se observa en la figura 30, para ambos sistemas MIP-HFB y MIP-HFL, se encuentran los picos característicos de la magnetita en los planos 220, 311, 400, 422, 511 y 440, mismos que concuerdan con lo reportado.<sup>69</sup> Con lo anterior se comprueba nuevamente que la magnetita no pierde su cristalinidad después de la polimerización.

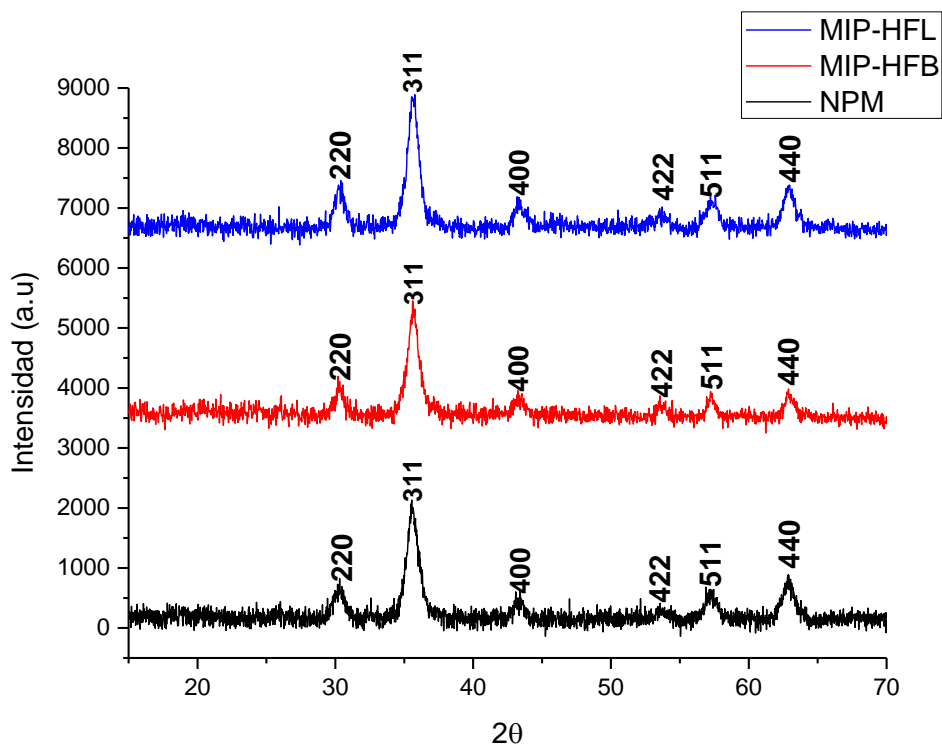


Figura 30. Difractogramas de rayos x obtenidos para los sistemas MIP-HFB, MIP-HFL y para NPM.

### 6.5 Estudios de adsorción de los sistemas NIP-HFB, NIP-HFL, MIP-HFB Y MIP-HFL

Este estudio se realizó con el fin de conocer cuánto metotrexato es adsorbido por gramo de nanopartícula recubierta poliméricamente. Para llevar a cabo la cuantificación de metotrexato (MTX), se realizó una curva de calibración mediante espectroscopía UV-visible, a una longitud de onda de 302 nm (figura 31).

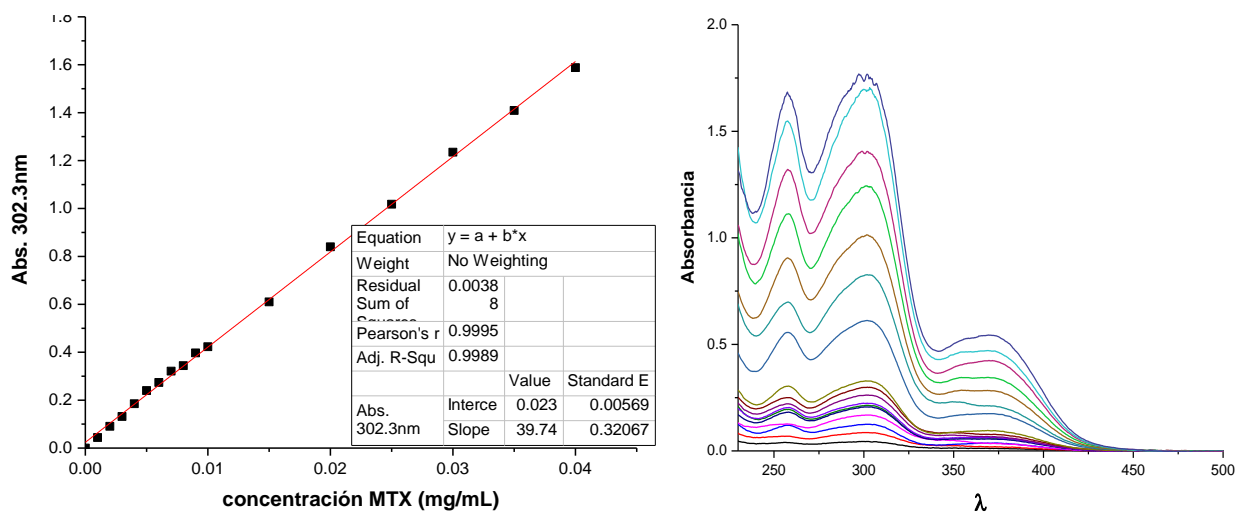
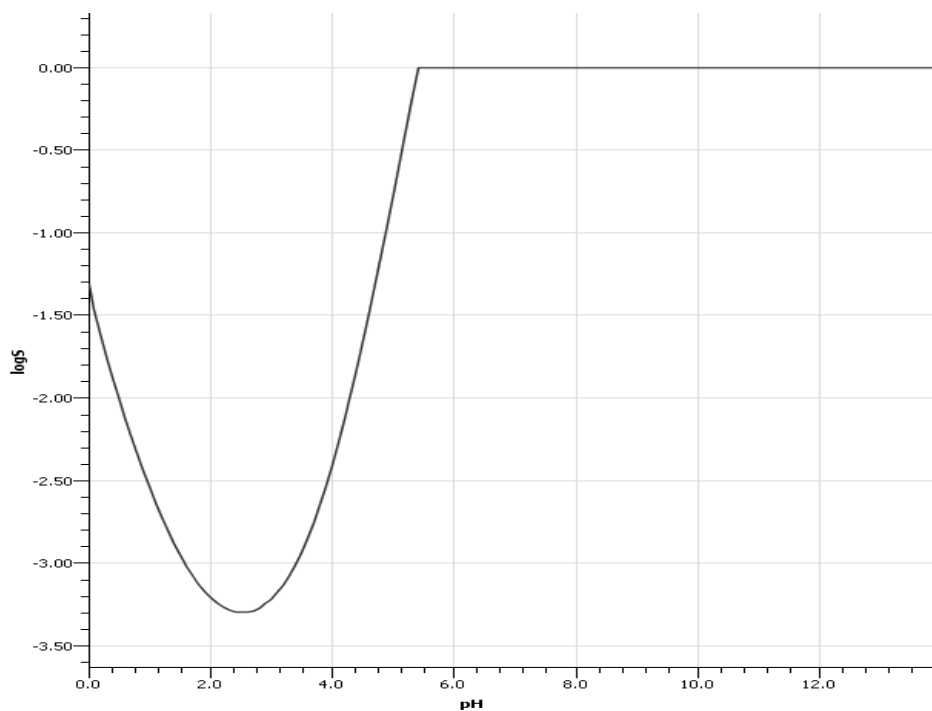


