



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas magnéticas con polímeros de impronta molecular y su evaluación en la liberación modificada de fármacos”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Leticia Antonio Gutiérrez

Tutor: Dr. Jesús Gracia Mora

Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, UNAM

Ciudad de México, enero de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	Dr. Pandiyán Sarasvathi Thangarasu
Secretario	Dr. Alfonso Ramón García Márquez
Vocal	Dra. América Rosalba Vázquez Olmos
Vocal	Dra. Patricia Guadarrama Acosta
Vocal	Dra. Luz María Melgoza Contreras

Asesor

Dr. Jesús Gracia Mora

Sitio donde se desarrolló el proyecto

Laboratorio 100 del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear del edificio B, Facultad de Química, UNAM y Laboratorio de Sistemas de Liberación de Fármacos del Departamento de Farmacia, edificio F-1, Facultad de Química, UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México; por la huella que ha dejado en mi como persona y profesional, por acogerme durante tanto tiempo y brindarme las herramientas para superarme en muchos aspectos.

A mi *alma mater*, la Facultad de Química, lugar que me formó y brindó los conocimientos necesarios para desenvolverme profesionalmente.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, con el número de becario: 629452.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para la presentación de este trabajo en el congreso “22nd International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations” en Valencia, España.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el apoyo PAPIIT IT201518 “Síntesis y caracterización de sistemas nanohíbridos superparamagnéticos con posible aplicación en el tratamiento del cáncer”.

A mi asesor, el Dr. Jesús Gracia Mora, por guiarme durante el desarrollo de este trabajo, por la confianza puesta en mí y por darme la oportunidad de continuar en su equipo.

A la Dra. Verónica Henao y al Dr. Iván Darío Rojas, por brindarme su apoyo para la caracterización de mis sistemas; por sus consejos y asesorías para la mejora del proyecto.

Al Dr. Josué Romero, del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por su ayuda para la obtención de las microscopías electrónicas.

Al Dr. Gustavo Tavizon y al Instituto de Física, por el apoyo en la obtención de las curvas de magnetización.

A los miembros del jurado, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y por sus valiosas aportaciones para la mejora de esta.

“La vida es una reacción química que solo requiere de equilibrio”

- Priyavrat Gupta

Contenido

Índice de figuras	10
Índice de tablas	14
Abreviaturas	16
1. Introducción	18
2. Antecedentes	21
2.1 Sistemas de liberación de fármacos	21
2.1.1 Sistemas convencionales de liberación de fármacos	21
2.1.2 Sistemas de liberación modificada	21
2.1.3 Clasificación	23
2.2 Nanoacarreadores como sistemas de liberación para el tratamiento del cáncer ..	24
2.3 Polímeros de impronta molecular para la liberación de fármacos	26
2.3.1 Bases de la impronta molecular	26
2.3.2 Síntesis de polímeros de impronta molecular: consideraciones importantes ..	28
2.3.2.1 Preorganización	28
2.3.3 Polímeros de impronta molecular como sistemas estímulo-respuesta	31
2.4 Nanopartículas magnéticas	32
2.4.1 Superparamagnetismo	32
2.4.2 Teoría de dominio	33
2.4.3 Hipertermia magnética	35
2.4.4 Magnetita	37
2.5 Sistemas teragnósticos	38
2.6 Polímeros de impronta molecular magnéticos	39
2.7 Consideraciones farmacéuticas	42

2.7.1 Isotermas de adsorción.....	42
2.7.2 Modelos cinéticos de liberación	45
3. Planteamiento del problema.....	49
4. Hipótesis.....	51
5. Objetivos	51
5.1 Objetivo general.....	51
5.2 Objetivos particulares	51
6. Metodología experimental	53
6.1 Materiales.....	53
6.2 Síntesis de polímeros de impronta molecular para el fármaco 6 mercaptopurina	53
6.2.1 MIP 6MP en metanol / acetonitrilo (3:7)	53
6.2.2 MIP 6MP en metanol / cloroformo (3:7).....	54
6.3 Caracterización de polímeros de impronta molecular para 6 mercaptopurina	54
6.3.1 Espectroscopia de infrarrojo de los polímeros de impronta molecular obtenidos.....	54
6.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	54
6.3.3 Capacidad de adsorción de 6MP	55
6.4 Síntesis de nanopartículas de magnetita por coprecipitación	55
6.5 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros de impronta molecular (MIP) para el fármaco 6 mercaptopurina (6MP)	55
6.5.1 Funcionalización de las nanopartículas.....	55
6.5.2 Síntesis del polímero de impronta usando 6MP como molécula molde	56
6.5.3 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con polímero sin molécula molde (NIP).....	56

6.6 Caracterización de nanopartículas magnéticas (MAG) y de los sistemas MIP y NIP	57
6.6.1 Espectroscopía de infrarrojo y análisis elemental	57
6.6.2 Difracción de rayos X de polvos	57
6.6.3 Morfología y tamaño de partícula	57
6.6.4 Potencial Z	58
6.6.5 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)	59
6.6.6 Magnetometría. Curvas de histéresis de los sistemas	59
6.7 Síntesis del sistema híbrido por hipertermia de las nanopartículas de magnetita.	59
6.8 Caracterización del sistema	60
6.8.1 Cantidad de polímero formado alrededor de las nanopartículas a través del tiempo por TEM.....	61
6.9.1 Estudios de adsorción de los sistemas sintetizados	61
6.9.2 Estudios de liberación de los sistemas	62
6.9.3 Estudios de liberación con hipertermia magnética.....	62
7. Resultados y discusión.....	63
7.1 Síntesis de polímeros de impronta molecular para el fármaco 6 mercaptopurina	63
7.2 Caracterización de polímeros de impronta molecular para 6 mercaptopurina	64
7.2.1 Espectroscopía de infrarrojo de los polímeros de impronta molecular sintetizados	64
7.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los polímeros.....	69
7.2.3 Adsorciones de 6MP de los polímeros en diferentes medios	71
7.3 Síntesis de nanopartículas de magnetita por coprecipitación	77
7.4 Caracterización de nanopartículas magnéticas (MAG).....	77

7.4.1 Espectroscopía de infrarrojo	77
7.4.2 Difracción de rayos X de polvos	78
7.4.3 Tamaño de partícula y potencial Z por Dispersión dinámica de luz (DLS)	80
7.4.4 Microscopía electrónica de transmisión	81
7.5 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas improntadas (MMIP) y no improntadas molecularmente (MNIP)	82
7.6 Caracterización de MNIP y MMIP	83
7.6.1 Espectroscopía de infrarrojo	84
7.6.2 Difracción de rayos X de polvos	88
7.6.3 Análisis elemental	91
7.6.4 Determinación del tamaño de partícula y potencial Z por el método de dispersión dinámica de luz	92
7.6.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM).....	93
7.6.6 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	96
7.6.7 Análisis térmico (TGA y DSC)	98
7.7 Síntesis del sistema híbrido por hipertermia de las nanopartículas de magnetita.	101
7.7.1 Caracterización del sistema	102
7.7.1.1 Espectroscopia de infrarrojo (24 h) y análisis elemental.	102
7.7.1.2 Difracción de rayos X	103
7.7.1.3 Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz	104
7.7.1.4 Cantidad de polímero formado alrededor de las nanopartículas a través del tiempo por TEM.....	105
7.7.2 Magnetometría. Curvas de histéresis de los sistemas	108

7.8 Estudios de adsorción de los sistemas sintetizados con y sin el uso de hipertermia magnética.	109
7.9 Estudios de liberación <i>in vitro</i> de los sistemas.....	115
7.9.1 Estudios de liberación con hipertermia magnética.....	121
8. Conclusiones.....	125
9. Perspectivas.....	126
10. Referencias bibliográficas	127
Anexo 1. Curvas de calibración del fármaco 6 mercaptopurina en distintos medios....	133
Anexo 2. Análisis cualitativo de la formación del recubrimiento polimérico sobre las nanopartículas de magnetita por hipertermia.	137
Anexo 3. Isotermas de adsorción de los sistemas improntados a concentraciones altas.	138

Índice de figuras

Figura 1. Perfiles hipotéticos de la concentración del fármaco en circulación sistémica resultante de la administración consecutiva de dosis múltiples de un sistema de liberación inmediata (A1,A2,...) comparado con el perfil de concentración ideal de fármaco (B) requerido para el tratamiento	22
Figura 2. Concentraciones plasmáticas de fármaco a través del tiempo dadas por distintas formas de administración, así como de formas farmacéuticas de liberación modificada.....	22
Figura 3. Características fisiológicas del tejido tumoral y los vasos sanguíneos que pueden evitar o facilitar la entrega de fármacos a los nanoacarreadores	24
Figura 4. Farmacocinética de agentes nanométricos.....	25
Figura 5. Proceso de la síntesis de un polímero de impronta molecular	27
Figura 6. Afinidad de los sitios de unión en los polímeros de impronta molecular heterogéneos.....	29
Figura 7. Vista esquemática de los diferentes efectos que el proceso de remoción de la molécula molde puede causar en la estructura de las cavidades improntadas.....	31
Figura 8. Curva de magnetización típica para partículas superparamagnéticas	33
Figura 9. Ilustración esquemática de la relación coercitividad-tamaño de partículas pequeñas.....	34
Figura 10. Mecanismos de relajación que influyen en el calentamiento de las nanopartículas magnéticas.....	36
Figura 11. Curva de magnetización de un material ferromagnético.....	37
Figura 12 Organización de la red cristalina de magnetita.....	38
Figura 13. Esquema de los principales factores que pueden afectar la velocidad de liberación del fármaco desde un sistema de liberación basados en polímeros degradables.....	46
Figura 14. Esquema que representa de forma general los pasos llevados a cabo para sintetizar los polímeros de impronta (MIPs).....	63
Figura 15. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional 1-vinilimidazol y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl ₃ (3:7) y MeOH/MeCN (3:7)	66

Figura 16. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional 4-vinilpiridina y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl ₃ (3:7) y MeOH/MeCN (3:7)	67
Figura 17. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional ácido itacónico y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl ₃ (3:7) y MeOH/MeCN (3:7)	68
Figura 18. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional ácido metacrílico y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/MeCN (3:7) y MeOH/MeCN (3:7)	69
Figura 19. Termogramas de los cuatro polímeros sintetizados en MeOH/MeCN (3:7). Condiciones: 30-340 °C, atmósfera de N ₂ y velocidad 20 °C/min.	70
Figura 20. Estudios de adsorción de los polímeros sintetizados en distintos medios....	72
Figura 21. Cantidad de 6MP adsorbida por cada polímero en buffer de fosfatos pH= 7,4.	73
Figura 22. Cantidad de 6MP adsorbida para cada polímero en medio MeOH.	73
Figura 23. Cantidad de 6MP adsorbida para cada polímero en medio MeOH/MeOH (3:7).	74
Figura 24. Cantidad adsorbida de 6MP (Q) por cada polímero en los diferentes medios de adsorción.....	74
Figura 25. Gráfico de medias obtenido por el método de LSD de Fisher al 95% de confianza para la cantidad de 6MP adsorbida (µg/g) por los polímeros sintetizados con la mezcla 3:7 MeOH/MeCN, y por los polímeros sintetizados con la mezcla 3:7 MeOH/CHCl ₃	76
Figura 26. Espectro de FTIR obtenido para las partículas de magnetita	77
Figura 27. Patrón de difracción de rayos X de polvos para la magnetita sintetizada por coprecipitación.	79
Figura 28. Dispersión del tamaño de partícula obtenido por la técnica de DLS para las partículas de magnetita.	80
Figura 29. Micrografía TEM para las nanopartículas de magnetita sintetizada por el método de coprecipitación.....	81
Figura 30. Distribución del tamaño de partícula por TEM.....	82
Figura 31. Funcionalización de las nanopartículas de magnetita con ácido metacrílico.	82
Figura 32. Esquema de la síntesis de los sistemas magnéticos recubiertos con polímeros de impronta para 6MP.....	83

Figura 33. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-1VIN y MNIP-1VIN, así como para el monómero funcional 1-vinilimidazol.....	84
Figura 34. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-4VP y MNIP-4VP y para el monómero funcional 4-vinilpiridina	85
Figura 35. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-ITA y MNIP-ITA, así como para el monómero funcional ácido itacónico	86
Figura 36. Espectros de FTIR para los sistemas MNIP-MA y MNIP-MA, así como para el monómero funcional ácido metacrílico	87
Figura 37. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA.	88
Figura 38. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema MMIP-4VP.....	89
Figura 39. Difractograma de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA.	89
Figura 40. Difractograma de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA.	90
Figura 41. Micrografías TEM del sistema MMIP-MA por contraste z.....	94
Figura 42. Micrografías TEM del sistema MMIP-4VP por contraste z.	94
Figura 43. Micrografías de TEM para el sistema MMIP-1VIN por contraste z.....	95
Figura 44. Micrografías de TEM para el sistema MMIP-ITA por contraste z.	95
Figura 45. Micrografía de SEM para el sistema MMIP-MA.....	96
Figura 46. Análisis por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) para el sistema MMIP-MA.....	97
Figura 47. Resultados obtenidos de TGA para los distintos sistemas.....	101
Figura 48. FTIR para magnetita, monómero funcional ácido metacrílico y para el sistema MNIP-MA-HPT.	102
Figura 49. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema NIP-HPT.....	103
Figura 50. Partículas de magnetita funcionalizadas con ácido metacrílico con hipertermia magnética.....	105
Figura 51. Imágenes de contraste z del sistema NIP-HPT después de 1 hora de reacción.	106
Figura 52. Micrografía de TEM para el sistema NIP-HPT después de 24 horas de reacción con exposición al campo magnético alterno.	107
Figura 53. Análisis EDS para el sistema sintetizado por hipertermia NIP-HPT después de 24 horas de reacción.....	107
Figura 54. Curvas de histéresis a 300 K para todos los sistemas MIP y para la magnetita.	108

Figura 55. Esquema del procedimiento realizado para los estudios de adsorción.	109
Figura 56. Isotermas de adsorción para los diferentes sistemas MMIPs y MNIPs.	111
Figura 57. Isotermas de adsorción de 6MP obtenidas para los sistemas MMIPs y MNIPs con sus respectivos ajustes a los modelos de Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich.....	112
Figura 58. Esquema del procedimiento seguido para realizar los estudios de liberación de los sistemas sintetizados.....	116
Figura 59. Perfiles de liberación de los sistemas sintetizados.....	117
Figura 60. Perfiles de liberación para los sistemas MMIPs en presencia de un campo magnético alterno.....	122
Figura 61. Gráfico comparativo de los perfiles de liberación obtenidos para los sistemas MMIP con y sin la aplicación de hipertermia magnética.....	123
Figura 62. Curva de calibración de la 6MP en MeOH	133
Figura 63. Curva de calibración de 6MP en medio MeOH/MeCN (3:7)	134
Figura 64. Curva de calibración de 6MP en medio buffer de fosfatos 0.1M, pH=7,4...	135
Figura 65. Estructura y pKa´s del fármaco 6-mercaptopurina y especie predominante a pH=14.....	136
Figura 66. Diagrama de variación de especies del fármaco 6-mercaptopurina en función del pH.....	136
Figura 67. Micrografías para las partículas con 24 horas de exposición al campo magnético alterno.....	137
Figura 68. micrografía SEM para el sistema MMIP-MA después de 24 horas de exposición al campo magnético durante la síntesis del polímero.....	137
Figura 69. Isotermas de adsorción para los sistemas MMIP a concentraciones altas.	138

Índice de tablas.

Tabla 1. Mecanismo de liberación de fármaco en función del valor de n.....	48
Tabla 2. Claves para los polímeros sintetizados de acuerdo con el monómero funcional y al disolvente empleado para su síntesis.....	64
Tabla 3. Cantidad media de 6MP adsorbida por los distintos polímeros sintetizados en tres medios distintos.....	75
Tabla 4. Tamaño promedio de cristalita para los sistemas sintetizados obtenidos aplicando la ecuación de Scherrer.	91
Tabla 5. Porcentajes en peso de C, H y N para los sistemas sintetizados. En rojo se resaltan los sistemas con mayor porcentaje de nitrógeno.....	91
Tabla 6. Tamaño de partícula y potencial Z obtenidos para todos los sistemas por la técnica de DLS.....	93
Tabla 7. Resultados de tamaño de partícula y potencial z obtenidos por DLS.	104
Tabla 8. Coeficientes de determinación obtenidos del ajuste de las isothermas de adsorción a diferentes modelos. Los números en rojo representan al modelo de mejor ajuste.....	113
Tabla 9. Coeficientes asociados a los modelos utilizados de los ajustes de isoterma.	114
Tabla 10. Sitios de unión de mediana afinidad calculados para los sistemas ajustados a la isoterma Langmuir-Freundlich.....	115
Tabla 11. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-1VIN.	118
Tabla 12. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-1VIN.....	118
Tabla 13. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-MA.	118
Tabla 14. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-ITA.....	119
Tabla 15. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-4VP.....	119
Tabla 16. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-MA.....	119
Tabla 17. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-4VP.....	120
Tabla 18. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-ITA.....	120
Tabla 19. Parámetros calculados para el ajuste no lineal Peppas-Sahlin de los diferentes sistemas.....	121
Tabla 20. Cantidad de 6MP liberada para los sistemas MMIPs con y sin el uso de hipertermia durante la liberación.....	123

Tabla 21. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH y sus valores de absorbancia.....	133
Tabla 22	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 23. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH/MeCN (3:7) y sus valores de absorbancia.	134
Tabla 24. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH y sus valores de absorbancia.....	135

Abreviaturas

MIP	Polímeros de impronta molecular
NPM	Nanopartículas magnéticas
RMI	Resonancia Magnética de Imagen
CME	Campo magnético externo
MMIPs	Polímeros de impronta molecular magnéticos
6MP	6 mercaptopurina
SLF	Sistema de liberación de fármacos
EPR	Efecto Permeación y Retención
RES	Sistema Retículo Endotelial
PMIPs	Polímeros improntados molecularmente.
TEM	Microscopía electrónica de transmisión.
SEM	Microscopía electrónica de barrido
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
EGDMA	Dimetilacrilato de etilenglicol
DLS	Dispersión dinámica de luz
AIBN	Azobisisobutironitrilo
NPM	Nanopartículas magnéticas
MMIP-MA	Nanopartículas magnéticas recubiertas con ácido metacrílico
MMIP-ITA	Nanopartículas magnéticas hidrofóbicas sin impronta molecular
MMIP-4VP	Polímeros de impronta molecular magnéticos. Monómero 4-vinilpiridina.
MMIP-1VIN	Polímeros de impronta molecular magnéticos. Monómero 1-vinilimidazol.
MNIP-MA	Polímeros de impronta molecular magnéticos. No improntado. Monómero ácido metacrílico.
MNIP-ITA	Polímeros de impronta molecular magnéticos. No improntado. Monómero ácido itacónico.
MNIP-4VP	Polímeros de impronta molecular magnéticos. No improntado. Monómero 4-vinilpiridina.

