



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL CALENTAMIENTO POR INDUCCIÓN MAGNÉTICA SOBRE LA
LIBERACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO MEDIANTE UN SISTEMA DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECUBIERTAS POR POLÍMEROS DE
IMPRONTA MOLECULAR”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JUAN RAMÓN LARA ZENTENO



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESÚS GRACIAS MORA
VOCAL: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS
SECRETARIO: CARLOS JUAREZ OSORNIO
1er. SUPLENTE: GERARDO LEYVA GOMEZ
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, ASÍ COMO EN LOS LABORATORIOS **001-003** DEL EDIFICIO F DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JESÚS GRACIA MORA

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUSTENTANTE:

JUAN RAMÓN LARA ZENTENO

Agradecimientos.

Agradezco en primera instancia al Dr. Jesús Gracia Mora por haberme dado la oportunidad de emprender el desarrollo de esta tesis, por todo el apoyo y recursos destinados para la evolución de este proyecto. Agradezco la confianza y libertad que se me dio para desarrollar esta investigación.

Agradezco a la Dra. María Josefa Bernad Bernad por el apoyo brindado en recursos materiales, equipo e instrumentos que fueron destinados para el desarrollo de esta tesis, así como de su asesoría y supervisión técnica.

Agradezco al Dr. Josué Romero Ibarra por la adquisición de las imágenes de TEM y SEM, que por no ser de su habilidad y conocimientos en microscopia electrónica no se habrían caracterizado tan bien los sistemas nanoparticulados.

Agradezco a la Dra. Laura Verónica Henao Holguín y al Dr. Iván Darío Rojas Montoya por su constante asesoría y apoyo a lo largo del desarrollo de esta tesis.

INDICE GENERAL

1. Resumen.....	7
2. Introducción y planteamiento del problema.....	9
3. Antecedentes	10
3.1 Cáncer.....	10
3.1.1 Tratamientos contra el cáncer.....	11
3.1.2 Quimioterapia.....	12
3.1.3. Antimetabolitos: Antagonistas del ácido fólico en el tratamiento contra el cáncer	13
3.2 Sistemas de liberación controlada en el tratamiento contra el cáncer.....	16
3.2.1 Teoría de Sistemas de Liberación.	16
3.2.1.1 Modelos cinéticos de liberación en los sistemas de liberación controlada.	18
3.2.2 Sistemas de liberación controlada activados magnéticamente.....	19
3.2.2.1 Nanopartículas magnéticas como sistemas de liberación controlada.....	20
3.2.3 Síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro (IONPS) por co-precipitación.....	21
3.2.4 Recubrimientos en nanopartículas de óxidos de hierro.	22
3.3 Impronta molecular con enfoque a la liberación de fármacos.	23
3.3.1 Enfoque no covalente para la síntesis de MIP.....	24
3.3.2 Componentes de los MIP y Factores que influyen la polimerización	24
3.3.2.1 Molécula molde.....	24
3.3.2.2 Monómero Funcional.....	25
3.3.2.3 Monómero estructural o entrecruzador.....	25
3.3.2.4 Disolvente.....	25
3.3.2.5 Iniciador.....	26
3.4 Magnetismo y caracterización de materiales magnéticos nanoparticulados.....	26
3.4.1 Magnetismo y materiales magnéticos.....	26
3.4.2 Caracterización de materiales magnéticos nanoparticulados.....	30
3.5 Campos magnéticos alternos.....	30
3.5.1 Principios de Circuitos de Corriente alterna.....	32
3.5.1.1 Generador de corriente alterna o alternador.....	32
3.5.1.2 Componente Resistivo.....	33
3.5.1.3 Componente Inductivo.....	34
3.5.1.4 Componente Capacitivo.	36

3.5.1.5	Circuitos R-L-C en serie y su aplicación en el desarrollo de un equipo generador de campos magnéticos alternos.....	37
3.5.2	Circuito Oscilador de Mazzilli o ZVS driver.....	39
3.6	Calentamiento magnético e hipertermia.....	40
3.7	Síntesis y Caracterización de IONPs-MIP como sistemas de liberación de fármaco .	40
3.7.1	Síntesis de IONPs-MIP.....	40
3.7.1.1	Polimerización de precipitación.....	41
3.7.1.2	Polimerización en emulsión.....	41
3.7.1.3	Copolimerización por injertación.....	42
3.7.2	Caracterización de IONPs-MIP.....	42
3.7.2.1	Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR).....	42
3.7.2.2	Difracción de Rayos X de polvos (XRD).....	43
3.7.2.3	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	45
3.7.2.4	Microscopia electrónica de Transmisión (TEM).....	45
3.7.2.5	Espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	46
3.7.2.6	Curvas de histéresis (magnetometría).....	46
3.7.2.7	Pruebas de calentamiento magnético (hipertermia magnética).....	47
3.7.2.8	Estudios de adsorción de fármaco.....	48
3.7.2.9	Estudios de liberación de fármaco.....	49
4.	Objetivos e Hipótesis.....	50
4.1	Objetivos.....	50
4.1.1	General.....	50
4.1.2	Particulares.....	50
4.2	Hipótesis.....	51
5.	Desarrollo Experimental y Análisis de resultados.....	51
5.1	Materiales.....	51
5.2	Síntesis de Nanopartículas y caracterización.....	51
5.2.1	Síntesis de Nanopartículas.....	51
5.2.1.2	Hidrofóbicas (NPHP).....	52
5.2.1.3	Partículas improntadas con ácido fólico (NPMIP) y no improntadas (NPNIP) ..	53
5.2.2	Caracterización de Nanopartículas.....	54
5.2.2.1	Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR).....	54
5.2.2.2	Difracción de Rayos X de polvos (DRX).....	56

5.2.2.3	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	58
5.3	Carga de Ácido Fólico en NPMIP y NPNIP	61
5.3.1	Curvas de Calibración para ácido fólico.....	61
5.3.2	Carga de Ácido Fólico en NPMIP y NPNIP.....	68
5.3.2.1	Cinéticas de adsorción de ácido fólico.....	69
5.3.2.2	Pruebas de adsorción de ácido fólico.....	70
5.3.2.3	Isotermas de adsorción para NPMIP y NPMIP	73
5.4	Diseño y desarrollo de los equipos generadores de campo magnético alterno.....	77
5.4.1	Medición de frecuencia, voltaje y campo magnético alterno	78
5.4.2	Fabricación de Bobinas	78
5.4.3	Equipo 1: Circuito LC acoplado a un amplificador de función de onda (AMP)	79
5.4.3.1	Acoplado y optimización de funcionamiento.....	80
5.4.4	Equipo 2: Circuito oscilador de Mazilli de Conmutación de voltaje cero (ZVS)	81
5.4.4.1	Acoplado y optimización de funcionamiento.....	83
5.5	Liberación de ácido fólico con NPMIP y NPMIP en presencia y ausencia de AMF.	84
5.5.1	Carga de NPMIPs y NPNIPs para el experimento.	84
5.5.2	Perfil de liberación.....	85
5.6	Prueba de liberación de ácido fólico con NPHFL en presencia de un campo magnético alterno	91
6.	Conclusiones.	92
7.	Perspectivas	93

1. Resumen

Este trabajo de tesis de licenciatura tuvo el objetivo de determinar cómo afecta a la liberación de fármacos el uso de un campo magnético alterno en un sistema de liberación de fármacos nanoparticulado de óxidos de hierro con cubierta de polímeros de impronta molecular. Siendo este un paso más para el desarrollo de un sistema de liberación de fármacos en nanopartículas magnéticas con cubierta de impronta molecular que tengan liberación activada magnéticamente.

Derivado del objetivo se tuvo que formular en primera instancia un sistema de liberación de fármacos nanoparticulado de óxidos de hierro con cubierta de polímeros de impronta molecular el cual se basó en las investigaciones previas. Posterior a la formulación fabricación de este sistema se le tuvo que hacer una caracterización, en la cual se incluyera la caracterización, química (tanto de la estructura cristalina de los núcleos como del recubrimiento polimérico con impronta a ácido fólico), morfológica y cinética (tanto de adsorción de fármaco como de liberación).

Para la caracterización del sistema de liberación se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con la técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) para caracterizar la cubierta polimérica, determinando grupos funcionales y diferenciando estos de sus monómeros constituyentes y sus productos poliméricos. Para los núcleos de óxidos de hierro se utilizaron las técnicas de microscopia electrónica de barrido y de transmisión para determinar tamaño de partícula, diámetro promedio, grosor de la cubierta, estructura cristalina y composición elemental. Por último, se determinaron las cinéticas de adsorción, las concentraciones de fármaco óptimas y las cantidades de ácido fólico máximas adsorbidas de cada uno de los sistemas fabricados para desarrollar el experimento los cuales eran el sistema de liberación de ácido fólico con impronta molecular (IONPs-MIP), el no improntado (IONPs-NIP) y las nanopartículas de óxidos de hierro hidrofóbicas (IONPs-NPHP) e hidrofílicas (IONPs-HFL)

Una vez caracterizados tanto el sistema de liberación improntado con ácido fólico IONPs-MIP, el no improntado IONPs-NIP y sus precursores de fabricación IONPs-NPHP y IONPs-HFL se prosiguió con el desarrollo del equipo generador de campos magnéticos alternos. Para desarrollar este equipo fue necesario conseguir un osciloscopio que midiera la frecuencia de

los pulsos generados, un detector de campos magnéticos alternos (sonda Hall), un generador de funciones de onda, un amplificador de la función de onda, así como una gran variedad de bobinas de cobre para generar diferentes amplitudes y frecuencias de campos magnéticos alternos. Por otro lado, se adquirió un equipo de calentamiento por inducción magnética denominado como circuito oscilador de Mazilli o Zero Voltage Switch circuit (ZVS) para probarlo como otro equipo generador de campos magnéticos alternos a una frecuencia y amplitud fija.

Una vez determinada combinación óptimamente funcional con el generador de funciones de onda, el amplificador de la función de onda y la bobina de cobre (Equipo 1 AMP) se procedió a caracterizar el campo magnético generado por este equipo en materia de frecuencia, amplitud de onda e intensidad campo magnético generado. Por otro lado, se efectuó la misma caracterización para el circuito oscilador de Mazilli o Zero Voltage Switch circuit (ZVS) el cual se denominó en este trabajo como (Equipo 2 ZVS).

Por último, se procedió a hacer una serie de perfiles de liberación, así como pruebas de liberación y de ácido fólico en presencia y en ausencia del campo magnético alterno de los dos diferentes equipos desarrollados con los sistemas de liberación IONPs-MIP, IONPs-NIP, IONPs-NPHP y IONPs-HFL dando por conclusión que existe una liberación aumentada de ácido fólico en las IONPs-HFL por la presencia del campo magnético alterno del Equipo 2 ZVS en comparación con su respectivo control.

Por otro lado, se pudo concluir que no existe una diferencia significativa en la adsorción de ácido fólico entre las IONPs-MIP y IONPs-NIP por lo cual se puede corroborar que el método de síntesis, así como el de carga de fármacos no son adecuados y se tiene que estudiar más a fondo la síntesis de estos sistemas de liberación de fármacos en nanopartículas magnéticas con cubierta de impronta molecular afín a ácido fólico.

Por último, se pudo corroborar y concluir que mediante un sencillo experimento de prueba de calentamiento las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro se calientan de 19°C a 34°C en un periodo de 30 minutos en presencia de un campo magnético alterno de 17 Gauss de amplitud de campo y una frecuencia de 107kHz.

2. Introducción y planteamiento del problema

La nanotecnología es un área interdisciplinaria dedicada al estudio, diseño, creación, manipulación y aplicación de materiales y sistemas funcionales mediante el control de la materia a escala menor que un micrómetro, así como su explotación tanto a escala de laboratorio como industrial. En una de sus ramas, la nanotecnología investiga el diseño de los materiales de tamaño nanométrico, los cuales poseen propiedades físicas y químicas muy distintas a las del material en un tamaño normal; dentro de ellas se encuentran las partículas magnéticas.

En el caso de las partículas magnéticas la reducción de tamaño trae un cambio en su comportamiento magnético. En la literatura se reporta la síntesis de una gran variedad de nanopartículas con comportamiento magnético. Entre los óxidos magnéticos, los óxidos de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ son los más adecuados debido a su relativamente baja toxicidad y adecuadas propiedades magnéticas.

Actualmente, las nanoestructuras magnéticas exhiben una gran variedad de aplicaciones que van desde los campos de la electrónica, mecánica, y óptica, hasta alcanzar áreas más complejas como la biotecnología. En este campo el uso de nanopartículas magnéticas está ganando importancia dada su potencial aplicación en el tratamiento contra el cáncer.

La liberación magnética dirigida de fármacos (MTD, por sus siglas en inglés) ha sido usada para mejorar el rendimiento terapéutico de algunos agentes quimioterapéuticos y para reducir sus indeseables efectos adversos sistémicos [1].

Por otro lado, el uso de recubrimientos para mejorar la estabilidad química y coloidal de las nanopartículas de óxidos de hierro ha sido ampliamente estudiado. Otra ventaja que se puede conseguir al recubrir nanopartículas de óxidos de hierro es el acarreamiento de manera selectiva de fármacos que por sus propiedades farmacológicas podrían desencadenar efectos adversos si se liberaran sistémicamente.

Cabe añadir que el uso de polímeros de impronta molecular como recubrimiento para las nanopartículas magnéticas puede ser una alternativa al momento de desarrollar un sistema de liberación MTD. Dichos polímeros tienen un tratamiento que los hace más afines a una

molécula en particular, simulando o imitando la afinidad que tienen los anticuerpos a su antígeno.

Dichos sistemas MTD como son las nanopartículas de óxidos de hierro recubiertas con polímero de impronta molecular (IONPs-MIP, por sus siglas en inglés) tienen las ventajas de acarrear al fármaco de una manera dirigida por campos magnéticos, y a su vez poder liberar el fármaco de manera activa en presencia de un campo magnético alterno.

Las IONPs-MIP tienen la cualidad por su carácter superparamagnético de tratar el cáncer de dos diferentes formas, la primera por la liberación activada del fármaco y la segunda por el calentamiento inductivo de estas en las células cancerígenas (hipertermia).

Cabe añadir que las IONPs-MIP han sido ampliamente estudiadas de manera independiente, teniendo como dato que existen 18,547 [2] artículos publicados referentes al desarrollo y caracterización de IONPs, así como 14,659 [3] artículos referentes a MIP. Sin embargo, existen 598[4] artículos relacionados sobre IONPs-MIP, de los cuales 179 [5] hablan de sistemas de liberación de fármaco y solo 110 [6] relacionados a cómo afecta el campo magnético a la liberación de estos sistemas. Cabe aclarar que este último dato se tiene que dividir en campo magnético constante y campos magnético alterno, por lo cual se puede concluir que es escasa la información al respecto de cómo el campo magnético alterno afecta a la liberación de fármaco en sistemas IONPs-MIP.

Por estas razones el objetivo de este trabajo fue determinar cómo afecta a la liberación de un fármaco en un sistema IONPs-MIP afín a ácido fólico la aplicación de un campo magnético alterno, el cual se desarrolló en el laboratorio.

3. Antecedentes

3.1 Cáncer

Cáncer es el nombre que se le da al conjunto de enfermedades relacionadas en las cuales algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin detenerse y se diseminan a los tejidos del derredor. Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen o se dañan, estas mueren y células nuevas las reemplazan [7]; Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales,

las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores.[7]

Para tener una idea de lo trascendente que es esta enfermedad, a continuación, se enlistan algunos hechos importantes sobre el cáncer:

- El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, y fue responsable de 8.8 millones de muertes en el 2015. Mundialmente cerca de 1 de cada 6 muertes es debida a esta enfermedad [8].
- Aproximadamente el 70% de las muertes por cáncer ocurren en países de bajos y medianos ingresos [8], como es el caso de México.
Solo 1 de cada 5 países de bajo y mediano ingreso tiene la información necesaria para conducir políticas contra el cáncer [9].

3.1.1 Tratamientos contra el cáncer.

Actualmente existen varios tipos de tratamiento contra el cáncer [10], de los cuales destacan:

- **Cirugía:** en donde un médico con capacitación especial extirpa el cáncer del cuerpo del paciente.
 - **Radioterapia:** También llamada terapia de radiación es un tratamiento en el cual se usan altas dosis de radiación (rayos X, radiactividad, rayos gama o partículas alfa) para destruir las células cancerosas.
 - **Inmunoterapia:** En esta terapia se le ayuda el sistema inmunitario del paciente a combatir el cáncer, ya sea con el uso de anticuerpos monoclonales u otros compuestos producidos por organismos vivos.
 - **Quimioterapia:** Este tratamiento se basa en el uso de fármacos para destruir células cancerosas, este tratamiento funciona al detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerosas, básicamente actúan sobre el ciclo celular, rompiéndolo o alentándolo.
- Terapias dirigidas:** Las terapias dirigidas atacan a las células cancerosas de manera más específica que los medicamentos quimioterapéuticos convencionales. Estos medicamentos se pueden usar como parte del tratamiento principal, o se pueden usar después del tratamiento para mantener el cáncer bajo control o evitar que regrese.

3.1.2 Quimioterapia

En la actualidad se usan más de 100 medicamentos de quimioterapia en el tratamiento contra el cáncer, ya sea por si solos o en combinación con otros medicamentos. La utilidad de estos fármacos radica en la forma específica de cáncer que existen y a sus efectos secundarios relacionados [11]

Como se mencionó anteriormente, los fármacos quimioterapéuticos actúan en alguna parte del ciclo celular durante el proceso de formación de nuevas células. Para ejemplificar lo que significa el ciclo celular se puede ver la Figura 1, en la cual se describe visualmente las 4 fases necesarias para la replicación celular, en la imagen se omite G_0 ya que no es parte de dicho proceso.

Por otra parte, es necesario mencionar que no todos los agentes quimioterapéuticos actúan al mismo nivel (blanco o diana) al momento de ejercer su mecanismo de acción, es por esto que se da una breve clasificación de estos en la Tabla 1, así como ejemplos de fármacos de cada una de las categorías.

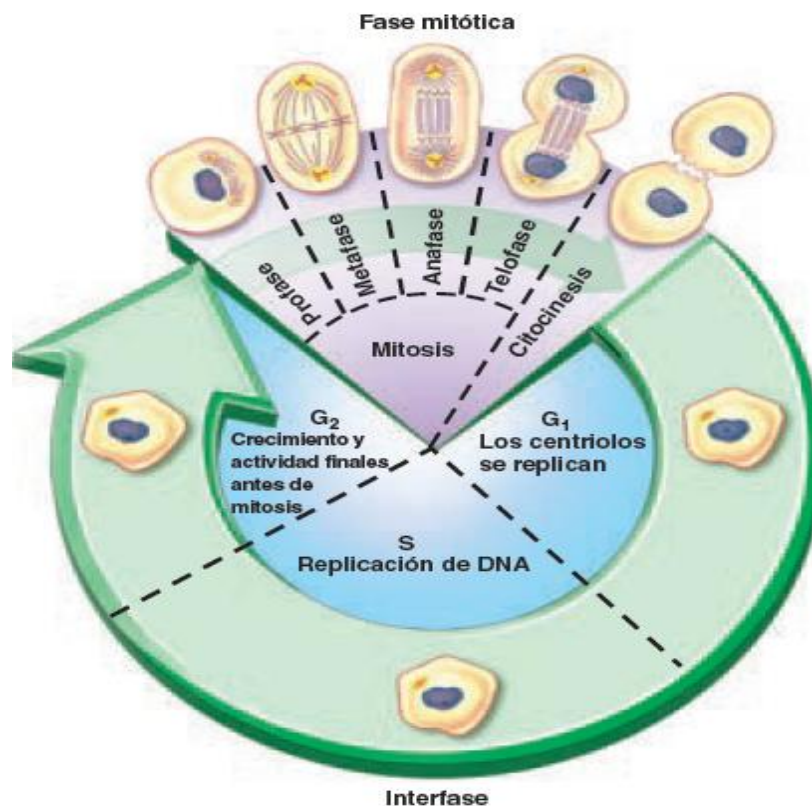


Figura 1. Ciclo celular. Adaptación tomada de Ira Fox S. "Fisiología Humana" 12va Ed. Mc Graw Hill.

Tipos de fármacos quimioterapéuticos.	Ejemplos de Fármaco:
Agentes Alquilantes	Altretamina, Bulsufán, Carboplatino, Carmustina, Clorambucil, Cisplatino, Ciclofosfamida, Dacarbazina, Lomustina, Melfalan, Oxalapatino, Temozolamida, Tiotepa
Antimetabolitos	5-fluorouracilo (5-FU), 6-mercaptopurina (6-MP), Capecitabina (Xeloda®), Citarabina (Ara-C®), Floxiridina, Fludarabina, Gemcitabina (Gemzar®), Hidroxiurea, Metotrexato , Pemetrexed (Alimta®)
Antibióticos antitumorales	Antraciclinas: Daunorubicina, Doxorubicina (Adriamycin®), Epirubicina, Idarubicin
Inhibidores de la topoisomerasa	Topoisomerasa I: Topotecán, Irinotecán (CPT-11) Topoisomerasa II: Etopósido (VP-16), Tenipósido, Mitoxantrona
Inhibidores de la mitosis	Docetaxel, Estramustina, Ixabepilona, Paclitaxel, Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina
Corticoesteroides	Prednisona, Metilprednisolona (Solumedrol®), Dexametasona (Decadron®)
Otros medicamentos de quimioterapia	L-asparaginasa

Tabla 1. Clasificación de los Fármacos Quimioterapéuticos.

3.1.3. Antimetabolitos: Antagonistas del ácido fólico en el tratamiento contra el cáncer

Para entender plenamente el mecanismo de acción de los antagonistas del ácido fólico, es importante saber en primer lugar como actúa normalmente esta molécula y cuáles son sus características fisicoquímicas.

El ácido fólico (FA) por sus siglas en inglés, es un miembro de la familia de las vitaminas B que estimulan el sistema hematopoyético. Se puede encontrar en los alimentos tales como vegetales verdes, hongos, levaduras, hígado y riñones [12]. Tiene una solubilidad máxima de 50 mg/mL en una solución 1M de NaOH, así como una solubilidad de 10mM en Dimetilsulfóxido (DMSO) [13]. Como se puede ver en la Figura 2 la molécula cuenta con tres

partes identificables, las cuales son un ácido glutámico (A), un ácido para-aminobenzoico (B) y una pteridina (C).

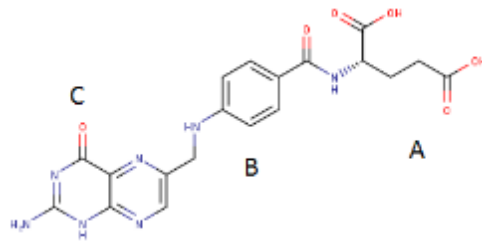


Figura 2. Estructura química del Ácido fólico.

Además, el ácido fólico en su forma desprotonada (folato) funciona como una coenzima o co-sustrato en la transferencia de un solo carbón en la síntesis de ácido nucleicos (DNA y RNA) así como en el metabolismo de aminoácidos [14]. En la Figura 3 se da un esquema general de como ocurre este proceso. Como se puede apreciar, el ácido fólico (FA) es reducido a dihidrofolato (H_2F) el cual, por la acción de la dihidrofolato reductasa (DHFR) se reduce a tetrahydrofolato (H_4F) que, a su vez, al estar en contacto con la hidroximetiltransferasa (SHMT), se convierte en metilentetrahydrofolato ($5,10-CH_2-H_4F$) el cual es el sustrato que la timidilato sintasa (TS) convierte la desoxiuridina monofosfato (dUMP) en desoxitimidina monofosfato (dTMP).

La dTMP es un monómero que constituye parte del DNA, el cual, en ausencia de esta molécula, no puede ser sintetizado correctamente, por lo cual es de vital importancia el FA para la síntesis de DNA. Cabe mencionar que el $5,10-CH_2-H_4F$ entra también como sustrato en la biosíntesis de las purinas, las cuales son monómeros necesarios para la construcción del RNA.

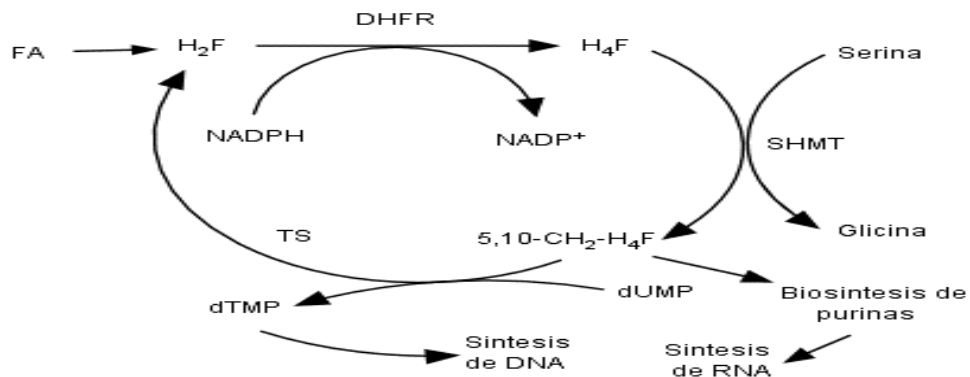


Figura 3. Función del ácido fólico en la síntesis de ácidos nucleicos.

Por lo descrito anteriormente, se puede llegar a la conclusión de que la DHFR es la enzima responsable de volver activa la molécula del ácido fólico y que al inhibirla se ataca a las células cancerígenas porque se ve mermada la producción de DNA y RNA. Precisamente ese es el mecanismo de acción que tienen los antagonistas del FA.

Para ejemplificar de una manera visual, la Figura 4 muestra cómo actúa el metotrexato (MTX), considerado el primer antimetabolito del ácido fólico en lograr exitosamente la remisión de leucemia linfoblástica aguda en niños [15].

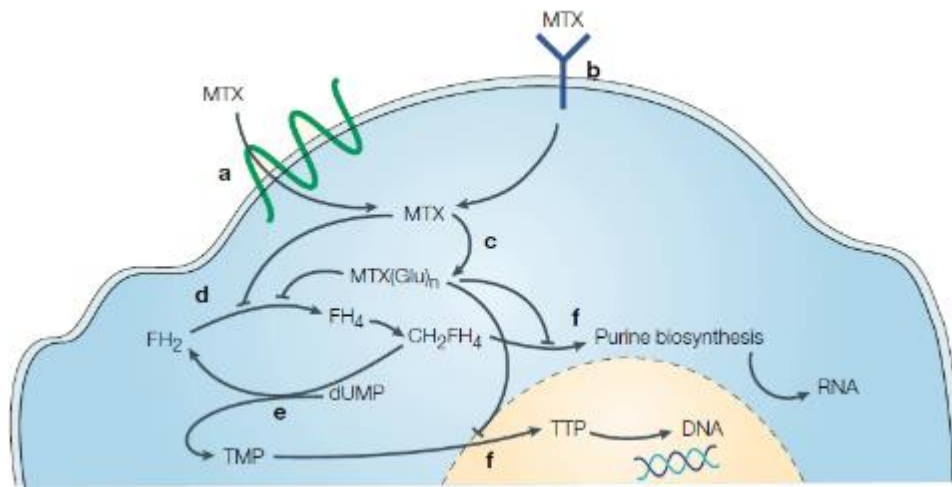


Figura 4. Mecanismo de acción del Metotrexato. El metotrexato (MTX) puede entrar a la célula por un acarreador de folato (a) usando la vía endocítica activada por su propio receptor (b). Al estar adentro este puede ser poliglutamado por la folilpoliglutamato sintasa (c). Estas dos especies pueden inhibir competitivamente la DHFR, disminuyendo así la síntesis de TMP (e) y la síntesis de metilentetrahidrofolato (CH₂FH₄). Dicho lo anterior tanto la síntesis de RNA como de DNA se ven disminuidas o anuladas (f).

Dado que, el metotrexato no es un fármaco citotóxico específico para las células cancerígenas, el uso de éste produce a nivel sistémico una gran variedad de efectos adversos, tales como: daño al hígado (cirrosis), daño a pulmones, úlceras estomacales, riesgo de linfoma, dolor de pecho, problemas al respirar, dedos y/o labios azules, dolor lumbar, náuseas, vómito, diarrea, pérdida de apetito, piel y ojos amarillos, fiebre, confusión, hormigueo en manos, dolor de cabeza [16], pérdida de cabello [17], falla renal, hematemesis, anemia, así como una gran variedad de problemas cardíacos. Esto debido a que este fármaco es

altamente tóxico, con un índice terapéutico muy bajo y una respuesta terapéutica con evidencia de toxicidad [18].

Estos efectos adversos son un reflejo de la liberación sistémica que tiene el metotrexato en todo el cuerpo, tanto en tableta por vía oral como en solución inyectable intravenosa, tienden a metabolizar y distribuir el fármaco en todas las partes, para que así de alguna manera llegue al sitio que se necesita.

Por otro lado, al utilizar sistemas de liberación controlada que controlen dónde y cuándo liberar el fármaco, se podría atacar solo las células cancerígenas que se desean matar y no afectar a las sanas, como una “bala mágica” tal y como lo planteo Paul Ehrlich hace más de 100 años.