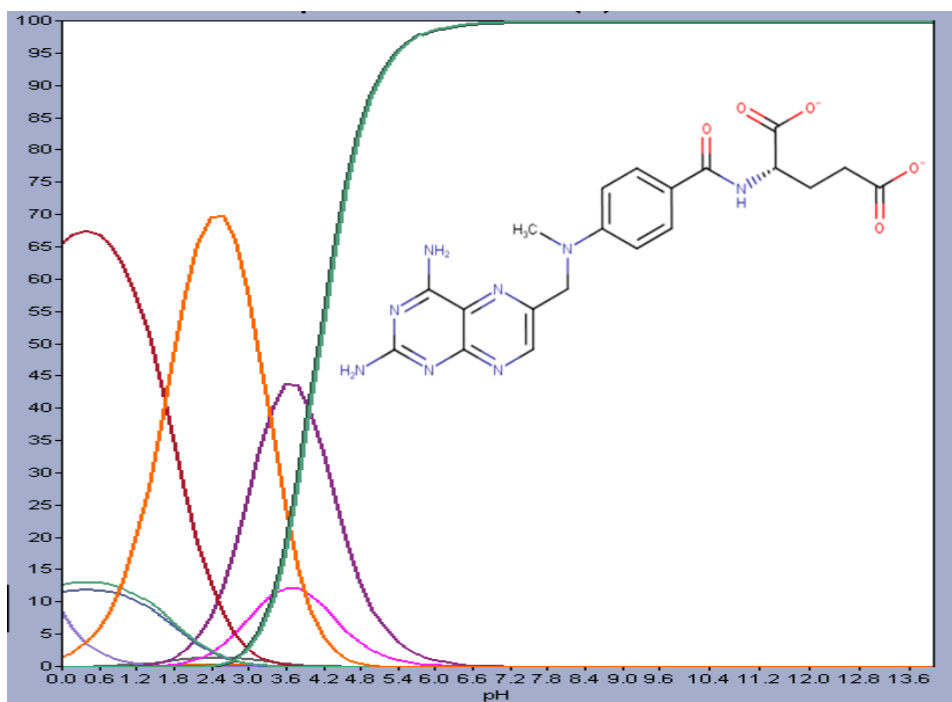
Figura 31. Curva de calibración y espectros de absorción del metotrexato (MTX)



Antes de iniciar los estudios de adsorción, se retiró la molécula molde de las nanopartículas MIP-HFB y MIP-HFL, para ello, se realizaron lavados con agua, puesto que el MTX es soluble en este medio, y posteriormente con  $K_2CO_3$  0.1 M, esto último con el fin de desprotonar a la molécula de MTX y así hacerla más afín al agua que al polímero, ya que, como se observa en la figura 32, el MTX es poco soluble en agua a  $pH < 6$ , además de que de acuerdo al gráfico de distribución de microespecies (figura 33), a  $pH > 7$ , se tiene una abundancia del 100% de la especie desprotonada en sus grupos carboxilo.



**Figura 32.** Solubilidad del metotrexato en función del pH.



**Figura 33.** Distribución de microespecies de metotrexato (%) en función del pH.

De esta forma, se realizaron cuatro lavados para extraer todo el fármaco de las partículas, (realizando más lavados posteriores con agua para neutralizar el medio) encontrando, por concentraciones aditivas, que se extrajeron 134.6 mg de MTX/g de MIP-HFB y 121.2 mg de MTX/g de MIP-HFL.

Una vez que se tuvo un panorama general de la cantidad de metotrexato aproximado que es capaz de adsorberse en los sistemas MIPs, se realizó una disolución de metotrexato tal que fuera más concentrada que la cantidad extraída con los lavados, esto con el fin de asegurar una completa saturación de los sitios específicos formados con la impronta molecular en ambos sistemas.

Se realizaron los estudios de adsorción de igual forma con los sistemas NIP-HFB y NIP-HFL, con el fin de tener un punto de comparación en cuanto a la cantidad de MTX adsorbida con y sin la presencia de sitios de reconocimiento específicos.

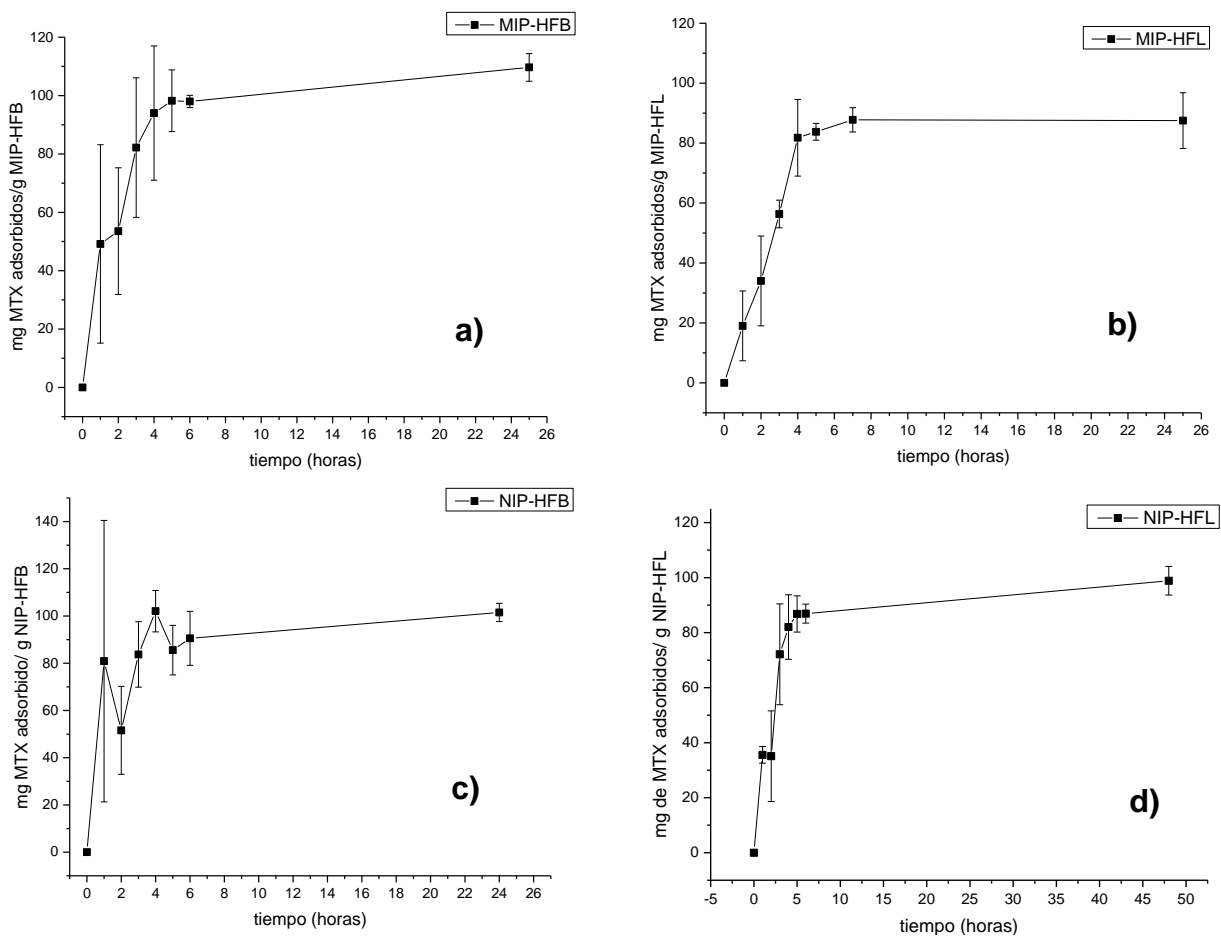
Antes de realizar las cinéticas de adsorción, las nanopartículas de todos los sistemas fueron tratadas con ácido acético, con el fin de protonar los sitios de reconocimiento del polímero y que, de esta forma, la interacción con el MTX fuera un poco más fuerte y así desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo MIP-MTX.

Una vez secas las nanopartículas, se pesaron en viales por separado y por triplicado, aproximadamente 10mg de nanopartículas de los diferentes sistemas y se pusieron en contacto con 10 mL de una disolución  $1.1 \times 10^{-3}$  M de MTX (0.5mg/mL). Las muestras se agitaron a 250 rpm a 25°C, tomando una alícuota del medio cada hora hasta las 24 horas.