MNIP-1VIN	Polímeros de impronta molecular magnéticos. No improntado. Monómero 1-vinilimidazol.
Rpm	Revoluciones por minuto
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
TGA	termogravimetría
SS	Suma de cuadrados
AIC	Criterio de Akaike
MSC	Criterio de selección de modelo

1. Introducción

El cáncer es un padecimiento cuya característica definitoria es la multiplicación rápida de células anormales que, al extenderse más allá de sus límites habituales, pueden invadir otras partes del cuerpo, proceso que se conoce como *metástasis*. Este padecimiento ha sido la principal causa de muerte a nivel mundial causando 8,8 millones de muertes en 2015.¹ En México el panorama no es distinto, ya que el cáncer se mantiene como la tercera causa de muerte, habiendo provocado en 2017 el 12% de total de las defunciones.²

Actualmente existen distintos tratamientos contra el cáncer de entre los cuales destacan tres: cirugía, radioterapia y quimioterapia. Aunque esta última es la más empleada, al no ser específica, trae consigo múltiples efectos secundarios que afectan la calidad de vida del paciente. Para evitar esto, se han estudiado distintos materiales que sirvan como acarreador del fármaco a administrar, y a su vez otorguen al sistema la capacidad de vectorización, liberando el fármaco en el sitio de acción y no de forma caótica, aprovechando las condiciones específicas del microambiente y la respuesta del material a dichas condiciones.^{3,4}

Los polímeros de impronta molecular (MIP por sus siglas en inglés) son materiales poliméricos que imitan a los receptores biológicos en su capacidad de reconocimiento de un ligando específico.⁵ Han tenido un gran auge en los últimos años debido a su gran versatilidad, teniendo aplicaciones en distintas áreas, principalmente la química analítica, sin embargo, los estudios dedicados a la entrega de fármacos, en particular en los sistemas de liberación inteligentes (balas mágicas), tienen un futuro prometedor.⁶

Los dos requerimientos esenciales de un sistema de liberación de fármaco son la capacidad de direccionalidad al área blanco y la liberación controlada del fármaco, lo cual no es fácil de lograr. Se cree que los MIPs son capaces de cumplir con la liberación controlada de fármacos, por lo que se ha mostrado un interés considerable en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de este tipo basados en MIPs.

La principal ventaja de utilizar polímeros de impronta es que las cavidades formadas en la red polimérica durante la polimerización imitan a la molécula molde en tamaño, forma y grupos funcionales. Esas cavidades entonces actúan como un sitio de unión específico

que reconoce selectivamente a la molécula molde. Sin embargo, los polímeros de impronta molecular típicos por sí solos carecen de características de vectorización o direccionamiento, por lo que es necesario acoplarlos a otro material que pueda proveer esta capacidad y que sea bajo en toxicidad para el organismo. De esta forma, se considera conveniente unir los MIPs con nanopartículas inorgánicas⁷, siendo los más predominantes los sistemas híbridos basados en la combinación de los polímeros de impronta con nanopartículas magnéticas.⁸⁻¹⁰

Las nanopartículas magnéticas (NPM) son un tipo especial de nanomateriales ampliamente usados en aplicaciones biomédicas, teniendo un rol importante debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, fácil modificación de superficie y propiedades magnéticas. A menudo, estas partículas son utilizadas para la detección y el tratamiento de enfermedades, particularmente como acarreadores de fármaco, como terapéutico en hipertermia magnética, y como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI).¹¹⁻¹³

La magnetita (Fe_3O_4) es el material magnético mayormente utilizado en biomedicina y biotecnología debido a su baja toxicidad, fácil preparación, magnetismo y biocompatibilidad.¹⁴ Además, debido a sus propiedades superparamagnéticas en cierto rango de tamaños, las NPM pueden ser controladas y dirigidas a la región patológica deseada usando campos magnéticos externos (CME).

La mejora de las propiedades biomédicas y la capacidad de carga de fármaco de estas partículas se puede lograr recubriéndolas con distintos materiales, entre los que se encuentran los polímeros orgánicos, mismos que a su vez pueden ser sintetizados por la técnica de impronta molecular.

La ventaja particular de los polímeros de impronta molecular magnéticos (MMIPs) es el hecho de que combinan las propiedades magnéticas de las nanopartículas con la alta capacidad de reconocimiento de los polímeros de impronta molecular en una sola estructura híbrida funcional, lo que permite obtener un sistema cuya entrega del fármaco se de en el sitio blanco, disminuyendo la dosis y mejorando la eficiencia de los fármacos, resultando a su vez en una reducción de los efectos adversos en tejidos normales.¹⁴

La 6-mercaptopurina (6-MP), es un fármaco antineoplásico que pertenece al grupo de los antimetabolitos. Posee propiedades inmunosupresoras y está indicado en el tratamiento

de la leucemia.¹⁵ Es un fármaco de clase II (baja solubilidad y alta permeabilidad) según el sistema de clasificación biofarmacéutica y tiene un tiempo de vida media de 1.5 h. La 6-mercaptopurina también posee potentes propiedades ácido-base (con pKa: 2.99 y 9.5) que ofrecen una gran variedad de sitios de unión metálicos, es por ello que se ha seleccionado como fármaco modelo para el desarrollo del presente proyecto.

Hasta ahora, hay pocos trabajos reportados que utilicen dicho fármaco para la impronta molecular, debido a su baja solubilidad en disolventes orgánicos, por lo que en este trabajo se reporta la síntesis de distintos sistemas formados por nanopartículas de magnetita recubiertas con distintos polímeros de impronta molecular, utilizando al fármaco 6-MP como molécula molde, así como su evaluación como sistema de liberación de fármacos.

2. Antecedentes

2.1 Sistemas de liberación de fármacos.

2.1.1 Sistemas convencionales de liberación de fármacos

Por muchas décadas, los tratamientos para una enfermedad aguda o padecimientos crónicos han sido llevados a cabo usando varias formas de dosis farmacéuticas, incluyendo tabletas, cápsulas, supositorios, cremas, ungüentos, líquidos, inyectables y aerosoles como acarreadores. Incluso hoy, esos sistemas de liberación son los productos de elección a menudo vistos en el mercado farmacéutico.

Este tipo de sistemas son conocidos por proveer una liberación inmediata del fármaco, por lo que para alcanzar y mantener la concentración en el organismo y el rango terapéutico efectivo necesario para el tratamiento, a menudo es necesario tomar este tipo de sistema varias veces al día, lo que resulta en una fluctuación significativa en los niveles del fármaco.¹⁶ La principal desventaja, es que los sistemas de liberación de fármacos convencionales van a menudo acompañados por efectos adversos sistémicos, que se atribuyen principalmente a su biodistribución no específica y a características incontrolables de la liberación del fármaco.¹⁷

2.1.2 Sistemas de liberación modificada

Los sistemas de liberación modificada están diseñados para mejorar la terapia farmacéutica, ideados para permitir un mayor control en la exposición de fármaco a través del tiempo, ayudar al fármaco a cruzar barreras fisiológicas, protegerlo de la eliminación prematura y llevarlo al sitio de acción deseado, mientras se minimiza al mismo tiempo la exposición sistémica al fármaco.¹⁸

Estos sistemas ofrecen claras ventajas sobre las terapias farmacéuticas convencionales, por ejemplo, después de la administración de la dosis farmacéutica de un sistema convencional, los niveles del fármaco en la sangre se elevan, llegan a un máximo y entonces cae. Debido a que cada fármaco tiene un rango terapéutico sobre el que es tóxico y debajo del cual es inefectivo, la oscilación de los niveles del fármaco puede causar periodos alternantes de inefectividad y toxicidad (*Figura 1*). Aunque las preparaciones de liberación sostenida atenúan los picos y los valles, no los eliminan. En

contraste, un sistema de liberación controlada mantiene el fármaco en el rango terapéutico deseado con una simple administración (*Figura 2*).¹⁹

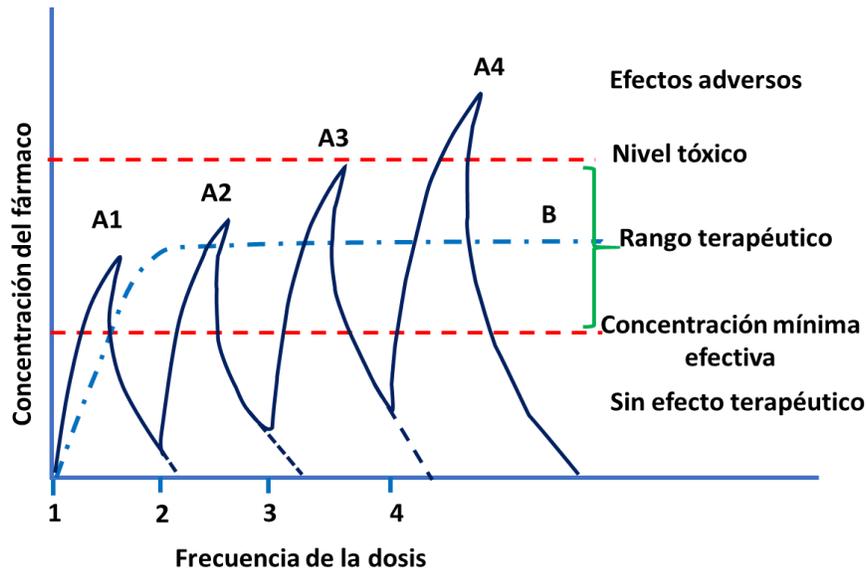


Figura 1. Perfiles hipotéticos de la concentración del fármaco en circulación sistémica resultante de la administración consecutiva de dosis múltiples de un sistema de liberación inmediata (A1,A2,...) comparado con el perfil de concentración ideal de fármaco (B) requerido para el tratamiento. (Adaptado de referencia¹⁶)

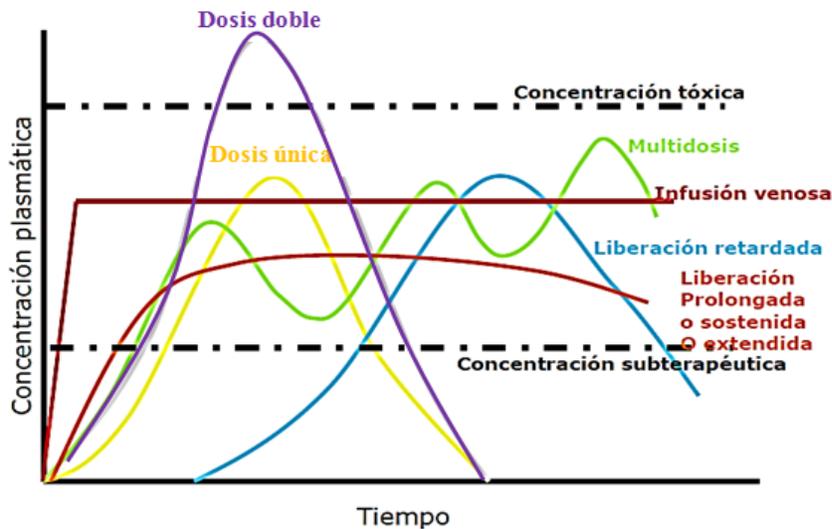


Figura 2. Concentraciones plasmáticas de fármaco a través del tiempo dadas por distintas formas de administración, así como de formas farmacéuticas de liberación modificada. (Adaptada de referencia ²⁰)

Los sistemas de liberación controlada entregan el fármaco en una cantidad predeterminada por un periodo de tiempo definido. En general, la velocidad de la liberación es determinada por el diseño de los sistemas y pueden ser (o no) independientes de las condiciones ambientales como el pH. Estos sistemas pueden

también entregar fármacos por largos periodos de tiempo (días o meses), disminuyendo la frecuencia de la dosis.

2.1.3 Clasificación

Basados en su sofisticación técnica, los sistemas de liberación de fármacos (SLF) han sido clasificados en cuatro categorías:¹⁶

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

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

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

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

4.- dirigidos al sitio: Sistemas vectorizados mediante el uso de moléculas de reconocimiento molecular y/o sensibles a estímulos que reconocen características de la enfermedad. El direccionamiento de estos sistemas puede conseguirse utilizando la sobreexpresión de transportadores y receptores en la membrana de las células cancerígenas, o bien, haciendo uso de estímulos externos o internos.

2.2 Nanoacarreadores como sistemas de liberación para el tratamiento del cáncer

Un aspecto emergente en el campo de la terapia medicinal es la liberación de fármacos vía nanopartículas. Los nanoacarreadores farmacéuticos son descritos como acarreadores de fármaco de tamaño submicrométrico (<200 nm de diámetro aproximadamente) con o sin características biodegradables.²¹

El uso de nanopartículas aumenta la eficacia terapéutica con riesgos reducidos de reacciones adversas y añade ventajas al fármaco tales como aumento de la solubilidad, mejora de estabilidad, tiempos de exposición prolongados, entrega selectiva a los sitios de acción y disminución de la resistencia a la permeación.²²

Se cree que los sistemas de liberación de fármacos nanoparticulados pueden ser muy útiles en el tratamiento de algunos tipos de cáncer debido a que aumenta el efecto de permeación y retención (EPR).^{23,24} Comparado a los tejidos normales, los tumores tienen grandes fenestraciones en las paredes capilares que permiten el paso de las nanopartículas de tamaños mayores a 10 nm (*Figura 3*); dichas fenestraciones pueden medir cientos de nanómetros (380-780 nm), dependiendo del tumor.^{25,26} El fármaco cargado en las nanopartículas es de esta forma relativamente más accesible a tejidos tumorales comparados con los tejidos sanos.¹⁸

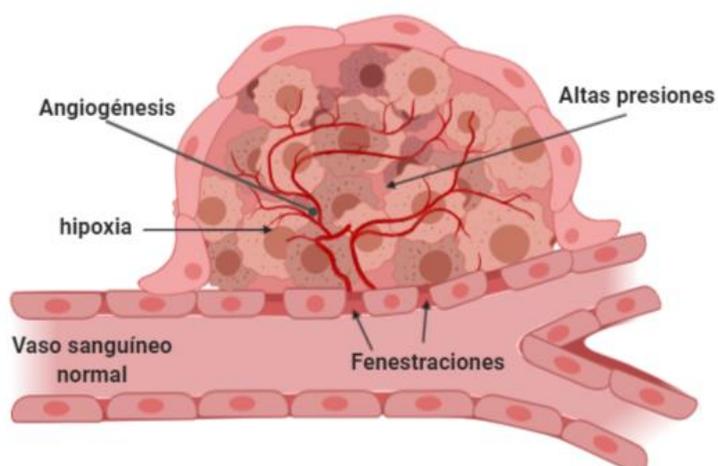


Figura 3. Características fisiológicas del tejido tumoral y los vasos sanguíneos que pueden evitar o facilitar la entrega de fármacos a los nanoacarreadores. (Fuente: Antonio, G., L. Adaptado de Kobayashi, H., 2014)²³

Las partículas adecuadamente recubiertas exhiben opsonización reducida y bajo aclaramiento por el sistema retículo endotelial (RES por sus siglas en inglés) y el aclaramiento renal es evitado cuando las nanopartículas son más grandes que los poros glomerulares.^{23,27} De esta forma, la vida media en circulación de las nanopartículas y su fármaco asociado se prolonga (*Figura 4*).

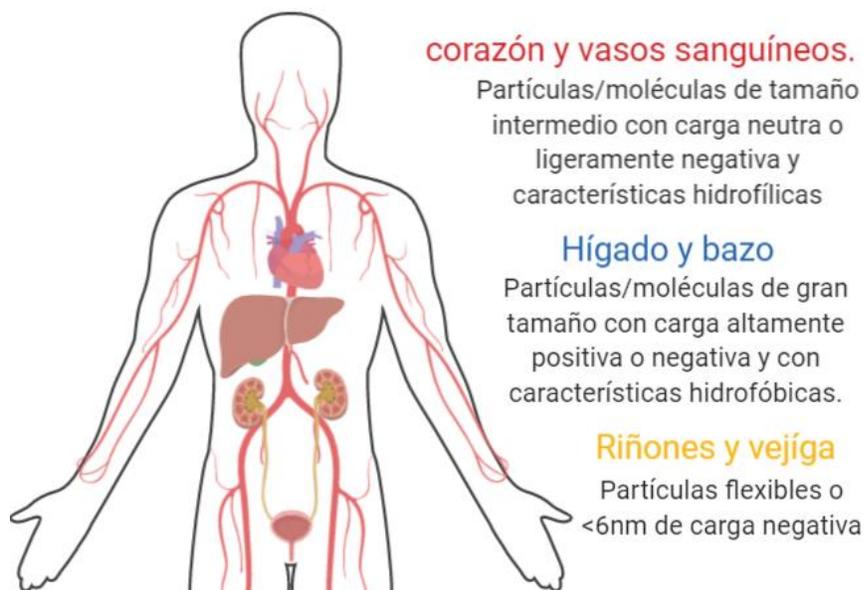


Figura 4. Farmacocinética de agentes nanométricos. Los nanoacarreadores que pueden evadir el efecto EPR deberían permanecer por más tiempo en circulación. (Fuente Antonio, G., L. Adaptado de Kobayashi, H., 2014)²³

Para asegurar el uso potencial en la clínica de estos sistemas, el material debe cumplir con las siguientes características esenciales: I) biocompatibilidad y biodegradabilidad suficientes; (II) buena estabilidad en condiciones fisiológicas; y (III) alta capacidad de carga de fármacos y baja toxicidad.^{17,28}

Los aspectos clave en la ingeniería y diseño de nanoacarreadores es tratar con el tamaño de partícula, propiedades superficiales y la liberación del fármaco para cumplir los objetivos específicos, por lo que la caracterización de estos materiales es crítica para controlar su comportamiento tanto *in vitro* como *in vivo*.^{21,29}

Con lo anterior en mente, se han desarrollado distintos sistemas nanoparticulados para la entrega de fármacos que incluyen liposomas, nanopartículas de auto-ensamble, poliméricas, lipídicas, entre otros.^{3,22}

2.3 Polímeros de impronta molecular para la liberación de fármacos

En el caso particular de la entrega de fármacos, los polímeros de impronta molecular han sido estudiados recientemente debido a que tienen la capacidad de controlar la liberación del fármaco a través de la modulación de la afinidad entre el fármaco y el polímero.³⁰ La liberación controlada por afinidad involucra cambios físicos reversibles en el arreglo espacial de los grupos químicos de la red polimérica que, cooperativamente, se unen al fármaco. Los sistemas que utilizan la técnica de impronta molecular intentan ir más allá en la imitación de la habilidad de reconocimiento que tienen las moléculas naturales (enzimas y anticuerpos), diseñando la red entera con receptores específicos capaces de reconocer el fármaco.³⁰

2.3.1 Bases de la impronta molecular

Los polímeros de impronta molecular son materiales poliméricos entrecruzados que exhiben una alta capacidad de unión y selectividad por una molécula blanco (horma o molde) que se encuentra presente en el proceso de síntesis. En otras palabras, imitan a los receptores biológicos en su capacidad de reconocimiento hacia un ligando específico.