3.2 Sistemas de liberación controlada en el tratamiento contra el cáncer.

Para una terapia contra el cáncer efectiva, es necesario perfeccionar y desarrollar nuevas estrategias para la liberación efectiva de fármacos quimioterapéuticos en las células cancerígenas. La quimioterapia convencional, da como resultado una acumulación del fármaco en tanto células normales como en cancerígenas, esto se debe a su inespecificidad. La meta final en la terapia contra el cáncer es reducir la toxicidad sistémica y mejorar así la calidad de vida del paciente [19]. Por estas razones es necesario entender a fondo cómo funcionan los sistemas de liberación.

3.2.1 Teoría de Sistemas de Liberación.

Los avances en farmacología y fisiología, el nacimiento de la biofarmacia y la evolución en el desarrollo de la farmacocinética, han hecho que los farmacéuticos y clínicos se den cuenta que la velocidad de liberación es la clave para conseguir beneficios terapéuticos con el menor número de efectos colaterales [20]. Es por esa razón que el desarrollo de los sistemas de liberación controlada ha aumentado en los últimos 40 años.

Los sistemas de liberación controlada se pueden clasificar en función de cómo se regula la liberación del fármaco (Figura 5), estos pueden ser:

- **Sistemas de liberación de velocidad preprogramada:** Este tipo de sistema fue la primera generación de los sistemas de liberación controlada, los cuales fueron desarrollados en la década de los 70's con el propósito de prolongar la liberación del

fármaco cuanto más se pudiera [20]. Esto se pudo lograr por el uso de dispersiones polímero- fármaco, el cual por difusión, erosión o hinchamiento de la matriz podía ser liberado [21]; por el uso de membranas poliméricas que controlaban la difusión del fármaco; o por la combinación de las dos técnicas anteriores [22].

- **Sistemas de liberación por activación:** Esta fue la segunda generación de liberación controlada [20], la cual se diferencia de los otros sistemas ya que puede ser activada tanto estímulos internos y externos, los cuales pueden ser:
 - **Físicos:** Como presión osmótica, presión hidrodinámica, presión de vapor, fuerza mecánica, **campos magnéticos**, sonoforesis o iontoforesis.
 - **Químicos:** Como cambio de pH o iones, así como reacciones de hidrólisis.
 - **Bioquímicos:** Como reacciones enzimáticas.
- **Sistemas de liberación regulados por retroalimentación:** En este grupo, la liberación del fármaco se da por la activación de un agente activante, el cual puede regular la liberación en función de su concentración.
- **Sistemas de liberación sitio dirigidos:** Estos sistemas son la última generación y lo que los sobresalen del resto, es la capacidad que tienen de adherirse a un sitio específicamente y en teoría solo liberar en ese lugar.

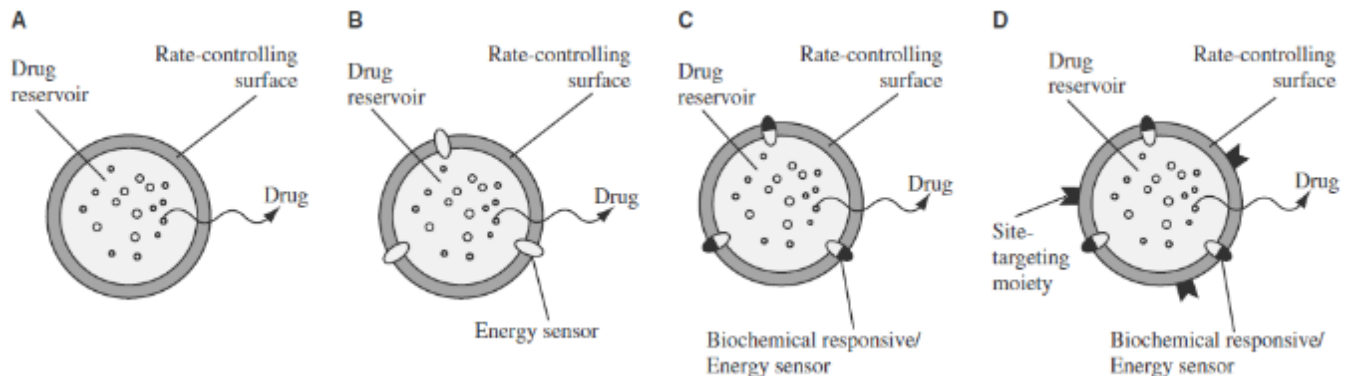


Figura 5. Las cuatro clases de los sistemas de liberación controlada. Sistemas de liberación de velocidad preprogramada (A), Sistemas de liberación por activación (B), Sistemas de liberación regulados por retroalimentación (C) y Sistemas de liberación sitio dirigidos (D).

Ahora, si bien existen diversas formas para desarrollar los sistemas de liberación, éstos tienen que pasar por un análisis cuantitativo riguroso para poder concluir su desempeño al momento

de liberar fármaco, y de ahí partir para hacer modificaciones al desarrollo de sistema, o bien para poder tener evidencia y de esta manera llevarlo a pruebas de efectividad terapéutica (*in vivo*). La manera por la cual se consigue dicha evidencia es caracterizando a los sistemas con pruebas *in vitro*, las cuales pueden ser tanto pruebas de disolución como perfiles de disolución. Estas pruebas *in vitro* dan evidencia del comportamiento cinético que tiene el sistema en cuanto a la liberación del fármaco se refiere.

3.2.1.1 Modelos cinéticos de liberación en los sistemas de liberación controlada.

Existe una gran cantidad de modelos cinéticos de liberación, los cuales pueden describir en general la liberación del fármaco. Estos modelos se pueden dividir en 3 categorías [23], las cuales son:

- **Métodos estadísticos:** Estos métodos se basan en el análisis estadístico de los resultados, ya sea haciendo un análisis exploratorio de los datos y comparando las medias y desviaciones estándar entre perfiles de liberación, o bien haciendo un análisis de varianza multivariada (MANOVA, por sus siglas en inglés).
- **Métodos modelo dependientes:** Estos métodos se basan en diferentes funciones matemáticas, las cuales pueden ser empíricas, semiempíricas o teóricas. Dichas funciones matemáticas tienen el objetivo de describir cómo se da la liberación. En la Tabla 2 se ejemplifican varios de los modelos, así como su fórmula matemática.
- **Métodos modelo independientes:** Esta categoría usa un enfoque más simple, en el cual se compara el factor de similitud (f_2) entre dos perfiles de disolución, para saber si son semejantes entre sí. Dada la ecuación (1), si f_2 tiene un valor de 50 a 100, entonces son similares los perfiles entre sí.

$$f_2 = 50 * \text{Log} \left[\left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - P_t)^2 \right] \right\}^{-0.5} * 100 \right] \dots (1)$$

En donde n es el número de tiempos de muestreo, R_t es el % disuelto promedio en el tiempo t de la curva de referencia y P_t es el % disuelto promedio en la curva de prueba.

Tabla 2. Métodos modelo dependientes. Adaptación de la referencia [24].

Zero order	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
First order	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Second order	$Q_t / Q_\infty (Q_\infty - Q_t) K_2 t$
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_3 t$
Weibull	$\log[-\ln(1 - (Q_t / Q_\infty))] = b \times \log t - \log a$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Baker-Lonsdale	$(3/2)[1 - (-1(Q_t / Q_\infty))^{2/3}] - (Q_t / Q_\infty) = K t$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t / Q_\infty = K_k t^n$
Quadratic	$Q_t = 100(K_1 t^2 + K_2 t)$
Logistic	$Q_t = A / [1 + e^{-K(t-y)}]$
Gompertz	$Q_t = A e^{-e^{-K(t-y)}}$
Hopfenberg	$Q_t / Q_\infty = 1 - [1 - k_0 t / C_0 a_0]^n$

3.2.2 Sistemas de liberación controlada activados magnéticamente.

Haciendo referencia al título 3.2.1, algunos sistemas pueden liberar fármacos mediante un estímulo tanto interno como externo. Una de las variantes de esta activación es la activación mediante campos magnéticos; estos sistemas tienen la cualidad no solo de ser activados cuando existe un campo magnético, si no que a su vez pueden ser dirigidos hacia un área específica en el cuerpo. A esta cualidad se le puede denominar como liberación de fármaco direccionado magnéticamente. Para conceptualizarlo visualmente, se puede observar la Figura 6.

Dichos sistemas son acarreadores particulados con una alta respuesta magnética, debido a que están hechos de sustancias como magnetita, hierro, cobalto, níquel o aleaciones [25]. Dado el pequeño tamaño este tipo de sistemas, pueden ser inyectados al torrente sanguíneo en una forma de dispersión coloidal y dirigidos al área afectada (tumor) mediante el uso de campos magnéticos. Así mismo, estos sistemas tienen la ventaja de poder actuar en el tratamiento contra el cáncer de dos maneras diferentes: pueden liberar fármaco como hacer hipertermia, esto depende del desarrollo del sistema, así como el campo magnético alterno que se le aplique. Más adelante se describirá como ocurren dichos procesos.

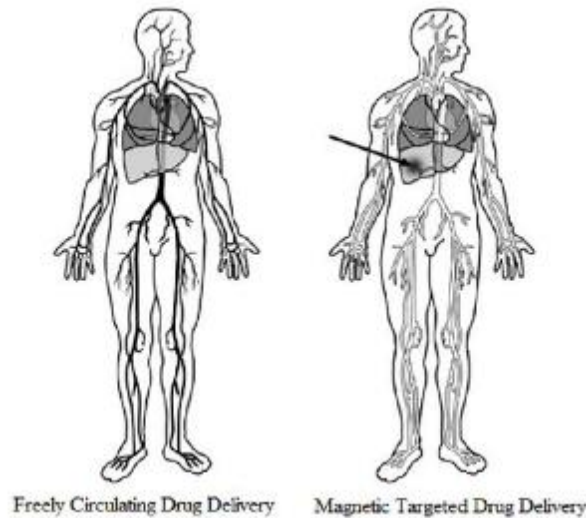


Figura 6. Concepto de liberación de fármacos dirigidos magnéticamente. Adaptada de la referencia [25]

Por otra parte, se puede mencionar que los sistemas modulados magnéticamente pueden ser usados en otras aplicaciones, tales como diagnóstico de enfermedades y direccionamiento de radioisótopos [26].

Cabe mencionar que los sistemas de liberación controlada activados magnéticamente pueden dividirse a su vez en cuatro grupos los cuales son: 1. nano partículas magnéticas, 2. microesferas magnéticas, 3. liposomas magnéticos y 4. emulsiones magnéticas [25]. A continuación, solo ahondaremos en el primer grupo.

3.2.2.1 Nanopartículas magnéticas como sistemas de liberación controlada.

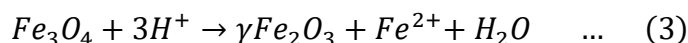
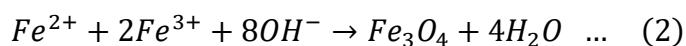
Las nanopartículas magnéticas son materiales inorgánicos y cero dimensionales (menor a 100 nm en todos los lados), las cuales exhiben propiedades intrínsecas únicas, como una alta magnetización de saturación, biocompatibilidad y baja toxicidad, por lo cual han atraído la atención para hacer aplicaciones biomédicas [27]. Las aplicaciones más significativas en las cuales se han usado nanopartículas magnéticas, son las relacionadas en liberación de fármacos e hipertermia en el tratamiento contra el cáncer [28].

Las nanopartículas magnéticas se pueden clasificar según la naturaleza inorgánica de sus núcleos, estos pueden ser aleaciones metálicas, así como óxidos metálicos. Por lo general se utilizan los óxidos metálicos de níquel, cobalto, hierro y manganeso, así como mezclas de

estos iones en aplicaciones biomédicas. Cabe aclarar que en el presente trabajo nos enfocaremos en óxidos de hierro dada su fácil preparación, así como su baja toxicidad comparada con la de otras ferritas [29].

3.2.3 Síntesis de nanopartículas de óxidos de hierro (IONPS) por co-precipitación.

Existen diversas formas de sintetizar nanopartículas de óxidos de hierro, sin embargo, la técnica por coprecipitación es probablemente la ruta química más simple y eficiente. Pueden ser sintetizados óxidos de hierro tales como magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) por la mezcla estequiométrica de sales férricas y ferrosas en un medio acuoso básico y no oxidante [30]. El proceso químico por el cual se sintetizan las nanopartículas de magnetita se describe en la ecuación (2). Sin embargo, la magnetita no es muy estable debido a su gran área superficial y reactividad, por lo cual tiende a oxidarse a maghemita en presencia de oxígeno. Cabe añadir que la magnetita puede oxidarse también dependiendo del pH de la suspensión, ya que bajo condiciones ácidas y anaeróbicas son desprendidos iones Fe^{2+} de la superficie de la nanopartícula en forma de complejos hexahidratados. Esto es representado en la ecuación (3).



La principal ventaja que tiene la reacción de coprecipitación como método de síntesis es que se puede sintetizar una gran cantidad de nanopartículas, sin embargo, el control del tamaño de partícula es limitado, ya que solo factores cinéticos pueden controlar el crecimiento de los cristales. No obstante, se pueden hacer esfuerzos en variar parámetros como pH, fuerza iónica, naturaleza de las sales, proporción Fe^{2+}/Fe^{3+} , tiempo de nucleación, velocidad de agitación y temperatura para obtener una menor dispersión de tamaño de partícula[30].

Si bien las nanopartículas se suspenden adecuadamente a un pH mayor a 9, esto no es óptimo para su uso en el cuerpo humano, ya que el pH de la sangre oscila entre los 7.35 y 7.45, por lo cual es necesaria una neutralización de estas nanopartículas. Sin embargo, la neutralización de la dispersión da como resultado coagulación de las nanopartículas[31], haciendo agregados difíciles de separar. Por esta razón es necesario el uso de agentes que recubran la superficie de la magnetita haciéndola más a fin a estar dispersa, Más adelante se

profundiza en la funcionalización y recubrimiento de las nanopartículas de óxidos de hierro y las ventajas que lleva consigo esto.

3.2.4 Recubrimientos en nanopartículas de óxidos de hierro.

Los recubrimientos en las nanopartículas de óxidos de hierro (IONPs por sus siglas en inglés) tienen diferentes propósitos, los cuales pueden ser desde la estabilización de la dispersión coloidal[30], pasando por la estabilización química del núcleo de la nanopartícula dada su extrema reactividad, hasta la disminución de la toxicidad en sistemas vivos y la posibilidad de cargar fármacos de una manera más eficiente [32]. Dichas aplicaciones dan pie a hacer una clasificación del recubrimiento en función del objetivo para su uso, las cuales son:

- **Estabilización de la dispersión coloidal:** Es común utilizar agentes estabilizadores en la síntesis de IONPs para prevenir la agregación de estas en sistemas tanto *in vitro* como *in vivo*. La estabilización de la superficie de las IONPs es lograda por el uso de monómeros orgánicos, ácidos como oleico (OA), láurico, lactobiotínico, dodecilsulfónico y hexadecilsulfónico son usados para este propósito. Además se pueden usar polímeros como polietilenglicol, alcohol polivinílico, alginato, quitosan y dextranos [32].
- **Estabilización química de los núcleos.** Dada la extrema reactividad que tienen las IONPs por su carácter nanoparticulado, son propensas a la oxidación por la presencia de agua o humedad en el ambiente. Por esta razón es necesario utilizar agentes que recubran y mantengan estables las características únicas de las IONPs. Estos agentes pueden ser inorgánicos como sílica, oro, grafito [32], así como polímeros, los cuales pueden ser poli(ácido metacrilato), poli(ácido acrílico), polivinilpirrolidona o etilcelulosa [30].
- **Disminución de la toxicidad y mejoramiento de la carga de fármacos:** Dado el análisis exhaustivo de la toxicidad de las IONPs, se concluyó que estas al estar con la superficie descubierta tienden a ser más tóxicas que las que están recubiertas[33], a su vez el recubrimiento por polímeros hace posible la carga de una cantidad apreciable de fármaco[34], es por estas razones que el uso de polímeros como el poli (1-ácido láctico-co-glicolato), poli(2-dimetilamin)etil metacrilato) y poli(N-isopropilacrlamida) se ha expandido para recubrir.

Es importante mencionar que a este tipo de sistema nanoparticulado con un recubrimiento en la superficie se le conoce en el ámbito científico como sistemas de carcaza sobre el núcleo o sistemas core-shell.

3.3 Impronta molecular con enfoque a la liberación de fármacos.

Un enfoque diferente para el recubrimiento de las IONPs es el uso de polímeros con afinidad preferente a un fármaco, a este tipo de polímeros y por su método de síntesis se les reconoce como polímeros de impronta molecular, los cuales tienen la función de tanto proteger los núcleos de las IONPs así como el de ser la superficie específica que alberga al fármaco en un sistema de liberación. Lin, L. *et al* describen a las nanopartículas magnéticas recubiertas con polímeros de impronta como “los más prometedores candidatos para aplicaciones como, sistemas de liberación” [35] por lo cual en el presente trabajo se ahondará en la síntesis y uso de estos polímeros inteligentes como potencial recubrimiento para mejorar el sistema de liberación de fármaco activado por campos magnéticos alternos.

Los polímeros de impronta molecular (MIP) son polímeros que han sido sintetizados usando la técnica de impronta molecular la cual deja cavidades específicas en la matriz del polímero con afinidad a la molécula “molde” usada, tanto en geometría como en interacciones específicas. Una manera simple de ver como se da este proceso se aprecia en la figura 7, la cual describe de manera general los pasos que se siguen para obtener MIPs.

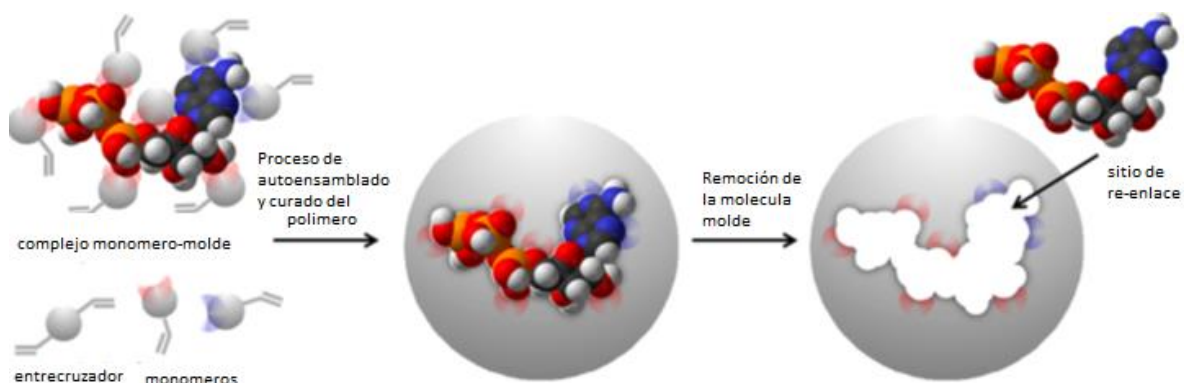


Figura 7. Proceso general de síntesis de MIP. Imagen adaptada de la referencia [36]

Básicamente el proceso se da en 3 etapas las cuales son la interacción y unión por fuerzas electrostáticas de los monómeros funcionales, entrecruzador y molécula molde,

posteriormente se da la etapa de polimerización seguida de una remoción de la molécula molde, dejando un polímero con sitios de unión preferentes a dicha molécula. La afinidad entre el molde y los monómeros funcionales debe ser lo más fuerte posible para permitir una unión fuerte entre el polímero y la molécula, pero también debe ser reversible esta unión. Así mismo, el polímero necesita ser poroso para permitir tanto la remoción del molde como su re-enlazamiento, por lo cual es normal utilizar un disolvente porogénico para incrementar dicha porosidad [36].

Existen diversos enfoques al momento de sintetizar un MIP, los cuales pueden ser por enfoque covalente, semi-covalente y no covalente [37]. Sin embargo, para fines de este trabajo nos enfocaremos en este último.

3.3.1 Enfoque no covalente para la síntesis de MIP.

Este método, también conocido como enfoque de auto ensamble, está inspirado por las interacciones no covalentes que juegan un rol clave en los procesos de reconocimiento molecular. Este enfoque es aceptado como el más exitoso y comúnmente usado en la síntesis de MIP. El complejo de prepolimerización entre la molécula molde y los monómeros funcionales es estabilizado por las interacciones débiles, incluyendo las interacciones electrostáticas, dipolo, dispersiones de London y puentes de hidrógeno, las cuales también gobiernan los procesos de re-enlace. En general, una mayor relación estequiométrica de monómero funcional con respecto al molde (relación molar 4:1 o mayor) debe ser agregado para desplazar el equilibrio de formación del complejo. Por otro lado, el uso de monómeros funcionales con grupos amida, carboxilatos, fosfonatos y fosfatos son ampliamente usados en este enfoque[38].

3.3.2 Componentes de los MIP y Factores que influyen la polimerización

Para sintetizar un MIP es necesario el uso de una molécula molde, monómeros funcionales, monómeros estructurales o entrecruzadores, un iniciador, así como un disolvente, en este apartado se describirá la función que tiene cada componente para el MIP.

3.3.2.1 Molécula molde.

Este componente juega un rol importante en la impronta ya que es la responsable de interactuar con los monómeros funcionales para poder hacer las cavidades específicas en el MIP. Por esta razón la molécula debe ser estable en condiciones de polimerización radicalaria, no debe tener grupos polimerizables, así como debe ser fotoestable preferentemente, estable en temperaturas moderadas de polimerización y debe ser soluble en la mezcla de prepolimerización[38].

3.3.2.2 Monómero Funcional.

Este componente provee grupos funcionales, los cuales son responsables de las interacciones de unión con el molde. A mayor fuerza en la interacción monómero-molde mejor será la impronta. Por lo general al diseñar un MIP se hace un enfoque genérico, en el cual se utilizan monómeros funcionales que sean complementarios con los grupos funcionales del molde[38].

3.3.2.3 Monómero estructural o entrecruzador.

Este componente estabiliza las cavidades y mantiene los grupos funcionales en su lugar. El tipo de monómero, así como la cantidad, influencia la morfología y la estabilidad mecánica de la red polimérica. Una relación molar alta entrecruzador/monómero funcional da como resultado un material más rígido con menor capacidad de hinchamiento, por lo general se utiliza una relación molar de 4:1 de entrecruzador con relación de monómero funcional[38].

3.3.2.4 Disolvente.

El disolvente juega un rol importante durante el proceso ya que sirve para juntar todos los componentes de la polimerización, así como agente porogénico, el cual hará un polímero macroporoso. En la impronta con enfoque no covalente, el disolvente influye en la estabilidad del complejo monómero-molde. Algunas características del disolvente como polaridad, constante dieléctrica y protonación pueden afectar de una manera importante en la impronta, por lo cual si la unión de este complejo es por puentes de hidrogeno es conveniente utilizar disolventes apróticos y no polares como tolueno o cloroformo, por otro lado, si la unión del complejo se da por interacciones hidrofóbicas es conveniente utilizar disolventes polares. También es importante mencionar que los MIPs preparados en disolventes orgánicos

presentan un pobre rendimiento en medios acuosos, el rendimiento del re-enlace es generalmente mejor en el mismo disolvente que fue usado para la polimerización[38].

3.3.2.5 Iniciador.

La mayoría de los MIP sintetizados usan la polimerización por radicales libres (FRP), la cual puede ser llevada a cabo térmicamente o fotoquímica mente. Este proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. El primer paso es generar radicales libres mediante la descomposición de un iniciador, si se aumenta la concentración del iniciador se pueden obtener mayores velocidades de polimerización, pero menores pesos moleculares de polímero. Los iniciadores más usados en la FRP son los compuestos azo, peroxo, redox o fotoiniciadores. El iniciador que es más ampliamente usado es el 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) el cual puede empezar la iniciación a temperaturas de 60°C[38] y por lo general se agrega 1% m/m de AIBN con respecto al peso del monómero[39].

3.4 Magnetismo y caracterización de materiales magnéticos nanoparticulados.

Dada la importancia que tiene los óxidos de hierro en el núcleo de los sistemas de liberación activados por campo magnético, es importante mencionar como están conformados químicamente estos y cómo es que se relacionan con los campos magnéticos por lo cual se dará un breve repaso de cómo funcionan los materiales magnéticos y el magnetismo.

3.4.1 Magnetismo y materiales magnéticos

El magnetismo es un fenómeno físico que ha fascinado a la gente desde hace más de 2500 años. La primera descripción de este fenómeno fue dada por Tales de Mileto cuando observó que un mineral negro atraía piezas de hierro, dicho material no era sino la ya tan mencionada magnetita, sin embargo, el verdadero responsable de este fenómeno es el campo magnético. El campo magnético es el resultado del movimiento de una partícula cargada, las más representativas son los electrones, los cuales pueden generar un campo magnético al viajar por un circuito eléctrico, al viajar por los orbitales atómicos en la materia o bien al rotar sobre su propio eje (spin) [40], estos dos últimos fenómenos son inherentes a la materia y la contribución de ambos se le conoce como momento magnético.

Esto puede ser sorprendente para algunos, pero toda la materia es magnética, sin embargo, existen materiales mucho más magnéticos que otros. La principal diferencia es que en algunos materiales no existe una interacción colectiva de los momentos magnéticos atómicos que los componen, mientras que en otros materiales existe una interacción colectiva muy fuerte entre los momentos magnéticos atómicos.

Dado al diverso acomodo que tienen los átomos y sus respectivos electrones en los diferentes materiales, es de esperarse que éstos se comporten magnéticamente diferente, por lo cual, la mejor manera de introducir los diferentes tipos de magnetismo en los materiales es describiendo como estos materiales responden a un campo magnético[41].

Por la razón anterior, el comportamiento magnético de los materiales puede ser clasificado siguiendo 5 grupos principales, los cuales son:

- 1. Diamagnético.** Se le denomina así, cuando el material tiene un comportamiento no cooperativo de los electrones orbitando cuando es expuesto por un campo magnético. Estos materiales están compuestos por átomos que no tienen un momento magnético neto (por ejemplo, cuando todos los orbitales están llenos y no hay electrones desapareados), sin embargo, cuando se exponen a un campo magnético, el diamagnético es repelido por el campo, esto se debe a que se forma momentos magnéticos inducidos que se contraponen al vector del campo magnético. Cabe mencionar que esta repulsión es de un orden débil.
- 2. Paramagnético.** Esta clase de material tiene algunos átomos con momentos magnéticos netos debido a electrones desapareados y orbitales parcialmente llenos. Cuando se expone un material paramagnético a un campo magnético, este ordena sus momentos magnéticos en dirección del campo. Cabe mencionar que los materiales paramagnéticos se ven atraídos al campo, pero de una manera débil. Algunos ejemplos de materiales paramagnéticos son el aluminio y el sulfato cúprico.
- 3. Ferromagnético.** Cuando uno piensa en materiales magnéticos, probablemente se piense en hierro, níquel o magnetita. A diferencia de los paramagnéticos, los momentos magnéticos de estos materiales exhiben interacciones muy fuertes. Los momentos magnéticos se ordenan paralelo a la dirección del campo y se quedan de esta manera inclusive cuando se quita el campo magnético.

- 4. Ferrimagnético.** En los compuestos iónicos como los óxidos, pueden ocurrir formas más complejas de ordenamiento magnético como resultado de la estructura cristalina del material. Uno de estos es el ferrimagnetismo, en el cual algunos momentos magnéticos del material se alinean en dirección del campo y otros se ordenan en forma antiparalela, dando por resultado un momento magnético neto que varía en función de la estructura y cantidad de los componentes.
- 5. Antiferromagnético.** Los antiferromagnéticos son aquellos en los que algunos momentos magnéticos del material se alinean en dirección del campo y otros se ordenan en forma antiparalela, con la diferencia de que aquí estos ordenamientos magnéticos dan un momento magnético igual a cero.

En resumen, la figura 8 muestra cómo los momentos magnéticos se alinean o forman en presencia y ausencia de un campo magnético.

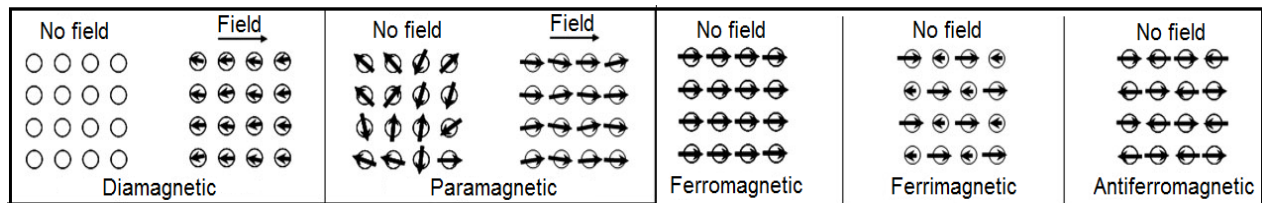


Figura 8. Ilustración de las diferentes clases de materiales magnéticos. Tomada de la referencia[42]

Cabe añadir que en el presente trabajo se hablara del superparamagnetismo, el cual es un caso especial de los materiales ferromagnéticos y se agregara a la lista de los materiales magnéticos por cuestiones de practicidad.