La cantidad adsorbida de MTX en cada sistema a los distintos tiempos, se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$C_{ads} = C_{in} - C_x$$

Donde  $C_{ads}$  es la cantidad en mg de MTX adsorbida/g de nanopartículas al tiempo x,  $C_{in}$  es la cantidad en mg de MTX que se encontraba inicialmente en el medio y  $C_x$  es la cantidad de MTX presente en el medio al tiempo x.



**Figura 34.** Cinéticas de adsorción de MTX por los sistemas a) MIP-HFB, b) MIP-HFL, c) NIP-HFB y d) NIP-HFL. Promedios de tres repeticiones con su respectiva desviación estándar.

Como se observa en la figura 34, para todos los sistemas, a excepción del sistema NIP-HFL, se tiene que la cinética llega al equilibrio después de las 4 horas, esto se ve porque no se tiene una diferencia significativa en la cantidad de MTX que ha sido adsorbida por cada sistema a través del tiempo, como lo demuestra la desviación estándar. Con lo anterior se puede decir que los sitios específicos de los sistemas MIP's se han saturado por completo y que ahora se tiene desplazado el equilibrio hacia el complejo MIP-MTX.

En el caso de los sistemas NIP's también se llega a un equilibrio, pues la molécula de MTX se unirá a la superficie de estas partículas, aunque lo hará de una forma menos fuerte y menos específica que con los sistemas MIP's al carecer de sitios de reconocimiento específicos.

Por otro lado, como lo muestran las gráficas, no hay una gran diferencia entre sistemas en cuanto a la cantidad máxima de MTX que es adsorbido, oscilando entre 80 y 120 mg/g nanopartícula. Esto se puede explicar debido a que en el caso de los sistemas MIP's, se tiene una disminución de los sitios en donde la molécula de MTX puede unirse inespecíficamente, al contrario que en los sistemas NIP's, en los que el MTX puede interactuar con la superficie de distintas formas.

## **6.6 Estudio de las cinéticas de liberación**

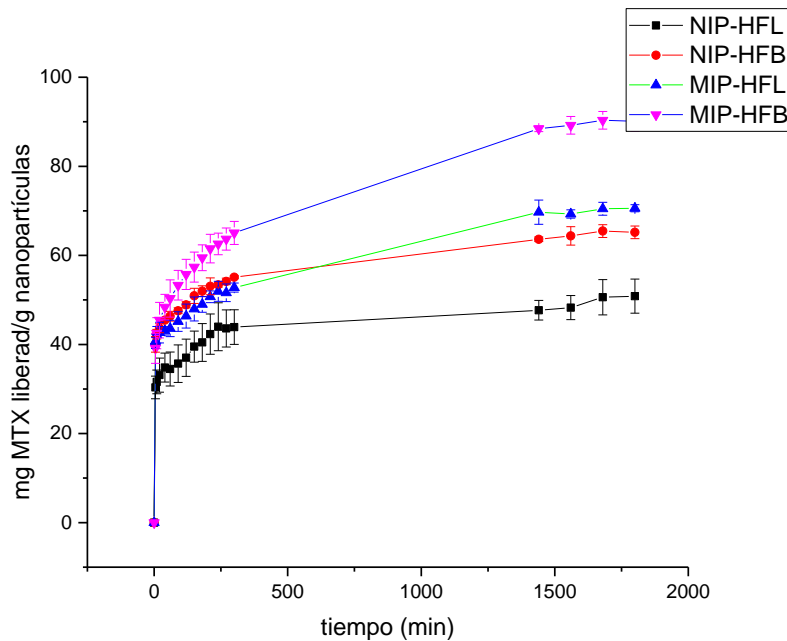
Una vez que se conoció la cantidad de MTX que adsorbe cada sistema, se procedió a realizar los estudios de liberación con las partículas cargadas para conocer el mecanismo por el que el fármaco es transportado al medio.

Una vez secas, se pesaron 10 mg de nanopartículas de cada sistema por triplicado y se adicionaron a 50 mL de una solución buffer de fosfatos pH=7.4, manteniendo una temperatura de 37°C y agitación constante a 250 rpm para simular condiciones fisiológicas.

Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo, calculando la cantidad de fármaco que era liberada y se graficó la cantidad liberada de MTX en función del tiempo para cada sistema. Las cinéticas obtenidas (figura 35), muestran una diferencia notable entre sistemas en cuanto a la cantidad de fármaco liberado, siendo el sistema MIP-HFB, aquel que liberó la mayor cantidad de MTX ( mg de MTX/g nanopartículas) en comparación con los sistemas NIP, esto era de esperarse, pues los sitios de reconocimiento sirven de reservorio, alojando a la molécula en el polímero, mientras que los sistemas NIP tienen limitada la carga de

fármaco por la ausencia de sitios en el polímero, dependiendo únicamente del área superficial, en el que las moléculas no tienen un acomodo específico. A este efecto se le denomina efecto de impronta y es una prueba de que se tienen sitios específicos para el metotrexato en el polímero que cubre a la nanopartícula.

En todos los casos se observa una liberación muy rápida (efecto burst), posteriormente se observa una liberación lenta. Este fenómeno se puede deber a que la partícula tiene metotrexato en la superficie probablemente de manera de bicapa o poli capas, este al no estar asociado con la superficie, se disuelve rápidamente al ponerse en contacto con el disolvente. Posteriormente se libera el fármaco unido a sitios no específicos y finalmente de forma más lenta los que están unidos a los sitios moldeados o de alto reconocimiento molecular. Este comportamiento es normal y se ha observado para sistemas similares.<sup>18</sup>