En disolución, la molécula molde interactúa con los monómeros funcionales y la estructura de esos agregados o complejos es mantenida por la copolimerización en presencia de una cantidad de entrecruzador en una relación estequiométrica mucho mayor con respecto a la horma. La molécula molde es adicionada al medio con el fin de causar el arreglo de los monómeros como función de su afinidad por la horma. El arreglo se vuelve permanente por la polimerización con un entrecruzador. Cuando las moléculas molde se remueven de la red polimérica, se crean cavidades complementarias en tamaño y grupos funcionales a aquellas de la molécula molde. Dichas cavidades pueden volver a unirse a la horma mostrando una alta afinidad y selectividad.³⁰

Después de la polimerización, la molécula molde es removida de la matriz polimérica, dejando entonces cavidades con sitios de unión específicos en el material (*Figura 5*).³¹

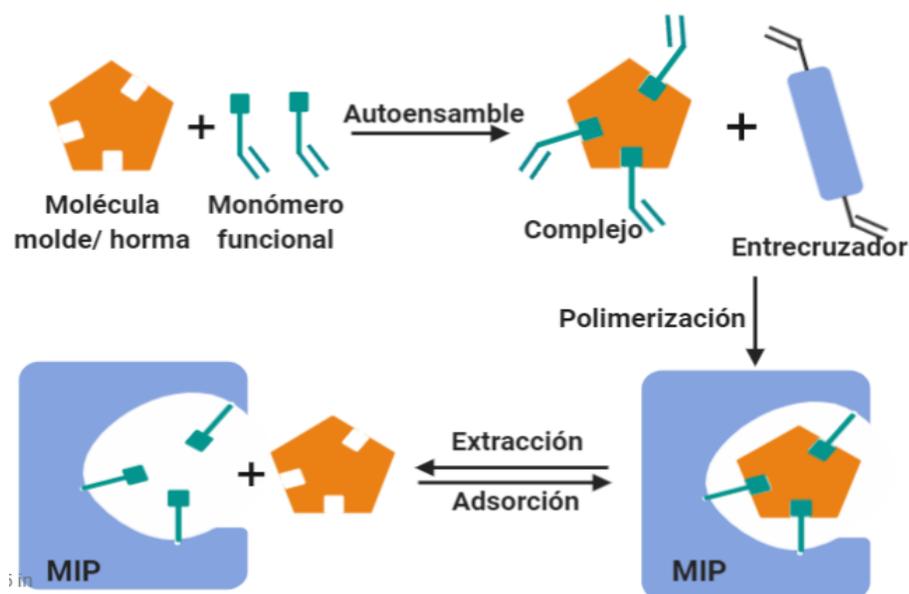


Figura 5. Proceso de la síntesis de un polímero de impronta molecular (Con base en Yilmaz, E., 2004).³²

En la mezcla previa a la polimerización, la molécula molde que se encuentra disuelta, puede interactuar con el monómero funcional mediante interacciones del tipo covalente, no covalente o de coordinación. Debido a esto, la impronta molecular puede ser clasificada en impronta covalente (enfoque pre-organizado), impronta no covalente (enfoque de auto ensamble) o impronta de coordinación; todo lo anterior de acuerdo con el tipo de interacciones involucradas entre las especies en la mezcla de pre-polimerización y durante las adsorciones.⁵

En el enfoque pre-organizado o covalente, la molécula molde es unida covalentemente a los monómeros previo a la polimerización. Después de la síntesis del polímero, esos enlaces se rompen para formar las cavidades improntadas.

Por otro lado, en el enfoque de auto ensamble o no covalente, propuesto en 1980 por Arshady, Mosbach y colaboradores³³, la molécula molde y los monómeros funcionales establecen interacciones del tipo puentes de hidrógeno, hidrofóbico o de transferencia de carga antes de la polimerización para formar complejos estables y solubles de estequiometría apropiada. Debido a que las interacciones son relativamente débiles, se requieren múltiples sitios de interacción entre la molécula molde y los monómeros funcionales para crear complejos fuertes. En general, este enfoque permite

combinaciones más versátiles de moléculas molde y monómeros y provee cinéticas de asociación y disociación más rápidas que el enfoque de impronta covalente.¹⁸

2.3.2 Síntesis de polímeros de impronta molecular: consideraciones importantes

Sin tener en cuenta el proceso utilizado para la síntesis del polímero, la preparación de los MIPs requiere de la copolimerización de los complejos monómero funcional-molécula molde con grandes proporciones del agente entrecruzador y la subsecuente remoción de la horma para crear los sitios de reconocimiento. Entonces, ambos, el paso de polimerización y el proceso de remoción de la horma son críticos para obtener buenos sitios de impronta. A continuación, se describen los aspectos más importantes que se deben tomar en cuenta al sintetizar MIPs.

2.3.2.1 Preorganización

Cuando se realizan polímeros de impronta molecular con el enfoque de auto ensamble, el punto crítico a considerar es la etapa de prearreglo o preorganización, donde un complejo se forma entre la molécula molde y uno o varios monómeros funcionales. Se asume que entre más estable o fuerte sea este complejo, más selectivo será el MIP.

La eficiencia de la formación de un complejo monómero funcional-molécula molde estable durante la etapa de prearreglo y la subsecuente obtención de sitios de alta especificidad y afinidad, dependen a su vez de varios factores que se mencionan a continuación.

2.3.2.2 Molécula molde y monómeros funcionales

Las características requeridas para que una molécula (fármaco) pueda ser utilizada como molécula molde en la impronta molecular, son dos: no debe tener grupos polimerizables y debe tener una alta estabilidad en las condiciones de síntesis de la red polimérica.³⁴ En cuanto al monómero funcional, se busca que tenga sitios que puedan interactuar reversiblemente con la molécula molde para formar los sitios de unión. Los monómeros de acrilatos son los más comúnmente utilizados debido a que fácilmente participan en la polimerización por radicales libres.³⁵

En la literatura, usualmente se reporta la proporción monómero-horma como 4:1, que permite la existencia de complejos de diferentes estequiometrías: aquellos con la estequiometría óptima (específica para cada par horma: monómero funcional), aquellos en los que el monómero está en exceso y aquellos sin suficiente monómero. El resultado final es la coexistencia en el MIP de un pequeño número de cavidades con mediana o alta afinidad (0.5-1% de los sitios de unión teóricos) y un gran número de cavidades con baja afinidad de unión (*Figura 6*).^{5,36}

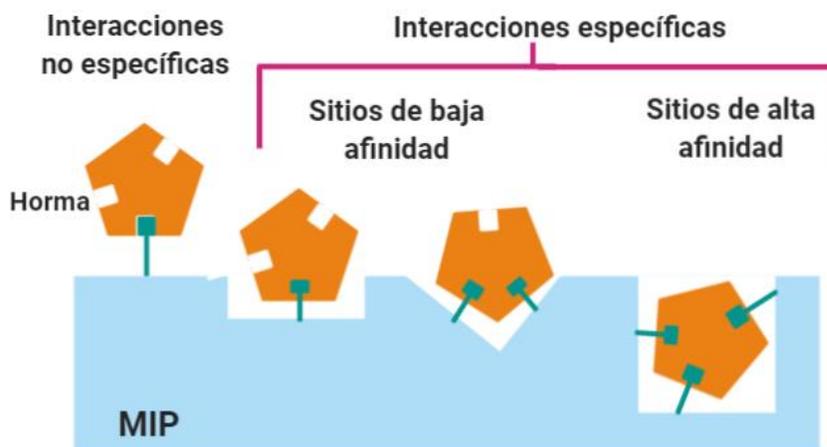


Figura 6. Afinidad de los sitios de unión en los polímeros de impronta molecular heterogéneos. (Fuente: Antonio, G. L. Adaptada de Karim, K., 2005)⁵

2.3.2.3 Disolvente

El disolvente no debe impedir la interacción entre la horma y el monómero funcional y debe impedir a su vez, la precipitación del complejo formado.³⁷ Esto es particularmente crítico en el caso del enfoque de impronta molecular no covalente. Los disolventes no polares son preferidos para incrementar la probabilidad de la formación de enlaces de hidrógeno (limitando su uso solo por problemas de compatibilidad con algunas moléculas molde como péptidos, oligonucleótidos, o azúcares), mientras que el agua y otros disolventes polares facilitan las interacciones hidrofóbicas, aunque disminuyen la afinidad y la selectividad de los MIPs para la molécula molde por la debilidad de las interacciones electrostáticas y de puentes de hidrógeno.

Por otro lado, la proporción del disolvente en la mezcla de reacción determina la porosidad y el tamaño de los MIPs; bajas proporciones permiten la obtención de

polímeros altamente entrecruzados, mientras que grandes proporciones crean sistemas porosos poco entrecruzados.^{36,37}

2.3.2.4 Entrecruzador

El entrecruzador usualmente está en mayor proporción para asegurar que las cavidades tengan una estructura suficientemente estable para mantener la conformación en ausencia de la horma. Una conformación rígida también confiere al MIP resistencia al estrés mecánico y a los ataques enzimáticos que estos pueden sufrir durante su uso subsecuente. Por otro lado, una alta proporción del entrecruzador también puede impedir la extracción de la molécula molde después de la síntesis al crearse sitios no accesibles al disolvente.^{30,38}

Para optimizar la calidad de la impronta evitando el método de prueba-error, los MIPs pueden ser diseñados racionalmente por un análisis computacional, simulando las interacciones bajo las condiciones a las que la síntesis del polímero ocurrirá.^{39,40} Además, se pueden hacer aproximaciones de las estabilidades de los complejos caracterizando el proceso de impronta por medio de las contribuciones energéticas de las interacciones ligando-receptor.⁴¹

2.3.2.5 Remoción de la molécula molde

La remoción de la horma es otro paso crítico en la preparación de los MIPs que es poco discutido en la literatura pero que es de suma importancia pues la remoción incompleta de la horma puede disminuir los sitios disponibles para los estudios de adsorción.

Si la horma se extrae en condiciones extremas (calentando bajo presión, con microondas, etc) se puede alterar la estructura de los MIPs causando hinchamiento de las redes poliméricas durante la extracción y el colapso durante la subsecuente desecación, distorsionando los puntos de unión y la fuerza de las interacciones (*Figura 7*).⁴²

Por ello, a pesar de que muchas veces la eficiencia de las inmersiones del polímero en solventes orgánicos o soluciones salinas (incubación) y la extracción continua en un

aparato soxhlet para extraer la molécula molde, está lejos de 100%, estos métodos de extracción siguen siendo los más empleados.

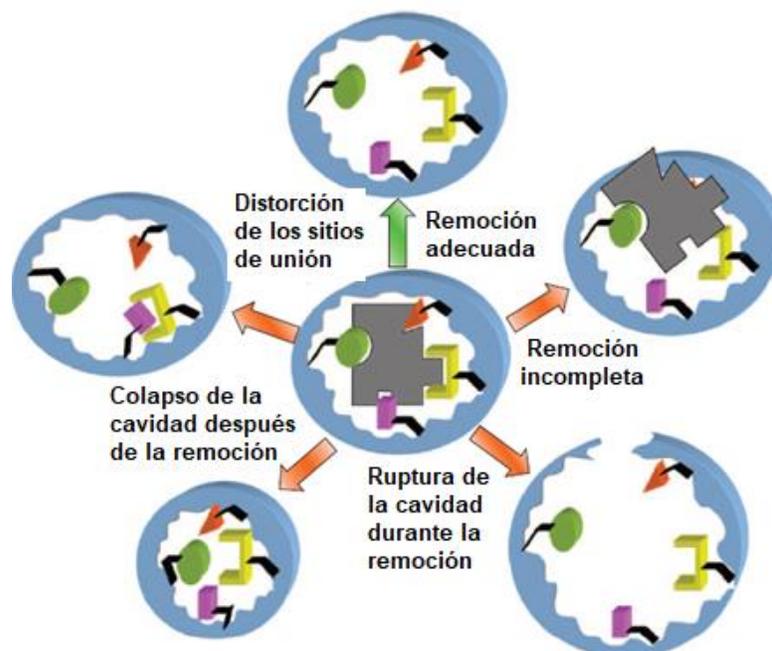


Figura 7. Vista esquemática de los diferentes efectos que el proceso de remoción de la molécula molde puede causar en la estructura de las cavidades improntadas. (Adaptada de Álvarez-Lorenzo, 2013)³⁰

2.3.3 Polímeros de impronta molecular como sistemas estímulo-respuesta

La combinación de los sistemas estímulo-respuesta con la tecnología de impronta molecular provee una herramienta ventajosa: la impronta provee una alta capacidad de carga de moléculas específicas y la habilidad de responder a estímulos externos modulando la afinidad de las redes para las moléculas molde, dando una capacidad regulatoria del proceso de carga/liberación del fármaco en función de la naturaleza o de la intensidad del estímulo.³⁰

Debido a que los sistemas de liberación poliméricos que utilizan el enfoque de impronta molecular en su mayoría no poseen propiedades de vectorización, los estudios más recientes se han enfocado en la obtención de un sistema híbrido, capaz de poseer ambas propiedades, de vectorización y como sistema de liberación.

Las nanopartículas magnéticas han tenido especial participación en el desarrollo de estos materiales, ya que, debido a sus propiedades magnéticas, responden a estímulos externos como campos magnéticos externos.

2.4 Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son los materiales magnéticos más empleados en las investigaciones y aplicaciones en nanomedicina y biología, incluyendo resonancia magnética de imagen (RMI), imagen de nanopartículas magnéticas⁴³, sistemas de liberación de fármacos, hipertermia magnética e identificación y separación de células.^{44,45}

Los procedimientos de síntesis, las propiedades fisicoquímicas, la toxicidad y biocompatibilidad, así como los métodos de vectorización de los sistemas basados en nanopartículas de óxido de hierro han sido revisados a fondo a lo largo de los años en muchos trabajos compilatorios.⁴⁶⁻⁴⁸ De la misma forma, las propiedades básicas de las nanopartículas magnéticas como tamaño, comportamiento magnético, estructura y recubrimientos funcionales están ampliamente reportados.⁴⁹⁻⁵¹

Los nanosistemas complejos de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro funcionalizadas y recubiertas se están convirtiendo en las herramientas más importantes en la nanomedicina⁵² debido a que representan la mejor relación entre buenas propiedades magnéticas y una baja toxicidad *in vitro* e *in vivo*⁵³ y por su biodistribución y efectos terapéuticos locales al ser posible su direccionamiento^{54,55}.

2.4.1 Superparamagnetismo

El origen del magnetismo radica en los movimientos orbitales y de espín de los electrones, y de cómo interactúan los electrones entre sí en un material. El comportamiento magnético de los materiales se puede clasificar en cinco grupos principalmente: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo y antiferromagnetismo^{56,57}

El superparamagnetismo es una forma de magnetismo que ocurre en materiales ferri y ferromagnéticos cuando estos están en forma de nanopartículas lo suficientemente pequeñas (dependiendo del material). En realidad, los materiales macrométricos básicamente contienen múltiples dominios magnéticos debido a su gran tamaño. De esta forma, las partículas suficientemente pequeñas son básicamente partículas

monodominio, que pueden ser tratadas como un momento magnético gigante, compuesto de todos los momentos magnéticos de los átomos formando las nanopartículas.

Las partículas superparamagnéticas se prefieren sobre las partículas ferri y ferromagnéticas para aplicaciones biomédicas debido a que, en ausencia de un campo magnético, las partículas ferromagnéticas tendrán una magnetización neta, mientras que las partículas superparamagnéticas no exhiben magnetización remanente al retirarse el campo debido al rápido regreso del momento magnético (*Figura 8*).⁵⁸ Esto puede ser un gran inconveniente si se desea funcionalizar las nanopartículas ya que la magnetización remanente provoca la agregación de partículas y dificulta su dispersión.

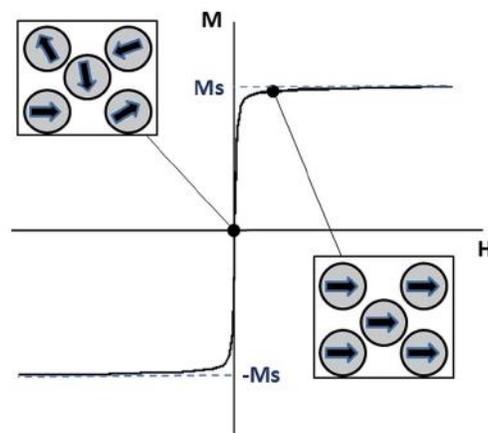


Figura 8. Curva de magnetización típica para partículas superparamagnéticas. En ausencia de un campo magnético (H), los monodominios se encuentran en desorden, mientras que al aplicar un campo magnético, los momentos magnéticos de los monodominios se arreglan en sentido del campo. (Tomado de Hervault, A. Thanh, N., 2014)⁵⁸

Las nanopartículas de magnetita y maghemita son materiales ferrimagnéticos debajo de su temperatura de Curie (850 K y 986 K respectivamente)⁵⁹, sin embargo, la magnetita está clasificada también como un material superparamagnético cuando son partículas de un tamaño en el rango de 1 a 10 nm.

2.4.2 Teoría de dominio

Un material ferromagnético macroscópico, como el hierro, cobalto o níquel, tiende a minimizar su energía espontáneamente dividiéndose en *dominios magnéticos*, que son regiones que contienen momentos magnéticos acoplados en la misma dirección, y que están separados unos de otros por medio de *paredes de dominio*. Cada dominio podría

estar entonces representado por un solo vector de magnetización para todos sus momentos magnéticos por unidad de volumen.

El concepto de dominios distingue al ferromagnetismo del paramagnetismo. La estructura de dominio de un material ferromagnético determina la dependencia del tamaño en su comportamiento magnético. Cuando el tamaño de un material ferromagnético se reduce debajo de un valor crítico, este se vuelve un monodominio. Se asume que el estado de más baja energía libre de las partículas ferromagnéticas tiene magnetización uniforme para las partículas más chicas que un cierto tamaño crítico (partículas monodominio), y tiene magnetización no uniforme para partículas más grandes (partículas multidominio).