- 6. Superparamagnetismo.** Existen otros tipos de materiales magnéticos más complejos como por ejemplo, los súperparamagnéticos, dichos materiales tienen analogía con los materiales paramagnéticos, pero difieren en que el momento magnético es mucho mayor y al igual que las paramagnéticas cuando el campo magnético es eliminado, las partículas entre si no tienen ninguna interacción[43]. Este tipo de material se puede encontrar en las IONPs y es por su característica superparamagnética que se utilizan las IONPs en aplicaciones biomédicas, ya que, al no presentar un momento magnético neto al quitar el campo magnético externo, estas no se agregan.

Como se dijo anteriormente, los materiales se pueden caracterizar magnéticamente al observar su comportamiento en presencia de un campo magnético, por lo cual si se observa la figura 9 se puede notar como se varían estos comportamientos al graficar la magnetización del material vs el campo magnético ejercido a la muestra.

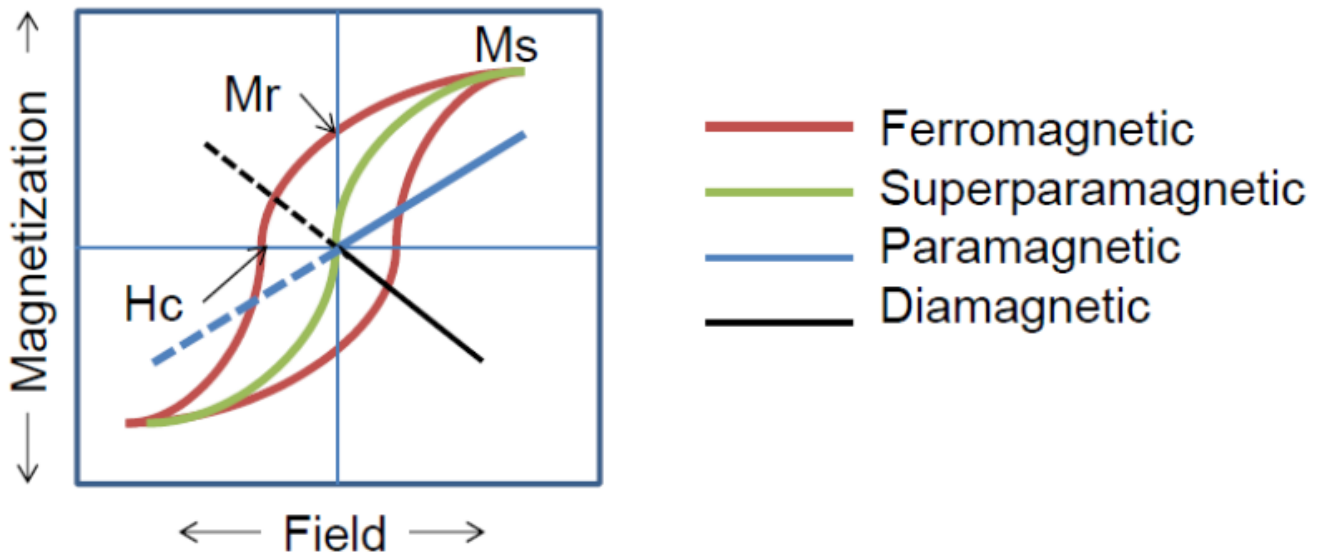


Figura 9. Caracterización magnética de diversos materiales, figura tomada de la referencia [42]

Los óxidos de hierro tienen la cualidad de comportarse como ferromagnéticos, los cuales tienen diversas propiedades que las otras clasificaciones no poseen, estas cualidades son: la magnetización residual al dejar de aplicar un campo magnético (M_r); la coercitividad (H_c) que es el campo que se tiene que aplicar para anular la M_r y la curva de histéresis, la cual sucede porque el material ya no tiene la misma configuración de los dominios magnéticos después de aplicado el campo (proporciona memoria al material)

Sin embargo, los óxidos de hierro también se pueden comportar como superparamagnéticos si se les disminuye lo suficiente el tamaño del cristal. Esto sucede porque al reducir el tamaño de la partícula los dominios tenderán a quedarse en partículas individuales, por ende, la partícula tenderá a contener un solo dominio y al ser expuestas a un campo magnético podrán las partículas rotar y alinearse en dirección del campo, cosa que es más complicada si los dominios están juntos en una sola partícula (ferromagnética) ya que presentan coercitividad.

3.4.2 Caracterización de materiales magnéticos nanoparticulados.

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas dependen de; su estructura física, como son el tamaño y la forma de estas; su estructura química, como son la fase de la que se compone el material; así también como su polidispersión de tamaño, carga y naturaleza del recubrimiento. Por lo tanto, existen diversas técnicas para caracterizar los materiales magnéticos nanoparticulados, sin embargo, los más usados son la microscopia electrónica de transmisión (TEM), la microscopia electrónica de barrido (SEM), la espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS), la difracción de rayo X de polvos (XRD), la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y las magnetometrías. Dichas técnicas se abordarán a detalle junto con otras más en la parte de “Síntesis y Caracterización de IONPs-MIP como sistemas de liberación de fármaco”.

3.5 Campos magnéticos alternos.

El campo magnético es un fenómeno que ocurre cuando existen electrones en movimiento ya sea tanto en un conductor como en los orbitales atómicos de un material. En esta ocasión nos enfocaremos en el primer fenómeno para poder explicar la generación de campos magnéticos alternos.

Para empezar, es necesario decir que una carga en movimiento genera un campo magnético (B) en el espacio circundante a la partícula (además de generar su campo eléctrico E). Este campo magnético sigue la regla de la mano derecha, la cual se describe en la figura 10.

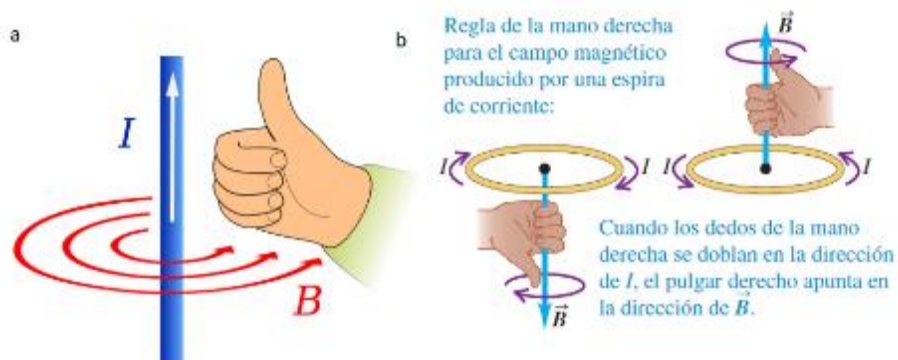


Figura 10. Regla de la mano derecha. Para determinar líneas de campo en un conductor recto con una corriente (a) y para determinar líneas de campo para un solenoide (b)

Cabe mencionar que al enrollar un alambre sobre un cilindro se forma un solenoide o bobina, el cual tiene aplicaciones importantes por ejemplo para generar electroimanes con potentes campos magnéticos. La razón por la cual se utilizan este tipo de bobinas en vez de solo el cable conductor recto es porque el campo generado por la bobina aumenta proporcionalmente con el número de vueltas, haciendo alcanzable grandes campos magnéticos sin grandes intensidades de corriente.

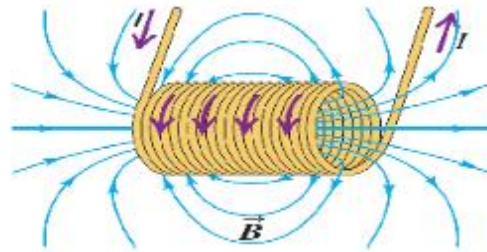


Figura 11. Líneas de campo magnético en un solenoide por el que pasa una corriente I

Es interesante observar que dada la estructura de la bobina en la figura 11 las líneas de campo que genera dicho dispositivo convergen en mayor medida al centro de la bobina que fuera de ella, por lo cual se puede concluir que la mayor intensidad de campo magnético se encuentra en el centro de la bobina y por ende se puede describir este fenómeno por la ecuación (4).

$$B_{max} = \frac{\mu_0 NI}{2a} \dots (4)$$

En dónde B_{max} es el campo magnético máximo generado en el centro, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío ($\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{NA}^{-2}$), N es el número de vueltas de la bobina, I es la intensidad de corriente y a es el radio interno de la bobina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la longitud de la bobina, así como el devanado de las espiras que esta tiene, y que afecta la uniformidad del campo generado, por lo cual en la ecuación (5) se hacen las correcciones pertinentes, en donde las componentes siguen siendo las mismas y solo l corresponde a la longitud del solenoide, cabe aclarar que esta ecuación es más precisa cuando el solenoide tiene más longitud que diámetro de espiras [44].

$$B = \mu_0 \frac{N}{l} I = \mu_0 n I \dots (5)$$

Ahora si bien ya conocemos como funciona un solenoide para generar un campo magnético de corriente directa, debemos de tomar unos principios y fundamentos de los circuitos de corriente alterna para saber cómo es que se generan los campos magnéticos alternos.

3.5.1 Principios de Circuitos de Corriente alterna

Los circuitos de corriente alterna (termino abreviado como CA) se usan en los sistemas de distribución de energía eléctrica, en la radio, en la televisión y en otros dispositivos de comunicación, así como en una amplia variedad de motores eléctricos. El calificativo de “alterna” significa que la corriente cambia de dirección, alternando periódicamente de una dirección a la otra. Por lo general trabajamos con corrientes que varían de forma senoidal [45], sin embargo, existen corrientes alternas con formas más complejas como la cuadrada o triangular. El circuito de corriente alterna tienen 4 componentes básicos los cuales son: un alternador o generador, un componente resistivo, un componente inductivo y un componente capacitivo, los cuales veremos a mayor detalle.

3.5.1.1 Generador de corriente alterna o alternador.

Para suministrar corriente alterna a un circuito se requiere una fuente de voltaje alterno. La corriente alterna puede ser generada por un motor eléctrico con la configuración de sus escobillones en corriente alterna, lo cual hace que por cada vuelta que dé el rotor, el generador producirá una fuerza electromotriz en un sentido a la mitad del giro del rotor y al otro sentido en la otra mitad. Dicho fenómeno sigue el principio de la inducción electromagnética y la ley de Faraday.

Así mismo la generación de una corriente alterna puede ser conseguida a través de un generador de función de onda, sin embargo, dicho equipo tiene un funcionamiento más complejo y tiene también una potencia menor. Para ejemplificar gráficamente como varia el voltaje en función del tiempo, se puede observar la Figura 12, así como el símbolo con el que se ejemplifica el generador en un circuito.

Las ecuaciones que describen el voltaje y la corriente instantánea de un generador son la ecuación 6 y 7 respectivamente.

$$v = V \cos \omega t = V \cos(2\pi ft) \dots (6)$$

$$i = I \cos \omega t = I \cos(2\pi ft) \dots (7)$$

Donde v es el voltaje instantáneo, i la corriente instantánea, V la amplitud del voltaje (voltaje máximo), I la amplitud de la corriente (corriente máxima), ω la frecuencia angular, f revoluciones por segundo y t el tiempo transcurrido.

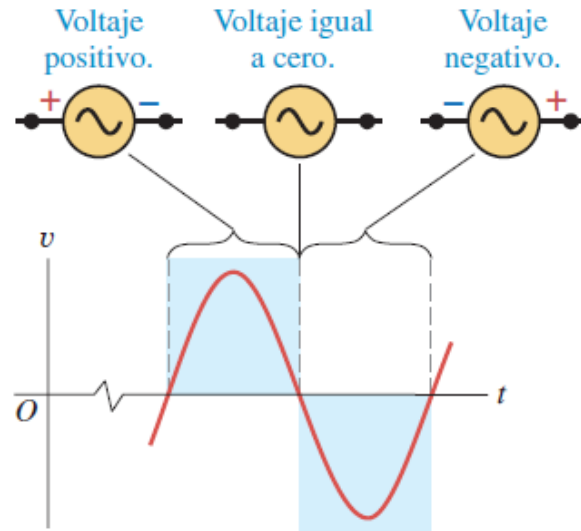


Figura 12. Variación de voltaje en función del tiempo dado por un generador de corriente alterna

3.5.1.2 Componente Resistivo

Un resistor R en un circuito de CA mantiene su resistencia tanto en una como en otra dirección, sin importar la variación de la frecuencia, haciendo que el voltaje en el resistor sea por ley de Ohm:

$$v_R = iR = IR \cos \omega t = V_R \cos \omega t \dots (8)$$

Dicho componente deja que tanto i como v_R sean proporcionales a $\cos \omega t$, así la corriente está en fase con el voltaje tal y como se muestra en la Figura 13.

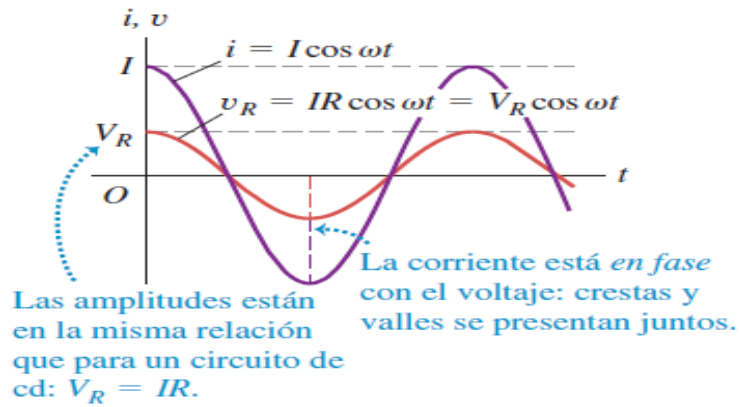


Figura 13. Gráfica de i y v_R a lo largo del tiempo.

3.5.1.3 Componente Inductivo.

Si sustituimos el resistor de la Figura 13 por un inductor con una autoinductancia (L) y suponiendo que la corriente atraviesa este inductor, observamos que el voltaje que hay entre las dos terminales del inductor (v_L) se adelanta un cuarto de ciclo (90°) con respecto de la corriente tal y como se ve en la Figura 14. Dicho fenómeno ocurre ya que, al variar la corriente con respecto al tiempo, el inductor produce una fuerza electromotriz auto inducida, contribuyendo con el voltaje del circuito, haciendo que el voltaje se adelante respecto a la corriente. De esta manera v_L puede describirse como:

$$v_L = I\omega L \cos(\omega t + 90^\circ) \dots (9)$$

De esta manera, el voltaje puede verse como una función coseno con una ventaja de 90° con respecto a la corriente.

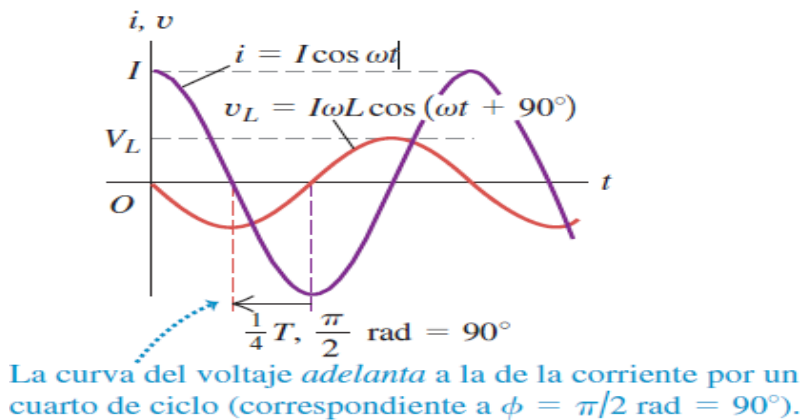


Figura 14. Gráfica de i y v_L a lo largo del tiempo

Es importante mencionar que en general se describe la fase del voltaje con respecto a la corriente y no al revés, porque así, si la corriente en un circuito es como la de la ecuación (7) entonces el voltaje instantáneo v se puede describir como:

$$v = V \cos(\omega t + \Phi) \dots (9)$$

Donde Φ es el ángulo de fase, el cual indica la fase del voltaje en relación con la corriente. Así bien para un resistor $\Phi = 0$, para un inductor es $\Phi = 90^\circ$ y para un capacitor es $\Phi = -90^\circ$.

Por otro lado, tomando la ecuación 9, podemos decir que la amplitud del voltaje del inductor V_L es igual a:

$$V_L = I\omega L \dots (10)$$

A su vez la reactancia inductiva para un inductor se define como:

$$X_L = \omega L \dots (11)$$

Por lo tanto, al sustituir los términos de la ecuación 11 en la ecuación 10 da por resultado que V_L es igual a:

$$V_L = IX_L \dots (12)$$

Dicha ecuación, nos hace entender que el voltaje en un inductor se comporta similar al de un resistor, siendo la X_L la razón entre un voltaje y una corriente, teniendo unidades iguales a las de resistencia (ohm). Sin embargo, X_L es dependiente de la frecuencia y R no lo es.

Interesantemente podemos observar que X_L es proporcional a la frecuencia, por ende, si el voltaje se mantiene constante y se aumenta la frecuencia, la reactancia aumentará y la intensidad corriente I disminuirá. Por lo tanto, los inductores a frecuencias altas obstruyen el paso de corriente (filtro de paso bajo). En general, cuanto más baja sea la frecuencia de un voltaje oscilante aplicado entre las terminales de un inductor, mayor será la amplitud de la corriente oscilante que resulta.

3.5.1.4 Componente Capacitivo.

Por último, si conectamos un capacitor con capacitancia C en un circuito CA, se produce una corriente i , descrita en la ecuación (7), a través del capacitor*. Posteriormente, en el componente se produce un voltaje instantáneo v_C descrito matemáticamente en la ecuación 13 y gráficamente en la Figura 15.

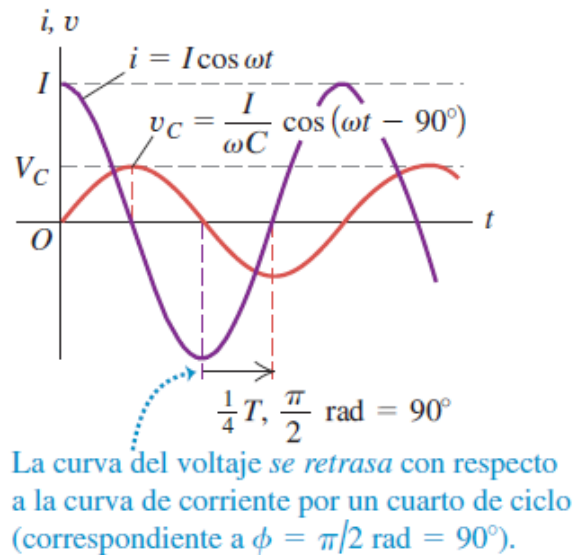


Figura 15. Gráfica de i y v_C a lo largo del tiempo

$$v_C = \frac{I}{\omega C} \cos(\omega t - 90^\circ) \dots (13)$$

Al observar la Figura 15 se puede notar que el voltaje y la corriente del capacitor están fuera de fase ya que el voltaje va con un retraso de 90° con respecto a la corriente, esto se debe a que el capacitor primero tiene que cargarse para generar un voltaje.

Por otro lado si tomamos la amplitud del voltaje del capacitor de la ecuación 13, podemos escribir una expresión en forma similar al de un resistor:

$$V_C = \frac{I}{\omega C} = IX_C \dots (14)$$

* En un capacitor no se puede desplazar una carga en realidad, ya que las dos placas del capacitor están aisladas una de la otra, sin embargo, en un circuito de corriente alterna, conforme el capacitor se carga y se descarga, en cada instante hay una corriente i que entra en una placa y otra igual que sale de la otra placa produciendo así una corriente de desplazamiento igual entre las placas, exactamente igual que si la carga se desplazara a través del capacitor.

Dicha ecuación nos da la reactancia capacitiva X_C y a diferencia de la reactancia inductiva, esta es inversamente proporcional tanto a su capacitancia como a la frecuencia, por lo que a medida que aumentan estas dos variables, el capacitor dejará pasar mayor corriente. Dicha cualidad se utiliza como filtros de paso alto

3.5.1.5 Circuitos R-L-C en serie y su aplicación en el desarrollo de un equipo generador de campos magnéticos alternos.

La manera más fácil de desarrollar un equipo generador de campos magnéticos alternos que puede producir un calentamiento magnético en las IONPs es mediante el uso de circuitos en serie RLC. Por lo tanto, es necesario entender cómo funciona el conjunto de componentes resistivos (R), inductivos (L) y capacitivos (C) en un circuito serie.

Para empezar y siguiendo lo ya antes descrito, sabemos que los componentes inductivos y capacitivos presentan una oposición al paso de corriente alterna según sea la frecuencia de esta. Por otro lado, los componentes resistivos presentan una oposición independiente de la frecuencia. Por lo tanto, a la oposición a la corriente eléctrica alterna de estos tres componentes se le conoce como impedancia. Describiéndolo según la ley de Ohm la ecuación para la impedancia sería:

$$Z = \frac{V}{I} \dots (15)$$

Por otro lado, la contribución de cada componente (inductivo y capacitivo) determinan el ángulo de fase que el voltaje tendrá en el circuito. Por ejemplo, si existe una contribución mayor del componente capacitivo que del inductivo, el voltaje del circuito tenderá a atrasarse con respecto a la corriente. El ejemplo contrario sería si existe una mayor contribución del componente inductivo que del capacitivo, por lo cual el voltaje del circuito tenderá a adelantarse con respecto a la corriente. Se puede determinar el ángulo de fase que tendrá un circuito siguiendo la siguiente ecuación:

$$\tan \Phi = \frac{\omega L - \frac{1}{\omega C}}{R} \dots (16)$$

Así bien para un circuito en serie RLC podemos reestructurar la ecuación 15 mediante un análisis de los diagramas de fasores para determinar que:

$$V = I \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \dots (17)$$

$$Z = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \dots (18)$$

Donde V es la amplitud del voltaje, I es la amplitud de la corriente, Z es la impedancia, R es la resistencia del circuito, XL es la reactancia inductiva y Xc es la reactancia capacitiva.

Observando la ecuación 18 podemos percatarnos que si las reactancias son iguales la única contribución que tiene la impedancia es la resistencia que tiene el circuito, por lo tanto, cuando se cumple esa condición la I es máxima. Para que XL y Xc sean iguales se deben de intersectar sus funciones dependientes de frecuencia en un punto, tal y como se observa en la Figura 16. A dicho punto de intersección en el eje de las ordenadas se le conoce como frecuencia de resonancia o (f_0)

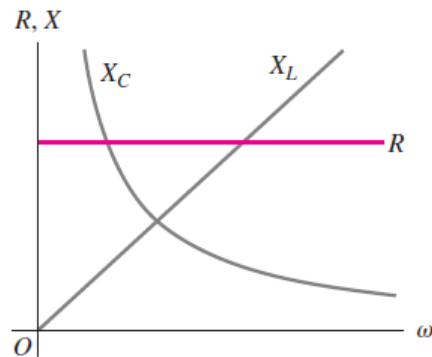


Figura 16. Funciones dependientes de la frecuencia (XL y XC) y función independiente de la frecuencia (R).

Se puede determinar la frecuencia de resonancia de un circuito RLC mediante la siguiente ecuación:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}} \dots (19)$$

Las implicaciones que tiene la igualación de las reactancias son de manera práctica que: (1) la corriente que pasa por el circuito (y por ende en la bobina) es máxima y (2) el voltaje y la corriente del circuito están en fase, por lo que se tiene la máxima potencia eléctrica en el circuito.

3.5.2 Circuito Oscilador de Mazzilli o ZVS driver.

Otra manera de generar campos magnéticos alternos para calentamiento por inducción magnética, es mediante el uso de equipos y circuitos que se venden comercialmente. Uno de estos circuitos es el circuito interruptor de voltaje cero o ZVS driver, el cual es una variación del circuito oscilador de Mazzilli que es usado para generar altos voltajes en tubos de rayos catódicos (componentes usados para encender las televisiones y monitores antiguos).

A continuación, en la Figura 17 se puede observar dicha modificación, ya que la bobina L3 no está acoplada en un transformador con núcleo de hierro, sino que es solo una bobina con núcleo de aire. Es importante notar que dicho circuito consta de componentes más complejos que los que ya se habían mencionado, así que se tratará el funcionamiento de dicho circuito a continuación.

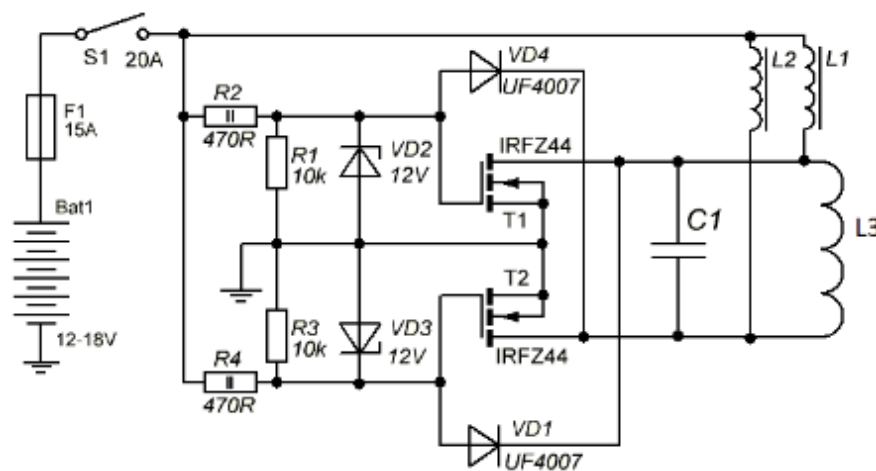


Figura 17. Circuito modificado del oscilador de Mazzilli o ZVS driver para calentamiento por inducción

Como se puede apreciar en la Figura 17 este circuito es alimentado por una batería o fuente de corriente directa, en este ejemplo se muestra que el voltaje es de 12-18V, sin embargo, dependiendo de la potencia del equipo el voltaje de entrada puede ser más alto (40-60V). Cuando el circuito es cerrado por el interruptor S1, la corriente pasa a través de R2 hasta llegar al MOSFET IRFZ44 que se denomina como T1, dicho MOSFET es activado por su compuerta dejando que un flujo de electrones vaya de la tierra al capacitor C1, cargando

dicho componente hasta su máxima capacidad y dejando cerrada la compuerta del transistor T1.

Al estar cargado el capacitor C1 este se empezará a descargar y perder su energía eléctrica a medida que la bobina empieza a generar un campo magnético y adquirir esta energía, cuando la bobina genere su máximo campo magnético regresará la corriente cedida por el capacitor per en sentido opuesto.

Dicho fenómeno se le conoce como resonancia del tanque L-C, así bien esto continuaría cíclicamente hasta que la energía fuera disipada por la resistencia intrínseca del material, sin embargo, a medida que se disipa la energía por motivo del material, tanto T2 como T1 mantienen esta oscilación a razón de la frecuencia de resonancia, abriendo y cerrando sus compuertas al paso de electrones alternadamente. Una manera animada de ver esto se describe en este link: <https://www.youtube.com/watch?v=0ONq3DxXE2w>.

3.6 Calentamiento magnético e hipertermia

Las IONPs, por su carácter superparamagnético, tienen la cualidad de orientar su momento magnético en solo dos orientaciones antiparalelas estables energéticamente, a este tipo de orientaciones se les denomina “eje fácil” ya que son las direcciones en donde se minimiza la energía magnética. Al tiempo que se tarda en hacer dos cambios de orientación del momento magnético a la nanopartícula se le conoce como tiempo de relajación de Neel (t_N). Así mismo, si la nanopartícula se dispersa en un medio líquido tenderá a rotar y al tiempo que se tarde en hacerlo se le conoce como tiempo de relajación browniano (t_B) [30].

Debido a los tiempos de relajación las IONPs tienen la capacidad de calentarse en presencia de un campo magnético alterno, ya que, dentro del campo magnético alterno, los momentos magnéticos de las nanopartículas se tratan de alinearse en dirección del campo y las nanopartículas empiezan a rotar en el medio de dispersión, forzando a disminuir los tiempos de relajación de Neel y Brown respectivamente, haciendo que la nanopartícula y el medio circundante se caliente [42]

3.7 Síntesis y Caracterización de IONPs-MIP como sistemas de liberación de fármaco

3.7.1 Síntesis de IONPs-MIP

La síntesis de IONPs-MIP puede ser resumida en dos etapas:

La primera etapa es la formación de los núcleos de óxidos de hierro, la cual es comúnmente realizada por descomposición termal de sales férricas [46],[47],[48] seguida de una opcional modificación superficial de la nanopartícula con SiO₂ [49]. También pueden sintetizarse los núcleos por co-precipitación básica de las sales férricas y ferrosas [50] con una opcional modificación superficial con SiO₂ [51], [52] o ácido oleico [53, 54]. Por último, también pueden ser compradas a un proveedor[55]. Cabe destacar que los núcleos de óxido de hierro hechos por la síntesis por co-precipitación alcalina son el único tipo de nanopartículas magnéticas aprobadas para uso clínico por la U.S. FDA[56]

La segunda etapa es el recubrimiento de los núcleos, derivado de la investigación bibliográfica, dicho recubrimiento puede hacerse mediante 3 enfoques diferentes, los cuales se citan a continuación:

3.7.1.1 Polimerización de precipitación

La polimerización de precipitación, también llamada polimerización en solución no homogénea se realiza mediante la disolución del monómero funcional, el entrecruzador y el iniciador en el disolvente. Posteriormente a medida que se da la polimerización, el MIP producido no es soluble en dicho solvente y precipita. Dicho método tiene la ventaja de dar grandes rendimientos con una distribución de partícula bastante estrecha.