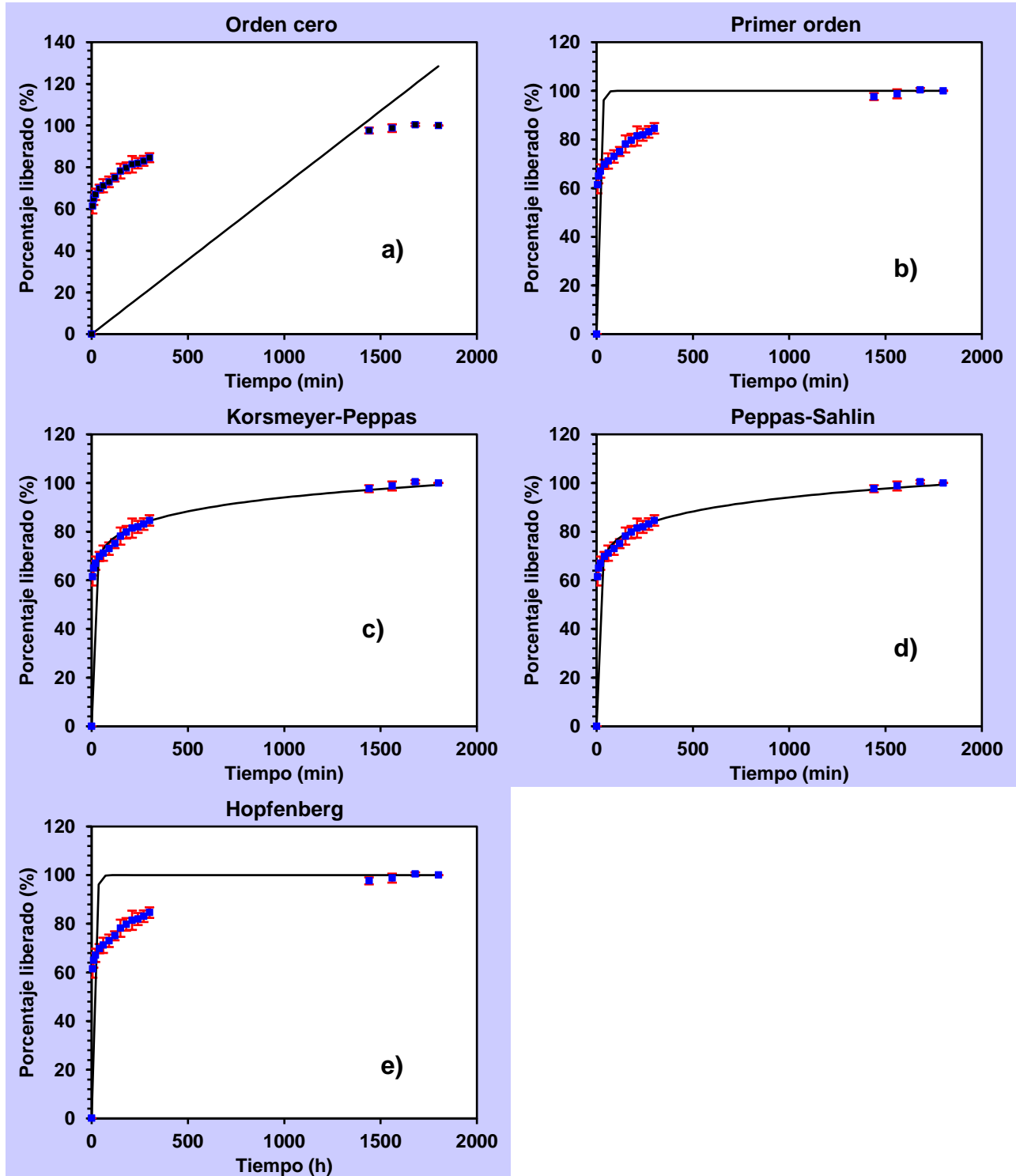


**Figura 35.** Comparación de las cinéticas de adsorción de cada sistema.

A las cinéticas de liberación obtenidas para cada sistema, se les hicieron ajustes no lineales a distintos modelos de cinéticas de liberación, entre los que se encuentran Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin y Hopfenberg, que evalúan la liberación desde una matriz polimérica. Estos ajustes se realizaron con ayuda del programa DDSolver<sup>70</sup>. Se seleccionó el modelo que presenta el mejor ajuste para todos los eventos, siendo el criterio más usualmente empleado, el coeficiente de correlación  $r^2$ .

### 6.6.1 Sistema NIP-HFB

Se siguió la cinética de liberación de MTX durante 30 h. y los resultados obtenidos se ajustaron a los modelos de orden cero, primer orden, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin y Hopfenberg (figura 36).



**Figura 36.** Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema NIP-HFB a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Peppas-Sahlin y e) Hopfenberg

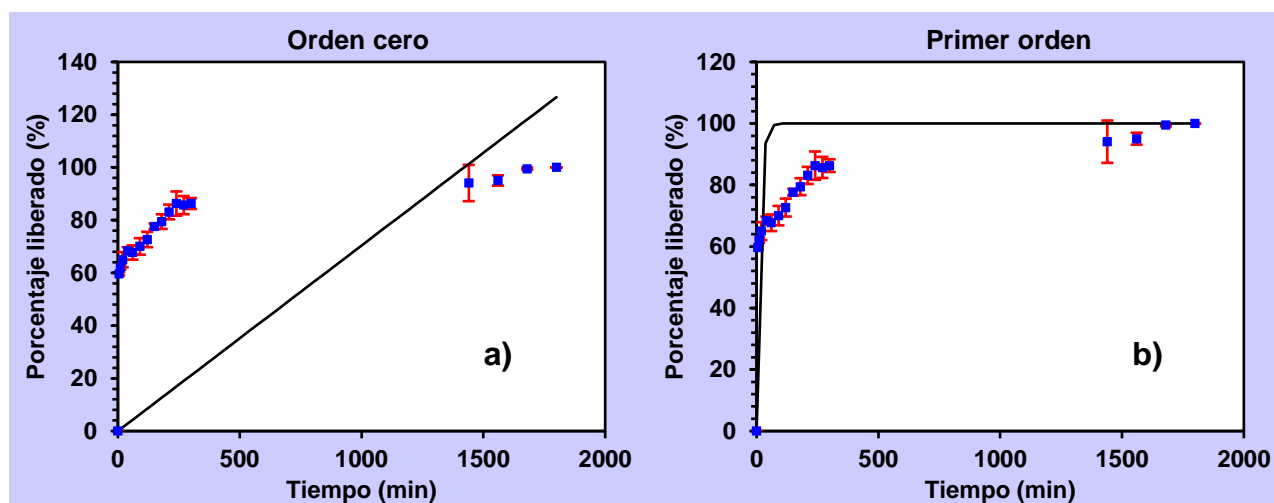
Al comparar los parámetros estadísticos de los ajustes a modelos (tabla 4), se observó que, para este sistema, el modelo que mejor se ajusta es el de Peppas-Sahlin al obtenerse el mayor coeficiente de correlación (Rsqr) con un valor de 0.9928, la menor desviación estándar (SS), el menor criterio de Akaike (AIC) y la mayor suma de cuadrados (MSC).

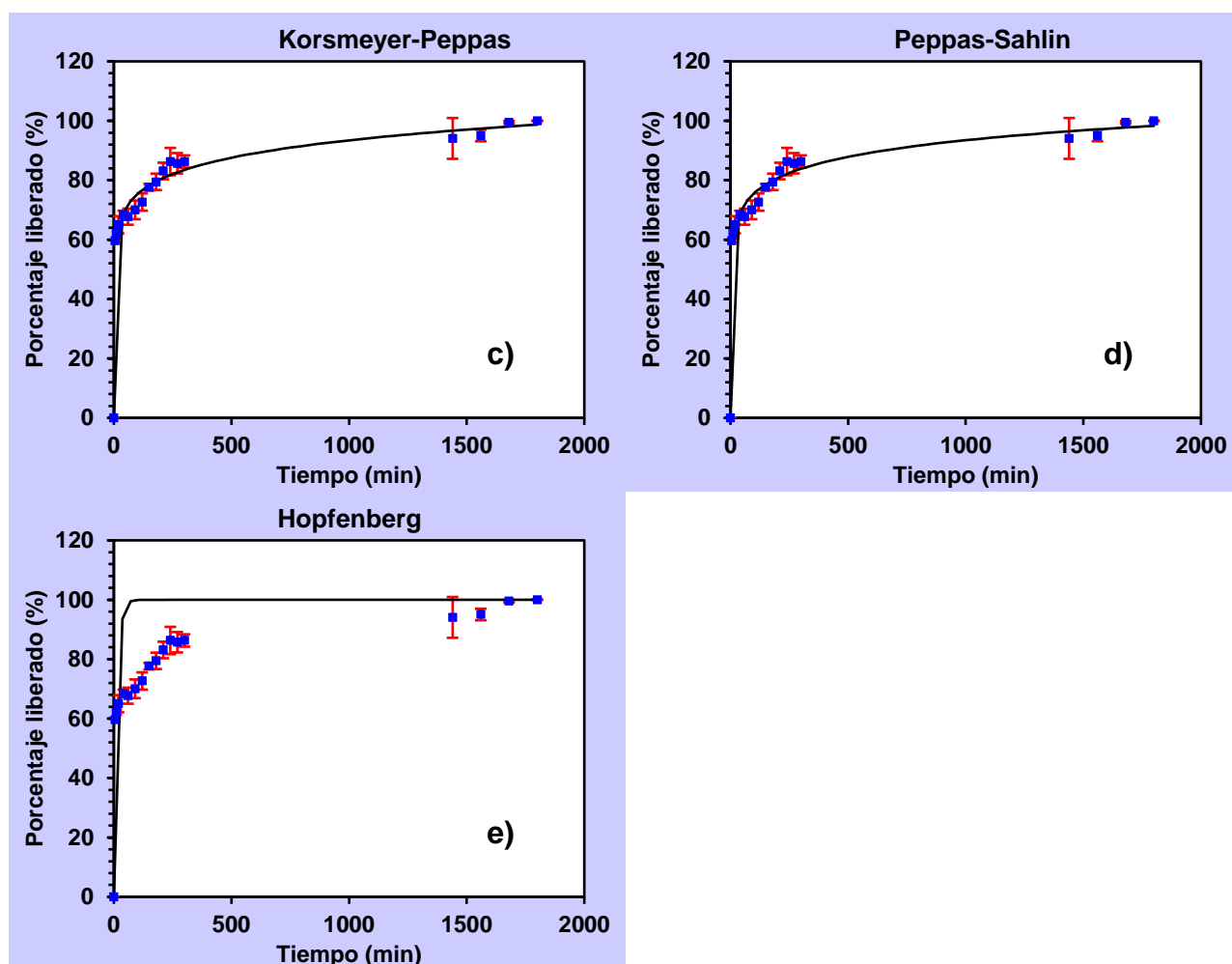
Tabla 4. Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos.