De acuerdo con la teoría de dominio magnético, el tamaño crítico del monodominio se ve afectado por muchos factores, incluyendo el valor de la saturación magnética, la fuerza de la anisotropía del cristal y las fuerzas de intercambio y a la forma de las partículas.

El comportamiento magnético de un material ferromagnético ante un campo magnético aplicado está bien descrito por un ciclo de histéresis, caracterizado por dos parámetros: remanencia y coercitividad. La coercitividad está relacionada a la anchura de la curva y es fuertemente dependiente del tamaño de partícula. Cuando el tamaño de partícula se reduce, la coercitividad incrementa hasta un máximo y entonces disminuye hasta cero, en ese momento dichas partículas se vuelven superparamagnéticas (Figura 9).⁶⁰

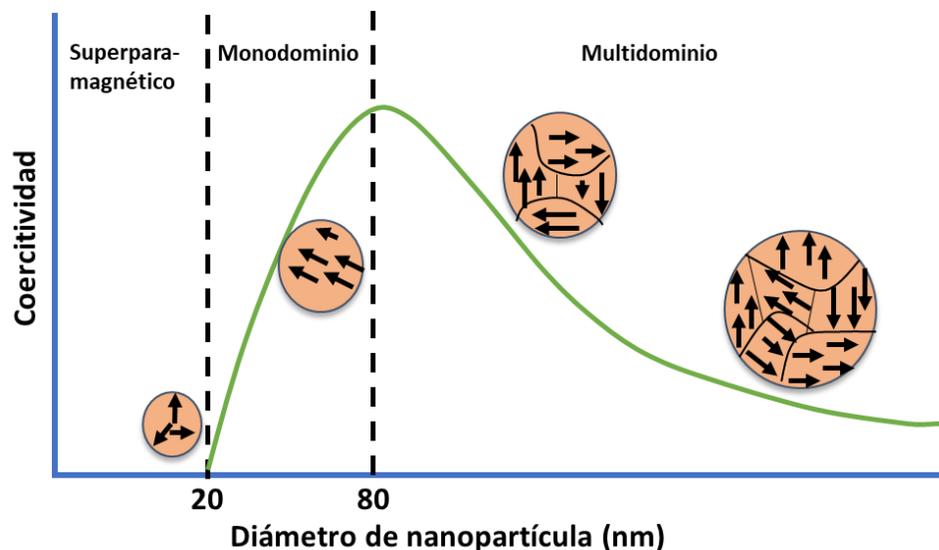


Figura 9. Ilustración esquemática de la relación coercitividad-tamaño de partículas pequeñas. (Adaptado de Akbarzadeh. Al., 2012)⁶⁰

2.4.3 Hipertermia magnética

Las células cancerígenas son sensibles a la hipertermia. Se ha observado que el proceso de apoptosis ocurre de 42-45°C en células cancerosas a comparación de células sanas que resisten estas temperaturas.⁶¹ El uso de las NPMs con un campo magnético alterno eleva la temperatura de forma localizada, sin dañar los tejidos circundantes⁶². Por esta razón, el enfoque más estudiado es usar NPMs e involucra experimentos utilizando magnetohipertermia.

La hipertermia del tumor puede ser llevada a cabo por dos diferentes efectos. Primero, el aumento en la temperatura en el tumor mejora el efecto EPR promoviendo la permeabilidad vascular⁶³. El segundo efecto se logra calentando a una temperatura cerca de la temperatura de transición de fase (T_g) de gel a líquido de los lípidos de la membrana celular, lo que la hace más permeable al agua y a fármacos hidrofílicos, promoviendo la filtración de los fármacos desde las nanopartículas una vez acumuladas en el tumor⁶⁴. Las NPMs dentro del tumor pueden cambiar su energía electromagnética en calor con la ayuda de un campo magnético externo.^{46,58}

Las partículas monodominio disipan el calor a través de pérdidas por relajación que recae en dos modelos: la relajación de Néel y la relajación Browniana (*Figura 10*). El mecanismo de relajación depende del tamaño de las nanopartículas y del material magnético (por su constante anisotrópica).⁶⁵ La relajación de Néel viene de la reorientación de los momentos magnéticos en la misma dirección que el campo magnético aplicado con cada oscilación del campo.⁶⁶ El tiempo de relajación de Néel, está dado por la ecuación 1:

$$\tau_N = \tau_0 \exp \left(\frac{kV}{k_B T} \right) \dots \dots \dots (1)$$

donde $\tau_0 = 10^{-9}$ s, k es la constante de anisotropía, V es el volumen de la nanopartícula magnética, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. La relajación de Néel es fuertemente dependiente del tamaño. Una partícula más pequeña requiere menos energía para la rotación de su momento magnético, en consecuencia, el mecanismo de relajación de Néel será muy importante.

La relajación Browniana es causada por el aumento de la fricción de la rotación de la partícula por sí misma en el líquido acarreador.^{58,66} El tiempo de relajación Browniana τ_B está expresado por la ecuación 2:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \dots \dots \dots (2)$$

donde η es la viscosidad del líquido acarreador, V_H es el volumen hidrodinámico de la partícula, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura. El mecanismo de relajación Browniana también depende del tamaño y de igual forma es fuertemente dependiente de la viscosidad (una viscosidad alta del líquido alentarán la rotación de las partículas). Generalmente, la relajación de Néel prevalece en nanopartículas pequeñas y la relajación Browniana en partículas grandes.

Una combinación de los dos tiempos de relajación magnéticos da el tiempo de relajación efectivo total τ de las partículas (*Ecuación 3*):

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \dots \dots \dots (3)$$

La aplicación de un CMA que oscile más rápido que el tiempo de relajación de las NPMs causará la liberación de la energía en forma de calor por el retraso en la relajación del momento magnético.⁵⁸

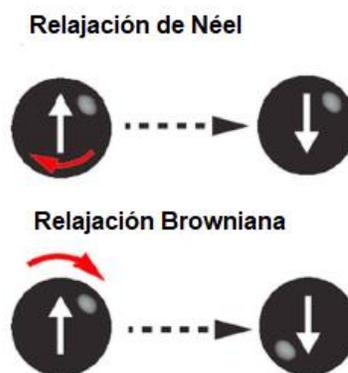


Figura 10. Mecanismos de relajación que influyen en el calentamiento de las nanopartículas magnéticas. Modificado de (Abenojar, E. C., 2016)⁶⁷

En nanopartículas magnéticas multi dominio (materiales ferri o ferromagnéticos), la producción de calor es debido a la pérdida por histéresis, que puede ser vista como la cantidad de energía disipada durante el ciclo de magnetización (*Figura 11*).^{58,68}

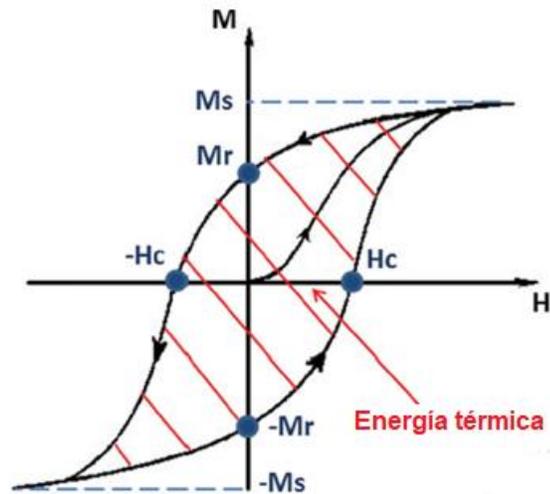


Figura 11. Curva de magnetización de un material ferromagnético. El área del ciclo de histéresis representa la energía disipada durante el ciclo de magnetización. Modificada de (Hervault, A., Kim, N.,2014)⁵⁸

Un ferromagneto está formado por dominios magnéticos (dominios de Weiss) en los que los momentos de los átomos están todos paralelos entre ellos para mantener el estado de energía más bajo, mientras que un ferrimagneto está formado por dominios magnéticos con momentos magnéticos opuestos de diferentes amplitudes. Cuando un campo magnético externo es aplicado, los dominios magnéticos tienden a alinearse en la misma dirección que el campo aplicado. La magnetización de saturación (M_s) se alcanza tan pronto como cada momento de cada dominio se alinea en esa dirección. Cuando el campo aplicado es removido, la magnetización no regresa a cero y a eso se le llama magnetización remanente (M_r). Para reducir la magnetización a cero de nuevo, un campo magnético con una intensidad precisa necesita ser aplicado, y esto es llamado coercitividad (o campo coercitivo (H_c)). La curva de magnetización de un ferromagneto se representa por un aro de histéresis y la pérdida por histéresis puede ser medida integrando el área del ciclo de histéresis (*Figura 11*).⁵⁸

2.4.4 Magnetita

La magnetita se caracteriza por tener una estructura cristalina de espinela con iones de oxígeno formando una red cubica empaquetada y iones de hierro localizados en los intersticios (*Figura 12*). Estos intersticios pueden ser de dos formas: sitios tetraédricos (el ion Fe está rodeado de cuatro oxígenos) o sitios octaédricos (el ion hierro está rodeado por seis oxígenos) formando las dos subredes A y B respectivamente.

La fórmula estructural de la magnetita es: $[\text{Fe}^{3+}]_A [\text{Fe}^{3+}, \text{Fe}^{2+}]_B \text{O}^{2-}_4$

Este arreglo particular de cationes en las subredes A y B es llamado estructura de espinela inversa, pues los espines en la subred A son antiparalelos a los de la subred B.⁶⁹

La magnetización de la magnetita surge del acoplamiento antiferromagnético (super intercambio de oxígenos) entre los iones Fe^{3+} en los intersticios octaédricos y tetraédricos, dejando los momentos magnéticos de los iones Fe^{2+} (en posiciones octaédricas) como responsables de la magnetización de la celda unitaria.^{48,57}

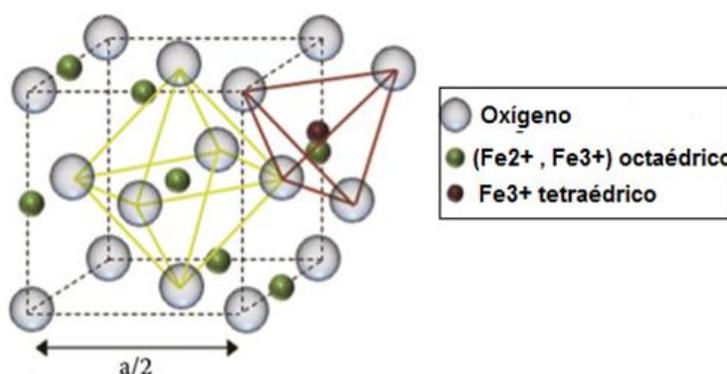


Figura 12 Organización de la red cristalina de magnetita. (Adaptado de Duguet, E., 2012)⁷⁰

Las principales vías de síntesis propuestas para la preparación de nanopartículas de Fe_3O_4 incluyen métodos físicos (por ejemplo deposición en fase gas), químicos (síntesis sol-gel, coprecipitación, método hidrotérmal, entre otros)^{71,72} y microbiológicos⁷³.

2.5 Sistemas teragnósticos

La seguridad del paciente ha sido el principal motivo para el desarrollo de sistemas nanoparticulados con funciones duales de diagnóstico y de terapia, particularmente para el tratamiento del cáncer. Este tipo de sistemas se conocen como *teragnósticos* o *teracnósticos*.

Las nanopartículas magnéticas pueden utilizarse en el diseño de sistemas teragnósticos, siendo particularmente interesante el uso de magnetita para su empleo en medicina oncológica debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, fácil síntesis, y su

capacidad de direccionamiento. Actualmente existen muchos trabajos sobre el desarrollo de sistemas magnéticos y su uso en nanomedicina.^{47,50,51,74-77}

Los sistemas magnéticos se dirigen al sitio deseado por medio del direccionamiento activo (modificación de las propiedades del material)⁵⁴ empleando un imán permanente para atraer a las nanopartículas magnéticas a una región definida donde se promueve la extravasación por el aumento en su concentración. Una vez que la extravasación ha ocurrido, la presencia del campo magnético mantiene a las nanopartículas en el intersticio del tumor, previniendo el escape del fármaco contra los gradientes de presión osmótica.

Para promover una mejora de la funcionalidad, las cinéticas de liberación (liberación controlada) y la protección del fármaco contra la degradación, los sistemas con nanopartículas magnéticas como núcleo han recibido particular atención recientemente. Esos sistemas nanoparticulados son candidatos interesantes que proveen plataformas multifuncionales para aplicaciones como teragnósticos.⁷⁸

2.6 Polímeros de impronta molecular magnéticos

Los polímeros de impronta molecular magnéticos se han investigado principalmente en el área analítica, con el fin de captar y separar ciertos compuestos de interés, de mezclas complejas. El uso de estos sistemas permite ahorrar el tiempo de la centrifugación de la muestra para separar al analito, por el uso de un campo magnético externo. Propiamente hablando, el número de publicaciones encontradas en la base de datos *Scopus* hasta octubre de 2019, muestra que se han publicado 1068 artículos que utilizan las partículas magnéticas con algún tipo de recubrimiento basándose en la técnica de impronta molecular.

De esta forma, los polímeros de impronta molecular magnéticos se han utilizado también para separar compuestos tóxicos de alimentos, como el trabajo de Bagheri A.R. y colaboradores, quienes desarrollaron y caracterizaron un polímero de impronta molecular magnético para el reconocimiento de acrilamida en bisquets. Primero, sintetizaron partículas de magnetita por coprecipitación y se modificó su superficie con polietilenglicol, luego, el polímero se sintetizó utilizando propanamida como horma y quitosan como monómero funcional. Por último, después de retirar la horma, se determinó la cantidad de acrilamida en cinco muestras de bisquets por medio de HPLC. Para ello, se molieron

las muestras y se extrajo la acrilamida dispersándolas en una mezcla agua/metanol. Las muestras se centrifugaron y se separó el sobrenadante, al cual se le agregó el sistema sintetizado. Después de se separaron las partículas magnéticamente y se pasaron a un medio de agua/metanol para extraer la acrilamida capturada, la cual se cuantificó por HPLC.⁷⁹

Trabajos similares, por mencionar algunos, son el de Yang C. y colaboradores, que idearon polímeros de impronta para determinar la concentración de quercetina en muestras de manzanas,⁸⁰ o el de Chen, L. y colaboradores, que desarrollaron un sistema MIP magnético para extraer antibióticos de tetraciclina de muestras de huevo.⁸¹

A su vez, el trabajo directamente relacionado con este proyecto es el desarrollado por Olivia A. Attallah y colaboradores, quienes llevaron a cabo la síntesis de un sistema MIP-magnético para el reconocimiento del fármaco 6-mercaptopurina, esto con el fin de utilizarlo en el análisis de muestras biológicas.

Los investigadores sintetizaron nanopartículas de magnetita con ácido oleico por coprecipitación, y posteriormente, la superficie se recubrió con una capa de sílica. El polímero fue sintetizado sobre estas partículas por la técnica de impronta molecular no covalente. Para la síntesis del polímero, se utilizó 6-mercaptopurina como horma, EGDMA como entrecruzador, AIBN como iniciador de radicales y ácido metacrílico como monómero funcional y metanol como medio de síntesis. El monómero fue seleccionado por un método computacional. Antes de la polimerización, se permitió la formación del complejo horma-monómero durante 12 h. La reacción de polimerización se llevó a cabo durante 24 h a 60°C, y el sistema limpio se caracterizó por medio de distintas técnicas y a su vez, se realizaron estudios de adsorción del fármaco y sus análogos, y se evaluó la extracción del fármaco de muestras de plasma.

El grupo de trabajo demostró que el sistema tiene buenas propiedades de reconocimiento para los analitos evaluados y lograron su incorporación a un método de cromatografía de líquidos para la cuantificación simultánea de 6-mercaptopurina y tioguanina, demostrando ser exacto y reciclable.⁸²

Al recubrir las partículas magnéticas con distintos materiales, se puede lograr la respuesta a otro tipo de estímulos que dependan del material con el que se recubre. La mayoría de las veces, y en el caso del enfoque en sistemas de liberación de fármacos,

estos recubrimientos resultan de utilidad puesto que confieren a las partículas magnéticas una mayor estabilidad. Proteger las nanopartículas magnéticas incrementa no solo su biocompatibilidad, sino que también disminuye su toxicidad.⁸³

Como ejemplo de lo anterior, se tiene el trabajo de Dorniani, D., y colaboradores realizaron la síntesis de un sistema de nanopartículas de magnetita, recubiertas con quitosán, a las que se adsorbió 6-mercaptopurina. El grupo de trabajo evaluó la eficiencia del sistema como sistema de liberación de fármacos sensible a pH, y también su toxicidad en una línea celular de fibroblasto de ratón, demostrando buenas propiedades y baja toxicidad.⁸⁴

El uso de los polímeros de impronta molecular como modificadores de superficie de nanopartículas magnéticas, ha logrado el desarrollo de sistemas que permiten, como se ha venido mencionando, control en la terapia vectorizada, principalmente, en el tratamiento del cáncer. De esta forma, el número de trabajos reportados para estos sistemas se reduce a 303, que son aquellos enfocados en la liberación de fármacos, y la gran mayoría de estas investigaciones se enfocan en la síntesis y caracterización del sistema, y en la evaluación de los perfiles de liberación del fármaco.

Por otro lado, los trabajos que incluyen el uso de hipertermia magnética son todavía menores. Entre estos trabajos se encuentra la investigación llevada a cabo por Kubo, T., y colaboradores, quienes sintetizaron un sistema MIP magnético utilizando el fármaco anticancerígeno metotrexato como molécula molde. El grupo de trabajo sintetizó nanopartículas de magnetita por coprecipitación, y posteriormente, las recubrieron con sílica. Sobre la superficie de las partículas modificadas se llevó a cabo la síntesis del polímero de impronta molecular, para lo que utilizaron ácido metacrílico como monómero funcional y divinilbenceno como entrecruzador. La síntesis se realizó en DMSO, agitando a 800 rpm y 40 °C por 24 h. el sistema se caracterizó y se realizaron los estudios de adsorción. Los estudios de los perfiles de liberación se realizaron de dos formas distintas, exponiendo al sistema a una temperatura de 60 °C, y aplicando un campo magnético alterno de 600 kHz de frecuencia y una fuerza del campo magnético de 3.2 kA/m.