Este método es, a pesar de ser tradicional, se mantiene como el método comúnmente más usado debido a sus tantas características como su simple proceso de preparación, tamaño de partícula fácilmente controlable, alto rendimiento y poca adsorción no específica. No obstante, la desventaja que tiene este método es la necesidad de usar grandes cantidades de porógeno, (aproximadamente el 95% del volumen total) causando contaminación al medio ambiente e incrementando el costo[57].

3.7.1.2 Polimerización en emulsión

Para este proceso tanto la molécula molde y el entrecruzador son solubilizados en disolventes orgánicos, después la solución orgánica es agregada al agua con un emulsificante, posteriormente son estas soluciones son totalmente mezcladas con el iniciador para obtener

una emulsión que polimerizará. Finalmente se obtienen polímeros esféricos con tamaño uniforme[57].

3.7.1.3 Copolimerización por injertación

Esta técnica es ampliamente aplicada en el campo de la impronta superficial. La tecnología de injertación puede ser realizada a través de dos variantes que son: “Injertación a” e “injertación de”.

El método de “injertación a” es un tipo de reacción covalente entre diferentes grupos funcionales de los núcleos y las ramificaciones del polímero injertado, así las ramificaciones del polímero quedan injertadas sobre los núcleos, produciendo núcleos funcionales.

El método de “injerto” incluye una reacción de iniciación, donde los grupos funcionales de la superficie del núcleo inician polimerización de los monómeros funcionales. Al comparar dichas variantes el método de “injerto” produce recubrimientos de mayor densidad y mejor control en el tamaño de las partículas fabricadas[57].

Es importante mencionar que el fundamento de la síntesis de IONPs-MIP reside en las técnicas básicas que componen sus materiales de partida, esto quiere decir que para entender cómo hacer IONPs-MIP se debe de saber cómo hacer IONPs y MIPs por separado. Dichos fundamentos de la síntesis de los reactivos de la síntesis de las IONPs-MIP fueron descritos en secciones anteriores, por lo cual es necesario repasar la sección 3.2.3 y la sección 3.3.

3.7.2 Caracterización de IONPs-MIP

A continuación, se enlistan las diferentes técnicas que se utilizan para caracterizar las IONPs-MIP, con su respectivo fundamento de la técnica.

3.7.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

La espectroscopía de infrarrojo se basa en la absorción de la energía electromagnética en la región del infrarrojo por los enlaces de una molécula. Dicha región del infrarrojo tiene un intervalo de longitud de onda que va desde los $7.8 \times 10^{-7} \text{m}$ hasta unos 10^{-4}m , sin embargo, el intervalo útil va de $2.5 \times 10^{-6} \text{m}$ hasta $2.5 \times 10^{-5} \text{m}$ en la espectroscopia de infrarrojo. Dicho

intervalo se puede expresar como su número de onda el cual es de 4000cm^{-1} a 400cm^{-1} y es generalmente el más usado al graficar espectros de infrarrojo.

Dado a que todas las moléculas tienen cierta cantidad de energía distribuida en su estructura (la cual hace que los átomos oscilen y los enlaces se estiren, contraigan y presenten otras vibraciones moleculares), y a que la energía de las moléculas es cuantizada (y por consecuencia que los movimientos vibratorios solo se puedan hacer a ciertas frecuencias) se sabe que cuando una molécula es irradiada con radiación electromagnética, esta absorbe radiación cuando su frecuencia coincide con la del movimiento vibratorio del enlace en la molécula.

Una ventaja que tiene la espectroscopia de infrarroja es que la mayor parte de los grupos funcionales tienen bandas características de absorción infrarroja que no cambian de un compuesto a otro, por lo que no se necesita interpretar los espectros por completo para obtener información sobre su estructura [58]

3.7.2.2 Difracción de Rayos X de polvos (XRD)

Los rayos X son una radiación electromagnética que se encuentra entre el ultravioleta y los rayos gamma. La región de longitud de onda de los rayos X es considerada de entre 0.01 y 100 Å (1 Å es igual a $1 \times 10^{-10}\text{m}$).

Existen dos principales aplicaciones para la difracción de rayos X. La primera es la cristalografía de rayos X, la cual usualmente utiliza cristales individuales para determinar sus fases. La segunda es la difracción de rayos X de polvos, la cual utiliza como en forma de polvo la muestra a analizar.

La difracción de rayos X de polvos es una de las técnicas de difracción de rayos X, la cual es usada para la identificación de fases cristalinas de varios materiales, así como para el análisis cuantitativo posterior a la identificación

La difracción es un fenómeno de dispersión ya que cuando los rayos X inciden sobre sólidos cristalinos, estos se dispersan en todas las direcciones, siendo unas completamente en fase reforzándose para formar patrones de difracción. La ley de Bragg describe las condiciones bajo las cuales puede ocurrir este fenómeno[59]. Si asumimos que un haz de rayos X con una

longitud de onda definido como λ incide sobre una muestra cristalina a un ángulo θ , la difracción ocurrirá si:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \dots (20)$$

Donde d es la distancia entre los planos sucesivos de la red cristalina expresada en Å y n es el orden de la reflexión. Dicho fenómeno puede ser representado como se muestra en la figura 18.

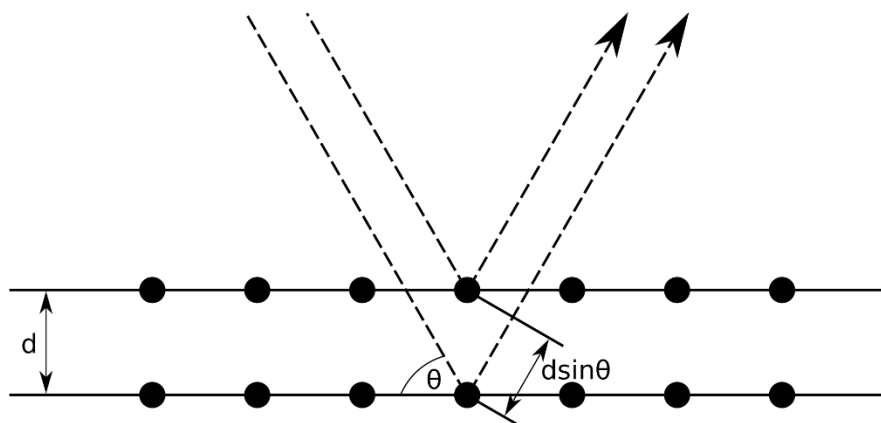


Figura 18. Representación gráfica de la ley de Bragg y el fenómeno de la difracción.

Sabiendo que cada patrón de difracción de rayos X de cada forma cristalina de un compuesto es único, se puede utilizar la técnica de difracción de rayos X de polvos para identificar y caracterizar las diferentes formas polimórficas de un compuesto al comparar el difractograma experimental con teóricos de una base de datos como puede ser ICDD Powder Diffraction File (PDF) por dar un ejemplo.

Otra ventaja que ofrece la difracción de rayos X de polvos además de obtener información de la estructura cristalina del polvo, es que también puede dar información del diametro promedio de partícula (d) mediante la ecuación de Scherrer, la cual se describe como:

$$d = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \dots (21)$$

Donde K representa un factor de forma adimensional que por lo general se describe como 0.9 o 0.94, λ es la longitud de onda de haz de rayos X (esto depende del filamento del emisor del difractómetro, por lo general es de cobre y la longitud de onda que emite es de 1.5406 Å), β

es el ancho del pico más intenso del difractograma a la mitad de su altura en radianes (también se le conoce como full width at half maximum, FWHM) y θ es el ángulo del difractograma donde está el pico más alto en radianes. Es importante mencionar que el resultado será en Å, por lo cual es necesario hacer la conversión a nanómetros o micrómetros según se deseé.

3.7.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Ya que la máxima magnificación útil obtenible en un microscopio óptico es de alrededor de 1000x es necesario disminuir la longitud de onda de la radiación que emite el microscopio. En un microscopio electrónico los electrones son acelerados a energías entre 2 y 1000keV, lo cual da longitudes de onda de 0.027-0.0009nm.

La microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) puede ofrecer información de la topología superficial, profundidad, la composición química y el comportamiento eléctrico.

En un SEM los electrones incidentes tienen una energía de 2-40keV, los cuales pasan por unos lentes condensadores electromagnéticos que demagnifican el haz de electrones a una sonda fina, la cual puede escanear a través de un área seleccionada. Posteriormente los electrones penetran la muestra y la interacción de los electrones con la materia de la muestra produce electrones secundarios, retrodispersados y de Auger, así como rayos X e incluso luz.

Todas las interacciones son captadas por varios detectores dentro de la cámara de la muestra. La señal captada de los electrones secundarios (los cuales son arrancados de la superficie de un sólido) es decodificada para producir una imagen de la muestra[60]. Para tener una mejor idea de cómo funciona el microscopio electrónico de barrido es recomendable ver el siguiente video: <https://www.youtube.com/watch?v=VWxYsZPtTsl>.

3.7.2.4 Microscopia electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopia electrónica de transmisión es una técnica capaz de obtener información de la composición elemental de la muestra, las distancias de enlaces, la simetría, los grupos espaciales, la morfología, la nanoporosidad y parámetros topológicos del material[61]. Aunque la microscopia electrónica de transmisión sirve para obtener una magnificación de objetos

nanométricos como en el SEM, la técnica TEM es más potente pudiendo resolver distancias por debajo de 1.5-1.8 Å, esto se debe a que los electrones son acelerados con una energía de entre 100-300 keV, lo cual hace incidir el haz de electrones dentro del material a tal grado que se transmiten a través del material para dar la imagen. Este fenómeno deja la favorable ventaja de resolver estructuras de entre 2-10 nm pero por desventaja se obtiene que la muestra analizada no tiene que ser mayor a 3 mm de diámetro.

3.7.2.5 Espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS)

Esta técnica puede ser obtenida de la información de un SEM o TEM, sólo depende si el aparato en cuestión cuenta con el detector de rayos X de estado sólido. En la espectrometría de rayos X de energía dispersiva (EDS por sus siglas en inglés), un espectro de rayos X es adquirido de la pequeña región enfocada de la muestra que es iluminada con el haz de electrones. Este espectro contiene los rayos X característicos de los elementos químicos que componen la muestra[62]

3.7.2.6 Curvas de histéresis (magnetometría)

La magnetometría es una técnica de caracterización de materiales magnéticos para identificar los diferentes tipos de materiales según sus propiedades magnéticas. Por lo general se utilizan equipos como el magnetómetro de muestra vibrante (VSM, por sus siglas en inglés), así como el dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID, por sus siglas en inglés) para obtener curvas de histéresis.

Dependiendo de la manera en la que interacciona el material al campo magnético ejercido por el magnetómetro, las curvas de histéresis tendrán diferentes formas. Algunos ejemplos los pudimos observar en la Figura 9 de la sección 3.4.1.

Brevemente podemos describir a las curvas de histéresis como una gráfica en la cual se registra la magnetización que tiene una muestra en función de un campo magnético ejercido sobre esta. Las curvas pueden ser hechas tanto con un campo magnético directo gradual o bien con un campo magnético alterno a una determinada frecuencia y amplitud de campo magnético.

Es importante mencionar que las curvas de histéresis no sólo nos dan información cualitativa de las características magnéticas del material, sino que también nos pueden dar información útil al momento de desarrollar un sistema de liberación de fármaco activada por campos magnéticos alternos.

3.7.2.7 Pruebas de calentamiento magnético (hipertermia magnética).

La capacidad de calentamiento que tienen las nanopartículas magnéticas es comúnmente cuantificada mediante la tasa de absorción específica (SAR, por sus siglas en inglés) también referida como potencia de pérdida específica (SLP, por sus siglas en inglés). Dicho atributo contempla la potencia calorífica liberada por unidad de masa del material magnético[63]. Siendo este atributo comúnmente usado para comparar que tanto calienta el material magnético, no existe un protocolo o método experimental estandarizado para determinarlo. Por esta razón se describirá a continuación 2 formas para determinarlo.

La primera forma para determinar el SAR o SLP es mediante el uso de las curvas de histéresis. Para determinarlo de esta manera es necesario que la curva de histéresis sea realizada con un campo magnético alterno (AMF, por sus siglas en inglés). Con esta condición la gráfica de magnetización (M) vs el campo aplicado (H) describirá un área atrapada dentro de la curva de histéresis de las nanopartículas superparamagnéticas solo si la frecuencia y la amplitud del campo aplicado son lo suficientemente altos.

Una vez obtenido la curva de histéresis es necesario aplicar la ecuación 22 para determinar el SAR. Donde f es la frecuencia del campo aplicado, μ_0 es la permeabilidad del vacío ($4\pi \times 10^{-7}$ T m/A), ρ_{MNP} es la densidad de material magnético, y la integral de línea de la función de magnetización dependiente de la intensidad del campo magnético aplicado es el área interior de la curva de histéresis. Dicha integral puede ser calculada o bien determinada utilizando herramientas como Origin o MathLab.

$$SAR = \frac{f \mu_0}{\rho_{MNP}} \oint M(H) dH \dots (22)$$

La segunda forma para determinar el SAR es corriendo un experimento en condiciones adiabáticas, esto quiere decir mediante un experimento en donde no se transfiera el calor entre la muestra y sus alrededores. Básicamente la muestra con nanopartículas magnéticas

es introducida en esta cámara y posteriormente se le aplica un AMF por un determinado tiempo y se determina la temperatura de la muestra a lo largo del experimento [63]. Posteriormente se utiliza la ecuación 23 que es una ecuación derivada de la idealización del experimento.

$$SAR = \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{C}{m_{MNP}} \dots (23)$$

Donde ΔT es la diferencia de temperaturas al inicio y al final del experimento, Δt es la duración del experimento, C es la capacidad calorífica de la muestra y m_{MNP} es la masa de las nanopartículas utilizada.

3.7.2.8 Estudios de adsorción de fármaco

Se denomina adsorción al fenómeno interfacial generado entre un adsorbato y un adsorbente, en el cual el adsorbato tiende a concentrarse en la superficie del adsorbente. Dicho fenómeno se diferencia de la absorción ya que en este último existe una penetración física de una fase en la otra.

Según sus características la adsorción puede clasificarse en:

- a. Fisorción la cual es provocada por fuerzas de van der Waals. Este tipo de adsorción es fácilmente reversible y el cambio en la entalpía producido es de alrededor de 20kJ/mol
- b. Quimisorción la cual es provocada por fuerzas análogas al enlace químico es irreversible a menos que haya cambios muy drásticos, de naturaleza específica y el adsorbato puede perder su identidad [64]

Para el caso de las IONPs-MIP los estudios de adsorción de fármacos son utilizados para conocer la eficiencia de la carga del fármaco [65], el tiempo óptimo de carga y la concentración optima necesaria para obtener la mayor eficiencia de carga sin desperdiciar cantidades de fármaco[66]. Así mismo se pueden determinar parámetros tales como energías de enlace, la forma en la cual se une el adsorbato con el adsorbente y la distribución de los sitios de unión en el adsorbente[39].

Estos estudios de adsorción se pueden dividir en cinéticas de adsorción y en isotermas de adsorción. Las primeras dan como resultado información de la eficiencia de carga y tiempo óptimo de carga, mientras que las segundas dan información de cantidad máxima cargada a concentración óptima y el tipo de adsorción que se produce en el sistema.

Por otro lado, un método inequívoco para diferenciar un polímero de improntado molecularmente de su contraparte no improntada es a través de las cinéticas e isotermas de adsorción ya que en ambos casos los polímeros improntados molecularmente adsorberán más que los no improntados, esto puede ser observado en las siguientes investigaciones citadas [46], [67] y [66].

Para generar cinéticas de absorción para el caso de las IONPS-MIP es necesario agregar una cantidad conocida de IONPS-MIP en un medio acuoso con concentración conocida de fármaco al cual es afín y hacer mediciones de la concentración del sobrenadante a lo largo del tiempo hasta no observar cambio en la concentración.

Para generar las isotermas de adsorción es necesario agregar una cantidad conocida de IONPS-MIP y hacer diferentes corridas a diferentes concentraciones conocidas del fármaco al cual es afín. En este tipo de experimento es muy importante mantener la misma temperatura a lo largo de todas las corridas y procurar medir la concentración del sobrenadante al tiempo que se haya descubierto previamente que la concentración no cambia a lo largo del tiempo (ósea cuando se conozca el tiempo al cual se llega a la concentración al equilibrio).

3.7.2.9 Estudios de liberación de fármaco

Debido a que los sistemas de administración de fármacos nanoparticulados pueden alterar la farmacocinética y farmacodinamia de un agente terapéutico, es crucial el determinar la calidad y el desempeño del producto durante la fase de desarrollo de la forma de dosificación nanoparticulada[68].

Para la gran mayoría de las formas de dosificación se puede determinar la calidad y el desempeño mediante experimentos *in vivo* y *in vitro* [69]. Estos últimos a través de las cinéticas de liberación pueden proveer información crítica acerca de la seguridad y eficacia del producto. Sin embargo, al hablar de sistemas nanoparticulados existe una carencia de pruebas *in vitro* estandarizadas, regulatorias o compéndiales.

Dicha actividad puede resultar ser un problema al intentar evaluar productos nanoparticulados utilizando configuraciones de estudios de liberación con aparatos existentes de la USP, los cuales fueron diseñados para productos orales o transdérmicos. Dicho problema se evidencia debido a que las características de las formas de dosificación novedosas son muy diferentes a las convencionales y, por ende, es necesario tomar las consideraciones apropiadas durante la selección y montaje del estudio de liberación.

Estas consideraciones pueden ser agitación, temperatura y medio de liberación, las cuales se deben de tomar considerando el sitio de administración, así como el sitio de acción de la formulación. Derivado de estas consideraciones y necesidades en los sistemas nanoparticulados D´Souza describe tres tipos de métodos para la evaluación de liberación de fármaco los cuales se dividen en; muestreo y separado; flujo continuo; de diálisis con membrana [68]

4. Objetivos e Hipótesis.

4.1 Objetivos

4.1.1 General

El presente trabajo tiene la finalidad de determinar cómo afecta a la liberación de fármacos el uso de un campo magnético alterno en un sistema de liberación de fármacos nanoparticulados de óxidos de hierro con cubierta de polímeros de impronta molecular.

4.1.2 Particulares

Para conseguir el objetivo general es necesario:

1. Formular y desarrollar un sistema de liberación de fármacos afín a ácido fólico con nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro
2. Caracterizar el sistema de liberación tanto en propiedades físicas, magnéticas, morfológicas, químicas y de adsorción.
3. Desarrollar un equipo que pueda generar campos magnéticos alternos.
4. Caracterizar el equipo en materia de funcionabilidad, de frecuencia de campo y de intensidad de campo.
5. Hacer liberaciones de fármacos del sistema de liberación formulado en presencia y en ausencia del campo magnético alterno que genere el equipo desarrollado.

4.2 Hipótesis.

La aplicación de los campos magnéticos alternos a nanopartículas superparamagnéticas hará que se caliente debido a los fenómenos de histéresis y de relajación de Neel y Brown. Si usamos este fenómeno en un sistema de liberación de fármaco de IONPs-MIP se modificará la liberación de fármaco debido al calentamiento.

5.Desarrollo Experimental y Análisis de resultados.

5.1 Materiales

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron: cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de la marca Baker, cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) de la marca Merck, ácido oleico de la marca Aldrich, ácido metacrílico (MAA), dietilenglicol dimetilacrilato (EGDMA), azobisisobutironitrilo (AIBN), Hidróxido de sodio (NaOH), carbonato de potasio (K_2CO_3), ácido fólico, cloruro de sodio (NaCl), fosfato disódico (Na_2HPO_4), fosfato monosódico (NaH_2PO_4) acetona, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (MeCN) y agua destilada.

5.2 Síntesis de Nanopartículas y caracterización

5.2.1 Síntesis de Nanopartículas

5.2.1.1 Hidrofílicas (NPHFL)

Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro se agregaron 1.3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dentro de un tubo de ensayo. Posteriormente se agregaron 25 mL de agua destilada y se sonicó el tubo de ensayo por 10 minutos. La solución resultante tenía un tono anaranjado marrón pero transparente. A dicha solución se le puso un tapón de hule y se purgó el aire que contenía dentro del tubo con N_2 burbujeándolo directo en la solución durante 5 minutos.

Posteriormente se calentó la solución del tubo a 80°C durante 15 minutos en un baño de aceite. La solución transparente tomó turbidez y color anaranjado. Después de transcurridos los 15 min se agregó a través de una jeringa una solución 2.5 M de NaOH previamente hecha y se agitó vigorosa y al mismo tiempo que se agregaba la solución básica hasta formar una suspensión completamente negra. Una vez conseguida la suspensión negra se trasvasó esta

suspensión a un vaso de precipitado y se enjuagó el tubo con agua para obtener los restos de la magnetita remanentes en el tubo.

Una vez en el vaso de precipitado se dejó reposar la suspensión negra a temperatura ambiente con un imán de neodimio en la base del vaso y una vez clarificada la suspensión se descartó el sobrenadante. El precipitado negro fue lavado con 50 mL de agua resuspendiendo, dejando sedimentar magnéticamente y descartando el sobrenadante. Este último proceso se hizo 3 veces más y el precipitado obtenido se dejó secar toda la noche. Al día siguiente el precipitado negro se trituró en un mortero de ágata con un poco de acetona y se dejó secar hasta que no hubiera remanentes de acetona. El producto final fue pesado dando alrededor de 0.5g de producto recuperado

5.2.1.2 Hidrofóbicas (NPHP)

Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro se agregaron 1.3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dentro de un tubo de ensayo. Posteriormente se agregaron 25 mL de agua destilada y se sonicó el tubo de ensayo por 10 minutos. La solución resultante tenía un tono anaranjado marrón pero transparente. A dicha solución se le puso un tapón de hule y se purgó el aire que contenía dentro del tubo con N_2 burbujeando directamente en la solución durante 5 minutos.

Posteriormente se calentó la solución del tubo a 80°C durante 15 minutos en un baño de aceite. La solución transparente tomó turbidez y color anaranjado. Después de transcurridos los 15 min se agregó inmediatamente a través de una jeringa 1 mL de ácido oleico y se agitó vigorosamente para dispersar el ácido oleico en la suspensión calentada. Inmediatamente después de dispersar el ácido oleico se agregó inmediatamente y a través de una jeringa 10 mL de una solución 2.5 M de NaOH previamente hecha y se agitó vigorosa al mismo tiempo que se agregaba la solución hasta formar una suspensión completamente negra. Una vez conseguida la suspensión negra se trasvasó esta suspensión a un vaso de precipitado y se enjuagó el tubo para obtener los restos de la magnetita remanentes en el tubo.

Una vez en el vaso de precipitado se dejó reposar la suspensión negra a temperatura ambiente con un imán de neodimio en la base del vaso y una vez clarificada la suspensión se descartó el sobrenadante. El precipitado negro fue lavado con 20 mL de acetona

resuspendiendo, dejando sedimentar magnéticamente y descartando la acetona. Este último proceso se hizo 3 veces más y el precipitado obtenido se dejó secar toda la noche. Al día siguiente el precipitado negro se trituró en un mortero de ágata con un poco de acetona y se dejó secar hasta que no hubiera remanentes de acetona. El producto final fue pesado dando alrededor de 0.5g de producto recuperado.

Para corroborar que fueran hidrofóbicas se suspendió una pequeña cantidad de estas en hexano y posteriormente se agregó agua para observar si había partículas que se suspendieran en dicho disolvente. Como resultado se observó que las NPHP no pasaban a la fase hidrofílica, como se observa en la siguiente figura.

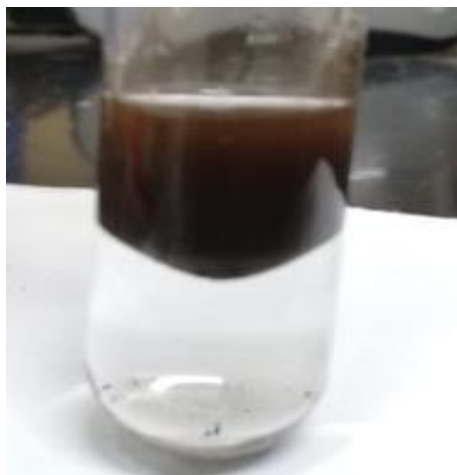


Figura 19. Dispersión de NPHP en hexano (fase superior) y agua (fase inferior)

5.2.1.3 Partículas improntadas con ácido fólico (NPMIP) y no improntadas (NPNIP)

Para sintetizar las nanopartículas improntadas con ácido fólico se agregaron 500mg de NPHP a un matraz bola de 500mL, posteriormente se agregaron 200 mL de MeCN y 200 μ L de MAA. Una vez agregados estos tres primeros reactivos se sonicó el matraz por unos 20 minutos seguido de una incubación del matraz a una temperatura de 20 °C a 300rpm durante 12 h. Transcurridas las 12 h se hace una incubación a una temperatura a 45°C a 300 rpm durante 3 h.

Transcurridas las 3 horas se sonicó nuevamente la mezcla dentro del matraz durante 10 min. Posteriormente se agregaron 1000 μ L de EGMA, 100 μ L de MAA, 100 μ L de una solución de ácido fólico con DMSO como diluyente en una concentración de 2mg/mL y 40mg AIBN. Una

vez agregado el AIBN se tapó el matraz con un tapón de hule y se purgó el aire dentro del matraz burbujeando N_2 a través de la mezcla formada durante 5 min. Transcurridos los 5 min de purga se dejó incubando el matraz con mezcla a una temperatura de $65^\circ C$ a 200 rpm durante 24h.

Una vez terminada la incubación de la mezcla del matraz se sedimenta magnéticamente las nanopartículas dentro del matraz y se descarta el sobrenadante. Se hace un lavado al precipitado con 50mL de MeCN y se trasvasa la suspensión a un recipiente de boca ancha. Se precipita nuevamente magnéticamente y se descarta el sobrenadante de MeCN, se hace un secado a temperatura ambiente durante 1 noche. Una vez secas las nanopartículas improntadas NPMIP se lavaron con 50mL de una solución 0.5M de NaOH seguido de una sedimentación magnética hasta verse clarificado el sobrenadante, este proceso se hizo 5 veces siendo la última un lavado con agua destilada y dejándolas secar durante una noche. Como resultado de hacer esto se obtuvieron alrededor de 340mg de NPMIP

Para la fabricación de las NPNIP se siguió el mismo procedimiento con la única diferencia de no agregar los 100 μL de una solución de ácido fólico con DMSO como diluyente en una concentración de 2mg/mL.