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Parámetros	$K_0$	$K_1$	$K_1, n$	$K_1, k_2$	$k_{HB}$
Rsqr	-5.5942	0.3135	0.9921	0.9928	0.3134
MSC	-3.0993	-0.8295	3.6031	3.5688	-0.9407
AIC	199.1214	158.2644	78.4779	79.0947	160.2670
SS	57124.1111	5951.7282	67.9323	62.3085	5952.5877

### 6.6.2 Sistema NIP-HFL

La cinética de liberación se siguió durante 30 horas, y los resultados obtenidos se sometieron a ajustes no lineales de distintos modelos.





**Figura 37.** Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema NIP-HFL a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Peppas-Sahlin y e) Hopfenberg

Los parámetros estadísticos de los ajustes a modelos (tabla 5), mostraron que el modelo que mejor se ajusta es nuevamente el de Peppas-Sahlin al obtenerse el mayor coeficiente de correlación (0.98), la menor desviación estándar, el menor criterio de Akaike y la mayor suma de cuadrados.

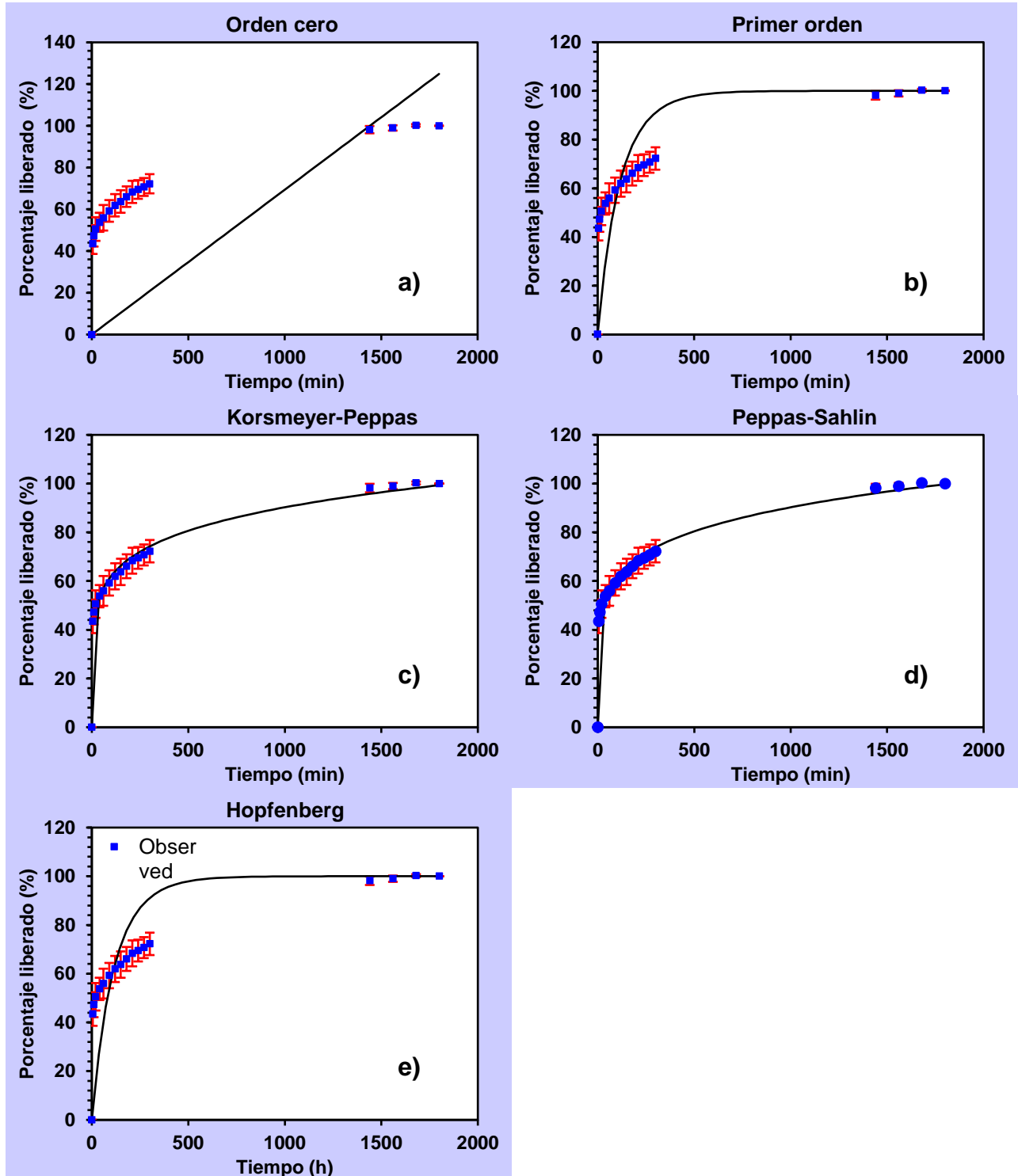
**Tabla 5.** Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema NIP-HFL al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos.

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Parámetros	$K_0$	$K_1$	$K_1, n$	$K_1, k_2$	$k_{HB}$
Rsqr	-5.4324	0.2857	0.9786	0.9800	0.2856
MSC	-3.0051	-0.8056	2.7240	2.6638	-0.9168
AIC	198.9047	159.3135	95.7820	96.8643	161.3151
SS	56416.1179	6291.3943	188.4530	176.4916	6291.9412



### 6.6.3 Sistema MIP-HFB

Al seguir la cinética de liberación en este sistema por 30 horas, se obtuvieron los siguientes ajustes no lineales.



**Figura 38.** Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema MIP-HFB a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Peppas-Sahlin y e) Hopfenberg

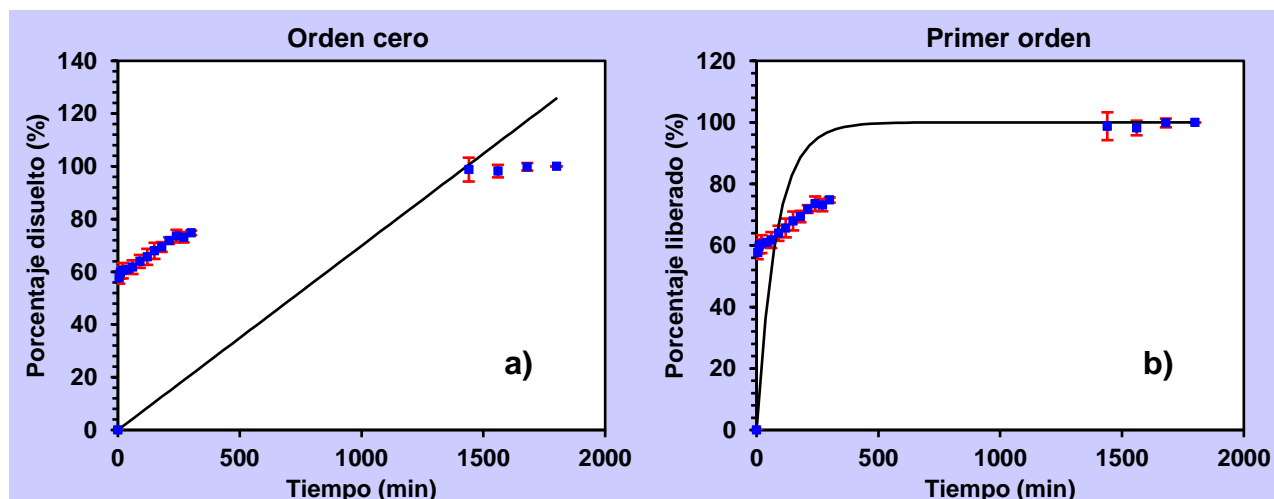
De acuerdo a los parámetros obtenidos en la tabla 6, se tiene que el modelo que mejor describe la cinética de liberación de MTX de este sistema es nuevamente el de Peppas-Sahlin, pues se presenta el mayor coeficiente de correlación (0.9912), la mayor suma de cuadrados, el menor criterio de Akaike y la menor desviación estándar.