Los resultados mostraron que, al aplicar el campo magnético, el metotrexato se liberó más rápido que al exponer al sistema a temperaturas de 60 °C.⁸⁵

Hasta la fecha, no hay trabajos publicados que estudien al sistema MIP magnético de 6-mercaptopurina como sistema de liberación de fármaco, y tampoco que evalúen su comportamiento al ser expuesto a un campo magnético alterno, por lo que este trabajo pretende ser innovador en este sentido.

2.7 Consideraciones farmacéuticas.

Al desarrollar un sistema de liberación de fármacos, se debe considerar no solo los materiales que lo conforman en cuanto a la respuesta esperada, seguridad y biocompatibilidad, sino que también se deben evaluar las propiedades de superficie del sistema, así como la capacidad de carga del fármaco y el comportamiento que tiene el sistema al ser expuesto bajo condiciones fisiológicas con el fin de tener un panorama más certero de cómo se llevará a cabo la liberación del fármaco.

En el caso particular de los sistemas de impronta molecular magnéticos, este paso de caracterización es muy importante ya que, de esta forma, se puede aproximar el número de sitios disponibles para que el fármaco se una después de haber removido la horma del sistema y su afinidad, así como el perfil de liberación que presentará el sistema una vez ingrese al organismo.

2.7.1 Isotermas de adsorción

Los polímeros de impronta molecular son materiales que pueden ser adaptados fácilmente en selectividad y afinidad para una molécula específica. Desafortunadamente, el proceso de impronta produce una amplia distribución de sitios de unión con distintas afinidades de unión. Esto es particularmente cierto para los polímeros de impronta no covalente, que son los más comunes debido a su fácil preparación y a la disponibilidad de sus monómeros. Esta heterogeneidad disminuye las habilidades de los MIPs en casi todas las aplicaciones analíticas.

Las principales razones que han sido sugeridas para justificar la heterogeneidad de los sitios de impronta son: a) la naturaleza amorfa del polímero y el bajo número de sitios formados por el arreglo al azar durante la copolimerización, b) la formación de distintos

complejos molécula molde/monómero funcional y c) el colapso de los sitios por la extracción de la molécula molde.³¹

Una isoterma de adsorción es una medida de la relación entre las concentraciones al equilibrio de la horma libre y unida en un cierto rango de concentración y es fácilmente generada de los estudios de un adsorbato al equilibrio. Pueden ser obtenidas de los estudios de adsorción en lote, en los que un peso constante de polímero es puesto al equilibrio en un rango de concentraciones del analito conocidas.⁸⁶

Las propiedades de unión pueden ser calculadas de la isoterma de unión ajustando a modelos específicos de unión. Para modelos homogéneos estos pueden ser directamente estimados de los coeficientes del ajuste. En el caso de superficies heterogéneas, la estimación de las propiedades de unión es más compleja y se asume que, a bajas concentraciones de la horma, las contribuciones de los sitios de unión de alta afinidad pueden ser evaluados y a altas concentraciones de la horma, se observan las contribuciones de los sitios de baja afinidad.⁸⁷

Existen una gran variedad de teorías y modelos que describen el fenómeno de adsorción, entre aquellos que han sido aplicados para MIPs están las isotermas de Langmuir, bi-Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich. Cada uno de esos modelos especifica una cierta relación matemática entre las concentraciones unida (B) y libre (F) en la isoterma de unión. Además, cada modelo hace ciertas consideraciones en función de la distribución de los sitios de unión.⁸⁶ A continuación, se describen los principales modelos utilizados para la caracterización de los MIP.

Isoterma de Langmuir (L). este modelo considera que: a) la adsorción no puede seguir más allá después de cubrir la monocapa, b) todos los sitios de unión de la superficie son equivalentes y pueden ajustar, a lo más, una molécula horma y c) la habilidad de una horma para unirse a un sitio dado no depende de los sitios vecinos ocupados. Entonces se asume que hay una sola clase de sitios de unión y que una vez que una molécula molde se une a un sitio, ninguna otra adsorción se puede dar en ese sitio. Si una superficie con N sitios de unión homogéneos con una constante de adsorción K es supuesta, entonces la concentración de la horma unida, B , respecto al número de sitios de unión puede ser expresada como:

$$B = \frac{NKC}{1 + KC} \dots \dots \dots (4)$$

Donde B y C son la cantidad de horma unida y la concentración de la horma en disolución, respectivamente. N representa la capacidad de saturación de la monocapa y K es la constante de adsorción. La isoterma de Langmuir puede ser fácilmente linealizada para obtener parámetros ajustables por análisis de regresión lineal (ecuación 5):³¹

$$\frac{C}{B} = \frac{1}{NK} + \frac{1}{N}C \dots \dots \dots (5)$$

Las constantes N y K pueden ser determinadas graficando C/B contra C .

Isoterma bi-Langmuir. El modelo más simple para un MIP no homogéneo es una superficie cubierta con dos diferentes tipos de sitios de unión, de alta energía y de baja energía, que se comportan independientemente y en cada uno de los que un modelo distinto de Langmuir aplica. De esta forma, la ecuación de Langmuir puede ser extendida a una ecuación llamada isoterma de bi-Langmuir (*Ecuación 6*):³¹

$$B = \frac{N_1K_1C}{1 + K_1C} + \frac{N_2K_2C}{1 + K_2C} \dots \dots \dots (6)$$

Donde K_1 usualmente es mucho más grande que K_2 y N_2 es mucho menor que N_1 .

Isoterma de Freundlich. Es una isoterma de adsorción empírica para adsorciones no ideales en superficies heterogéneas y también de adsorciones multicapa. Este modelo asume una fuerte relación entre B y F . Hay dos parámetros de ajuste: m y a . m es también conocido como índice de heterogeneidad y su valor varía de cero a uno, donde 1 es una superficie homogénea y valores cercanos a cero indican heterogeneidad. Por otro lado, el factor preexponencial a es una medida de la capacidad (N_t) y de la afinidad (K_0) de unión. Sin embargo, las contribuciones individuales de N_t y K_0 al factor preexponencial no pueden ser extraídas directamente sin experimentos adicionales o asunciones.

$$B = aF^m \dots \dots \dots (7)$$

El modelo de Freundlich (ecuación 7) ha sido mostrado estar aplicado generalmente a los polímeros de impronta no covalentes ya que ofrece aproximaciones más exactas de las superficies heterogéneas.^{86,88}

Isoterma Langmuir-Freundlich (LF). Esta isoterma (ecuación 8), es una función que describe una relación específica entre la concentración al equilibrio de la molécula huésped (horma en el caso de los MIPs) unida (B) y libre (F) en sistemas heterogéneos con tres coeficientes de ajuste: N_t , a , y m . N_t , es el número total de sitios de unión. La variable a , está relacionada a los sitios de unión de mediana afinidad (k_0) por $k_0=a^{1/m}$. Por último, m , es el índice de heterogeneidad, que varía de 0 a 1. Para un material homogéneo, $m=1$ y si $m < 1$, entonces el material es heterogéneo.

$$B = \frac{N_t a F^m}{1 + a F^m} \dots \dots \dots (8)$$

Como el nombre lo implica, la isoterma de LF es una mezcla de las isotermas de Langmuir y Freundlich y se puede reducir a cualquiera en sus límites, por ejemplo, cuando $m=1$, la isoterma de LF se reduce a la de Langmuir (Ecuación 4) en la que a , corresponde directamente a la afinidad de unión (K). Por otro lado, cuando cualquiera, F o a se aproximan a cero, la isoterma LF se reduce a la isoterma de Freundlich (ecuación 7). se debe de notar la que la isoterma de LF se reduce a la isoterma de Freundlich para todos los sistemas a bajas concentraciones. Entonces, el modelo de unión de LF es capaz de modelar ambas superficies de unión, homogéneas y heterogéneas.⁸⁷

2.7.2 Modelos cinéticos de liberación

Cuando se diseñan sistemas de liberación modificada es importante identificar y entender los mecanismos particulares involucrados en el proceso de liberación. A menudo, más de un mecanismo está involucrado en un tiempo dado o diferentes mecanismos pueden dominar en diferentes etapas del proceso de liberación del fármaco (Figura 13).

Los mecanismos usados para alcanzar esos objetivos son diversos y complejos y dependen de la aplicación particular. De hecho, la mayoría pueden operar simultáneamente o en diferentes etapas del proceso de entrega de fármaco. Un entendimiento de esos mecanismos es muy importante cuando se diseñan y manufacturan sistemas de liberación controlada.¹⁸

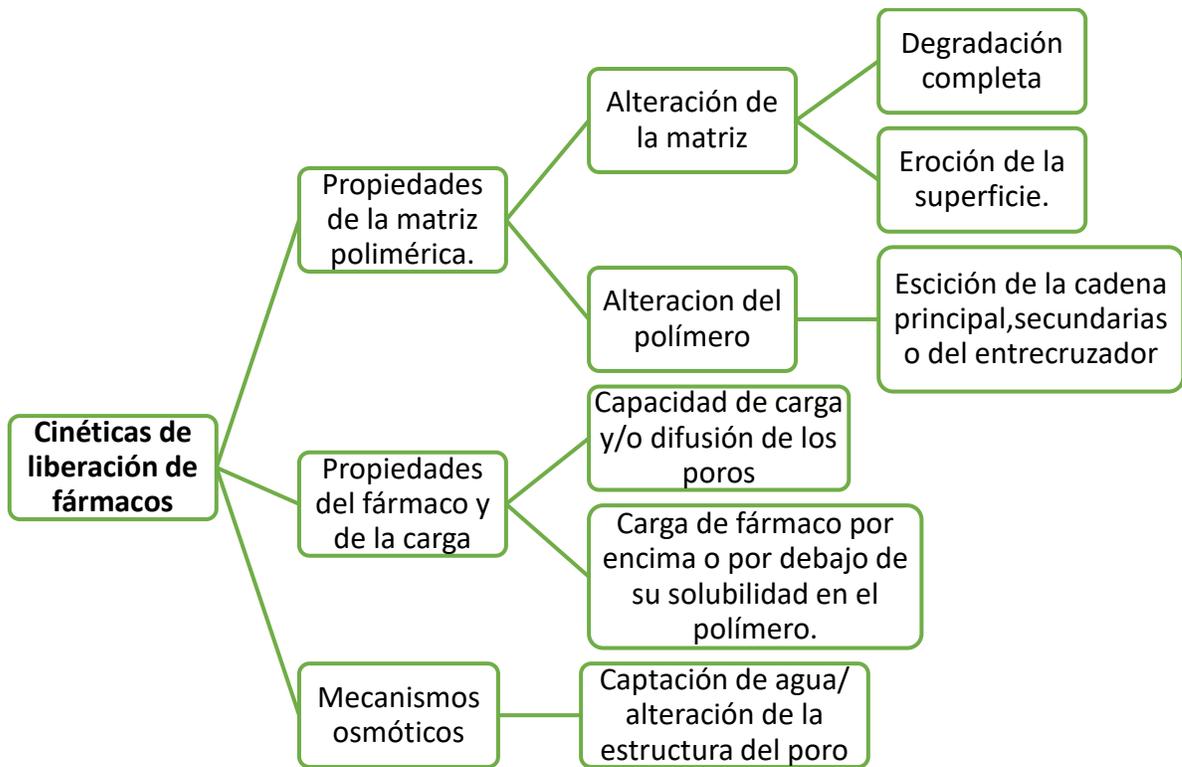


Figura 13. Esquema de los principales factores que pueden afectar la velocidad de liberación del fármaco desde un sistema de liberación basados en polímeros degradables. (Modificado de Siepmann, J., 2012)¹⁸

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

Los métodos dependientes del modelo se basan en funciones, que describen el perfil de disolución. Una vez que se ha seleccionado una función adecuada, se evalúan los perfiles de disolución dependiendo de los parámetros derivados del modelo. Estos modelos incluyen: orden cero, primer orden, Higuchi, modelo de Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg, Gompertz y otros modelos de regresión.^{89,90}

Modelo de orden cero: La disolución de fármaco a partir de formas de dosificación que no disgregan y liberan el fármaco lentamente (asumiendo que el área no cambia que no se alcanzan condiciones de equilibrio) puede representarse mediante la ecuación 9:

$$Q_t = Q_0 K_0 t \dots \dots \dots (9)$$

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

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

$$\frac{dC}{dt} = K(C_s - C) \dots \dots \dots (10)$$

Donde C es la concentración del soluto al tiempo t , C_s es la concentración de saturación del soluto en el medio y K es la constante de primer orden expresada en unidades de tiempo⁻¹.

La ecuación 10 puede ser expresada en logaritmos decimales como:

$$\log C = \log C_0 - \frac{Kt}{2.303} \dots \dots \dots (11)$$

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

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

$$f_t = M_t/M_\infty = at^n \dots \dots \dots (12)$$

Donde M_t/M_∞ es una fracción de fármaco liberado al tiempo t , a es una constante que incorpora características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica y n es el exponente de liberación, que es indicativo del mecanismo de liberación como se describe en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Mecanismo de liberación de fármaco en función del valor de n.

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

* El proceso de liberación es controlado por la relajación de las cadenas poliméricas, la difusión se produce a velocidad constante si no cambia la geometría del sistema durante el proceso de liberación⁹¹.

Modelo Peppas-Sahlin: Este modelo es utilizado cuando se desea investigar si el mecanismo se está llevando a cabo por hinchamiento, en este caso, las cadenas poliméricas se separan dando un aumento en el área de contacto con el medio, aumentando la movilidad del fármaco. Este proceso se representa con la ecuación 13:

$$f_t = k_1^n + k_2^n \dots \dots \dots (13)$$

Donde k_1 corresponde a la difusión y k_2 a la relajación del polímero y se consideran fenómenos aditivos. El exponente n corresponde al tipo de difusión tomando valores similares a los de Korsmeyer-Peppas y f_t es la fracción de fármaco al tiempo t. ⁹²

Modelo Hopfenberg: Es un modelo matemático que correlaciona la liberación del fármaco de una superficie polimérica erosionable de distintas geometrías. Asume que la liberación es un proceso de orden cero, resultado de la combinación de la disolución y erosión en la superficie del polímero y supone que la velocidad de liberación es proporcional al área superficial. La fracción acumulativa del fármaco liberado al tiempo t fue descrita como:

$$M_t/M_\infty = 1 - [1 - k_{HB}t/C_L a]^n \dots \dots \dots (14)$$

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

3. Planteamiento del problema

Al ser la quimioterapia (tratamiento con distintos fármacos para la eliminación de células cancerígenas) el método de elección para el tratamiento del cáncer, y teniendo claro que la principal desventaja es la liberación inmediata del fármaco y la distribución sistémica no selectiva del mismo a partir de las formas farmacéuticas convencionales, la investigación de muchos grupos de trabajo se ha enfocado en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación que sean capaces de ser dirigidos al sitio de interés y una vez ahí, liberar el fármaco.

El uso de polímeros de impronta molecular (MIPs) como sistemas de liberación de fármacos es una estrategia que se ha comenzado a estudiar en los últimos años debido a sus potenciales ventajas sobre otros sistemas. Estos sistemas se basan en el reconocimiento específico de un polímero por un fármaco, y se espera que esta complementariedad sirva para hacer la liberación del fármaco más lenta y contribuir de esta forma a la disminución de los efectos adversos de los fármacos.

Debido a que los polímeros de impronta molecular por si mismos carecen de propiedades de vectorización a un sitio específico del cuerpo, una estrategia recientemente propuesta es la producción de un sistema híbrido basado en el uso de nanopartículas magnéticas (principalmente magnetita) recubiertas con polímeros sinterizados por medio de la tecnología de impronta molecular. Estos polímeros de impronta molecular magnéticos conservan las propiedades magnéticas de la magnetita, por lo que es posible dirigirlos a un sitio específico utilizando un campo magnético externo.

Actualmente, el estudio de los polímeros de impronta molecular magnéticos ha crecido, sin embargo, de los trabajos encontrados en la literatura, solo una mínima cantidad dirigen su investigación al área de liberación de fármacos. De esta forma, en el presente trabajo se plantea la síntesis de distintos sistemas basados en polímeros de impronta molecular magnéticos para el reconocimiento del fármaco antineoplásico 6-mercaptopurina.

La caracterización de los sistemas proveerá información importante sobre sus propiedades fisicoquímicas y dará evidencias de su uso potencial como sistema de liberación.

Por último, este trabajo busca estudiar el efecto que tiene la exposición de los sistemas a un campo magnético alterno sobre la liberación de la 6-mercaptopurina, lo que permitirá conocer si el fenómeno de hipertermia que presentan las nanopartículas bajo estas condiciones es suficiente para causar un cambio en la velocidad de liberación. Cabe mencionar que estas propiedades no han sido abordadas por casi ningún grupo de trabajo que reportan sistemas similares, por lo que el sistema que aquí se plantea proveerá información útil a considerar en el desarrollo de este tipo de sistemas para la liberación de fármacos.

4. Hipótesis

Las propiedades de adsorción de partículas de magnetita de tamaño nanométrico recubiertas con polímeros de impronta molecular, dependerán del monómero funcional. La evaluación del proceso de impronta permitirá seleccionar al monómero que presente las mejores características para una adsorción óptima de la 6-mercaptopurina. Al mismo tiempo, se podrá evaluar su potencial como posible sistema de liberación de fármacos, tomando en cuenta las propiedades conferidas al sistema por la presencia de la magnetita. La hipertermia magnética modificará la velocidad de liberación del fármaco en los polímeros de impronta molecular magnéticos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de magnetita y recubrirlas con distintos polímeros, utilizando la técnica de impronta molecular, con el fármaco 6-mercaptopurina como molécula molde. Caracterizar los sistemas y evaluar su potencial como sistemas de liberación modificada.

5.2 Objetivos particulares

- Sintetizar polímeros de impronta molecular utilizando 6-mercaptopurina como molde, en medios de síntesis distintos y con distintos monómeros funcionales.
- Caracterizar los polímeros sintetizados con distintas técnicas analíticas y comparar la capacidad de adsorción de cada polímero en distintos medios.
- Sintetizar partículas de magnetita de tamaño nanométrico mediante el método de coprecipitación, y llevar a cabo su caracterización con ayuda de las técnicas de espectroscopía de infrarrojo, análisis elemental, difracción de rayos X de polvos, microscopia electrónica de transmisión y de barrido, análisis elemental, dispersión dinámica de luz, termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido)
- Recubrir las partículas con distintos polímeros mediante el método de impronta molecular utilizando al fármaco antineoplásico 6-mercaptopurina como molécula molde.
- Iniciar la polimerización sobre las partículas a través de hipertermia magnética.