5.2.2 Caracterización de Nanopartículas

5.2.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo (FTIR)

Para realizar el análisis por espectroscopía de infrarrojo se utilizó un espectrofotómetro de FTIR/FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer en un rango de 4000 a 500cm^{-1} . En dicho equipo se analizaron las nanopartículas hidrofílicas (NPHFL), nanopartículas hidrofóbicas (NPHP), nanopartículas improntadas (NPMIP), nanopartículas no improntadas (NPNIP), así como los recubrimientos individuales como lo fueron el ácido oleico y polímero sintetizado (MIP)

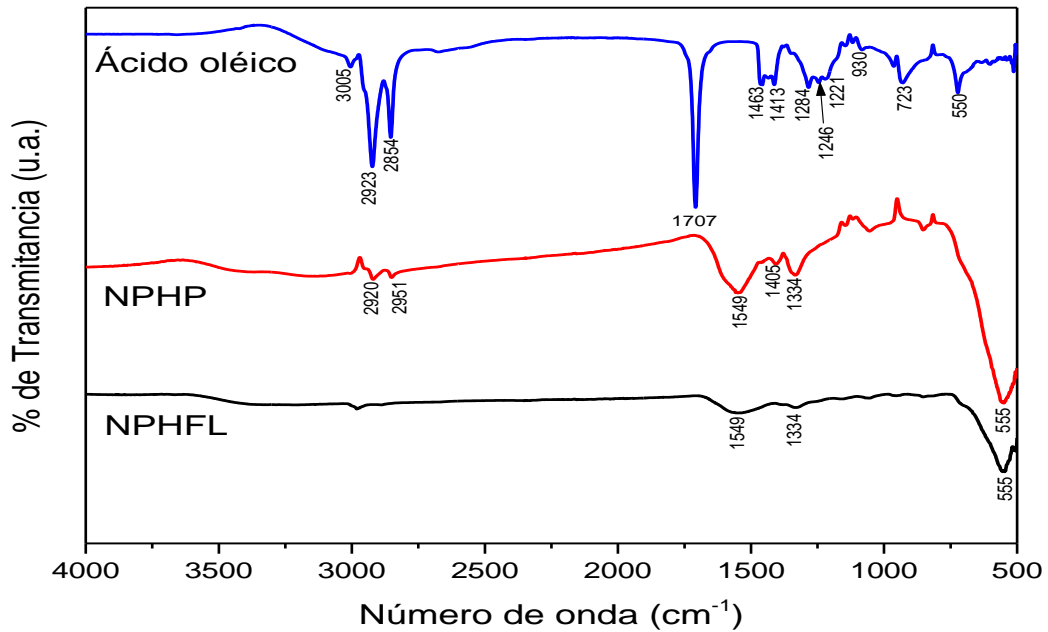


Figura 20. Espectroscopias de infrarrojo con transformada de Fourier de muestras de ácido oleico, nanopartículas hidrofóbicas (NPHP) y nanopartículas hidrofílicas (NPHFL)

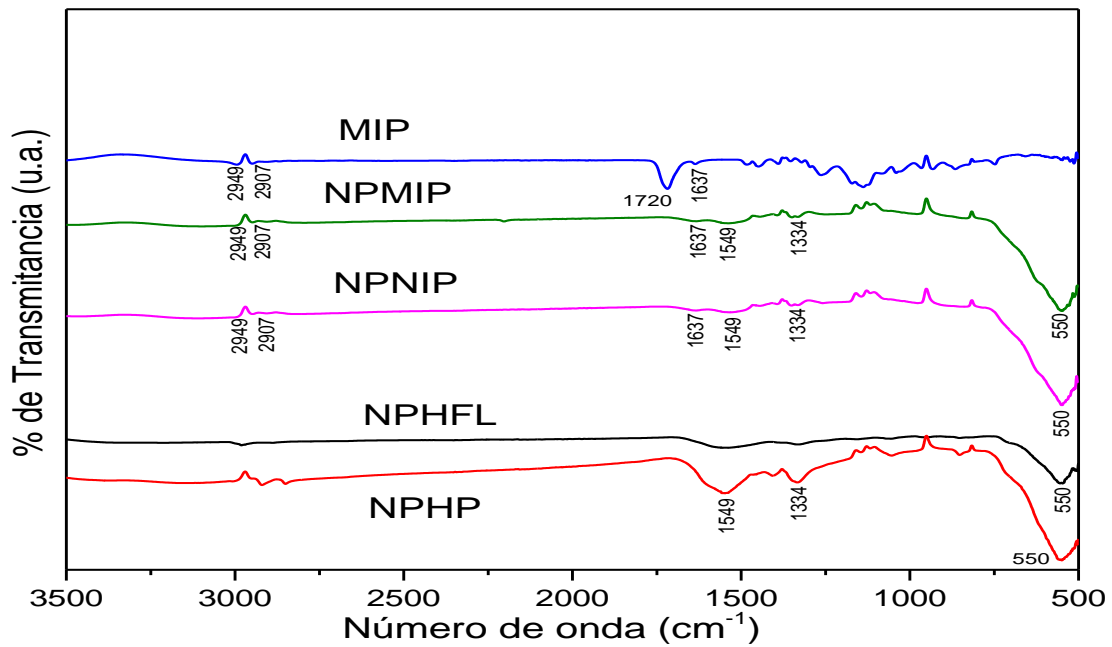


Figura 21. Espectroscopias de infrarrojo con transformada de Fourier de muestras de nanopartículas con cubierta polimérica no improntada (NPNIP), nanopartículas con cubierta

polimérica improntada, polímero de impronta molecular (MIP), nanopartículas hidrofílicas (NPHFL), nanopartículas hidrofóbicas (NPHP).

5.2.2.2 Difracción de Rayos X de polvos (DRX)

Para determinar la estructura cristalina y llevar a cabo la comparación con una referencia bibliográfica de nanopartículas de magnetita se llevó a cabo el análisis de difracción de rayos X de polvos mediante un difractómetro de rayos X modelo D8 ADVANCE DAVINCI, con una radiación monocromática de Cu a una longitud de onda de 1.54 Å

Las muestras de NPMIP, NPHFL y NPHP fueron analizadas por este método dando por resultado la siguiente gráfica:

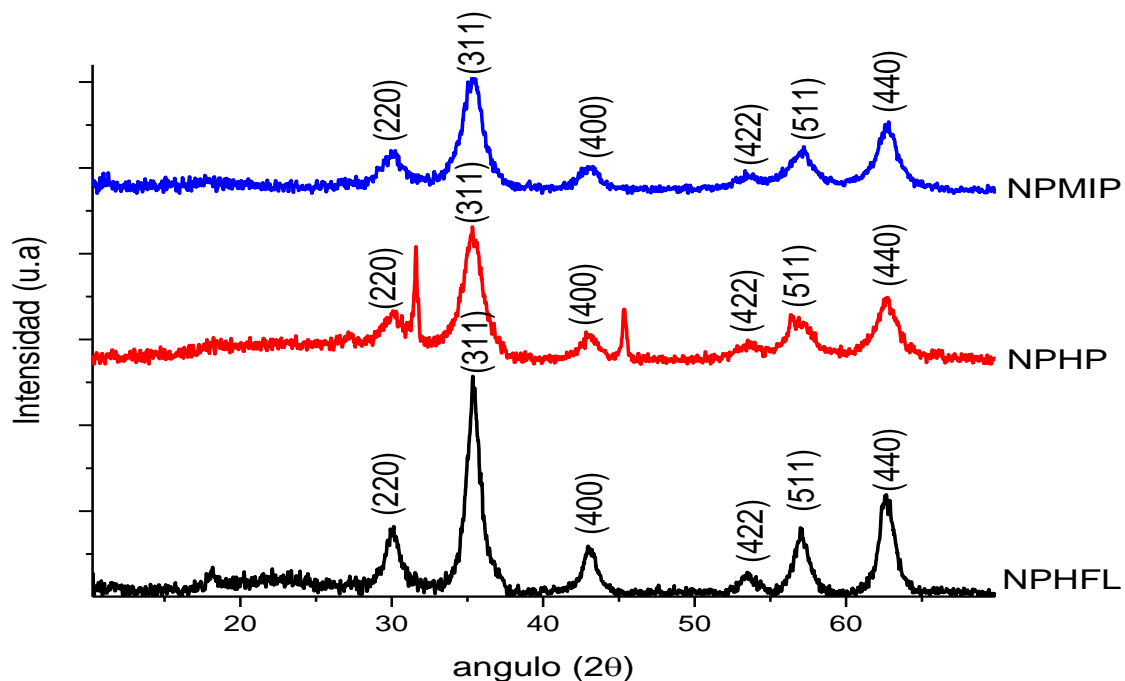


Figura 22. Gráfica de difracción de rayos X de polvos de tres diferentes muestras, la superior: NPHFLS, la de en medio NPHP y la inferior NPMIP.

Una vez hecha la difracción de polvos para cada muestra, se analizaron los difractogramas con el software MATCH y compararon con difractogramas de una base precargada (PDF-2) dando por resultado una concordancia de los picos con los de la carta cristalográfica del Fe₃O₄ 01-075-0033 la cual corresponde a magnetita para todas las muestras. Con estos

resultados podemos concluir que las nanopartículas sintetizadas son de magnetita, la cual tiene una estructura de Bravais cúbica centrada en la cara.

Por otro lado, se utilizó la ecuación de Scherrer para determinar el diámetro promedio de las nanopartículas de la muestra, dando por resultado la siguiente tabla.

Nanopartícula	2θ (°)	FWHM (°)	Diámetro promedio de nanopartícula (nm)
NPHFL	35.37	0.9600	8.86
NPHP	35.30	1.4100	6.03
NPMIP	35.14	0.9098	9.35

Es interesante notar que, aparentemente, las nanopartículas NPHP son más pequeñas que las NPHFL, lo cual se puede deber al uso del ácido oleico en la síntesis de las nanopartículas de magnética, así mismo que las NPMIP aumentaron de tamaño, probablemente por la cubierta polimérica, sin embargo, esto debe ser corroborado con las microscopias electrónicas de transmisión y barrido para no confundir esto con errores en la medición y cálculo de los diámetros.

5.2.2.3 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Para observar la morfología de las NPHFL, NPHP y NPMIP se utilizó un instrumento de microscopia electrónica de transmisión JEM-ARM200F operado a 200kV. Con el cual se pudo obtener las siguientes imágenes:

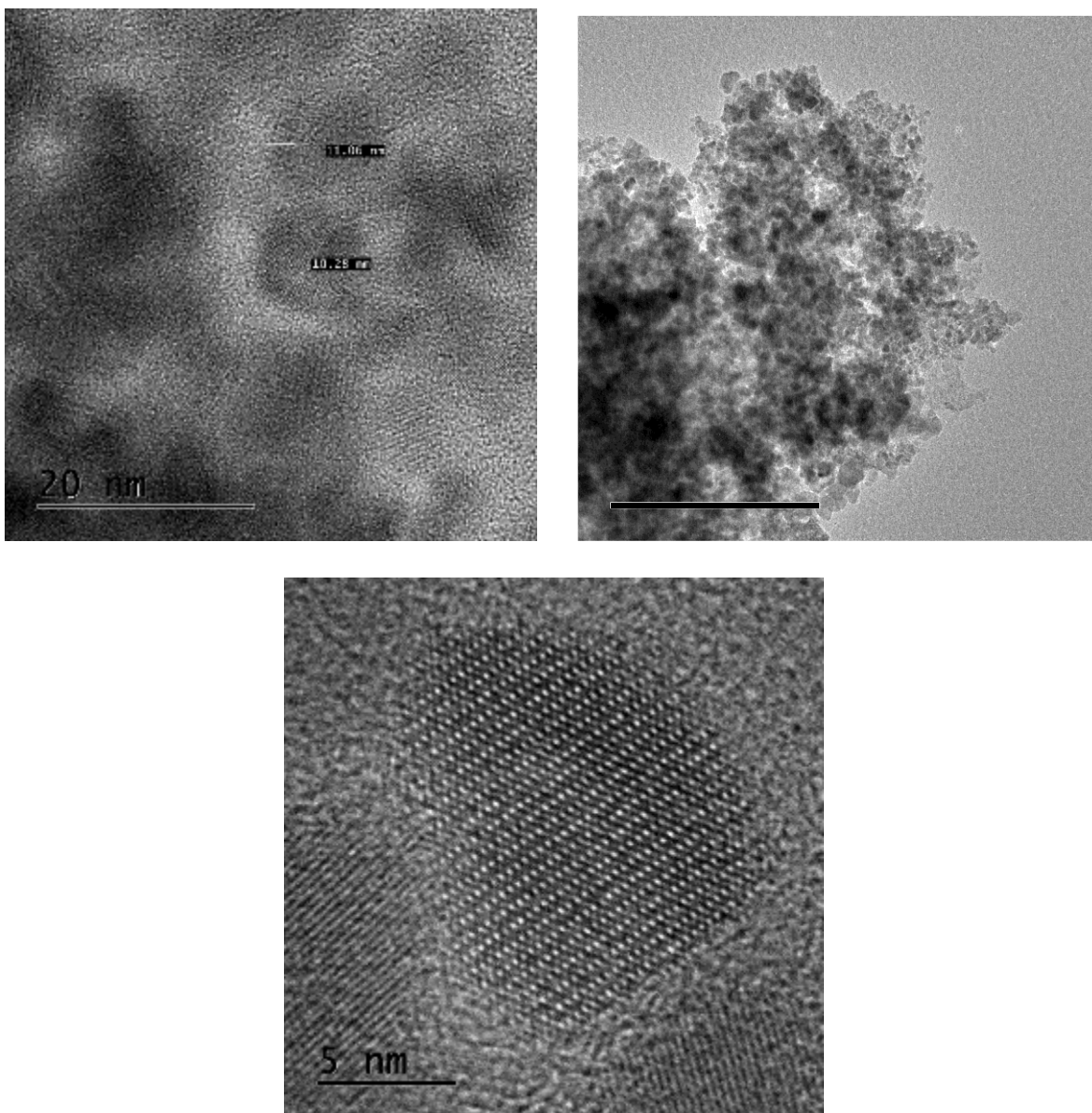


Figura 23. Imágenes de TEM para HFL.

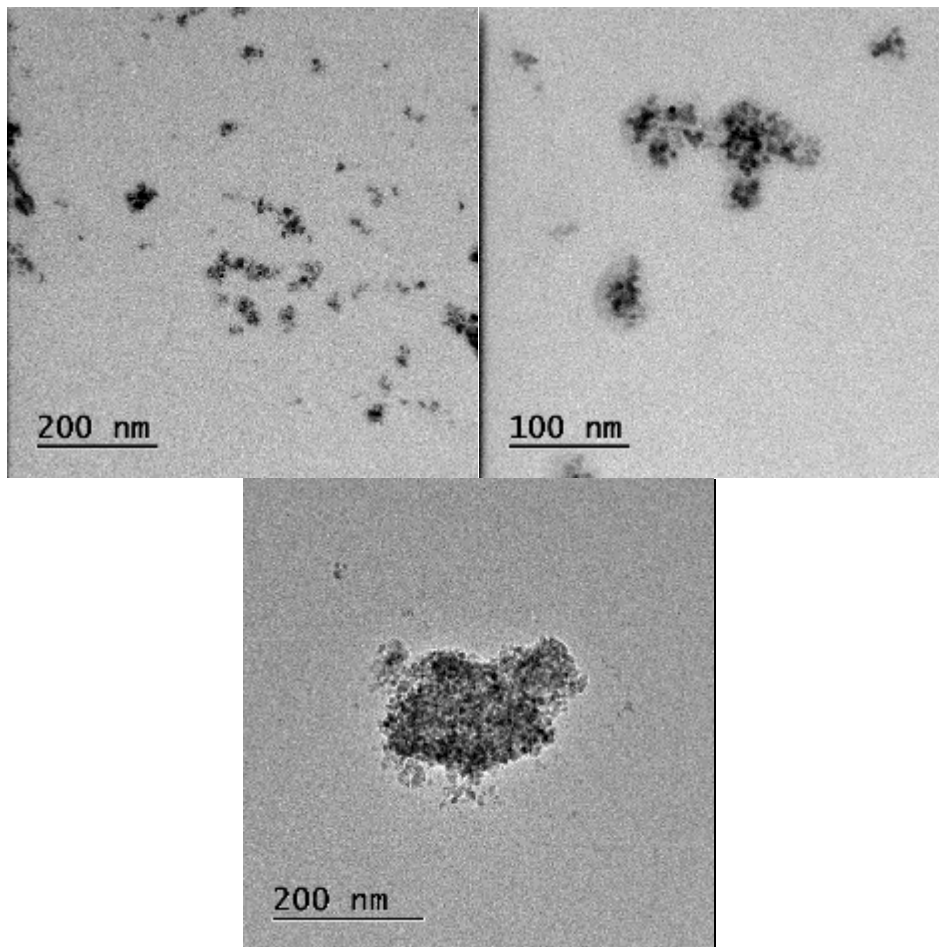


Figura 24. Imágenes de TEM para NPHP.

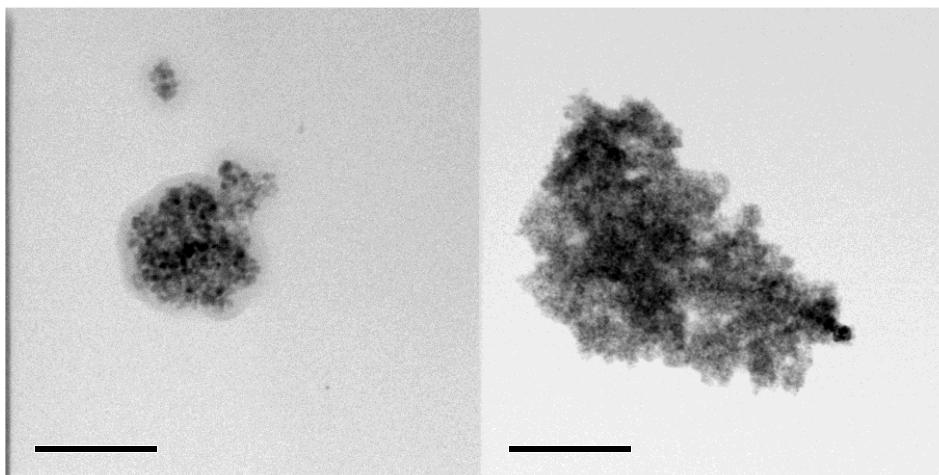


Figura 25. Imágenes de TEM para NPNIP.

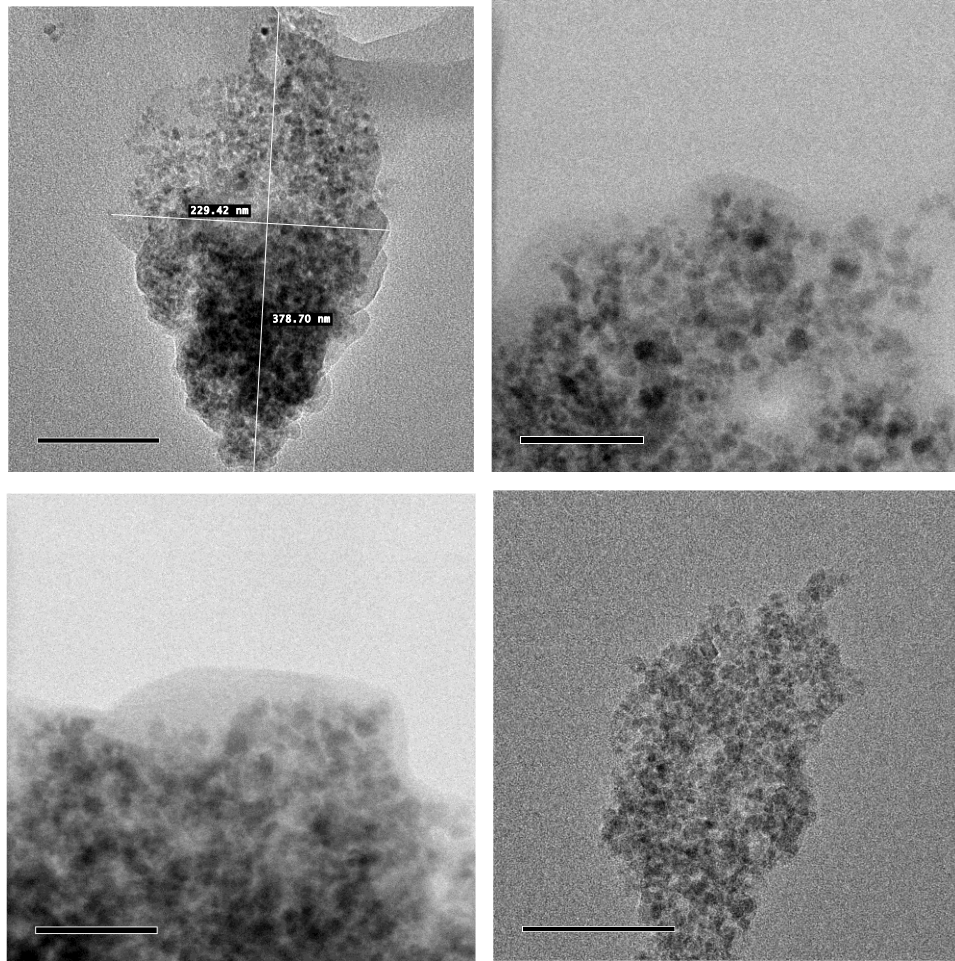


Figura 26. Imágenes de TEM para NPMIP

Al observar las imágenes podemos notar que si bien los núcleos de magnetita son del tamaño esperado y descrito por la ecuación de Scherrer (aproximadamente 10 nm) podemos ver que aglomerados en todos los casos siendo de entre 50 nm y hasta 700 nm de diámetro. Esto nos puede indicar que el método de síntesis no fue el indicado ya que no se pudieron conseguir nanopartículas individuales con su cubierta polimérica, probablemente debido una falta de agitación y dispersión. Sin embargo, este resultado es muy normal, la mayoría de los trabajos en sistemas similares informan de nanocompositos de diferentes tamaños y los obtenidos en este trabajo aun son nanométricos.

5.3 Carga de Ácido Fólico en NPMIP y NPNIP

Para determinar la cantidad de ácido fólico que las NPMIP y NPNIP eran capaces de adsorber se hicieron en primera instancia las curvas de calibración necesarias para poder cuantificar el ácido fólico en diferentes soluciones. Posteriormente se utilizó esta información para cuantificar el fármaco en los experimentos de carga en las NPMIP y NPNIP.

5.3.1 Curvas de Calibración para ácido fólico.

A continuación, se describirán los métodos, espectros de absorción y curvas de calibración en 3 diferentes disolventes, agua destilada, una mezcla DMSO y MeCN (1:2) y buffer de fosfatos pH=7.4.

5.3.1.1 Agua destilada.

Para desarrollar la curva de calibración de ácido fólico en agua se hizo una solución madre de 0.47mg/mL, mediante la adición de 23.5mg de ácido fólico en un matraz aforado de 50 mL, posteriormente se llenó aproximadamente a la mitad el matraz con agua destilada y se agregaron gota a gota aproximadamente 5mL de una solución 0.05M de NaOH previamente hecha con el fin de disolver el ácido fólico suspendido mientras se agitaba el matraz. Una vez obtenida una solución amarilla transparente se llevó al aforo el matraz con agua destilada. Al finalizar la solución madre se trasvasó a un vaso de precipitado y se le midió el pH el cual dio por resultado un rango de 6.5 a 7.

Una vez hecha la solución madre (SM) se prepararon 5 soluciones a diferente concentración de ácido fólico. A continuación, se muestra la tabla usada para formular las diferentes concentraciones las cuales se hicieron mediante el uso de las micropipetas adecuadas.

Tabla 3. Volúmenes utilizados para la preparación de las disoluciones de la curva de calibración en agua.

Solución	Vi (μL de la SM 0.47mg/mL AF)	V_{H2O} (μL de agua)	V_F (volumen final en μL)	C_F (μg/mL AF)
C1	20	4980	5000	1.9
C2	40	4960	5000	3.8
C3	80	4920	5000	7.5
C4	100	4900	5000	9.4
C5	150	4850	5000	14.1

Las disoluciones se leyó la absorbancia de cada una de ellas, así como la de un blanco con agua destilada en un espectrofotómetro de UV-Vis. A continuación, se muestran las lecturas realizadas a través de una gráfica.

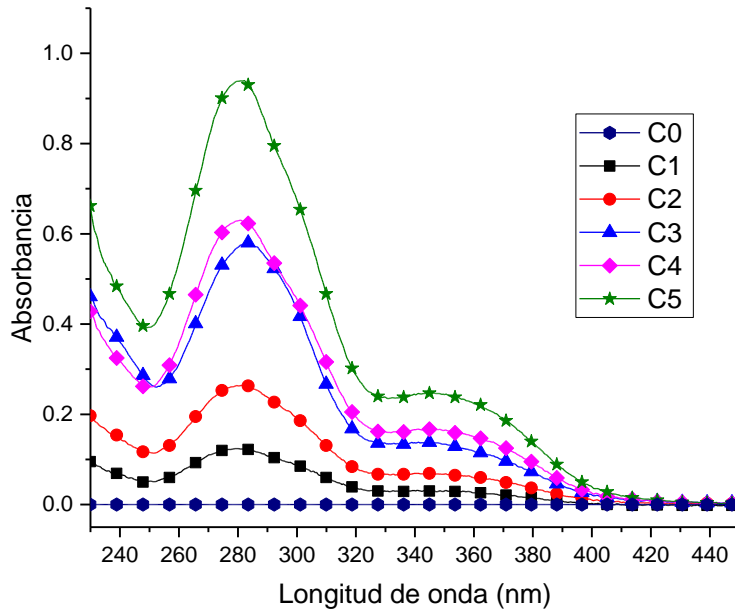


Figura 27. Espectros de absorbancia de diferentes soluciones de ácido fólico en agua a pH neutro.

Una vez obtenidos los espectros, se identificó que la longitud de onda en la cual la absorbancia es máxima es de 280.61 nm, por lo cual se graficó la absorbancia a 280.61 nm contra la concentración de las soluciones de ácido fólico, dando la siguiente gráfica.

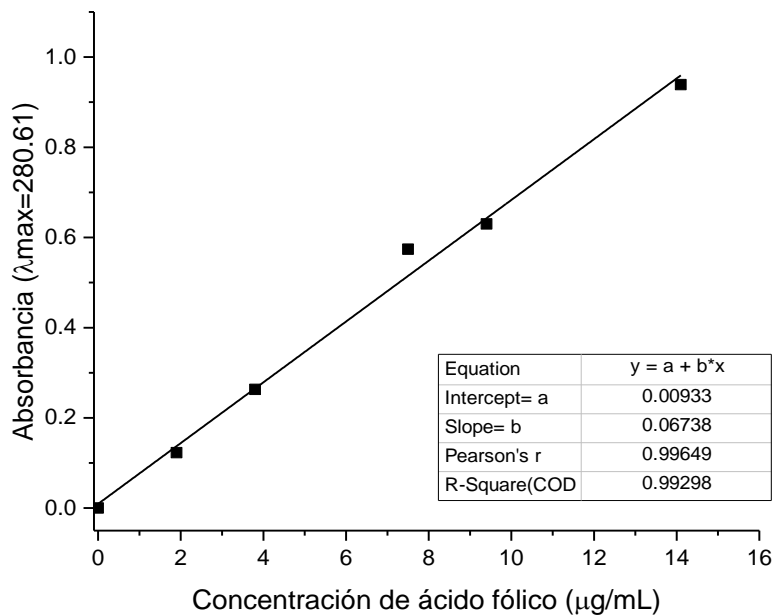


Figura 28. Curva de calibración de ácido fólico en agua.

5.3.1.2 Buffer de fosfatos pH 7.4

Para desarrollar la curva de calibración de ácido fólico en buffer de fosfatos pH=7.4 fue necesario realizar el buffer agregando 1.2 g Na_2HPO_4 , 0.22 g NaH_2PO_4 y 8.5g de NaCl dentro de un matraz aforado de 1000 mL. Posteriormente se hizo una solución madre de 0.219 mg/mL, mediante la adición de 21.9 mg de ácido fólico dentro de un matraz aforado de 100 mL y llevándolo al aforo con el buffer de fosfatos pH=7.4 hecho previamente.

Una vez hecha la solución madre (SM) se desarrollaron 5 soluciones a diferente concentración de ácido fólico. A continuación, se muestra la tabla usada para formular las diferentes concentraciones las cuales se hicieron mediante el uso de las micropipetas adecuadas.

Tabla 4. Volúmenes utilizados para la preparación de las disoluciones de la curva de calibración en buffer de fosfatos pH 7.4.

Solución	Vi (µL de la SM 0.219 mg/mL AF)	V _{H2O} (µL de agua)	V _F (volumen final en µL)	C _F (µg/mL AF)
C1	50	4950	5000	2.19
C2	100	4900	5000	4.38
C3	200	4800	5000	8.76
C4	250	4750	5000	10.95
C5	350	4650	5000	15.33

Una vez hechas las disoluciones se leyó la absorbancia de cada una de ellas, así como la de un blanco con buffer de fosfatos pH 7.4 en un espectrofotómetro de UV-Vis. A continuación, se muestran las lecturas realizadas a través de una gráfica.

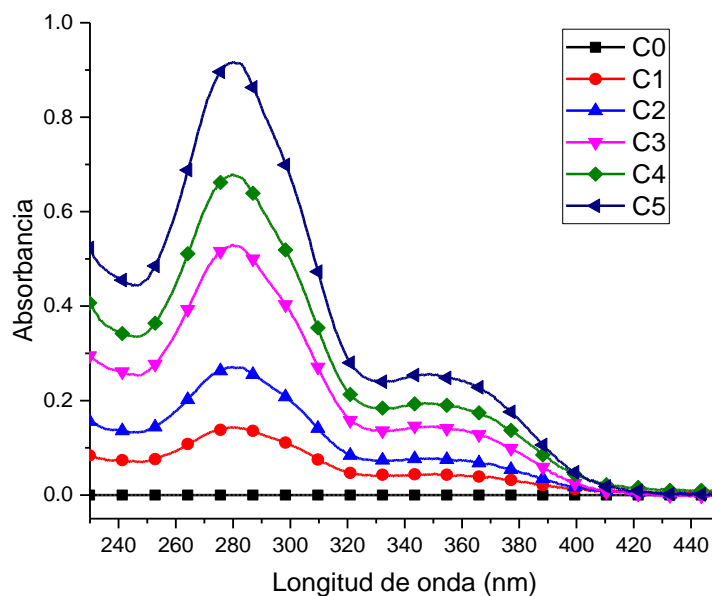


Figura 29. Espectros de absorción de diferentes soluciones de ácido fólico en buffer de fosfatos pH 7.4

Se determinó que la longitud de onda en la cual la curva de calibración es más precisa es de 282.4 nm, por lo cual se graficó la absorbancia a 282.4 nm contra la concentración de las soluciones de ácido fólico, dando la siguiente gráfica.