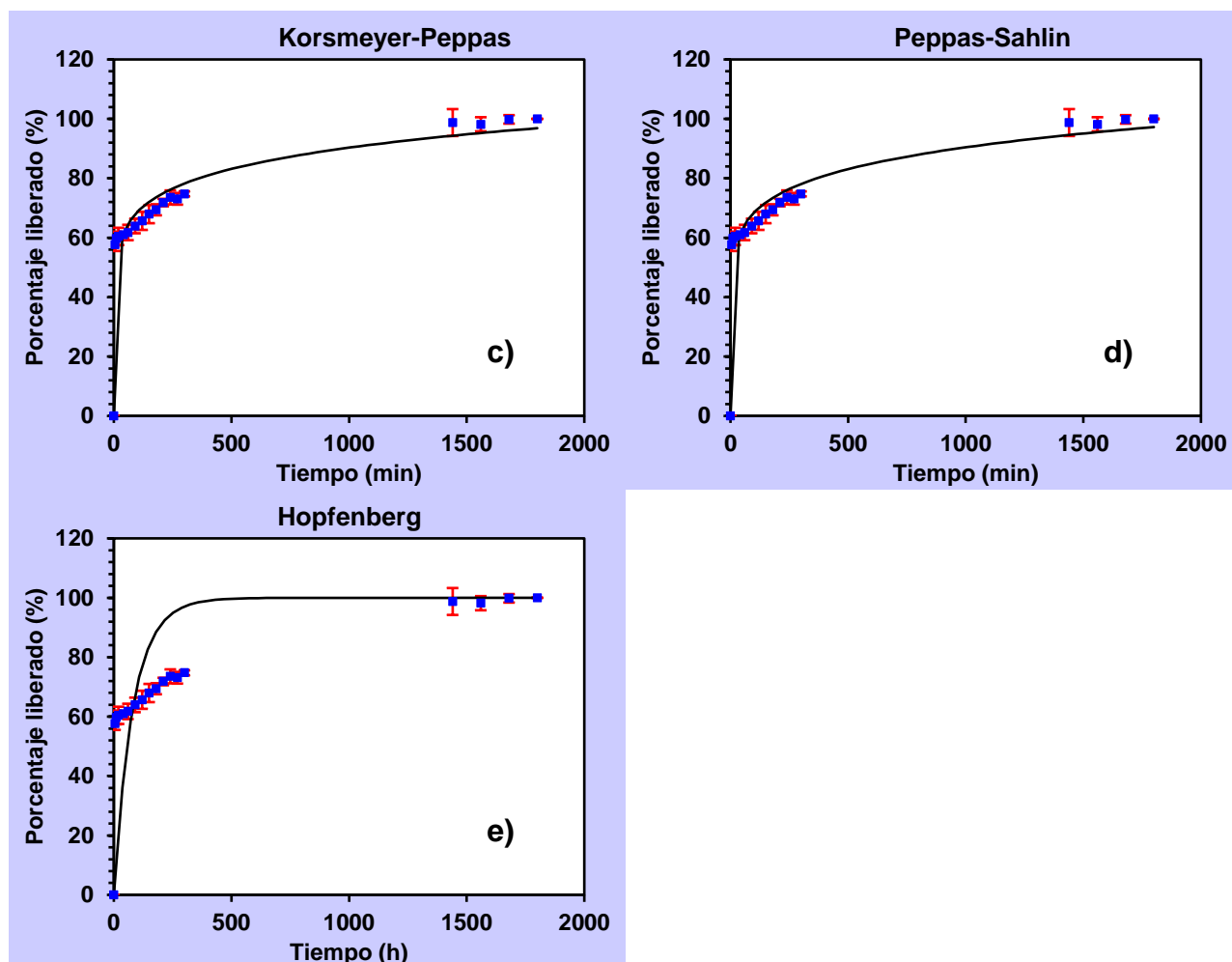
**Tabla 6.** Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema MIP-HFB al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos.

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Parámetros	$K_0$	$K_1$	$K_1, n$	$K_1, k_2$	$k_{HB}$
Rsqr	-2.4425	0.3576	0.9889	0.9912	0.3574
MSC	-1.8755	-0.2059	3.7969	3.9227	-0.3172
AIC	190.3058	160.2519	88.2020	85.9373	162.2567
SS	35350.4041	6613.3411	116.3940	92.1167	6615.0611

#### 6.6.4 Sistema MIP-HFL

Después de seguir la cinética por 30 horas, se realizaron los ajustes a modelos no lineales con los resultados obtenidos (figura 39).





**Figura 39.** Modelos de ajuste no lineal para la cinética de liberación del sistema MIP-HFL a) Orden cero, b) primer orden, c) Korsmeyer Peppas, d) Peppas-Sahlin y e) Hopfenberg

Para este último sistema, se observó el mismo comportamiento, es decir, los parámetros estadísticos demostraron un mejor ajuste al modelo de Peppas-Sahlin, dando el coeficiente de correlación más alto (0.9618).

**Tabla 7.** Parámetros estadísticos obtenidos para el sistema MIP-HFL al ajustar los datos de liberación a los distintos modelos.

Modelo	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Parámetros	$K_0$	$K_1$	$K_1, n$	$K_1, k_2$	$k_{HB}$
Rsqr	-3.8759	-0.0917	0.9587	0.9618	-0.0919
MSC	-2.4835	-0.9890	2.2091	2.1787	-1.1003
AIC	194.2531	167.3512	109.7860	110.3337	169.3546
SS	43571.3793	9772.1521	371.9653	343.8294	9774.0059

**Tabla 8.** Parámetros calculados para el ajuste no lineal Peppas-Sahlin de los diferentes sistemas.

**Modelo: Peppas-Sahlin ( $f_t = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$ )**

Sistema	$k_1$	$K_2$	n
NIP-HFB	35.959	15.041	0.066
NIP-HFL	41.213	6.629	0.096
MIP-HFB	23.995	6.739	0.121
MIP-HFL	30.454	9.914	0.089

En resumen, como se observa en la tabla 8, para todos los sistemas, el modelo que mejor ajustó de acuerdo a las cinéticas de liberación fue el de Peppas-Sahlin. Este modelo sugiere que la liberación se lleva a cabo por dos vías: por difusión de Fick, la cual está relacionada al valor de  $k_1$ , y una segunda vía, debida al hinchamiento de la matriz polimérica que da un aumento en el área de contacto con el medio, aumentando la movilidad del fármaco hacia el medio este último mecanismo está relacionado al valor de  $k_2$ .

Se observa que los valores más altos de los parámetros calculados en todos los sistemas, se obtuvieron para  $k_1$ , por lo que se puede decir que el mecanismo de liberación, se da mayoritariamente por difusión de Fick y en una menor proporción por el hinchamiento de la matriz, lo cual se corrobora al observar los valores obtenidos para n en todos los sistemas, siendo en todos los casos, menos a 0.5 (tabla 2).

La principal diferencia que se tiene entre los distintos sistemas al ser evaluados como posible sistema de liberación controlada de fármacos, es la cantidad del mismo que se libera de cada sistema. En los sistemas NIP's, se tuvo una mayor cantidad de fármaco liberado al inicio de la cinética de liberación, como se comentó anteriormente, esto era de esperarse ya que al no tener sitios de alta especificidad el metotrexato se encuentra débilmente unido al polímero y el efecto burst es mayor, en comparación con los sistemas MIP's, donde este efecto fue menos intenso.