- Caracterizar los sistemas obtenidos con la ayuda de distintas técnicas (espectroscopía de infrarrojo, difracción de rayos X de polvos, microscopia electrónica de transmisión y de barrido, análisis elemental, dispersión dinámica de luz, termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido).
- Evaluar la capacidad de adsorción de los sistemas y analizar las isothermas de adsorción.
- Llevar a cabo los estudios de liberación *in vitro* de cada sistema en condiciones fisiológicas (pH= 7,4 y T= 37 °C), y analizar las cinéticas de liberación del fármaco.
- Comparar la diferencia en los perfiles de liberación de cada sistema al ser expuestos bajo la influencia de un campo magnético alterno (efecto de hipertermia magnética).

6. Metodología experimental

6.1 Materiales.

Cloruro de hierro II tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99\%$), cloruro de hierro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $> 97\%$), dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA, 98%), ácido metacrílico (99%), ácido itacónico ($\geq 99\%$), 1-vinilimidazol ($\geq 99\%$), 4-vinilpiridina (95%) y el clorhidrato de 6 mercaptopurina (98%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. El azobisisobutironitrilo (AIBN) fue donado por AKZO NOBEL Chemicals. S.A. de C.V. (ref. #26 LB-837).

Los disolventes utilizados, acetonitrilo y metanol, fueron grado reactivo analítico, adquiridos de J.T.Baker. Antes de utilizar los monómeros ácido metacrílico y 4-vinilpiridina, así como el EGDMA, se les pasó por una resina removedora de inhibidor (Alfa Aesar, cristalina).

6.2 Síntesis de polímeros de impronta molecular para el fármaco 6 mercaptopurina

Para evaluar el efecto del disolvente en la impronta molecular, así como el efecto del monómero en la etapa de prearreglo, se llevó a cabo la síntesis de 4 polímeros diferentes en dos medios distintos como se describe a continuación. Las proporciones fármaco/ monómero funcional/ entrecruzador se mantuvieron constantes en 1:4:20.

6.2.1 MIP 6MP en metanol / acetonitrilo (3:7)

21.5 mg de 6 mercaptopurina (0.125 mmol) se disolvieron primeramente en 3 ml de metanol (MeOH) y se agregó posteriormente 7 ml de acetonitrilo. Se agregaron entonces 0.5 mmol de monómero funcional (43 μL de ácido metacrílico, 65 mg de ácido itacónico, $\sim 45 \mu\text{L}$ 1-vinilimidazol o $\sim 55 \mu\text{L}$ 4-vinilpiridina) y se agitó. Posteriormente, se adicionaron 2.5 mmol (350 μL) de dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) y 15 mg del iniciador azobisisobutironitrilo (AIBN) agitando hasta tener una disolución homogénea. La reacción se llevó a cabo a 65 °C por 24 h en atmósfera inerte (N_2).

Un vez concluida la reacción de polimerización, los polímeros se sometieron a molienda por corte a 20000 rpm (IKA, Tekmar A-10 S2) y se realizaron lavados con MeOH en un

soxhlet durante 24 horas para remover la molécula molde (6MP). Por último, después de remover el fármaco, los polímeros se tamizaron con una malla de 200 μm para homogeneizar el tamaño de partícula.

6.2.2 MIP 6MP en metanol / cloroformo (3:7)

De la misma forma que se mencionó anteriormente, 21.5 mg de 6 mercaptopurina (0.125 mmol) se disolvieron en 3 ml de MeOH y en esta ocasión se agregaron 7 ml de cloroformo (CHCl_3). Se agregaron 0.5 mmol de monómero funcional (43 μL de ácido metacrílico, 65 mg de ácido itacónico, ~ 45 μL 1-vinilimidazol o ~ 55 μL 4-vinilpiridina) y se agitó. Posteriormente, se adicionaron 2.5 mmol (350 μL) de EGDMA y 15 mg de AIBN y se agitó. La mezcla de igual forma se colocó en atmósfera inerte de N_2 y se dejó reaccionar durante 24 horas a 65°C .

El procedimiento realizado para remover la molécula molde y homogeneizar el tamaño de partícula, fue el descrito anteriormente.

6.3 Caracterización de polímeros de impronta molecular para 6 mercaptopurina

Una vez sintetizados los polímeros, se procedió a caracterizarlos. Para esto se utilizaron las técnicas que se describen a continuación.

6.3.1 Espectroscopia de infrarrojo de los polímeros de impronta molecular obtenidos

Los espectros de infrarrojo de cada polímero, así como de sus respectivos monómeros funcionales, se obtuvieron de un equipo de FTIR/FIR modelo Spectrum 400 de Perkin-Elmer de 4000 a 400 cm^{-1} . Con esta técnica es posible confirmar la formación de enlaces por las características vibracionales de cada muestra.

6.3.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para conocer las propiedades térmicas de los polímeros, estos se sometieron a un ciclo de calentamiento de 30 a 300°C en un equipo DSC1 Mettler Toledo con una velocidad de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ y en atmósfera de N_2 para todos los polímeros evaluados.

6.3.3 Capacidad de adsorción de 6MP

Con el fin de evaluar la capacidad de carga de cada polímero dependiendo del monómero funcional, se realizó una prueba de adsorción en distintos medios (Buffer fosfatos pH=7,4, MeOH y en la mezcla MeOH/MeCN (3:7)).

Se pesaron por triplicado 30 mg de cada polímero y se pusieron en contacto con 10 mL de cada disolución de 6MP 2.5×10^{-4} M. La mezcla se mantuvo en agitación constante a 25 °C durante 3 horas y después de este tiempo se cuantificó la cantidad de 6MP en el sobrenadante, utilizando las curvas de calibración descritas en el anexo 1.

6.4 Síntesis de nanopartículas de magnetita por coprecipitación

La síntesis de las partículas de magnetita se llevó a cabo por el método de coprecipitación. Se pesaron 0.50 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 1.296 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (relación estequiométrica 2:1) y se disolvieron en 24.5 mL de agua. La mezcla se colocó en atmósfera de N_2 y se calentó a 85°C agitando vigorosamente. Finalmente, se agregaron 10 mL de NaOH 2M para precipitar la magnetita. Al terminar la reacción, se realizaron enjuagues con agua hasta tener pH de aproximadamente 7, separando las partículas magnéticamente con ayuda de un imán de neodimio de 14000 Gauss.

Las partículas sintetizadas se secaron a 40°C durante una hora en un desecador termostático al vacío (Vacuo-Temp, J.P. SELECTA) y luego por 24h a temperatura ambiente.

6.5 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros de impronta molecular (MIP) para el fármaco 6 mercaptopurina (6MP)

6.5.1 Funcionalización de las nanopartículas

200 mg de partículas se resuspendieron en 100 mL de acetonitrilo. Se sonicó por 10 min y se agregó 0.2 mmol de monómero funcional (alrededor de 20 μL de 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol y ácido metacrílico y 30 mg en el caso del ácido itacónico). La mezcla se calentó a 45°C y 250 rpm durante 3 horas. Después de este tiempo, las partículas se

precipitaron con ayuda de un imán y se retiraron los residuos de la reacción realizando 3 lavados con acetonitrilo.

6.5.2 Síntesis del polímero de impronta usando 6MP como molécula molde

Una vez que se obtuvieron las partículas funcionalizadas con los distintos monómeros funcionales, las partículas húmedas se resuspendieron por separado en 200 mL de acetonitrilo y se sonicó durante 10 min. Posteriormente se agregaron 3.22 mmol de EGDMA (450 μ L), 0.35 mmol de 6MP (60 mg), 0.65 mmol de cada monómero y al final 15 mg de AIBN (1.01×10^{-5} mol) y se agitó. La polimerización se llevó a cabo bajo atmósfera de N_2 , 65 °C y a 250 rpm durante 24 h.

Al finalizar la reacción, las partículas se separaron magnéticamente y se realizaron lavados con acetonitrilo para remover los residuos de la polimerización. Posteriormente, se realizaron lavados con una disolución de K_2CO_3 0.1 M (pH= 14) para remover la 6MP, ya que, en estas condiciones de pH, se favorece la presencia de la especie desprotonada del fármaco, lo que aumenta su solubilidad en agua (consultar anexo 1).

Las partículas se secaron a 40 °C con vacío durante una hora y posteriormente 24 h a temperatura ambiente.

6.5.3 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas con polímero sin molécula molde (NIP)

El proceso utilizado para funcionalizar las partículas fue el descrito anteriormente. 200 mg de partículas se resuspendieron en 100 mL de acetonitrilo, se sonicó por 10 min y se agregó 0.2 mmol de monómero funcional (alrededor de 20 μ L de 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol y ácido metacrílico y 30 mg en el caso del ácido itacónico). La mezcla se calentó a 45 °C durante 3 horas a 250 rpm y se retiraron los residuos de la reacción, realizando lavados con acetonitrilo, precipitando las partículas con un imán.

Para esta síntesis, no se adicionó el fármaco con el fin de no tener sitios específicos. Las partículas funcionalizadas con los distintos monómeros funcionales, se resuspendieron por separado en 200 mL de acetonitrilo y se sonicaron durante 10 min. Posteriormente se agregaron 3.22 mmol de EGDMA (450 μ L), 0.65 mmol de cada monómero y finalmente

15 mg de AIBN (1.01×10^{-5} mol). La polimerización se llevó a cabo bajo atmósfera de N_2 , 65 °C y a 250 rpm durante 24 h.

Al finalizar la reacción, las partículas se separaron magnéticamente y se lavaron con acetonitrilo para remover los residuos. Por último, las partículas se secaron a 40°C con vacío por una hora y posteriormente 24h a temperatura ambiente.

6.6 Caracterización de nanopartículas magnéticas (MAG) y de los sistemas MIP y NIP

Tanto las partículas de magnetita, como los sistemas obtenidos al recubrir las partículas con los distintos polímeros se caracterizaron para comprobar la correcta formación del polímero sobre las partículas, así como para conocer las propiedades fisicoquímicas que presenta el nuevo sistema antes de evaluar su potencial como sistema de liberación.

6.6.1 Espectroscopía de infrarrojo y análisis elemental

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

6.6.2 Difracción de rayos X de polvos

La estructura cristalina de la magnetita se caracterizó con la ayuda de un Difractómetro de rayos X, modelo D8 ADVANCE (BRUKER AXS) en modo Theta-Theta. Con una fuente de radiación de $CuK\alpha$ y una $\lambda=1.54$ Å. La identificación de fase fue llevada a cabo utilizando el software MATCH![®].⁹³

6.6.3 Morfología y tamaño de partícula

Una de las propiedades que es importante conocer debido a que el sistema está pensado para administrarse parenteralmente (a causa de las características biofarmacéuticas de la 6MP), es el tamaño de partícula. Para ello, se utilizaron distintas técnicas que son descritas a continuación.

6.6.3.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La determinación del tamaño de partícula con esta técnica se realizó por triplicado en un equipo Zetasizer Nano ZS, utilizando una celda de vidrio para las mediciones.

Las nanopartículas se dispersaron en agua desionizada (aproximadamente 0.2 mg de nanopartículas/ mL) y se sonicaron durante 10 minutos, las mediciones se realizaron a 25°C.

6.6.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La preparación de la muestra se llevó a cabo de la siguiente manera: los distintos sistemas se dispersaron en agua desionizada (aproximadamente 0.2 mg /mL, tiempo de sonicación: 10 min) y una gota de la muestra se colocó en una rejilla de soporte de cobre, malla 200 con formvar y recubrimiento de carbono. Posteriormente, la muestra en la rejilla se colocó bajo vacío dinámico en un desecador termostático al vacío de dos a tres días antes de su observación. El equipo utilizado fue un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo JEM-ARM200F a 200 KeV. Las imágenes obtenidas se analizaron con ayuda de los softwares Gatan DigitalMicrograph® versión 3.30.2016.0 e ImageJ®.

6.6.3.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM JEOL JSM-7600F. Las muestras utilizadas se tomaron de las mismas dispersiones preparadas para la observación en TEM. Se colocó una gota de la dispersión en una cinta de carbono para fijar al porta muestra y se mantuvieron con vacío dinámico durante dos o tres días antes de su observación.

6.6.4 Potencial Z

El propósito de esta técnica es conocer la estabilidad que los sistemas sintetizados tendrán en dispersión. La determinación del potencial Z se llevó a cabo por triplicado en

un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical) a la par que se midió el tamaño de partícula por DLS, es decir, en las condiciones descritas para la determinación del tamaño de partícula.

6.6.5 Análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para conocer las propiedades térmicas de los polímeros que recubren las nanopartículas sintetizadas, se realizaron los correspondientes análisis térmicos.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en un equipo DSC1 Mettler Toledo, sometiendo a las partículas a un ciclo de calentamiento de 30 a 300°C con una velocidad de 20°C/min y en atmósfera de N₂ para todos los sistemas MIPs y NIPs.

Dado que en esta ocasión se evalúan las partículas compuestas con un centro inorgánico y recubrimiento orgánico, se llevó a cabo también su análisis por termogravimetría (TGA por sus siglas en inglés) en un equipo TGA 4000 Perkin Elmer, en un ciclo de 30- 300°C con una velocidad de 20°C/ min. Esta técnica es útil para conocer la composición orgánica e inorgánica de sistemas híbridos por la pérdida de peso que experimenta la muestra al perder el material orgánico por combustión.

6.6.6 Magnetometría. Curvas de histéresis de los sistemas

Las propiedades magnéticas de los sistemas fueron evaluadas usando un magnetómetro de muestra vibrante SQUID, MPMS3 (Quantum Design Inc.), a 300 K.

6.7 Síntesis del sistema híbrido por hipertermia de las nanopartículas de magnetita.

Por otro lado, con el fin de evaluar la síntesis del recubrimiento polimérico sobre las nanopartículas haciendo uso de la capacidad de generar hipertermia de este material, se llevó a cabo la síntesis del recubrimiento de nanopartículas de magnetita con polímero, exponiendo las nanopartículas a un campo magnético alterno de 107 KHz y 17.7 gauss durante la síntesis.

La síntesis se llevó a cabo en un circuito oscilador de Mazilli de Conmutación de voltaje cero (ZVS) (equipo generador de campos magnéticos alternos) conectado a una fuente de alimentación de 40 V de salida con 15 W de potencia. Este equipo ha sido utilizado y caracterizado previamente en el grupo de trabajo.⁹⁴

El experimento se realizó en un vaso termostatado rodeado por una bobina fabricada con tubo de cobre de 5/16 pulgadas con una $N=5$. La frecuencia y el campo magnético generado fue medida con ayuda de un osciloscopio InfiniiVision 2000 serie X (Agilent) utilizando una sonda MC162 EMC EMI RFI.

Para llevar a cabo el experimento, se pesaron 50 mg de nanopartículas y se sonicaron en 40 mL de acetonitrilo durante 10 min, las partículas dispersas se colocaron en el vaso termostatado y se agregó primeramente 0.1 mmol de ácido metacrílico (10 μ L) para funcionalizarlas. Se puso en operación el equipo durante 2 h, al tiempo que las partículas se agitaban a 250 rpm en un agitador orbital (dragon scientific, DSR-10) para evitar su precipitación.

Al transcurrir las dos horas, se añadió a la mezcla 0.1 mmol más de ácido metacrílico, 0.78 mmol de EGDMA (110 μ L) y 10 mg de AIBN y se agitó. El sistema entonces se puso bajo atmósfera de N_2 y se colocó nuevamente en el equipo generador de campos magnéticos alternos. Se tomaron muestras a 0 (nanopartículas funcionalizadas) 3 y 24 horas para comprobar si la polimerización se había llevado a cabo.

Al tiempo que se sintetizaban las partículas anteriores, se llevó a cabo el mismo procedimiento para partículas control. En un vaso termostatado se colocó la misma cantidad de nanopartículas con las mismas proporciones de reactivos mencionados con anterioridad, pero con la diferencia de que estas partículas no fueron expuestas al campo magnético alterno. Esto con la intención de descartar que la polimerización se lleve a cabo en condiciones ambientales.

6.8 Caracterización del sistema

La caracterización de las partículas obtenidas con este nuevo método se llevó a cabo utilizando las mismas técnicas descritas para los MIPs y NIPs magnéticos

(espectroscopía de infrarrojo a 24 h, análisis elemental, tamaño de partícula y potencial Z por DLS).

6.8.1 Cantidad de polímero formado alrededor de las nanopartículas a través del tiempo por TEM

Las muestras tomadas a diferentes intervalos de tiempo durante la síntesis del polímero sobre la nanopartícula, así como la muestra de las partículas control, se observaron en TEM con el fin de saber si la polimerización se llevaba a cabo bajo esas condiciones y encontrar el tiempo adecuado para que la reacción se complete.

Antes de depositar las muestras a las rejillas de TEM, las muestras se sometieron a lavados con acetonitrilo, separando con ayuda de un imán de neodimio, con el fin de eliminar los residuos de la reacción. Posteriormente, las partículas se resuspendieron en agua desionizada para su depósito en las rejillas.

6.9.1 Estudios de adsorción de los sistemas sintetizados.

Para evaluar las características de la eficiencia del reconocimiento molecular, así como la capacidad de carga que tienen los sistemas sintetizados, se realizaron isothermas de adsorción de 6MP.

10 mg de los sistemas MIP y NIP limpios (sin fármaco) se colocaron por separado en vasos termostatados y se pusieron en contacto con disoluciones de 6MP en MeOH/MeCN (3:7) a distintas concentraciones entre 5×10^{-6} y 6×10^{-5} M (para un total de 10 concentraciones diferentes). La mezcla se mantuvo con agitación constante a 250 rpm en un agitador orbital y todos los estudios se realizaron a temperatura constante de 25°C.

Para determinar la cantidad de fármaco adsorbido por las nanopartículas al equilibrio, se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas) y se midió el espectro de absorción electrónica en la región UV-visible, determinando la concentración con ayuda de la curva de calibración del anexo 1. Con los datos obtenidos por triplicado, se construyó la isoterma de adsorción y se realizaron los ajustes a distintos modelos de adsorción.

6.9.2 Estudios de liberación de los sistemas

Para caracterizar el potencial de los sistemas sintetizados como sistemas de liberación de fármaco, se llevaron a cabo los estudios de liberación *in vitro* de los mismos.