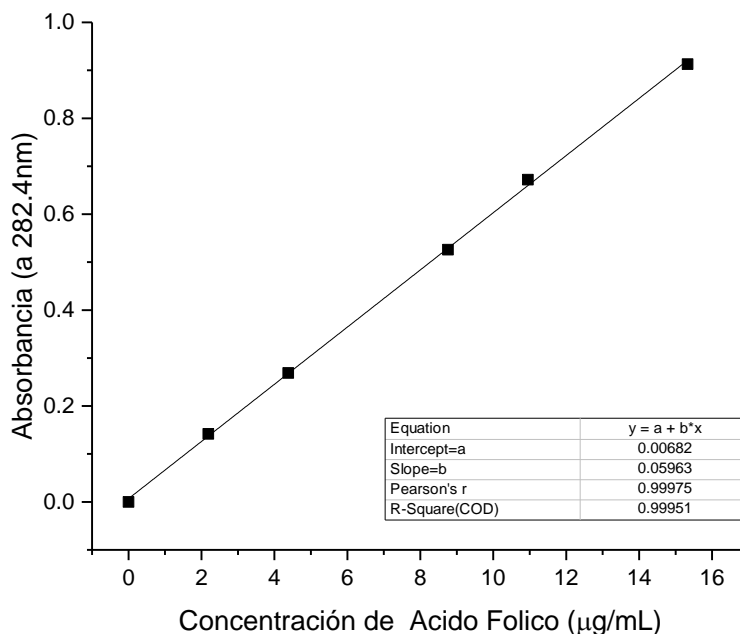


Figura 30. Curva de calibración de ácido fólico en buffer de fosfatos pH 7.4.

5.3.1.3 Dimetilsulfóxido y acetonitrilo (1:2)

Para desarrollar la curva de calibración de ácido fólico en una solución de DMSO y MeCN (1:2) fue necesario hacer 300 mL de la solución usando 100 mL de DMSO y 200 de MeCN. Posteriormente se hizo una solución concentrada de ácido fólico en DMSO disolviendo 10.5mg de ácido fólico en 4 mL de DMSO. De la solución anterior se tomó 1 mL y fue diluido con 4 mL de DMSO/MeCN (1:2) para conseguir una solución madre de 525 $\mu\text{g/mL}$ de ácido fólico.

Una vez hecha la solución madre (SM) se desarrollaron 5 soluciones a diferente concentración de ácido fólico. A continuación, se muestra la tabla usada para formular las diferentes concentraciones las cuales se hicieron mediante el uso de las micro pipetas adecuadas.

Tabla 5. Volúmenes utilizados para la preparación de las disoluciones de la curva de calibración en DMSO/MeCN (1:2)

Solución	V_i (μL de la SM 525μg/mL AF)	V_{H₂O} (μL de DMSO/MeCN (1:2))	V_F (volumen final en μL)	C_F (μg/mL AF)
C1	20	4980	5000	2.1
C2	40	4960	5000	4.2
C3	80	4920	5000	8.4
C4	100	4900	5000	10.5
C4.5	125	4875	5000	13.125
C5	150	4850	5000	15.75

Una vez hechas las disoluciones se leyó la absorbancia de cada una de ellas, así como la de un blanco con de DMSO/MeCN (1:2) en un espectrofotómetro de UV-Vis. A continuación, se muestran los espectros en la figura 31.

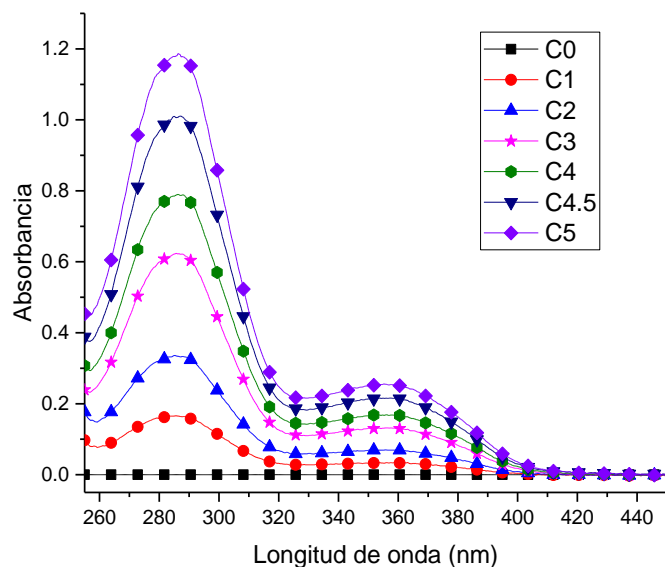


Figura 31. Espectros de absorción de diferentes soluciones de ácido fólico en DMSO/MeCN (1:2)

Se identificó que la longitud de onda en la cual la absorbancia es máxima es de 286.28 nm, por lo cual se graficó la absorbancia a 286.28 nm contra la concentración de las soluciones de ácido fólico, dando la siguiente gráfica.

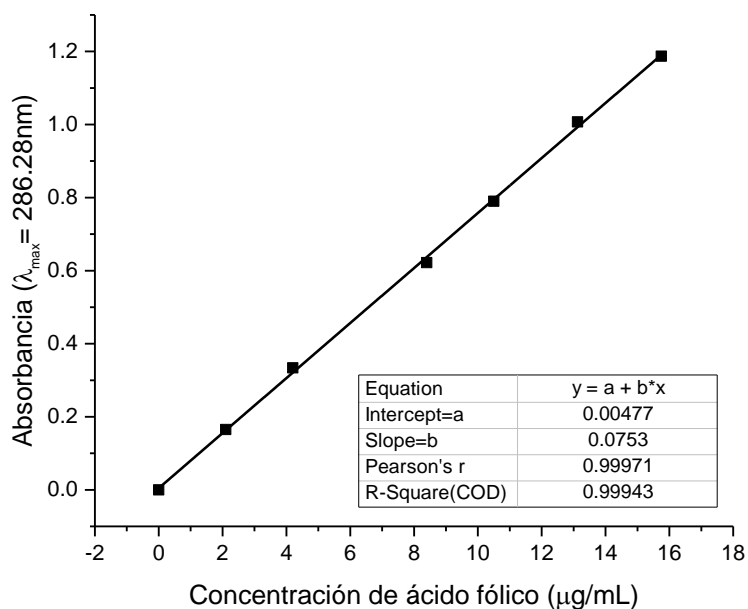


Figura 32. Curva de calibración de ácido fólico en DMSO/MeCN (1:2)

5.3.2 Carga de Ácido Fólico en NPMIP y NPNIP

Se procedió a determinar la cantidad de ácido fólico que las nanopartículas podían adsorber de NPMIP y las NPNIP, por lo cual se hicieron diversos estudios de carga de fármaco para definir su adsorción a diferentes concentraciones de ácido fólico.

5.3.2.1 Cinéticas de adsorción de ácido fólico.

Para realizar las cinéticas de adsorción de ácido fólico se agregaron 100mg de NPMIPs en un vaso termostatado, el cual se mantenía a una temperatura de 25°C y estaba fijo a la placa de un agitador orbital, se agregaron 44.5mL de buffer de fosfatos pH=7.4 y posteriormente se agregaron 15.5mL de una solución de ácido fólico en buffer de fosfatos pH=7.4. Una vez añadida la solución de ácido fólico se llevó a agitación el vaso de 300 rpm. Al tiempo 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min y 180 min fueron tomados 200µL de alícuota los cuales eran llevados a 2mL en un vial y dejados sobre un imán de neodimio durante 30 min. Una vez transcurrido ese tiempo era leída su absorbancia a una longitud de onda de 282.4nm en un espectrofotómetro.

El experimento se realizó por triplicado con una concentración inicial en el vaso termostatado de 0.1mg/mL de ácido fólico y también se realizó a 0.15 mg/mL y a 0.05 mg/mL de ácido fólico.

A continuación, se describen los resultados en la siguiente figura.

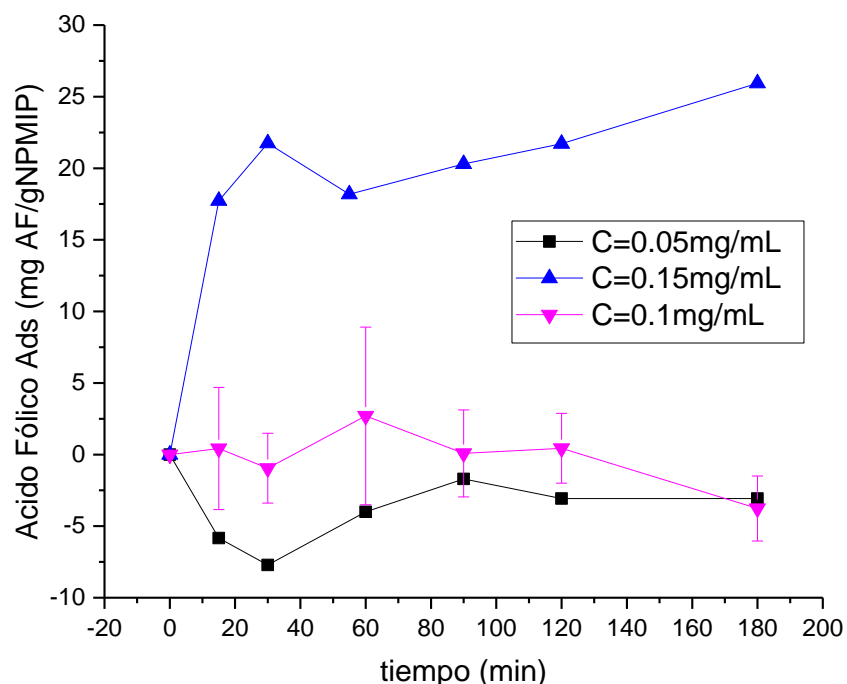


Figura 33. Cinética de adsorción de las NPMIPs a tres diferentes concentraciones de ácido fólico.

5.3.2.2 Pruebas de adsorción de ácido fólico.

Dado que las cinéticas de adsorción en buffer de fosfatos no fueron completamente concluyentes se desarrollaron diversas pruebas de adsorción con diferentes disolventes para poder conocer mejor el comportamiento de adsorción de las NPMIPs.

Prueba de adsorción en agua destilada.

Para hacer la prueba de adsorción en agua destilada se preparó una solución de ácido fólico a una concentración de 0.1mg/mL. Esta "solución" debido al pH tenía un aspecto de suspensión, por lo cual se pasó a través de un filtro hidrofílico de 0.22 μ m de diámetro de poro. Se utilizaron 5 mL del filtrado de esta solución fueron añadidos a un vial en el cual contenía previamente 10mg de NPMIPs, se llevó a sonicación por 10 min y posteriormente se mantuvieron en agitación y temperatura constante ($T=20^{\circ}\text{C}$ y 200rpm) durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugaron los viales durante 30 min a 14,000rpm. Una vez terminado el tiempo de centrifugación se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 280.61 nm. Así mismo, se tomó la lectura de absorbancia del filtrado antes de

agregarlo a las NPMIPs para saber la concentración inicial. El experimento se realizó por triplicado y a continuación se muestran los resultados.

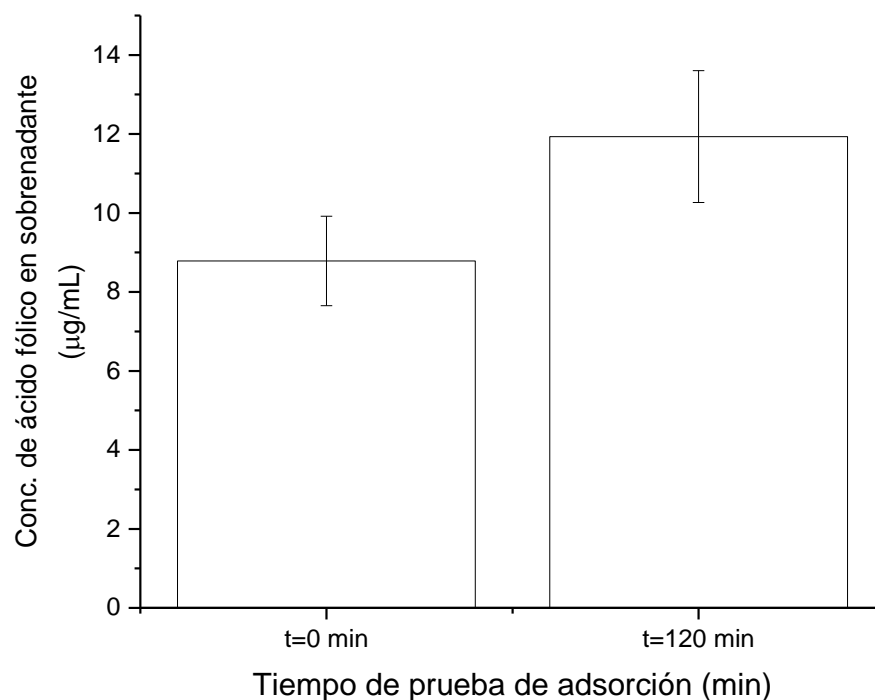


Figura 34. Prueba de adsorción de ácido fólico en agua en agua.

En esta gráfica podemos observar que la concentración inicial de ácido fólico no era de 0.1mg/mL como lo teníamos previsto, si no que era mucho menor, así mismo podemos observar que las NPMIP sintetizadas parecieran contener un remanente de ácido fólico. Esto suele ser normal en los polímeros de impronta molecular, ya que si hay un efecto de reconocimiento, el remover toda la molécula molde suele ser uno de los pasos limitantes en el proceso.

Prueba de adsorción en DMSO/MeCN (1:2).

Para continuar observando el comportamiento de la adsorción de ácido fólico por las NPMIPs se realizó una prueba de adsorción usando como disolvente una mezcla de DMSO/MeCN (1:2).

Para esta prueba se preparó una solución de ácido fólico en DMSO/MeCN (1:2) a una concentración de 2.725 mg/mL. Por otro lado se agregaron 10mg de NPMIP en un vial y posteriormente se agregaron 3000 μ L de DMSO/MeCN (1:2) en el vial y se sónico por 5 minutos, inmediatamente se agregaron 30 μ L de la solución de ácido fólico, se agregaron 970 μ L de DMSO/MeCN (1:2) y se mantuvieron en agitación y temperatura constante ($T=20^{\circ}\text{C}$ y 200rpm) durante 2 horas, posteriormente se sedimentaron magnéticamente las NPMIP durante 30 min y se tomaron 3 mL de sobrenadante, los cuales fueron centrifugados a 14,000rpm durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de centrifugación se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 286.28 nm.

En la siguiente figura se puede observar la notable disminución de la concentración al paso de 2 horas.

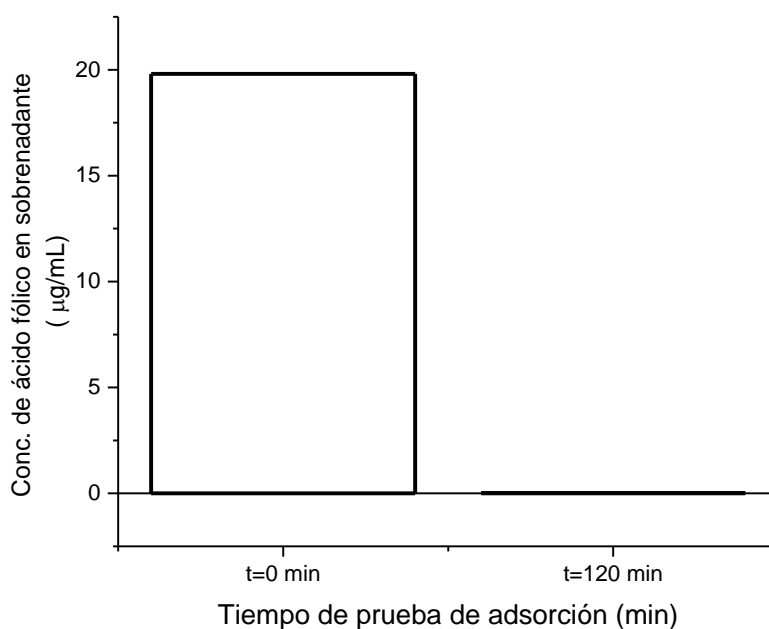


Figura 35. Prueba de adsorción de ácido fólico en DMSO/MeCN (1:2)

Para hacer más evidente la carga de ácido fólico en la NPMIP a continuación se muestra una comparación entre la cantidad adsorbida en μg de ácido fólico por mg de NPMIP entre las pruebas de adsorción de agua y DMSO/MeCN (1:2).

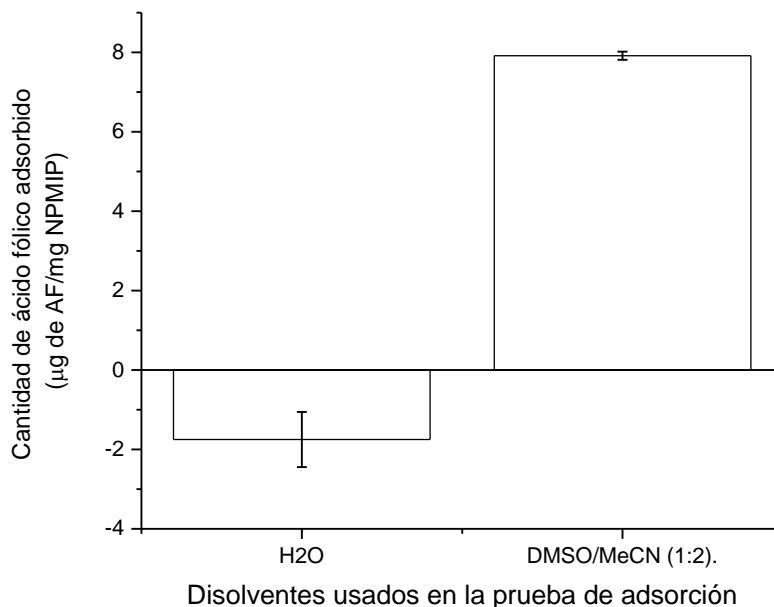


Figura 36. Comparación cuantitativa del efecto del disolvente en la adsorción de ácido fólico por NPMIPs

5.3.2.3 Isotermas de adsorción para NPMIP y NPMIP

Una vez que se encontró el medio adecuado para favorecer la adsorción de ácido fólico en las NPMIPs, el próximo paso fue conocer que tanto pueden adsorber, por lo que se repitió el experimento de la prueba de adsorción en DMSO/MeCN (1:2) con la diferencia de que se hicieron las pruebas con concentraciones de ácido fólico sucesivas (x5, x10, x15, x20) partiendo de la misma solución madre usada en la prueba de adsorción en DMSO/MeCN (1:2), aumentando el volumen agregado de la solución madre y disminuyendo el volumen de disolvente respectivamente para obtener el mismo volumen. A continuación, se muestra la isotermas de adsorción que se pudieron desarrollar tanto para las NPMIPs como para las NPNIPs.

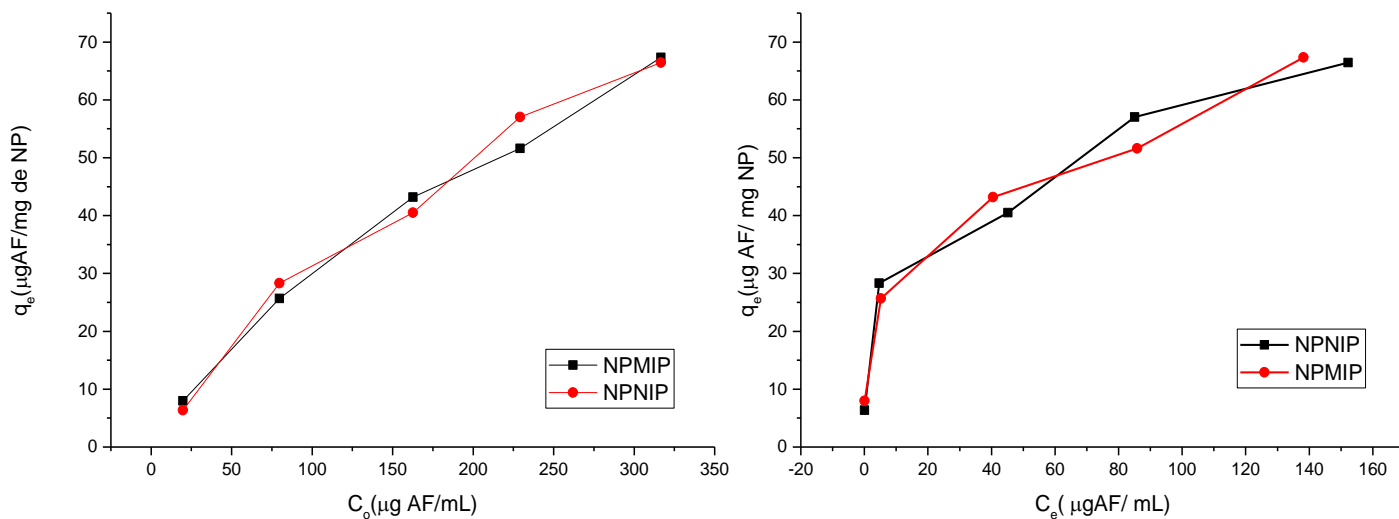


Figura 37. Isothermas de adsorción de ácido fólico de NPMIPs y NPNIPs en DMSO/MeCN (1:2) graficadas con la concentración inicial C_0 (izquierda) y la concentración al equilibrio C_e (derecha), q_e es la cantidad de ácido fólico adsorbida por miligramo de NP.

Al observar las gráficas se puede notar que no existe una diferencia significativa en la adsorción de las NPMIPs con la adsorción de las NPNIPs, esto podría ser un indicio de que no se llevó adecuadamente la formación de la impronta, o que el efecto de impronta no es notorio en ese disolvente. Esto último es muy común, ya que, si el disolvente tiene una alta afinidad por el sustrato, las interacciones sustrato-disolvente serán mayores que las sustrato-polímero dando como consecuencia que el equilibrio hacia el sustrato en disolución se vea favorecida. Por el contrario, si la solubilidad del sustrato no es muy grande en el disolvente, el sustrato se unirá al polímero tanto en sitios específicos como inespecíficos, haciendo que no sea posible observar el efecto de impronta. De aquí se puede deducir que el efecto de impronta es muy dependiente del disolvente.

Para confirmar se pueden graficar los datos de las isothermas de adsorción de las NMIPs y las NPNIPs en las formas lineales de los modelos de isothermas de adsorción descritos por Chen, X. [70] (Langmuir y Freundlich) podemos conocer a cual modelo se asemeja más nuestras isothermas y definir diferentes parámetros que intervienen en la adsorción. A continuación, se muestra una tabla donde se describen los diferentes valores obtenidos al hacer la regresión

lineal de los modelos de Langmuir y Freundlich para las isothermas de adsorción y las gráficas de estos modelos con los datos experimentales.

Tabla 6. Regresiones lineales y definición de parámetros de las isothermas de adsorción para NPMIP y NPNIP por los modelos de Langmuir y Freundlich.

Modelo	Langmuir						Freundlich							
Ecuación	$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{q_m K_L}$						$\ln q_e = \frac{1}{n} \ln C_e + \ln K_F$							
NPMIP	y=	m		x	+	b	y=	m		x	+	b		
	y=	0.01496	± 0.00181	x	+	0.16451	± 0.13613	y=	0.24318	± 0.01164	x	+	2.90312	± 0.04445
	Pearson's r=			0.97865			Pearson's r=			0.99658				
	R-Square(COD)=			0.95776			R-Square(COD)=			0.99318				
	q _m =	66.8449	µg AF/mg de NP				n=	4.11218						
	K _L =	0.09094	mL/ µg AF				K _F =	18.2309 mL/ µg AF						
NPNIP	y=	m		x	+	b	y=	m		x	+	b		
	y=	0.01473	± 0.00164	x	+	0.1692	± 0.13196	y=	0.30364	± 0.02351	x	+	2.67824	± 0.08678
	Pearson's r=			0.98197			Pearson's r=			0.99112				
	R-Square(COD)=			0.96427			R-Square(COD)=			0.98233				
	q _m =	67.8887	µg AF/mg de NP				n=	3.29337						
	K _L =	0.08706	mL/ µg AF				K _F =	14.5594 mL/ µg AF						

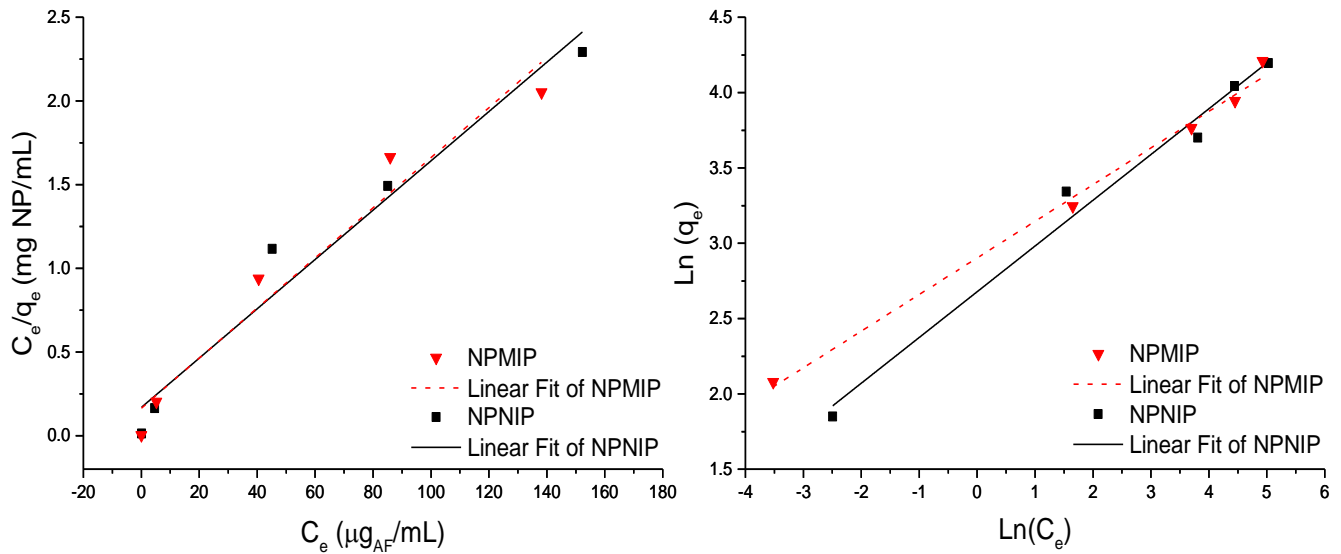


Figura 38. Isothermas de adsorción de las NPMIP y NPNIP en dos diferentes modelos Langmuir (izquierda) y Freundlich (derecha)

Una vez obtenidos estos parámetros en primera instancia podemos observar que los datos tanto de la isoterma de adsorción de NPMIP y NPNIP se acoplan mejor al modelo de Freundlich según lo descrito por la r de Pearson y la R^2 , lo cual nos hace inferir que tanto las NPMIPs como las NPNIPs tienen un proceso de adsorción sobre una superficie heterogénea [71]. Este resultado es el esperado, ya que, en un polímero de impronta molecular, siempre tendrán al menos dos tipos de sitios de adsorción los correspondientes a los que fueron improntadas y que deberían tener mayor especificidad geométrica y por lo tanto las interacciones son mejores y los sitios no específicos que son los que corresponden al resto de la superficie polimérica. Cabe destacar que en un polímero no improntado (NIP) es de esperar que su superficie también sea heterogénea, ya que la polimerización no es controlada y en consecuencia la estructura misma del polímero y su superficie son heterogéneas.

Por otro lado, al acoplarse mejor los datos de las NPMIP y NPNIP al modelo de Freundlich podemos inferir que este proceso de adsorción puede tener multicapas de adsorbato (ácido fólico en este caso) [70].

Siguiendo con los parámetros del modelo de Freundlich al comparar tanto la capacidad de adsorción K_F como la intensidad de adsorción n , podemos observar que son mayores para las

NPMIP que para las NPNIP, por lo tanto, y sabiendo que a mayor K_F y n mayor adsorción, podríamos concluir que las NPMIP adsorben más cantidad de ácido fólico, aunque el valor de K_F sugiere que a pesar de que el polímero improntado adsorbe menor cantidad, lo hace con mayor afinidad. Esto revela que a pesar de que las condiciones del disolvente no fueron las óptimas se puede apreciar un pequeño efecto de impronta.

Por otro lado, la evidencia encontrada discrepa con lo reportado por Hussain, S. [66] o por Liu, B.[46] donde se pueden apreciar diferencias de adsorción entre las NPMIP y NPNIP de $3\mu\text{g AF/ mg NP}$ para lo reportado por Hussain, S. y 40nmol/mg de NP para lo reportado por Liu, B. que al convertirlo a masa de ácido fólico serían $4.4\mu\text{g AF/ mg NP}$. Con esto los autores nos quieren decir que las NPMIP, con los datos reportados, en teoría tendrían que adsorber, sin embargo, a las cantidades de adsorción reportadas (aproximadamente $60\mu\text{g AF/ mg NP}$) una diferencia de 3 o 4 $\mu\text{g AF}$ puede ser derivada de un error experimental.

5.4 Diseño y desarrollo de los equipos generadores de campo magnético alterno

Como segunda parte de este trabajo de investigación se desarrollaron dos equipos generadores de campos magnéticos alternos, con el fin de utilizarlos para hacer un calentamiento magnético en los núcleos de magnetita de las NPMIPs y las NPNIPs cuando se libera el ácido fólico de la impronta.