Otro factor que es de suma importancia es la capacidad de absorción de MTX de cada sistema. Los resultados mostraron que los sistemas MIP's liberaron una mayor cantidad de MTX/g de nanopartículas (70-90 mg/g) que los sistemas NIP's (50-65 mg/g), lo cual era de esperarse debido a que estos últimos no poseían los sitios específicos de reconocimiento de la molécula, entonces, el MTX que lograron adsorber, interactuó de forma distinta en toda la superficie, generando posiblemente impedimento estérico y limitando de esta forma la cantidad de MTX que se podía unir a superficie.

## 7.0 CONCLUSIONES

Se lograron sintetizar nanopartículas de magnetita de 10 a 20 nm mediante el método de coprecipitación, modificando la superficie con ácido oleico para hacerlas hidrofóbicas. Dichas partículas se caracterizaron mediante TEM, espectroscopía de infrarrojo, análisis elemental, dispersión dinámica de luz, potencial z y rayos x de polvos. Además se comprobó que la modificación de superficie con ácido oleico les confirió propiedades hidrofóbicas, manteniendo tamaños de partícula en el intervalo de 10 a 20 nm.

Una vez que se caracterizaron, se llevó a cabo el recubrimiento polimérico mediante la técnica de impronta molecular. Se utilizó metotrexato como fármaco modelo para el molde y se sintetizaron partículas con polímero, pero sin usar metotrexato con el fin de que sirvieran como estándar comparativo. La caracterización indica que las partículas se cubren de polímero en una forma "core-shell", la microscopía electrónica indica que el recubrimiento es de aproximadamente de aproximadamente 2 nm y no hubo una diferencia significativa en el recubrimiento de las partículas hidrofílicas e hidrofóbicas.

Se realizaron los estudios de adsorción y de liberación de los cuatro sistemas (NIP-HFB, NIP-HFL, MIP-HFB y NIP-HFL) encontrando que las partículas que más adsorben, y las que más liberan, son aquellas en donde se llevó a cabo la impronta molecular, también se observa claramente el efecto del reconocimiento molecular polímero-metotrexato inducido por la impronta en la liberación de fármaco, siendo esta más lenta, esto se debe a la mayor afinidad del polímero hacia el metotrexato.

Los estudios de las cinéticas de liberación mostraron un mejor ajuste al modelo de Peppas-Sahlin para todos los sistemas, con lo que se pudo saber que el mecanismo por el que se libera el fármaco es primordialmente por difusión de Fick, aunque también se tiene una contribución por el hinchamiento de la matriz polimérica. Se observa en todos los estudios un efecto burst importante. Esto es debido a que hay una parte del metotrexato unido muy débilmente en la superficie de las nanopartículas y cuando estas entran en contacto con la disolución, se disuelve rápidamente esta fracción del total del fármaco. El resto se encuentra adsorbido con mayor fuerza y su desorción es mucho más lenta en comparación con el efecto burst. Todo lo anterior es mucho más notorio en las MIPs debido al efecto de impronta.

## 8.0 PERSPECTIVAS

En este trabajo se utilizó al metotrexato como molécula molde para realizar la impronta molecular, por lo que podría evaluarse la robustez de la impronta al utilizar distintos monómeros funcionales para aumentar la interacción fármaco- nanopartícula y contar con tiempos de liberación mayores.

Es conveniente realizar estudios preliminares antes de llevar a cabo la síntesis del polímero de impronta, evaluando la afinidad del fármaco con distintos monómeros funcionales para asegurar así, una mejor interacción y afinidad del fármaco por el sitio específico sintetizado.

Los estudios *in vivo* serían de gran ayuda para conocer como es el comportamiento de estos sistemas dentro de un organismo

Por último, se podrían realizar perfiles de liberación, sometiendo a los sistemas sintetizados a un campo magnético alterno, para saber en qué medida difiere su aplicación en la liberación del fármaco. Con esto se contaría con un sistema estímulo respuesta.

## 9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 OMS. *Cáncer. Organización Mundial de la Salud.*, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>> (
- 2 NCI. *What is the cancer?. National Cancer Institute.* , <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects/>> (
- 3 Kazemi, S., Sarabi, A. A. & Abdouss, M. Synthesis and characterization of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for controlled release of letrozole. *Korean Journal of Chemical Engineering* **33**, 3289-3297, doi:10.1007/s11814-016-0171-x (2016).
- 4 Chomoucka, J. *et al.* Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. *Pharmacological Research* **62**, 144-149, doi:10.1016/j.phrs.2010.01.014 (2010).
- 5 Griffete, N. *et al.* Design of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for controlled release of doxorubicin under an alternative magnetic field in athermal conditions. *Nanoscale* **7**, 18891-18896, doi:10.1039/C5NR06133D (2015).
- 6 Weinberg, R. A. How cancer arises. *Scientific American* **275**, 62-70 (1996).
- 7 Bernard W. Stewart, C. P. W. World Cancer Report 2014. 630 (Lyon, 2014).
- 8 INEGI. (INEGI, 2016).
- 9 INEGI. Estadísticas a propósito del...Día Mundial contra el Cáncer. (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2017).
- 10 Liu, D., Yang, F., Xiong, F. & Gu, N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics* **6**, 1306-1323, doi:10.7150/thno.14858 (2016).
- 11 Olivos, H. M. T. *Síntesis y caracterización de polímeros de impresión molecular para liberación prolongada de ivermectina.* licenciatura thesis, UNAM, (2010).
- 12 Chien, Y. *Novel Drug Delivery Systems, Second Edition.* (Taylor & Francis, 1991).
- 13 Mitra, A. K. *et al.* NOVEL DELIVERY APPROACHES FOR CANCER THERAPEUTICS. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **219**, 248-268, doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.067 (2015).
- 14 Salud, S. d. (2013).
- 15 Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **13**, 123-133 (2001).
- 16 Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. & Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* **67**, 217-223 (2010).
- 17 Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. & Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **15**, 25-35, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9) (1983).
- 18 Ambrosio, P. J. S. *Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato y recubiertas con acrilatos para uso como vehículo de doxorubicina.* Licenciatura thesis, UNAM, (2013).
- 19 Jain, K. K. Nanotechnology-based drug delivery for cancer. *Technology in Cancer Research and Treatment* **4**, 407-416 (2005).
- 20 Kawasaki, E. S. & Player, A. Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **1**, 101-109, doi:10.1016/j.nano.2005.03.002 (2005).
- 21 Mansour, H. M., Sohn, M., Al-Ghananeem, A. & DeLuca, P. P. Materials for pharmaceutical dosage forms: Molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 3298-3322, doi:10.3390/ijms11093298 (2010).