Antes de iniciar con los estudios de liberación, 70 mg de cada sistema (MIPs sin 6MP y NIPs) se pusieron en contacto por separado con 50 mL de una disolución de 6MP en medio MeCN/MeOH (3:7) con una concentración $2 \times 10^{-3} \text{M}$ y se dejaron agitando a 250 rpm manteniendo la temperatura constante a 25°C durante 12 horas para asegurar la saturación de cada sistema. Después de este tiempo, las partículas se separaron magnéticamente y se lavaron con 20 mL de MeOH para separar el fármaco que no estuviera propiamente adsorbido sobre las nanopartículas. Por último, los sistemas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Después de cargar cada sistema con el fármaco, se realizaron sus respectivos estudios de liberación. Para ello, 10 mg de cada sistema cargado con el fármaco se pusieron en contacto por separado con 40 mL de Buffer de fosfatos a pH 7,4 con temperatura constante a 37°C (controlador de temperatura marca PolyScience) para simular condiciones fisiológicas. Se agitó a 250 rpm en un agitador orbital.

Las cinéticas de liberación de cada sistema se realizaron por triplicado y se obtuvieron tomando muestras a distintos tiempos (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 y 30 horas). Para determinar la cantidad de 6MP liberado, se utilizó la espectroscopía UV calculando la concentración de 6MP en el medio con ayuda de la curva de calibración en el anexo 1.

6.9.3 Estudios de liberación con hipertermia magnética

Para evaluar el efecto que tiene la exposición de los sistemas sintetizados ante un campo magnético alterno, es decir, la generación de hipertermia magnética sobre la liberación del fármaco, se llevaron a cabo los estudios de liberación *in vitro* de los sistemas MMIP. Se colocaron 10 mg de cada sistema por separado en un vaso termostatado con 40 mL de buffer de fosfatos pH= 7,4. El vaso se colocó en el centro de la bobina en el equipo generador de campos magnéticos alternos y se mantuvo temperatura de 37°C y agitación a 250 rpm con el fin de evaluar únicamente el efecto de la hipertermia en la liberación de 6MP. La toma de muestra y la cuantificación de 6MP se realizaron como se describió para el experimento anterior.

7. Resultados y discusión

7.1 Síntesis de polímeros de impronta molecular para el fármaco 6 mercaptopurina

Se sintetizaron polímeros de impronta molecular sin nanopartículas magnéticas con el fin de establecer las condiciones de síntesis y las características de dichos polímeros. Todos los polímeros se sintetizaron como se muestra en la *Figura 14* (para más detalles consultar la sección de metodología).

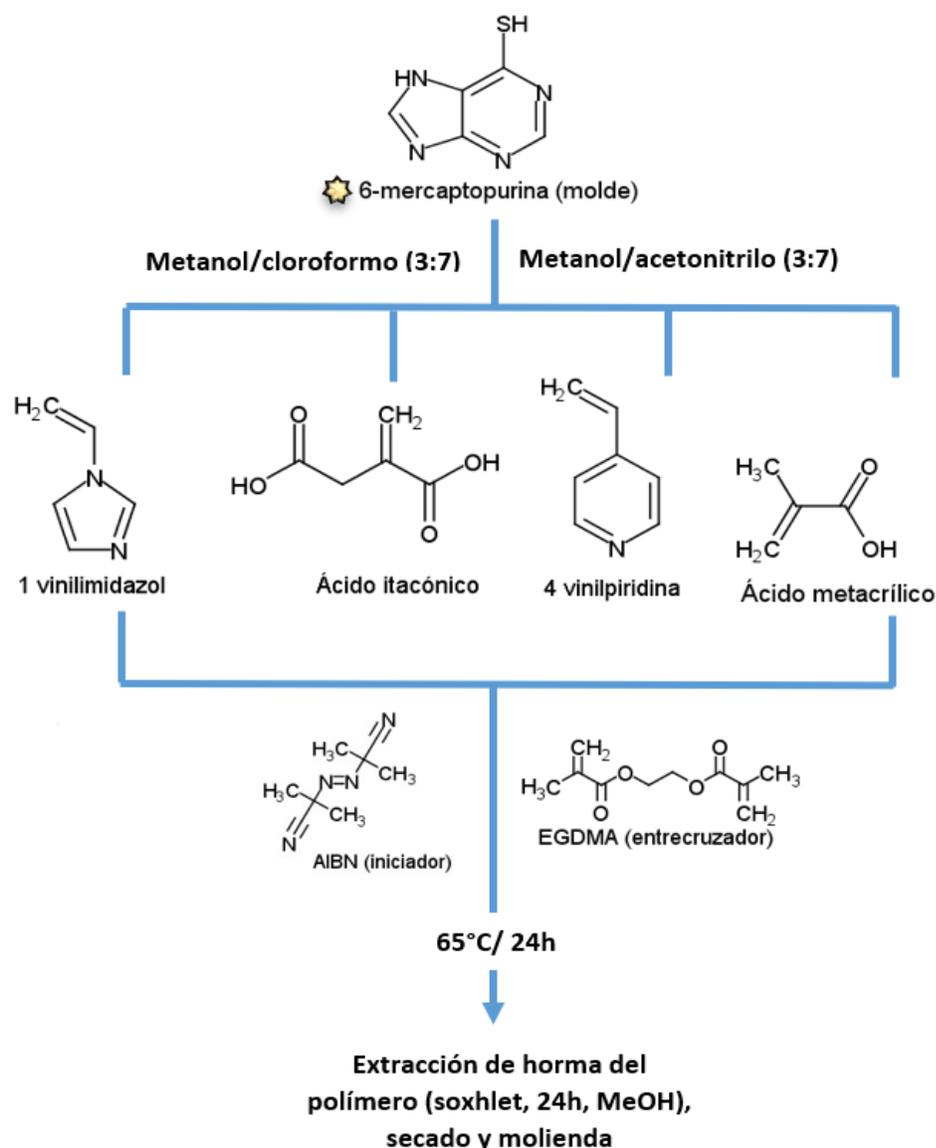


Figura 14. Esquema que representa de forma general los pasos llevados a cabo para sintetizar los polímeros de impronta (MIPs).

Se obtuvieron 8 polímeros diferentes (*Tabla 2*) dependiendo del disolvente utilizado para la síntesis y del monómero funcional que compone el polímero.

Tabla 2. Claves para los polímeros sintetizados de acuerdo con el monómero funcional y al disolvente empleado para su síntesis.

Polímero	Monómero funcional				Disolvente de síntesis	
	1- vinilimidazol	4- vinilpiridina	Ácido metacrílico	Ácido itacónico	Metanol/ acetonitrilo	Metanol/ triclorometano
PMIP-1VIN- MeCN	✓	-	-	-	✓	-
PMIP- 1VIN-CHCl ₃	✓	-	-	-	-	✓
PMIP-4VP- MeCN	-	✓	-	-	✓	--
PMIP-4VP- CHCl ₃	-	✓	-	-	-	✓
PMIP-MA- MeCN	-	-	✓	-	✓	-
PMIP-MA- CHCl ₃	-	-	✓	-	-	✓
PMIP-ITA- MeCN	--	-	-	✓	✓	-
PMIP-ITA- CHCl ₃	-	-	-	✓	-	✓

7.2 Caracterización de polímeros de impronta molecular para 6 mercaptopurina

Los polímeros obtenidos se caracterizaron como se describe a continuación:

7.2.1 Espectroscopía de infrarrojo de los polímeros de impronta molecular sintetizados

Cada polímero se caracterizó por FTIR (infrarrojo por transformada de Fourier) para comprobar la presencia de los monómeros funcionales en el polímero. Esta técnica es muy útil puesto que da información de los grupos funcionales presentes en la muestra analizada. Los espectros de infrarrojo se presentan en las *Figuras 16-19*. Para comprobar que los grupos del entrecruzador y del monómero funcional estuviesen presentes en el espectro, y saber si se trató de una copolimerización, se compararon los espectros de los polímeros con los del monómero funcional, pues éste último es el encargado de formar los sitios específicos en la impronta. Se debe tomar en cuenta además que la presencia del entrecruzador en el polímero es muy grande debido a las relaciones estequiométricas utilizadas en la síntesis, por lo que las bandas debidas al entrecruzador serán más intensas.

En la *Figura 15*, se muestran las principales bandas vibracionales presentes en los polímeros, que evidencian la presencia del monómero funcional.

En los espectros de ambos polímeros se observan bandas en 1722 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento C=O del grupo carbonilo, y que se atribuye al entrecruzador; las bandas anchas alrededor de los 3000 cm^{-1} , se pueden atribuir al estiramiento O–H del grupo carboxilo, presente también en el entrecruzador. Las bandas presentes en 2948 y 2872 cm^{-1} para PMIP-1VIN-MECN y en 2956 y 2887 cm^{-1} para PMIP-1VIN-CHCl₃, son atribuidas al estiramiento C–H asimétrico y simétrico respectivamente, del grupo CH₂. Esta banda era de esperarse en ambos polímeros debido al rompimiento de los dobles enlaces presentes en el monómero y en el entrecruzador, para formar enlaces de este tipo.

La banda presente en 3404 cm^{-1} en el espectro del monómero de 1-vinilimidazol (1VIN), aunque es de baja intensidad, es representativo del estiramiento C=N en una amina aromática. La asignación se confirma con la banda en 1647 cm^{-1} del mismo espectro. Dicha banda se observa también en el polímero PMIP-1VIN-MeCN, y no se descarta su presencia en el polímero PMIP-1VIN-CHCl₃, puesto que la banda ancha que presenta puede estar ocultando la señal.

Por último, las bandas en 1155 y 1259 cm^{-1} en PMIP-1VIN-CHCl₃, y 1132 y 1254 cm^{-1} para PMIP-1VIN-MeCN corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del enlace C–O de grupos éster atribuidos nuevamente a la presencia del entrecruzador en el polímero.

Finalmente, se observa la desaparición de las bandas en 3005 y 3111 cm^{-1} en los espectros de los polímeros, lo cual era de esperarse puesto que estas bandas corresponden al estiramiento C=C terminal de la estructura, mismo que es el enlace que se espera que se rompa durante la polimerización por radicales libres.

Figura 15. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional 1-vinilimidazol (negro) y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl₃ (3:7) (rojo) y MeOH/MeCN (3:7) (azul)

En la *Figura 16* se observan bandas parecidas a las descritas anteriormente, dado que el monómero 4-vinilpiridina se trata de una amina aromática, se observan las bandas principales en 3407 cm⁻¹ debido al estiramiento C=N, así como el conjunto de bandas que van de 2986 a 3068 cm⁻¹ atribuidas a la presencia de insaturados (C=C) tanto del alqueno como de los aromáticos. Estas bandas desaparecen en los espectros de ambos polímeros (PMIP-4VP-MeCN y PMIP-4VP-CHCl₃), al romperse el enlace C=C de la 4-vinilpiridina al polimerizar.

Por otro lado, la presencia del entrecruzador en ambos polímeros se comprueba por las señales en 1721 cm⁻¹ (PMIP-4VP-MeCN) y 1723 cm⁻¹ (PMIP-4VP-CHCl₃), que corresponden al estiramiento C=O del grupo carbonilo, así como las bandas 1128 y 1266 cm⁻¹ para PMIP-4VP-MeCN, y en 1155 y 1259 cm⁻¹ para PMIP-4VP-CHCl₃ que corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del enlace C–O de los grupos éster del EGDMA. Las bandas anchas alrededor de los 3000 cm⁻¹ se atribuyen al estiramiento del enlace C–H del grupo carboxilo o a la posible humedad de la muestra.

Figura 16. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional 4-vinilpiridina (negro) y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl₃ (3:7) (rojo) y MeOH/MeCN (3:7) (azul)

En la *Figura 17*, para los polímeros que utilizan ácido itacónico como monómero funcional (espectros rojo y azul) se observan las mismas señales que se han mencionado anteriormente. De esta forma, las bandas en 1722 y 1721 cm⁻¹ se asocian también al estiramiento del enlace C=O del grupo carbonilo presente en el polímero. Se observan también bandas en 1129 y 1262 cm⁻¹ (azul) y en 1156 y 1259 cm⁻¹ (rojo) que se asocian al estiramiento C–O del grupo éster en el EGDMA. Las señales alrededor de 3400 y 3500 cm⁻¹ corresponden a estiramientos O–H de los grupos hidroxilo, asociados a la presencia de humedad en la muestra.

Para el monómero ácido itacónico (negro), la señal ancha observada en 1685 cm⁻¹ se asocia al grupo metileno terminal ($\overset{R_2}{R_1}>C=CH_2$) confirmada por las bandas en 899 y 1435 cm⁻¹ correspondiente a las vibraciones fuera del plano y en el plano δCH respectivamente. Por último, se observa para este mismo espectro una señal en 3012 cm⁻¹ asociada al estiramiento O-H propia de un ácido carboxílico, lo que se confirma por la serie de sobretonos que van de 2920 a 2532 cm⁻¹.

Figura 17. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional ácido itacónico (negro) y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/CHCl₃ (3:7) (rojo) y MeOH/MeCN (3:7) (azul)

Finalmente, en la *Figura 18*, para los polímeros PMIP-MA-MeCN y PMIP-MA-CHCl₃ que fueron moldeados con ácido metacrílico, se observan las señales en 1721 cm⁻¹ para el estiramiento C=O del grupo carbonilo, así como bandas en 1131 y 1262 cm⁻¹ (azul) y en 1155 y 1259 cm⁻¹ (rojo) que corresponden a los estiramientos C–O simétricos y asimétricos del grupo éster del EGDMA. Se observan también la presencia de bandas alrededor de 2900 cm⁻¹ debidas a la presencia de grupos insaturados y alrededor de 3000 cm⁻¹ por la posible humedad en la muestra.

Las bandas presentes en el espectro del monómero funcional (ácido metacrílico) corresponden con las descritas anteriormente para el monómero ácido itacónico, ya que no contienen grupos funcionales distintos y la estructura es casi la misma.

Figura 18. Espectros FTIR obtenidos para el monómero funcional ácido metacrílico (negro) y para los polímeros de impronta sintetizados en MeOH/MeCN (3:7) (rojo) y MeOH/MeCN (3:7) (azul)

7.2.2 Calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los polímeros

La técnica de DSC es un método que se fundamenta en la medición de las modificaciones estructurales de materiales basadas por intercambios de calor, tal como el consumo de calor (involucrado en la fusión y descomposición) o la emisión de calor (involucrado en la cristalización).

Se estudiaron las propiedades térmicas de los polímeros obtenidos con los distintos monómeros funcionales por DSC. Se evaluaron cuatro de los ocho polímeros sintetizados, cada uno sintetizado con diferente monómero funcional. Los termogramas obtenidos se muestran a continuación.

Figura 19. Termogramas de los cuatro polímeros sintetizados en MeOH/MeCN (3:7). Condiciones: 30-340 °C, atmósfera de N₂ y velocidad 20 °C/min.

Como se observa en la *Figura 19*, para los cuatro polímeros sintetizados se tienen casi las mismas características térmicas. El pico endotérmico observado en todos los termogramas en el rango de 67 a 82 °C, se asocia a la pérdida de humedad del material.

Se observa en todos los termogramas, un segundo proceso endotérmico (absorción de energía) entre 285 y 309 °C, que se asocia a la descomposición del polímero.

Se observa que el polímero que utiliza ácido metacrílico como monómero funcional es el que se descompone primero (a 285.88 °C), mientras que el polímero basado el 1-vinilimidazol resiste un poco más (descompone a 309.12 °C).

Las temperaturas de transición vítrea (T_g) también son muy similares en todos los polímeros, presentándose en un rango de 160-230 °C, esto es debido a que la mayor parte del polímero está formado por el entrecruzador (proporción monómero funcional/ entrecruzador, 4:20), en otras palabras, en el polímero obtenido el monómero funcional está intercalado al azar con el entrecruzador, por lo que los cambios estructurales no

serán suficientes para dar grandes cambios en las propiedades térmicas de los polímeros.

7.2.3 Adsorciones de 6MP de los polímeros en diferentes medios

Una vez teniendo los polímeros de impronta molecular limpios, es decir, sin la molécula molde, se realizaron pruebas para evaluar la capacidad máxima de fármaco que los polímeros pueden adsorber bajo ciertas condiciones (capacidad de carga) y para evaluar el efecto del medio en la adsorción de 6MP.

Se evaluaron tres medios distintos: buffer de fosfatos 0.1M a pH= 7,4, metanol (MeOH) y MeOH/MeCN. Se utilizaron disoluciones de 6MP con una concentración inicial de 2.5×10^{-4} M en cada disolvente o mezcla de disolventes, y 10 mL de las mismas se pusieron en contacto con 20 mg de polímero (*Figura 20*). Se cuantificó la cantidad adsorbida de 6MP por cada polímero a las 3 h por espectroscopía UV-vis, para lo que se realizó una dilución 1:10 y se utilizó la curva de calibración del anexo 1.

La razón de utilizar distintos disolventes es porque los sitios de impronta que se esperan haber formado, reconocerán a la 6MP por interacciones débiles, tipo electrostáticas o puentes de hidrógeno. De esta forma, si el fármaco es muy afín al medio (disolvente) que se encuentra en exceso, será poco probable que el equilibrio se desplace hacia la formación del complejo polímero-6MP. Con este tipo de estudios se puede estimar la afinidad de la horma hacia el polímero.

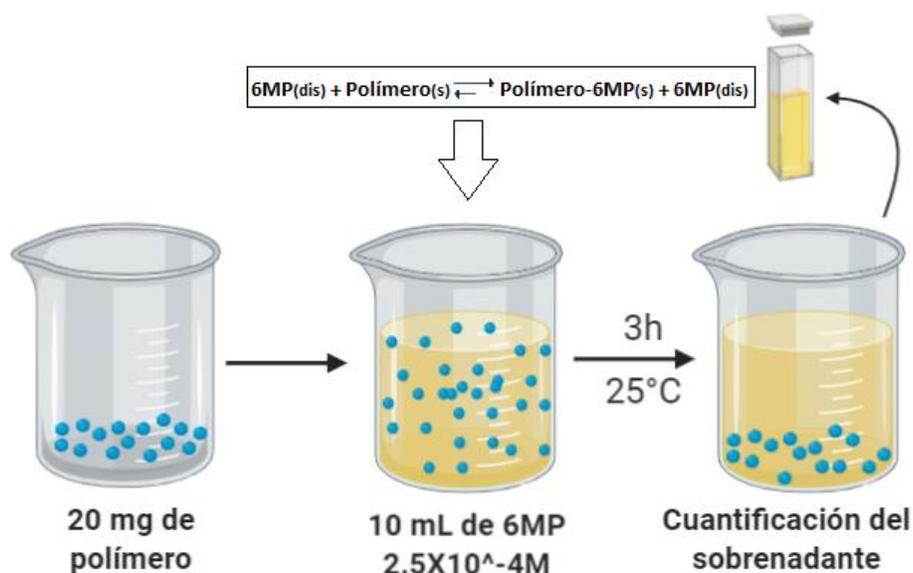


Figura 20. Estudios de adsorción de los polímeros sintetizados en distintos medios. El experimento fue realizado manteniendo la temperatura constante a 25°C y con agitación magnética.