Para empezar con el desarrollo, lo primero que se tuvo que hacer era conocer cuáles eran las condiciones de voltaje, frecuencia y amplitud de campo magnético eran necesarios para generar calentamiento magnético. Dicho esto, se hizo una investigación para determinar cuáles eran esas condiciones. A continuación, se muestra una tabla con las condiciones encontradas.

Tabla 7. Comparación de condiciones de calentamiento magnético encontradas en la literatura.

Tipo de Sistema	Diámetro de NP (nm)	Frecuencia de campo magnético (kHz)	Intensidad de campo magnético (kA/m)	Tiempo de exposición al campo mag. (min)	%m/v de NP en disp.	$\Delta T = T_{t=i} - T_{t=0}$ (°C)	Autor, Ref.

IONPs	52±4	233	38.4	10 min	1	15	Polo-Corrales, L. [72]
NP Magnetita	No descrito	233	6.6	10 min	2.	65	Latorre-Esteves, M. [73]
Vesículas con maghemita	9 nm (γ-Fe ₂ O ₃)	520	28	30 min	No descrito	5	Béalle, G. [74]
Microesferas con maghemita	8 nm (γ-Fe ₂ O ₃)	700	21.53	25	6.9	16	Brulé, S. [75]

Por otro lado Challa, S. [76] describe a 500kHz y 10kA/m como los parámetros más efectivos para aplicaciones de hipertermia. Sin embargo, Chang, D. [77] reporta que para minimizar las corrientes de Eddy y maximizar el diferencial de temperatura entre los tejidos normales y tumorales que contengan partículas magnéticas es mejor una frecuencia de 100kHz. Dicho esto, se buscó desarrollar equipos que se encontraran en el rango de 100-700kHz y entre 3-28 kA/m.

5.4.1 Medición de frecuencia, voltaje y campo magnético alterno

Las mediciones de frecuencia y voltaje fueron llevadas a cabo mediante el uso de un osciloscopio InfiniiVision 2000 serie X de la marca Agilent con la sonda que se tiene de fábrica, por otro lado, la frecuencia y el campo magnético generado fue medido con el uso de una sonda MC162 EMC EMI RFI la cual puede medir el campo magnético de hasta 50 Gauss dentro de una frecuencia de 2 kHz - 1 MHz.

5.4.2 Fabricación de Bobinas

Para generar el campo magnético alterno dentro de los equipos es necesario desarrollar la bobina, Por lo tanto, se diseñaron diferentes bobinas las cuales se observan en las siguientes figuras.



Figura 39. Bobinas fabricadas con tubo de cobre de 5/16 de pulgada, de izquierda a derecha se enlistan las bobinas de N=3, N=18, N=5, N=10, N=10 hecha de alambre magneto AWG 12, N=8 hecha de con tubo de cobre de 5/16 de pulgada y N=200 hecha de cable de Litz #4 255S.

Una vez fabricadas se analizó su impedancia (Z) e inductancia (H) a lo largo de un rango de frecuencias con un analizador de impedancias modelo 6500B de la marca Wayne Kerr, con el fin de saber cómo se comportarían al variar la frecuencia de alimentación.

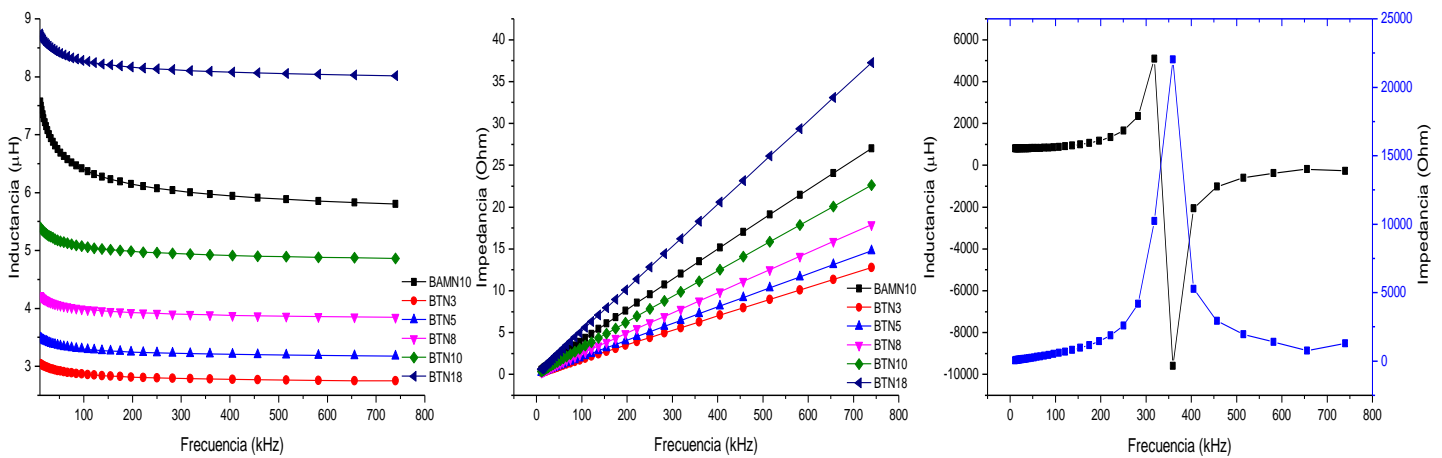


Figura 40. Comportamiento de la inductancia e impedancia de las bobinas desarrolladas. A la izquierda se observan las inductancias de las bobinas en función de la frecuencia. En medio se observan las impedancias de las bobinas en función de la frecuencia. Por ultimo a la derecha se observan la inductancia e impedancia de la bobina hecha con el cable de Litz.

5.4.3 Equipo 1: Circuito LC acoplado a un amplificador de función de onda (AMP)

El equipo 1 surge del acople de un generador de función de onda modelo DS335 de la marca Stanford Research Systems, un amplificador de función de onda modelo TS250-0 de la marca Accel Instruments y un circuito L o LC asociado, los cuales se describen más adelante. A continuación, se muestra un esquema del acople del Equipo 1 (AMP)

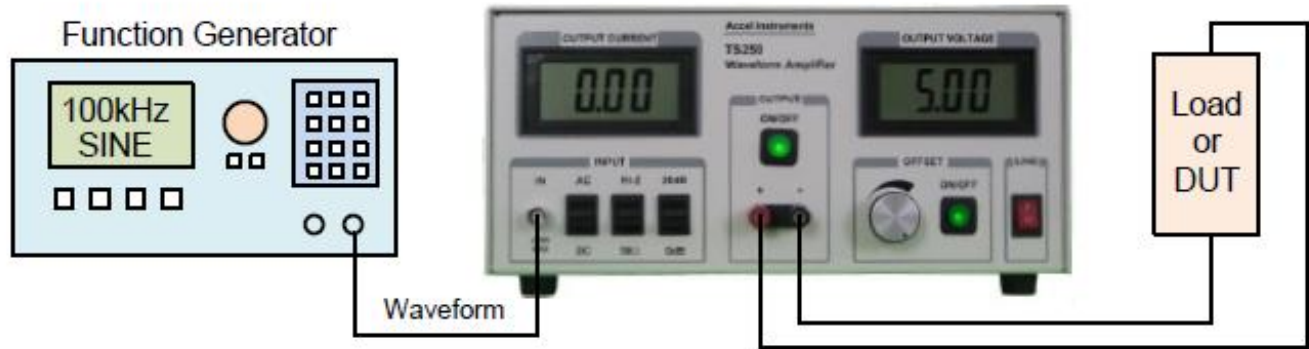


Figura 41. Esquema del Equipo 1 (AMP)

5.4.3.1 Acoplado y optimización de funcionamiento

Para poder saber cuál es la mejor combinación de acoplamiento entre el equipo 1 (AMP) y las bobinas se hizo una corrida con varios circuitos propuestos y se midió la frecuencia y campo magnético generado. Solo dos circuitos fueron los que funcionaron y dieron lecturas constantes. A continuación, se muestran los resultados obtenidos al medir su rendimiento con el osciloscopio ya sea con amplificación de 20dB o sin amplificación.

El primer circuito que se acoplo al equipo 1(AMP) fue la bobina de Litz, se ajustó el valor de la frecuencia hasta conseguir el máximo campo magnético y se encendió la amplificación a 20dB. El segundo circuito fue un circuito en serie de la bobina con $N=5$ fabricada con tubo de cobre de 5/16 de pulgada y un capacitor de poliéster de 217nF de capacitancia, para este caso no fue posible encender la amplificación ya que hacía corto circuito con el equipo. A continuación, se muestran las gráficas hechas con los datos obtenidos del osciloscopio.

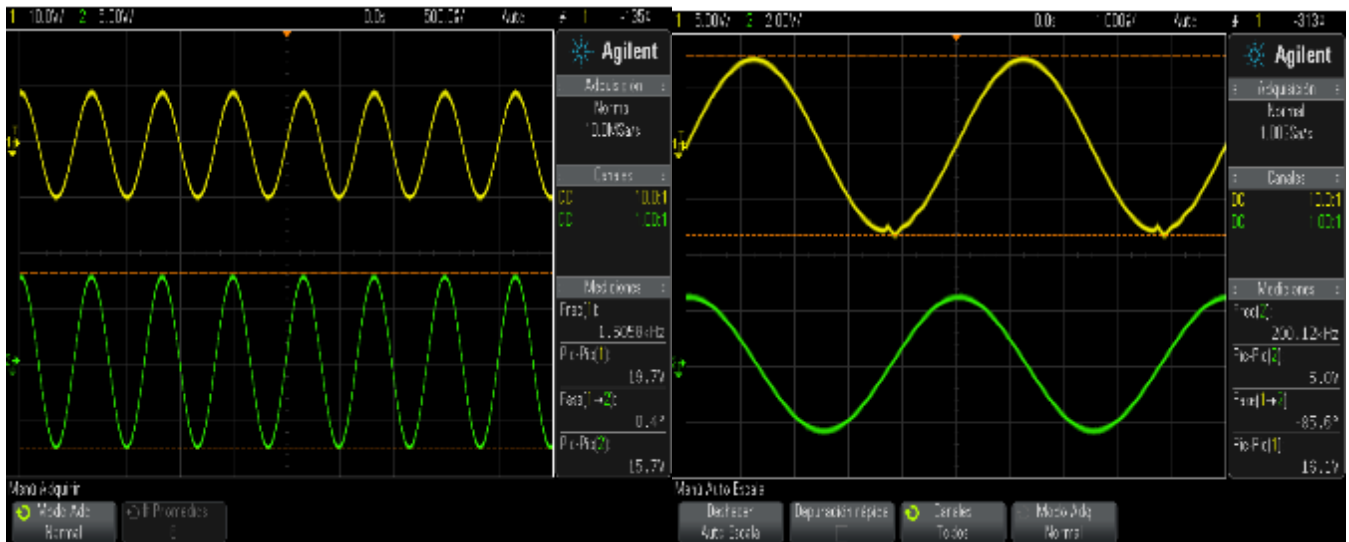


Figura 42. Lecturas del Osciloscopio para la bobina de Litz (izquierda) y el circuito en serie de la bobina N=5 y el capacitor 217nF (derecha) en el equipo 1

Se puede observar que la bobina de Litz adquiere su máximo valor de amplitud de campo magnético, el cual es igual a 15.7 Gauss o 1.2523 kA/m (Voltaje del canal 2) a una frecuencia de 1.5 kHz. Por otro lado, el circuito en serie de la bobina N=5 y el capacitor 217nF adquiere su máximo valor de amplitud de campo magnético, el cual es igual a 5 Gauss o 0.39885 kA/m a una frecuencia de 200.12 kHz. Una vez analizado esto se decidió continuar usando solamente el circuito en serie por cumplir con una frecuencia dentro del rango establecido de diseño.

5.4.4 Equipo 2: Circuito oscilador de Mazilli de Conmutación de voltaje cero (ZVS)

Para el segundo equipo utilizamos un circuito comercial, el cual es descrito como un circuito oscilador de Mazilli de Conmutación de voltaje cero (ZVS), el diagrama de este circuito ha sido presentado previamente en los antecedentes. A continuación, se presentará una imagen de cómo se ve en realidad.



Figura 43. Equipo 2, Circuito Oscilador de Mazilli (ZVS)

Además de lo descrito en la imagen para dar energía a este circuito fue necesario conectarlo a una fuente de alimentación de 40 V de salida con 15 W de potencia. Así mismo, a los extremos de la bobina se tuvo que agregar un sistema de enfriamiento, el cual constaba de una bomba de agua que hacía recircularla dentro del tubo de la bobina.

Una vez adquirido, se midieron las características de generador de campo magnético de este equipo por lo cual a continuación se muestran los parámetros que este equipo presenta de fábrica.

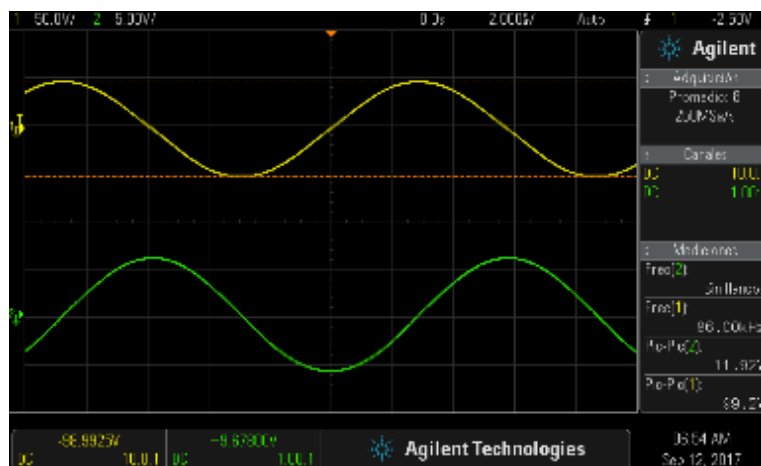


Figura 44. Lecturas del Osciloscopio para el equipo 2 ZVS con su bobina de tubo de cobre de $\frac{1}{4}$ de pulgada y N=8.

El equipo 2 ZVS presenta de fábrica una amplitud de campo magnético de hasta aproximadamente 12 Gauss o 0.9508 kA/m a una frecuencia de 86 kHz. Dicho esto, se decidió mejorar la frecuencia y la amplitud de campo magnético modificando las características físicas de la bobina.

5.4.4.1 Acoplado y optimización de funcionamiento.

Para mejorar las características antes mencionadas se procedió a probar con diferentes bobinas, las cuales fueron diseñadas variando su diámetro de tubo y número de vueltas, con el fin de obtener frecuencias más rápidas y amplitudes más fuertes. Como resultado, a continuación, se muestran las lecturas hechas al acople del Equipo 2 (ZVS) con estas bobinas.

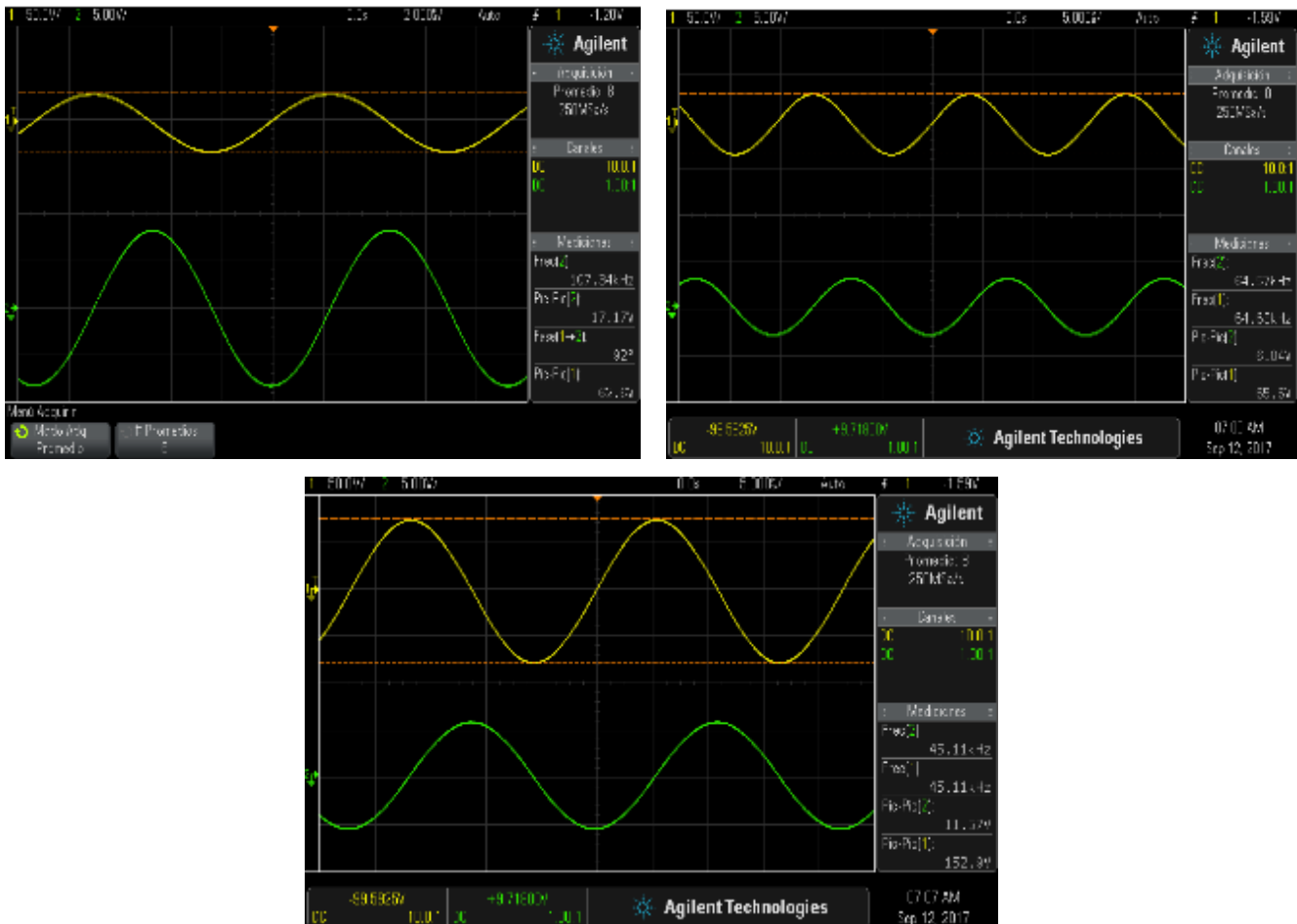


Figura 45. Lecturas del Osciloscopio para el equipo 2 ZVS con una bobina de tubo de cobre de 5/16 de pulgada con N=5 (esquina superior izquierda), con una bobina de tubo de cobre de

5/16 de pulgada con N=10 (esquina superior derecha) y con una bobina de tubo de cobre de 5/16 de pulgada con N=18 (parte inferior al centro)

Al hacer estas mediciones, podemos observar que la bobina de tubo de cobre de 5/16 de pulgada con N=5 aumentó la frecuencia del campo magnético alterno a 107.34 kHz, así como la amplitud volviéndola ahora de 17.17 Gauss o 1.3696 kA/m. Una vez analizado esto se decidió continuar usando solamente este acoplamiento por cumplir con una frecuencia dentro del rango establecido en el diseño.

5.5 Liberación de ácido fólico con NPMIP y NPNIP en presencia y ausencia de AMF.

Una vez identificada la carga de las NPMIPs y las NPNIPs, así como desarrollados los equipos generadores de campo magnético alterno, la tercera etapa de este proyecto de investigación fue conocer el impacto que tiene la aplicación de un campo magnético alterno en la liberación de ácido fólico por este sistema de liberación.

En este experimento se buscó conocer diversos factores que intervienen en la liberación, como lo son; el comportamiento de liberación de las NPMIPs con respecto a las NPNIPs; y el efecto que tiene la aplicación de dos diferentes campos magnéticos.

5.5.1 Carga de NPMIPs y NPNIPs para el experimento.

Para poder realizar el experimento por triplicado, se tuvo que hacer la carga de fármaco en un lote lo suficientemente grande de NPMIPs y NPNIPs a las mismas condiciones de carga para que esto no fuera un factor que influyera en los resultados, por lo cual a continuación se describe el proceso de carga.

Se pesaron aproximadamente 180mg de NP (NPMIP y NPNIP por separado) y se agregaron dentro de un tubo de ensayos con capacidad para 50 mL, posteriormente se agregaron 2.6mL de DMSO y 13.4mL de MeCN al tubo, después se sonicó el tubo durante 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de sonicación se agregaron 4mL de una solución de ácido fólico a una concentración de 2mg/mL en DMSO y se mezclaron los componentes vigorosamente.

El tubo se mantuvo en agitación y temperatura constante ($T=20^{\circ}\text{C}$ y 200rpm) durante 2 horas. Posteriormente se sedimentaron magnéticamente las NP durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo se separó el sobrenadante de las NP y se tomaron 3 mL de este, los

cuales fueron centrifugados a 14,000rpm durante 30 min. Por último, una vez terminado el tiempo de centrifugación se leyó la absorbancia del sobrenadante diluido en un factor de 1 en 40 a una longitud de onda de 286.28 nm.

Las NP sedimentadas se lavaron con 5 mL de MeCN para quitar los restos de DMSO y se sedimentaron magnéticamente por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 noche. Como resultado, se obtuvieron 180 mg de NP cargadas con 43.07 μg de AF/mg de NP para las NPNIP y 43.25 μg de AF/mg de NP para las NPMIPs.

Es importante notar que aunque la concentración inicial fue mayor que las concentraciones utilizadas para las isotermas de adsorción la cantidad adsorbida por miligramos de nanopartículas fue menor, esto pudo pasar debido a la relación de volumen de dispersante y cantidad de nanopartículas ya que en este caso fue menor que en las isotermas, además muy probablemente la agitación y turbulencias fueron menores en este proceso de carga que en las pruebas de isotermas, lo cual nos hace pensar que es un factor importante el que se mantengan en dispersión las nanopartículas.

5.5.2 Perfil de liberación

Para realizar los perfiles de liberación se agregaron aproximadamente 10 mg de NP cargadas (NPMIP y NPNIP) en un vaso termostatado, posteriormente se llevó a una temperatura de 37°C. Una vez alcanzada esa temperatura se agregaron 25 mL de buffer de fosfatos a pH=7.4 y se empezó a agitar a 200rpm. Se tomó una alícuota de 1 mL a los 5, 15, 30, 60, 120, 180 y 360 minutos y se reemplazó con buffer fresco. Una vez tomada la alícuota se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm y el sobrenadante fue utilizado para medir la concentración de ácido fólico a 282.4nm en un espectrofotómetro con un factor de dilución de 2.

Este procedimiento se hizo por triplicado para medir la liberación de las NPMIP y NPNIP en presencia y ausencia de campos magnéticos alternos. Los campos magnéticos fueron encendidos durante las 3 primeras horas de la liberación. A continuación, se muestran las gráficas de los perfiles de liberación.

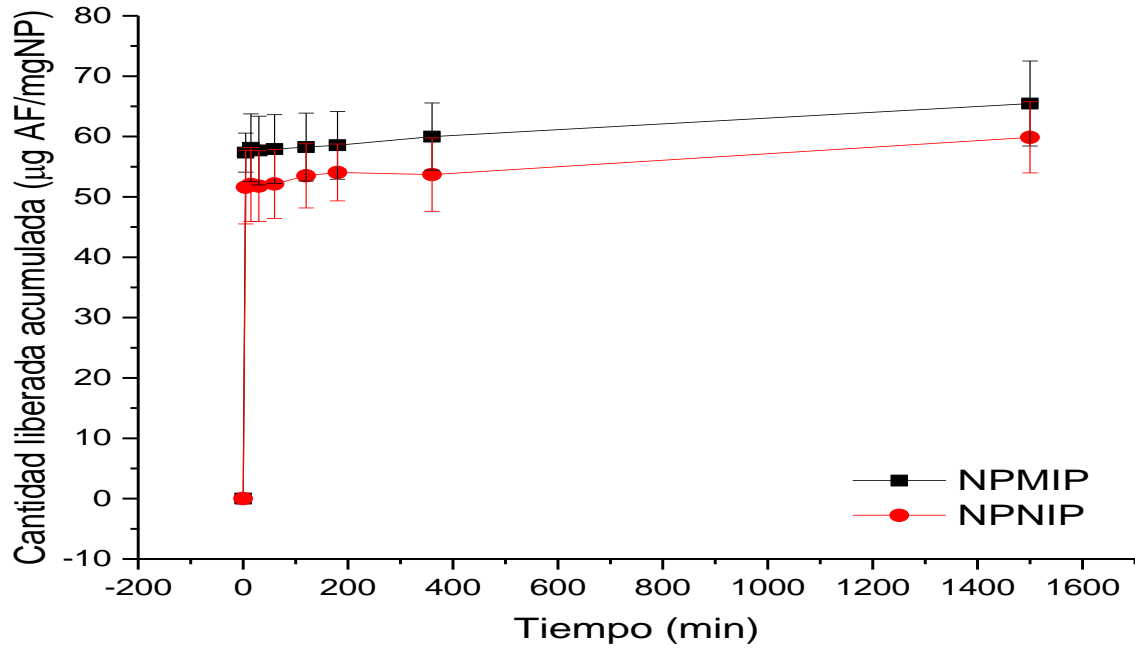


Figura 46. Comparación de los perfiles de liberación de NPMIP y NPNIP.

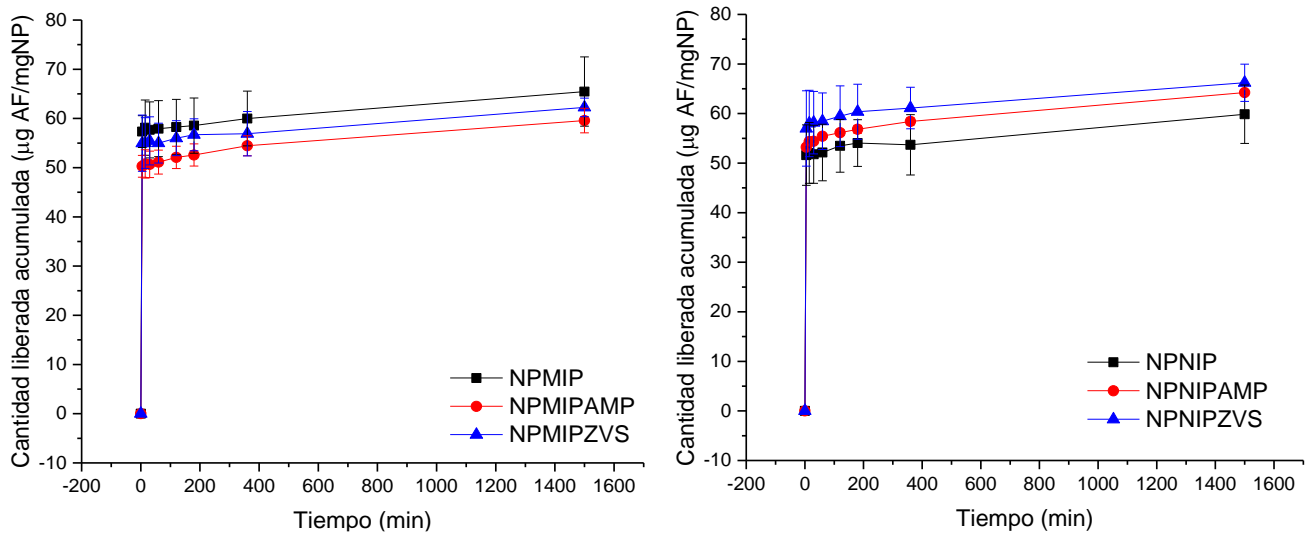


Figura 47. Comparación de la liberación de ácido fólico de las NPMIP con sus respectivos tratamientos magnéticos (izquierda) y de las NPNIPs y sus respectivos tratamientos magnéticos (derecha)

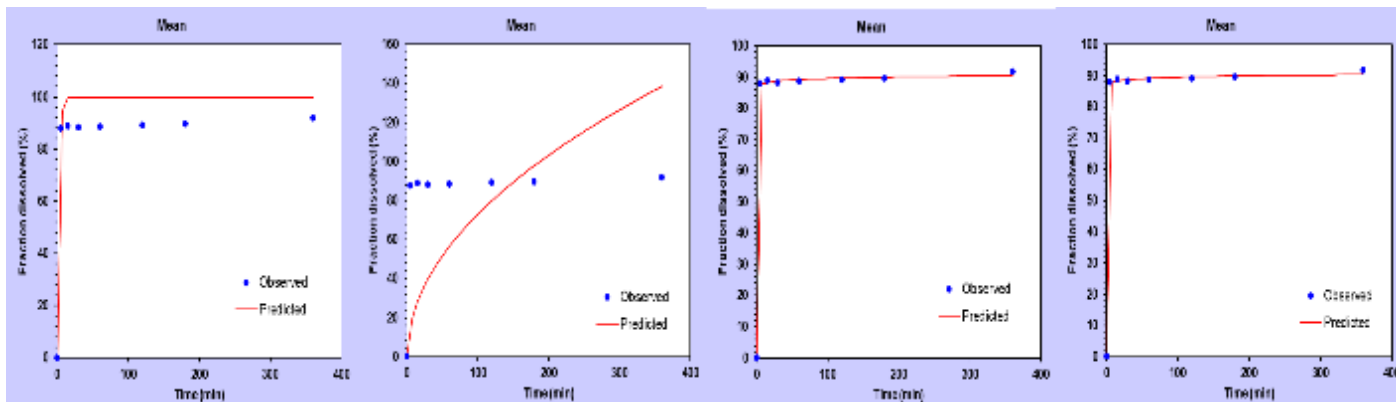
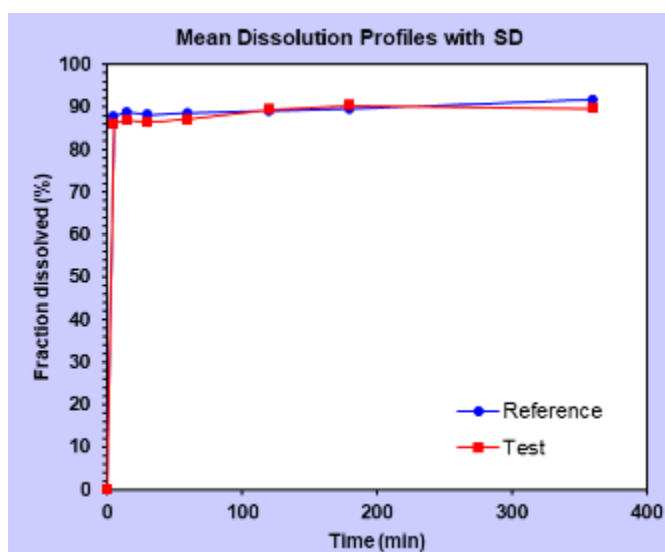


Figura 48. Comparación de modelos cinéticos de liberación para el perfil de liberación de NPMIP. De izquierda a derecha se muestran el modelo cinético de primer orden el modelo de Higuchi, el modelo de Korsmeyer-Peppas y el modelo de Weibull.