- 22 Fang, J. Y. & Al-Suwayeh, S. A. Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* **9**, 657-669, doi:10.1517/17425247.2012.679927 (2012).
- 23 Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S. & Devoisselle, J. M. Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine* **1**, 157-168, doi:10.2217/17435889.1.2.157 (2006).
- 24 Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R. & Santamaría, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today* **2**, 22-32, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1748-0132\(07\)70084-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1748-0132(07)70084-1) (2007).
- 25 Felton, C. *et al.* Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging: Recent advances in iron- and manganese-based magnetic nanoparticles. *Drug Metabolism Reviews* **46**, 142-154, doi:10.3109/03602532.2013.876429 (2014).
- 26 Cole, A. J., Yang, V. C. & David, A. E. Cancer theranostics: The rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology* **29**, 323-332, doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.001 (2011).
- 27 Agiotis, L. *et al.* Magnetic manipulation of superparamagnetic nanoparticles in a microfluidic system for drug delivery applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **401**, 956-964, doi:10.1016/j.jmmm.2015.10.111 (2016).
- 28 Chen, X. & Wong, S. T. C. in *Cancer Theranostics* 3-8 (Academic Press, 2014).
- 29 Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. & Kobayashi, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **100**, 1-11, doi:10.1263/jbb.100.1 (2005).
- 30 Kobayashi, H., Watanabe, R. & Choyke, P. L. Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects; What Is the Appropriate Target? *Theranostics* **4**, 81-89, doi:10.7150/thno.7193 (2014).
- 31 Durán, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo, V. & Delgado, A. V. Magnetic colloids as drug vehicles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**, 2948-2983, doi:10.1002/jps.21249 (2008).
- 32 Moskowitz, B. M.
- 33 Kolhatkar, A. G., Jamison, A. C., Litvinov, D., Willson, R. C. & Lee, T. R. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 15977-16009, doi:10.3390/ijms140815977 (2013).
- 34 Sun, C., Lee, J. S. H. & Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1252-1265, doi:10.1016/j.addr.2008.03.018 (2008).
- 35 Öchsner, A., da Silva, L. F. & Altenbach, H. *Advanced Structured Materials*. (2012).
- 36 Goya, G. F., Grazú, V. & Ibarra, M. R. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Current Nanoscience* **4**, 1-16, doi:10.2174/157341308783591861 (2008).
- 37 Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J. & Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 8070-8101, doi:10.3390/ijms16048070 (2015).
- 38 Thanh, N. T. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*. 584 (CRC Press, 2012).
- 39 Kim, J. E., Shin, J. Y. & Cho, M. H. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Archives of Toxicology* **86**, 685-700, doi:10.1007/s00204-011-0773-3 (2012).
- 40 Shubayev, V. I., Pisanic li, T. R. & Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**, 467-477, doi:10.1016/j.addr.2009.03.007 (2009).
- 41 Vasapollo, G. *et al.* Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 5908-5945, doi:10.3390/ijms12095908 (2011).
- 42 Yan, M. *Molecularly imprinted materials: science and technology*. (CRC press, 2004).
- 43 He, H. *et al.* Magnetic nanoparticles for tumor imaging and therapy: A so-called theranostic system. *Pharmaceutical Research* **30**, 2445-2458, doi:10.1007/s11095-013-0982-y (2013).
- 44 Hofmann-Amttenbrink, M., Hofmann, H. & Montet, X. Superparamagnetic nanoparticles - a tool for early diagnostics. *Swiss medical weekly : official journal of the Swiss Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology* **140**, doi:10.4414/smw.2010.13081 (2010).



- 45 Khairi, N. A. S., Yusof, N. A., Abdullah, A. H. & Mohammad, F. Removal of Toxic Mercury from Petroleum Oil by Newly Synthesized Molecularly-Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 10562-10577, doi:10.3390/ijms160510562 (2015).
- 46 Yu, J. C. C. & Lai, E. P. C. Molecularly Imprinted Polymers for Ochratoxin A Extraction and Analysis. *Toxins* **2**, 1536-1553, doi:10.3390/toxins2061536 (2010).
- 47 Curcio, M. *et al.* Selective recognition of methotrexate by molecularly imprinted polymers. *E-Polymers* (2009).
- 48 Ahmadi, M., Madrakian, T. & Afkhami, A. Solid phase extraction of doxorubicin using molecularly imprinted polymer coated magnetite nanospheres prior to its spectrofluorometric determination. *New Journal of Chemistry* **39**, 163-171, doi:10.1039/c4nj01402b (2015).
- 49 Hashemi-Moghaddam, H., Kazemi-Bagsangani, S., Jamili, M. & Zavareh, S. Evaluation of magnetic nanoparticles coated by 5-fluorouracil imprinted polymer for controlled drug delivery in mouse breast cancer model. *International Journal of Pharmaceutics* **497**, 228-238, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.040 (2016).
- 50 Kaamyabi, S., Habibi, D. & Amini, M. M. Preparation and characterization of the pH and thermosensitive magnetic molecular imprinted nanoparticle polymer for the cancer drug delivery. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **26**, 2349-2354, doi:10.1016/j.bmcl.2016.03.020 (2016).
- 51 Kubo, T., Koterawasa, K., Naito, T. & Otsuka, K. Molecularly imprinted polymer with a pseudo-template for thermo-responsive adsorption/desorption based on hydrogen bonding. *Microporous and Mesoporous Materials* **218**, 112-117, doi:10.1016/j.micromeso.2015.07.006 (2015).
- 52 Liu, X. *et al.* Determination of methotrexate in human serum by high-performance liquid chromatography combined with pseudo template molecularly imprinted polymer. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7533-7538, doi:10.1016/j.chroma.2009.06.018 (2009).
- 53 PaParisi, O. I. *et al.* Magnetic molecularly imprinted polymers (MMIPs) for carbazole derivative release in targeted cancer therapy. *Journal of Materials Chemistry B* **2**, 6619-6625, doi:10.1039/C4TB00607K (2014).
- 54 Türkmen, D. *et al.* Molecular imprinted magnetic nanoparticles for controlled delivery of mitomycin C. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* **42**, 316-322, doi:10.3109/21691401.2013.823094 (2014).
- 55 Zamora-Gálvez, A. *et al.* Molecularly Imprinted Polymer-Decorated Magnetite Nanoparticles for Selective Sulfonamide Detection. *Analytical Chemistry* **88**, 3578-3584, doi:10.1021/acs.analchem.5b04092 (2016).
- 56 Chen, M., Shen, H., Li, X. & Liu, H. Facile synthesis of oil-soluble Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles based on a phase transfer mechanism. *Applied Surface Science* **307**, 306-310 (2014).
- 57 Bandhu, A., Sutradhar, S., Mukherjee, S., Greneche, J. M. & Chakrabarti, P. K. Synthesis, characterization and magnetic property of maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles and their protective coating with pepsin for bio-functionalization. *Materials Research Bulletin* **70**, 145-154, doi:10.1016/j.materresbull.2015.04.035 (2015).
- 58 Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S. & Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 24-46, doi:10.1016/j.addr.2010.05.006 (2011).
- 59 Sun, S. N. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Physics B* **23**, doi:10.1088/1674-1056/23/3/037503 (2014).
- 60 Clogston, J. D. & Patri, A. K. Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **697**, 63-70, doi:10.1007/978-1-60327-198-1\_6 (2011).
- 61 Mandel, K. & Hutter, F. The magnetic nanoparticle separation problem. *Nano Today* **7**, 485-487, doi:10.1016/j.nantod.2012.05.001 (2012).
- 62 Trisnanto, S. B. & Kitamoto, Y. Field-dependent Brownian relaxation dynamics of a superparamagnetic clustered-particle suspension. *Physical Review E* **90**, doi:10.1103/PhysRevE.90.032306 (2014).

- 63 Yavuz, C. T. *et al.* Low-field magnetic separation of monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals. *Science* **314**, 964-967, doi:10.1126/science.1131475 (2006).
- 64 Lee, S.-Y. & Harris, M. T. Surface modification of magnetic nanoparticles capped by oleic acids: Characterization and colloidal stability in polar solvents. *Journal of Colloid and Interface Science* **293**, 401-408, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2005.06.062> (2006).
- 65 Zhang, L., He, R. & Gu, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* **253**, 2611-2617, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023> (2006).
- 66 Celis, J. A. *et al.* Synthesis and characterization of nanometric magnetite coated by oleic acid and the surfactant CTAB: Surfactant coated nanometric magnetite/maghemite. *Hyperfine Interactions* **238**, doi:10.1007/s10751-017-1414-x (2017).
- 67 Nedkov, I. *et al.* Surface oxidation, size and shape of nano-sized magnetite obtained by coprecipitation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **300**, 358-367, doi:10.1016/j.jmmm.2005.05.020 (2006).
- 68 Safdarian, M., Ramezani, Z. & Ghadiri, A. A. Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymer: Perphenazine template and its application in urine and plasma analysis. *Journal of Chromatography A* **1455**, 28-36, doi:10.1016/j.chroma.2016.05.083 (2016).
- 69 Lopez, J. A., González, F., Bonilla, F. A., Zambrano, G. & Gómez, M. E. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanofluid. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 60-66 (2010).
- 70 Zhang, Y. *et al.* DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal* **12**, 263-271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1 (2010).