Tabla 8. Valores obtenidos de hacer las regresiones de los datos de la cinética de liberación de NPMIP con diferentes modelos cinéticos.

Model	First-order	Higuchi	Korsmeyer-Peppas		Weibull		
Equation	$F=100*[1-Exp(-k1*t)]$	$F=kH*t^{0.5}$	$F=kKP*t^n$		$F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}$		
Best-fit Values							
Parameter	k1	kH	kKP	n	α	β	Ti
	0.404	7.307	86.411	0.008	0.503	0.028	0.000
N_observed	8	8	8	8	8	8	8
DF	7	7	6	6	5	5	5
R_obs-pre	0.9926	0.5308	0.9998	0.9998	0.9997	0.9997	0.9997
Rsqr	0.9008	-1.0813	0.9995	0.9995	0.9995	0.9995	0.9995
Rsqr_adj	0.9008	-1.0813	0.9994	0.9994	0.9993	0.9993	0.9993
MSE	98.5636	2068.4001	0.5771	0.5771	0.7298	0.7298	0.7298
MSE_root	9.9279	45.4797	0.7597	0.7597	0.8543	0.8543	0.8543
Weighting	1	1	1	1	1	1	1
SS	689.9452	14478.8010	3.4625	3.4625	3.6490	3.6490	3.6490
WSS	689.9452	14478.8010	3.4625	3.4625	3.6490	3.6490	3.6490

AIC	54.2929	78.6435	13.9360	16.3556
MSC	-0.0088	-3.0526	5.0358	4.7334



Statistics	Value
Observed f2	87.403
Number of bootstrap	5000
Bootstrap mean	87.403
Bootstrap median	87.403
5% percentile	87.403
95% percentile	87.403
Skewness	1.000
Kurtosis	-2.001
Is 5% percentile \geq 50	Yes
Similarity of R and T	Accept

Figura 49. Prueba de factor de similitud f2 para el perfil de liberación de NPNIP (referencia) y NPMIP (prueba)

Tabla 9. Resultados obtenidos del desarrollo de la prueba del factor de similitud (f2) entre las cinéticas de liberación de NPMIPs y de NPNIPs con sus respectivas cinéticas de liberación con tratamientos magnéticos.

Pruebas realizadas	NPMIP vs. NPMIPAMP	NPMIP vs. NPMIPZVS	NPNIP vs. NPNIPAMP	NPNIP vs. NPNIPZVS
Observed f2	78.93678677	95.253	83.545	90.989
Number of bootstrap	5000	5000	5000	5000
Bootstrap mean	78.93678677	95.253	83.545	90.989
Bootstrap median	78.93678677	95.253	83.545	90.989
5% percentile	78.93678677	95.253	83.545	90.989
95% percentile	78.93678677	95.253	83.545	90.989
Skewness	-1.000300115	-1.000	1.000	1.000
Kurtosis	-2.00080048	-2.001	-2.001	-2.001
Is 5% percentile \geq 50	Yes	Yes	Yes	Yes
Similarity of R and T	Accept	Accept	Accept	Accept

Como se puede observar en figura 46 la cinética de liberación tanto de las NPNIPs como de las NPMIPs es muy rápida y muy parecidas entre ellas. Así mismo, al comparar estas cinéticas con las respectivas para los tratamientos magnético podemos apreciar en la figura 47 que las liberaciones son muy similares. Sin embargo, esto no fue corroborado hasta que se hicieron las respectivas pruebas de factor de similitud (f_2), como se observa en la tabla 8.

Por otro lado, se pudo determinar que el modelo cinético que más se adecua a los datos experimentales de liberación es el de Korsmeyer-Peppas el cual nos da una exponente de liberación $n=0.008$, la cual nos sugiere que la liberación es a través de un mecanismo de difusión Fick.

Observando las figuras 46 y 47 podemos notar que existe un efecto de liberación inmediata a los 5 minutos de casi el 87 % de fármaco liberado (efecto Burst), lo cual nos quiere decir que ese porcentaje estaba adsorbido tanto en las NPMIPs y NPNIPs de manera inespecífica y muy probablemente en multicapas. Sin embargo, existe una liberación más lenta después de los 5 minutos, lo cual nos sugiere que existen huecos de afinidad específica a ácido fólico.

Prueba de calentamiento magnético con NPHFL

Una vez identificado que no existe diferencia significativa entre la liberación de las NPNIPs y las NPMIPs en presencia y en ausencia del campo magnético alterno, queda remanente la duda de si lo que falló fue el sistema de liberación o el desarrollo de los equipos o ambos. Por lo tanto, se prosiguió a hacer un sencillo experimento para determinar si las nanopartículas magnéticas eran afectadas de algún modo con los equipos que hemos desarrollado.

El experimento consiste en agregar una gran cantidad de nanopartículas en un volumen de dispersante muy pequeño para poder identificar un cambio de temperatura mediante el uso de un termómetro de alcohol y que una alta dispersión hiciera que el exceso de disolvente enmascarara la hipertermia. Dicho esto, se agregaron aproximadamente 300 mg de nanopartículas magnéticas (magnetita) en un vial de vidrio pequeño, posteriormente se agregó 1 mL de buffer de fosfatos $pH=7.4$. Una vez agregado el buffer se dejó sonicar durante 15 minutos y después de eso se dejó reposar por 20 min a temperatura también. Una vez transcurrido el tiempo se introdujo este vial dentro de las bobinas de los dos equipos (Equipo 1 AMP y Equipo 2 ZVS) y se le colocó en la boca del vial un termómetro de alcohol. Una vez

montado el experimento se prendieron los equipos durante 30 minutos y se hicieron lectura de temperatura a 1, 3, 10, 15, 20, 30 min. A continuación, se muestran los resultados.

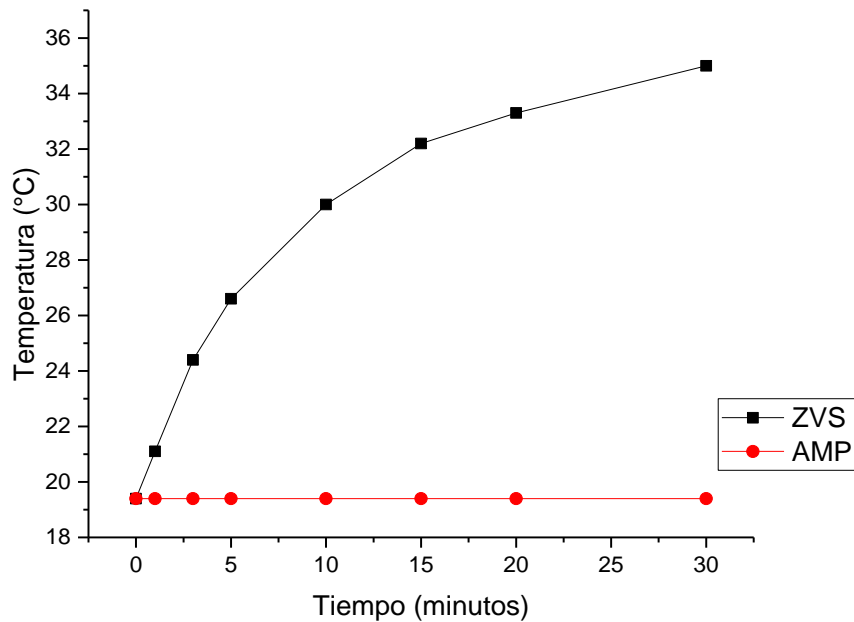


Figura 50. Gráfica de calentamiento magnético con los dos diferentes equipos desarrollados.

Como se puede apreciar, existe un aumento en la temperatura del vial a medida que pasa el tiempo para el tratamiento con el equipo ZVS, mientras que con el otro equipo no se levanta la temperatura. Esto nos puede dar a entender que el equipo 1 (AMP) no tiene las correctas condiciones de campo y frecuencia para poder calentar magnéticamente a las nanopartículas. Sin embargo, el Equipo 2 ZVS pudo calentar las nanopartículas hasta los 34 partiendo de 20 °C (temperatura ambiente).

Con este experimento se puede calcular la tasa de absorción específica (SAR), la cual es un parámetro para evaluar el desempeño del calentamiento de las nanopartículas magnéticas. Este parámetro es definido como el calor disipado por unidad de tiempo por masa de nanopartículas [78]. A continuación, se muestra la siguiente ecuación.

$$SAR = \frac{m_{Np} c_{Np} + m_s c_s}{m_{Np}} \left(\frac{dT}{dt} \right)$$

Donde m_{Np} es la masa de las nanopartículas magnéticas, c_{Np} el calor específico de las nanopartículas, m_s es la masa del disolvente y c_s el calor específico del disolvente. A continuación, se muestra el cálculo para determinar el SAR.

$$SAR = \frac{0.309g \cdot 0.6357 \frac{J}{g \cdot ^\circ C} + 1g \cdot 4.186 \frac{J}{g \cdot ^\circ C}}{0.309g} \left(\frac{15.6 \cdot C}{1800 s} \right) = 0.1229 \frac{W}{g \text{ de NP}}$$

Una vez encontrado este valor podemos compararlo con el trabajo realizado por Kekalo en 2015 [79], en el cual reporta que nanopartículas de magnetita de entre 20 y 40 nm pueden alcanzar valores de SAR de entre 22 a 200 W/g cuando se encuentran inmersos en un campo magnético de 8 a 40 kA/m a 160kHz de frecuencia. Dicha comparación denota una gran diferencia con el resultado obtenido, el cual se puede deber a la intensidad de campo y la frecuencia de este ejercidos en el experimento. Por lo tanto, es evidente la relación proporcional entre la intensidad de campo magnético y la frecuencia con el calentamiento magnético en las nanopartículas.

5.6 Prueba de liberación de ácido fólico con NPHFL en presencia de un campo magnético alterno

Por último, se repitió el experimento de carga de ácido fólico con la única diferencia de que en vez de usar NPNIP y NPMIP se utilizó NPHFL. Una vez obtenidas las NPHFL cargadas se agregaron aproximadamente 10 mg de NPHFL a un vaso termostatado con un medio de disolución que constaba de 1 mL de NaOH 2.5M y 24 mL de H₂O. Se mantuvo durante 30 min a temperatura ambiente y agitación constante a 200rpm con el equipo ZVS encendido. Como resultado se obtuvo la siguiente gráfica.

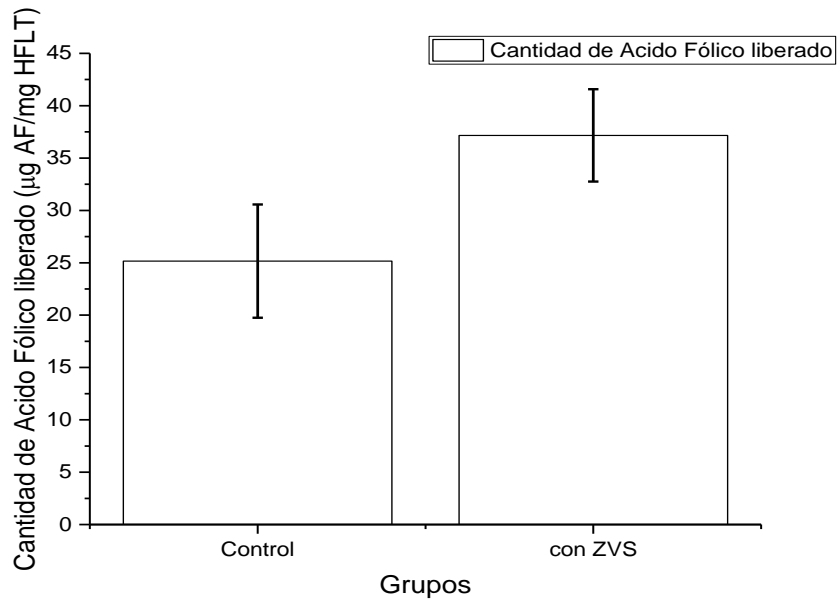


Figura 51. Prueba de liberación de ácido fólico con NPHFL en presencia y ausencia de un campo magnético alterno.

Como se puede observar en la gráfica existe una diferencia significativa entre la liberación del grupo control y del que se trató con el campo magnético alterno, por lo cual podemos deducir que el campo magnético aumentó la liberación de ácido fólico.

Una posibilidad es que la adsorción sobre las partículas con polímero sea más fuerte que el efecto de la hipertermia magnética ya que en las mismas condiciones la liberación del ácido fólico es estimulada por el campo magnético alterno y cuando la adsorción es sobre las partículas con polímero no hay diferencia en la liberación. También puede suceder que la hipertermia afecte únicamente a lo que está inmediatamente unido a la partícula y cuando hay polímero el fármaco se une a este y no a la partícula, razón por la cual no se ve afectada la liberación.

6. Conclusiones.

Se formuló y desarrolló un sistema de liberación de fármacos afín a ácido fólico con nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro con un recubrimiento de impronta molecular. Por otro lado, por deficiencias en el proceso de impronta molecular no se obtuvo un sistema de liberación improntado con mayor capacidad de carga con respecto al no

improntado. Sin embargo, el sistema improntado si mostró mayor afinidad que el que no pasó por el proceso de impronta.

Subsecuentemente, se caracterizó el sistema de liberación tanto en propiedades físicas, magnéticas, morfológicas, químicas y de adsorción.

Posteriormente, se desarrollaron dos equipos que pueden generar campos magnéticos alternos, de los cuales el equipo 2 (ZVS) es funcional para conocer el SAR de las nanopartículas magnéticas, así como para evaluar el efecto de un campo magnético en la liberación de fármacos. Por otro lado, el equipo 1 (AMP) tiene prometedoras posibilidades de variación y mejora.

También, se hicieron cinéticas de liberación en los sistemas desarrollados con la presencia y en ausencia del campo magnético alterno que generaron los equipos desarrollados, sin embargo, no se vio una diferencia significativa entre los grupos tratados con campos magnéticos y los controles.

Por último, comprobó el calentamiento magnético de las nanopartículas de magnetita de aproximadamente 10nm de diámetro dispersos en agua a 107kHz y aproximadamente 20 Gauss.

7.Perspectivas

Con la finalidad de mejorar la caracterización de los sistemas de liberación de nanopartículas magnéticas con cubierta de polímeros con impronta molecular sería conveniente utilizar técnicas como la son DSC y TGA para una mejor caracterización del polímero de impronta molecular, mientras que el de DLS serviría muy bien para identificar los radios hidrodinámicos del sistema los cuales tienen mucho que ver en materia de calentamiento magnético.

Por otro lado, el uso de magnetometrías con campos magnéticos directos y alternos del sistema de liberación tanto en su forma sólida, así como en su forma de dispersión coloidal por SQUID y/o VSM mejorarían la caracterización magnética de los núcleos del sistema, lo cual mejoraría a su vez el desarrollo de nuevas condiciones de frecuencia e intensidad de campo magnético.

Un método no explorado para el desarrollo y mejora de la impronta sería la polimerización por emulsión ya que se ha observado que esta técnica podría disminuir la probabilidad de formación de agregados de nanopartículas y polímero

Una oportunidad de mejora en la investigación de sistemas de liberación de fármacos nanoparticulados activados por campos magnéticos alternos es la determinación de los tiempos de relajación de Neel y Brown del sistema de liberación de fármaco sería la mejor forma para identificar los parámetros óptimos de campo magnético alterno para potenciar el calentamiento magnético.

Por último, para observar una diferencia significativa de la carga y afinidad de las NPMIPs con las NPNIPs se debería de hacer una cinética de liberación con menor carga en los sistemas o bien con un lavado para eliminar el efecto burst como variable de error.

8. Fuentes y literatura citada.

1. Mody, V.V., et al., *Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor*. Applied Nanoscience, 2014. 4(4): p. 385-392.
2. dato obtenido de buscar en ScienceDirect las palabras "magnetic nanoparticles" el 10 de marzo de 2018.
3. dato obtenido de buscar en ScienceDirect la palabras molecular imprinted polymers el 10 de marzo de 2018.
4. dato obtenido de buscar en ScienceDirect las palabras "magnetic nanoparticles" AND MIP el 10 de marzo de 2018.
5. dato obtenido de buscar en ScienceDirect las palabras "magnetic nanoparticles" AND MIP AND "drug delivery" el 10 de marzo de 2018.
6. dato obtenido de buscar en ScienceDirect las palabras "magnetic nanoparticles" AND MIP AND "drug delivery" AND "magnetic field" el 10 de marzo del 2018.
7. ¿Qué es el cáncer?, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>. [cited 2018 12 de febrero].
8. Cancer, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. [cited 2018 12 de febrero].
9. Global Initiative for Cancer Registry Development. International Agency for Research on Cancer <http://gicr.iarc.fr/en/>. [cited 2018 12 de febrero].
10. Tipos de tratamiento, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>. [cited 2018 12 de febrero].
11. ¿Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia?, <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html>. [cited 2018 12 de febrero].
12. Folic acid, <http://en.chembase.cn/substance-44.html#>. [cited 2018 12 de febrero].

13. *Folic acid*, www.chemspider.com/Chemical-Structure.5815.html. [cited 2018 12 de febrero].
14. *Folate Dietary Supplement Fact Sheet*, <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/>. [cited 2018 14 de febrero].
15. Chabner, B.A. and T.G. Roberts Jr, *Chemotherapy and the war on cancer*. Nature Reviews Cancer, 2005. 5: p. 65.
16. *Methotrexate* (By *injection*), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0011140/?report=details>. [cited 2018 14 de febrero].
17. Attar, S., *Adverse effects of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. A hospital-based study*. Vol. 31. 2010. 909-15.
18. *METHOTREXATE*, <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3123>. [cited 2018 14 de febrero].
19. Mitra, A.K., et al., *NOVEL DELIVERY APPROACHES FOR CANCER THERAPEUTICS*. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2015. 219: p. 248-268.
20. Alvarez-Lorenzo, C. and A. Concheiro, *CHAPTER 1 From Drug Dosage Forms to Intelligent Drug-delivery Systems: a Change of Paradigm*, in *Smart Materials for Drug Delivery: Volume 1*. 2013, The Royal Society of Chemistry. p. 1-32.
21. Lee, P., et al., *Controlled-release technology : pharmaceutical applications / Ping I. Lee, William R. Good, editors*. 1987.
22. Chien, Y.W., *Drug Delivery: Controlled Release*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick, Editor. 2006, CRC Press. p. 1082-1103.
23. Dash, S., et al., *Kinetic Modeling on Drug Release from Controlled Drug Delivery Systems*. Vol. 67. 2010. 217-23.
24. Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. 13(2): p. 123-133.
25. Ahmad, M., et al., *Comprehensive Review on Magnetic Drug Delivery Systems: A Novel Approach for Drug Targeting*. Vol. 2. 2013.
26. Häfeli, U.O., *Magnetically modulated therapeutic systems*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. 277(1): p. 19-24.
27. Hedayatnasab, Z., F. Abnisa, and W.M.A.W. Daud, *Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application*. Materials & Design, 2017. 123: p. 174-196.
28. Tran, N. and T.J. Webster, *Magnetic nanoparticles: biomedical applications and challenges*. Journal of Materials Chemistry, 2010. 20(40): p. 8760-8767.
29. Tomitaka, A., et al., *Biocompatibility of various ferrite nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using HeLa cells*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2009. 321(10): p. 1482-1484.
30. Laurent, S., et al., *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications*. Chemical Reviews, 2008. 108(6): p. 2064-2110.
31. Massart, R., *Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media*. IEEE Transactions on Magnetics, 1981. 17(2): p. 1247-1248.

32. Reddy, L.H., et al., *Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications*. Chemical Reviews, 2012. 112(11): p. 5818-5878.
33. Valdiglesias, V., et al., *Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2016. 38: p. 53-63.
34. Chomoucka, J., et al., *Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering*. Pharmacological Research, 2010. 62(2): p. 144-149.
35. Li, L., et al., *Preparation of Core-shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Recognition of Bovine Hemoglobin*. Chemistry – An Asian Journal, 2009. 4(2): p. 286-293.
36. Wackerlig, J. and R. Schirhagl, *Applications of Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles and Their Advances toward Industrial Use: A Review*. Analytical Chemistry, 2016. 88(1): p. 250-261.
37. P. Branchaud, B., *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology Edited by Mingdi Yan (Portland State University) and Olof Ramström (Royal Institute of Technology, Stockholm)*. Marcel Dekker: New York. 2005. xiv + 734 pp. \$179.95. ISBN 0-8247-5353-4. Vol. 127. 2005.
38. Alvarez-Lorenzo, C., *Handbook of Molecularly Imprinted Polymers*, A. Concheiro, Editor. 2014, iSmithers Rapra Publishing.
39. Sellergren, B. and A.J. Hall, *Chapter 2 - Fundamental aspects on the synthesis and characterisation of imprinted network polymers*, in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, B. Sellergren, Editor. 2001, Elsevier. p. 21-57.
40. Jiles, D., *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*. 1991, Springer-Science+Business Media, B.V. p. 1-26.
41. M Moskowitz, B., *Hitchhiker's Guide to Magnetism*. 2018.
42. Kolhatkar, A.G., et al., *Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. 14(8): p. 15977-16009.
43. Neuberger, T., et al., *Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005. 293(1): p. 483-496.
44. Hugh D. Young, R.A.F., *University Physics with Modern Physics* 12th ed. Vol. 2. 2009: Pearson Education, Inc. 900.
45. D. Halliday, R.R., K. S. Krane, *Física Versión Ampliada*. Vol. 2. 1994: Editorial Continental. 691.
46. Liu, B., et al., *Highly-Controllable Molecular Imprinting at Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Ultrafast Enrichment and Separation*. The Journal of Physical Chemistry C, 2011. 115(35): p. 17320-17327.
47. Cruz-Montoya, E.D.L. and C. Rinaldi, *Synthesis and characterization of polymer nanocomposites containing magnetic nanoparticles*. Journal of Applied Physics, 2010. 107(9): p. 09B506.
48. Li, L., et al., *Temperature and magnetism bi-responsive molecularly imprinted polymers: Preparation, adsorption mechanism and properties as drug delivery system for sustained release of 5-fluorouracil*. Materials Science and Engineering: C, 2016. 61: p. 158-168.

49. Gao, R., et al., *Preparation and characterization of uniformly sized molecularly imprinted polymers functionalized with core-shell magnetic nanoparticles for the recognition and enrichment of protein*. Journal of Materials Chemistry, 2011. 21(44): p. 17863-17871.
50. Hashemi-Moghaddam, H., et al., *Evaluation of magnetic nanoparticles coated by 5-fluorouracil imprinted polymer for controlled drug delivery in mouse breast cancer model*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. 497(1): p. 228-238.
51. Kaamyabi, S., D. Habibi, and M.M. Amini, *Preparation and characterization of the pH and thermosensitive magnetic molecular imprinted nanoparticle polymer for the cancer drug delivery*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016. 26(9): p. 2349-2354.
52. Lin, L., et al., *Preparation of Core-shell Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Nanoparticles for Recognition of Bovine Hemoglobin*. Chemistry – An Asian Journal, 2009. 4(2): p. 286-293.
53. Zhu, L.-L., Y.-H. Cao, and G.-Q. Cao, *Preparation and Application of Core-shell Magnetic Imprinted Nanoparticles for Bisphenol A*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013. 41(11): p. 1724-1728.
54. Xiaobing, W., et al., *Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Particles Synthesized by Suspension Polymerization in Silicone Oil*. Macromolecular Rapid Communications, 2006. 27(14): p. 1180-1184.
55. Türkmen, D., et al., *Molecular imprinted magnetic nanoparticles for controlled delivery of mitomycin C*. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2014. 42(5): p. 316-322.
56. Wilczewska, A.Z., et al., *Nanoparticles as drug delivery systems*. Pharmacological Reports, 2012. 64(5): p. 1020-1037.
57. Niu, M., C. Pham-Huy, and H. He, *Core-shell nanoparticles coated with molecularly imprinted polymers: a review*. Microchimica Acta, 2016. 183(10): p. 2677-2695.
58. McMurry, J., *Química Orgánica*. 5ta Edición ed. 2001: International Thomson Editores.
59. Suryanarayanan, R., *X-Ray Powder Diffractometry*, in *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, J. Swarbrick, Editor. 2007: Pinehurst, North Carolina, USA. p. 4103-4116.
60. Vernon-Parry, K.D., *Scanning electron microscopy: an introduction*. III-Vs Review, 2000. 13(4): p. 40-44.
61. Ducati, J.M.T.a.C., *Transmission Electron Microscopy*, in *Characterization of Solid Materials and Heterogeneous Catalysts*.
62. Fultz, B., *The TEM and its Optics*, in *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. , B. Fultz, Editor. 2008, Springer: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 62-63.
63. Natividad, E. and I. Andreu, *Characterization of Magnetic Hyperthermia in Magnetic Nanoparticles*, in *Magnetic Characterization Techniques for Nanomaterials*, C.S.S.R. Kumar, Editor. 2017, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 261-303.
64. Viades Trejo, J., *Fisicoquímica Farmacéutica (0108) Unidad 2. Fenómenos Superficiales en Sistemas Farmacéuticos*. 2012.
65. Hua, X., et al., *Magnetically triggered drug release from nanoparticles and its applications in anti-tumor treatment*. Drug Delivery, 2017. 24(1): p. 511-518.
66. Hussain, S., et al., *A novel core@shell magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples*. Reactive and Functional Polymers, 2016. 106: p. 51-56.

67. 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*, 2015. 7(45): p. 18891-18896.
68. D'Souza, S., *A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms*. Vol. 2014. 2014.
69. De Jong, W.H. and P.J.A. Borm, *Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards*. *International Journal of Nanomedicine*, 2008. 3(2): p. 133-149.
70. Chen, X., *Modeling of Experimental Adsorption Isotherm Data*. *Information*, 2015. 6(1): p. 14.
71. Ayawei, N., A.N. Ebelegi, and D. Wankasi, *Modelling and Interpretation of Adsorption Isotherms*. *Journal of Chemistry*, 2017. 2017: p. 11.
72. Polo-Corrales, L. and C. Rinaldi, *Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers*. *Journal of Applied Physics*, 2012. 111(7): p. 07B334.
73. Latorre-Esteves, M. and C. Rinaldi, *Applications of Magnetic Nanoparticles in Medicine: Magnetic Fluid Hyperthermia*. Vol. 28. 2009. 227-38.
74. Béalle, G., et al., *Surface decoration of cationic vesicles with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: a model system for triggered release under moderate temperature conditions*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014. 16(9): p. 4077-4081.
75. Brulé, S., et al., *Doxorubicin Release Triggered by Alginate Embedded Magnetic Nanoheaters: A Combined Therapy*. *Advanced Materials*, 2011. 23(6): p. 787-790.
76. Kumar, C.S.S.R. and F. Mohammad, *Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. 63(9): p. 789-808.
77. Chang, D., et al., *Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations*. *Frontiers in pharmacology*, 2018. 9: p. 831-831.
78. Shaterabadi, Z., Nabiyouni G., Soleymani M. , *Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2018. Volume 133: p. 9-19.
79. Kekalo, K., et al., *Magnetic Nanoparticles with High Specific Absorption Rate at Low Alternating Magnetic Field*. *Nano LIFE*, 2015. 5(2): p. 1550002.