Los resultados obtenidos del experimento se muestran a continuación:

En las *Figuras 21-23* se presentan los resultados obtenidos para la cantidad de 6 MP adsorbida (μg 6MP/g polímero) por cada polímero para cada medio de adsorción evaluado. La *Figura 24* muestra la cantidad de 6MP adsorbida por cada polímero en cada experimento a modo de comparación.

En la *Tabla 3* se presentan las cantidades exactas de fármaco adsorbido, donde se observa que la cantidad adsorbida de fármaco por cada polímero es independiente del medio en el que se realizó la síntesis de los mismos. Con esto se comprueba que el disolvente utilizado para la síntesis de los polímeros no afecta significativamente en el reconocimiento del polímero hacia la 6MP por lo que la naturaleza de los sitios de reconocimiento está dada por las interacciones monómero funcional-6MP en la etapa de prearreglo durante la síntesis del polímero.

Por otro lado, en cuanto al medio utilizado para las adsorciones, se observa que en el medio de buffer de fosfatos se obtuvo una adsorción de fármaco menor con respecto a los otros dos medios.

Figura 21. Cantidad de 6MP adsorbida por cada polímero en buffer de fosfatos pH= 7,4.

Figura 22. Cantidad de 6MP adsorbida para cada polímero en medio MeOH.

Figura 23. Cantidad de 6MP adsorbida para cada polímero en medio MeOH/MeOH (3:7).

Figura 24. Cantidad adsorbida de 6MP (Q) por cada polímero en los diferentes medios de adsorción (MeOH, buffer de fosfatos pH=7,4 y mezcla MeOH/MeCN (3:7)). Donde **A**= PMIP-1VIN-CHCl₃; **B**= PMIP-1VIN-MeCN; **C**= PMIP-4VP-CHCl₃; **D**= PMIP-4VP-MeCN; **E**= PMIP-ITA-CHCl₃; **F**= PMIP-ITA-MeCN; **G**= PMIP-MA-CHCl₃; **H**= PMIP-MA-MeCN.

Tabla 3. Cantidad media de 6MP adsorbida por los distintos polímeros sintetizados en tres medios distintos.

Polímero	Cantidad de 6MP adsorbida en medio MeOH (µg/g)	Cantidad de 6MP adsorbida en medio MeOH/MeCN (3:7) (µg/g)	Cantidad de 6MP adsorbida en medio Buffer de fosfatos pH=7,4 (µg/g)
PMIP-1VIN-CHCl ₃	2282.52	2350.53	536.26232
PMIP-1VIN-MeCN	2138.06	1780.29	344.91538
PMIP-4VP-CHCl ₃	2798.67	2956.68	839.10725
PMIP-4VP-MeCN	3179.93	3041.81	456.11202
PMIP-ITA-CHCl ₃	1135.30	2022.54	532.24629
PMIP-ITA-MeCN	699.99	3635.93	608.43347
PMIP-MA-CHCl ₃	1781.79	1492.18	472.55874
PMIP-MA-MeCN	1540.21	2140.95	1359.59227

Se realizó el análisis de varianza y una prueba de rangos múltiples de los datos obtenidos para conocer si existía diferencia significativa en la cantidad de 6MP adsorbida por el efecto de las distintas variables evaluadas. El análisis se realizó con ayuda del software Statgraphics, Centurion XVI.II, y los resultados se muestran en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Análisis de Varianza para cantidad absorbida - Suma de Cuadrados Tipo III. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: polímero	928784.	1	928784.	2.01	0.1608
B: monómero	4.31507E6	3	1.43836E6	6.79	0.0007
C: Disolvente	3.948E7	2	1.974E7	93.22	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1.69266E6	3	564219.	2.66	0.0584
AC	429712.	2	214856.	1.01	0.3702
BC	1.10047E7	6	1.83411E6	8.66	0.0000
ABC	6.7122E6	6	1.1187E6	5.28	0.0003
RESIDUOS	1.01646E7	48	211763.		

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de cantidad absorbida en contribuciones debidas a varios factores. La contribución de cada factor se midió eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que hay valores-P menores que 0.05, estos factores (disolvente utilizado y el monómero funcional), y sus interacciones, son los que tienen un efecto estadísticamente significativo sobre cantidad absorbida con un 95.0% de nivel de confianza. Se observó también que en el medio buffer de fosfatos se tuvo una adsorción significativamente más baja que en los otros medios.

La prueba de rangos múltiples reveló con un 95% de confianza, que no hay diferencia significativa en la cantidad de 6MP adsorbida por los polímeros sintetizados en distintos disolventes, lo que se comprueba al observar el gráfico de medias obtenido por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (*Figura 25*).

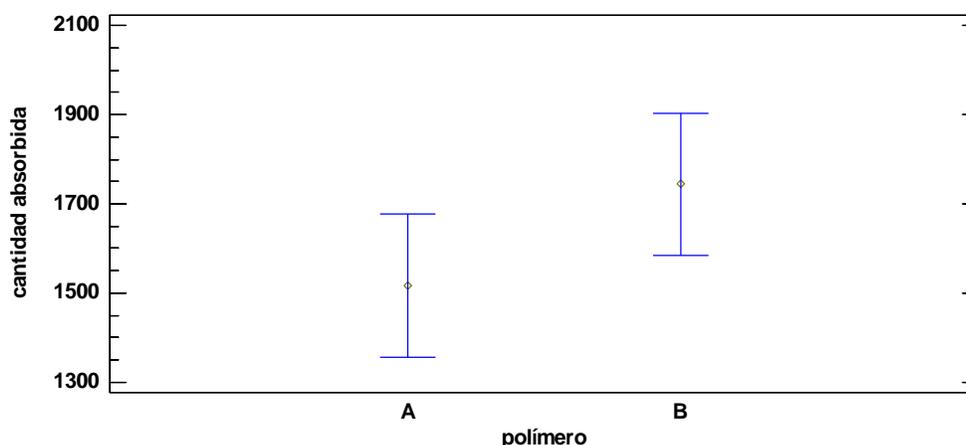


Figura 25. Gráfico de medias obtenido por el método de LSD de Fisher al 95% de confianza para la cantidad de 6MP adsorbida ($\mu\text{g/g}$) por los polímeros sintetizados con la mezcla 3:7 MeOH/MeCN (A), y por los polímeros sintetizados con la mezcla 3:7 MeOH/ CHCl_3 (B).

Con los resultados anteriores en mente, se decidió utilizar acetonitrilo como disolvente para llevar a cabo el recubrimiento de las partículas de magnetita con la técnica de impronta molecular, tomando en cuenta que la adsorción en este medio es ligeramente mayor con respecto a los otros medios.

7.3 Síntesis de nanopartículas de magnetita por coprecipitación

La síntesis de las partículas de magnetita se llevó a cabo mediante el método de coprecipitación^{48,95} como se describió anteriormente (ver metodología). Se obtuvo un polvo de color negro con un rendimiento de aproximadamente 80%.

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



7.4 Caracterización de nanopartículas magnéticas (MAG)

Con el fin de asegurar que las partículas sintetizadas se obtuvieron con las características en tamaño y propiedades que se requieren para su posterior uso, se llevó a cabo su caracterización por medio de distintas técnicas que se mencionan a continuación:

7.4.1 Espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojo obtenido para las partículas de magnetita sin ninguna clase de recubrimiento (MAGN) se muestra en la *Figura 26*.

Figura 26. Espectro de FTIR obtenido para las partículas de magnetita

Como era de esperarse, las bandas vibracionales que presentan las partículas son solo tres, debido a que se trata de un material inorgánico formado por una red con enlaces Fe-O-Fe y son pocos los modos normales de vibración presentes en la muestra.

De esta forma, la banda en 3358 cm^{-1} puede ser atribuida a los estiramientos simétricos del grupo -OH en la superficie de la magnetita, pues las partículas de magnetita son ácidos de Lewis y pueden unir moléculas de agua a su superficie. Por otro lado, la banda en 543 cm^{-1} está bien reportada en la literatura y se atribuye a la vibración de los enlaces Fe-O de la magnetita.⁹⁵

7.4.2 Difracción de rayos X de polvos

Una de las formas más usadas para caracterizar materiales cristalinos como lo es el caso de la magnetita, es mediante la técnica de difracción de rayos X de polvos, debido a que cada material tiene un patrón de difracción asociado. De esta forma, la estructura cristalina de la magnetita fue caracterizada por este método y el difractograma obtenido (*Figura 27*) se analizó con ayuda del programa MATCH!-Phase identification from powder diffraction ver. 3.5.0.99®, coincidiendo con magnetita de acuerdo con el PDF (Powder Diffraction File) número 00-019-0629.

Los picos de difracción con los Índices de Miller asociados (220), (311), (400), (422), (511) y (440) reflejan los planos cristalinos característicos de la magnetita con una estructura de espinela cúbica.⁹⁶ La magnetita puede oxidarse durante su síntesis si no se cuidan las condiciones, pasando a sus formas oxidadas maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) o hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Generalmente, los picos de difracción en los planos (113) y (210) o (213) y (210) son los picos característicos de maghemita y hematita respectivamente. Dado que esos picos no aparecen en el patrón de difracción presentado, se descarta la presencia de diferentes composiciones o estructuras de óxido de hierro.^{97,98}

Figura 27. Patrón de difracción de rayos X de polvos para la magnetita sintetizada por coprecipitación. El área sombreada representa el pico de máxima intensidad que fue utilizado para medir el tamaño de partícula. En la esquina superior derecha se observa el ajuste Gaussiano realizado para este fin.

Con los resultados de rayos X de la magnetita es posible estimar el tamaño promedio de cristalita utilizando la ecuación de Scherrer:^{99,100}

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \dots \dots \dots (15)$$

Donde, β es el ancho a la mitad de la altura de la señal de máxima intensidad, K es el factor de forma, λ es la longitud de onda de la difracción de rayos X (generalmente $\lambda=0.154$ nm), d es el tamaño promedio de cristalita y θ es el ángulo de Bragg en grados.

Con lo anterior, el ancho a la mitad de la altura (FWHM) para la señal de máxima intensidad en 35.57° de la magnetita se calculó con ayuda del programa OriginPro® 2016 haciendo un ajuste no lineal a un modelo de gaussiana de esta señal, obteniéndose una FWHM de 0.9257. De acuerdo con el modelo de Scherrer, el tamaño promedio de cristalita fue de 9.42 nm.

7.4.3 Tamaño de partícula y potencial Z por Dispersión dinámica de luz (DLS)

Una muestra de nanopartículas de magnetita se suspendió en agua desionizada (concentración de aproximadamente 2 mg/mL) y se midió el tamaño y el potencial Z en un equipo zetasizer NanoS. Se obtuvo un tamaño promedio de 236.9 nm (*Figura 28*).

Figura 28. Dispersión del tamaño de partícula obtenido por la técnica de DLS para las partículas de magnetita.

Estos resultados no fueron los esperados que eran de alrededor de 10 nm, por lo que se sugiere la formación de aglomerados, pues en agua es fácil para las nanopartículas formarlos debido a su bajo potencial Z (-21mV) asociado a inestabilidad en suspensión de la muestra, debido a que no es lo suficientemente negativa para provocar repulsiones entre partículas. Este fenómeno ha sido informado previamente en la literatura y se sugiere que se forman cadenas, y éstas a su vez forman cúmulos con un radio hidrodinámico mucho mayor con respecto a la partícula aislada.

Se obtuvo un índice de polidispersidad (PDI) de 0.439, este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra se encuentra cercana a ser monodispersa y valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños. Esto concuerda con el gráfico presentado en la *Figura 28*, donde se observan dos poblaciones de partículas.

7.4.4 Microscopía electrónica de transmisión

Debido a que el tamaño obtenido para la magnetita por DLS fue mayor a lo esperado, se llevó a cabo la observación de la muestra por microscopía electrónica de transmisión (TEM). La técnica se basa en la incidencia de un haz de electrones sobre la muestra y la imagen es formada por los electrones transmitidos a través de la muestra. Por otro lado, las microestructuras locales como los planos cristalinos pueden ser analizadas utilizando microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM).¹⁰¹

Las microscopías obtenidas para la magnetita se muestran en la *Figura 29* donde se puede observar la estructura de la red cristalina. Al mismo tiempo, se realizó un análisis de dispersión de electrones de las partículas mediante el uso del software Gatan DigitalMicrograph® 3.01.598.0.

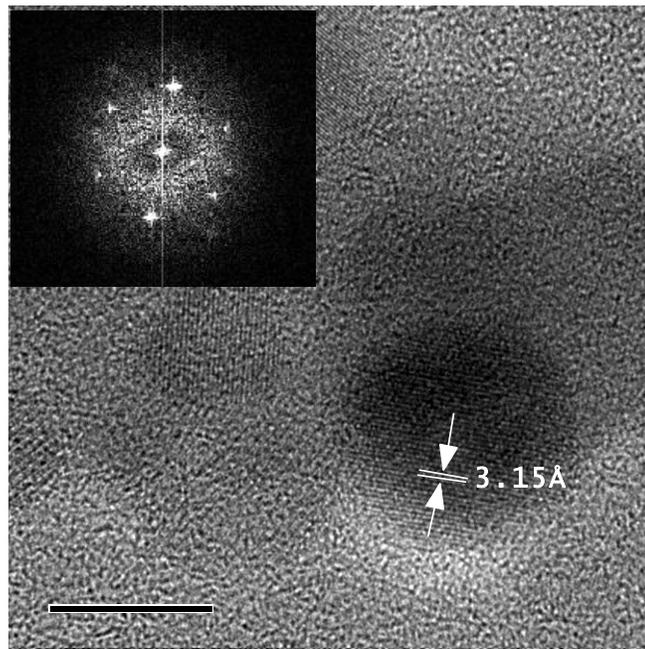


Figura 29. Micrografía TEM para las nanopartículas de magnetita sintetizada por el método de coprecipitación. En la esquina superior izquierda se observa la dispersión de electrones.

Con las microscopías de las partículas, se calculó la dispersión del tamaño de partícula con ayuda del software imageJ®, obteniendo un tamaño promedio de 9.76 ± 1.7 nm (N=100) (*Figura 30*). Estos tamaños concuerdan con los obtenidos en otros trabajos reportados para nanopartículas sintetizadas por coprecipitación.^{102,103}

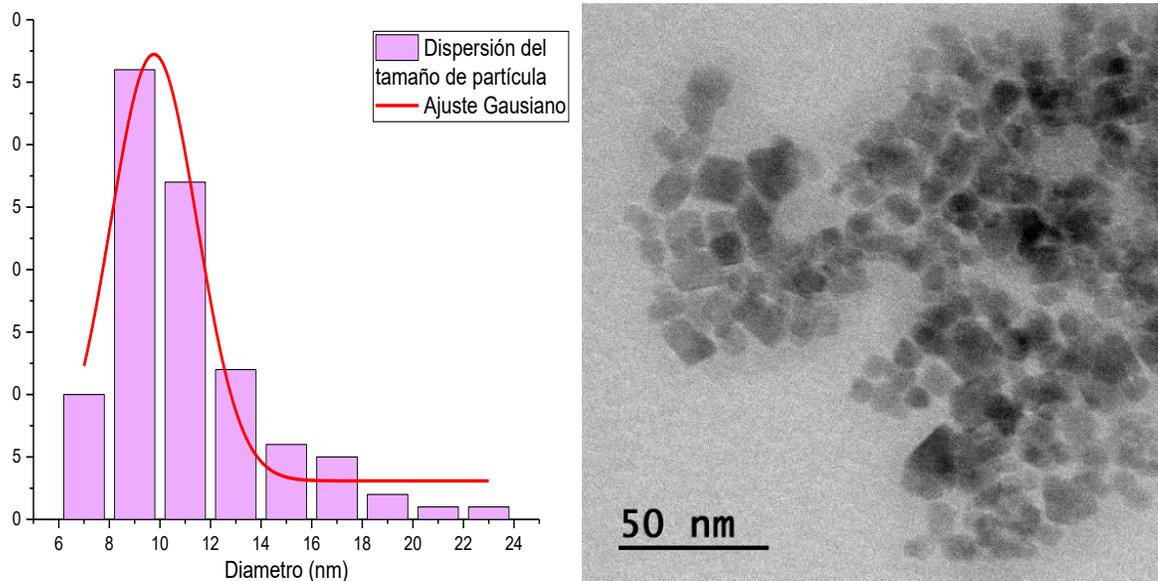


Figura 30. Distribución del tamaño de partícula por TEM. A la derecha se muestra el ajuste gaussiano del grafico de frecuencia de los diámetros medidos de las partículas de magnetita de la micrografía de la derecha (N=100).

7.5 Síntesis de nanopartículas de magnetita recubiertas improntadas (MMIP) y no improntadas molecularmente (MNIP)

La síntesis de los sistemas de impronta molecular magnéticos se realizó como se explicó anteriormente en la metodología, modificando primero la superficie de las partículas con los distintos monómeros funcionales. La *Figura 31* muestra un ejemplo de la funcionalización de las nanopartículas para el monómero ácido metacrílico. Los pasos siguientes se muestran en la *Figura 32*.

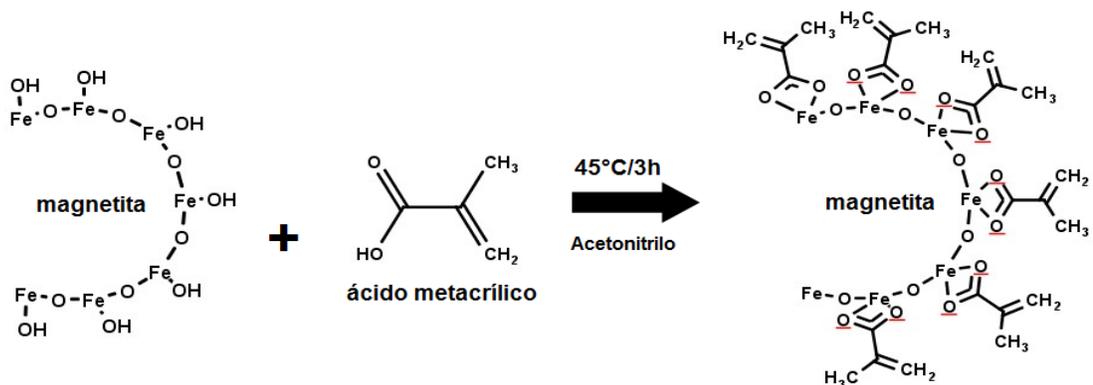


Figura 31. Funcionalización de las nanopartículas de magnetita con ácido metacrílico.

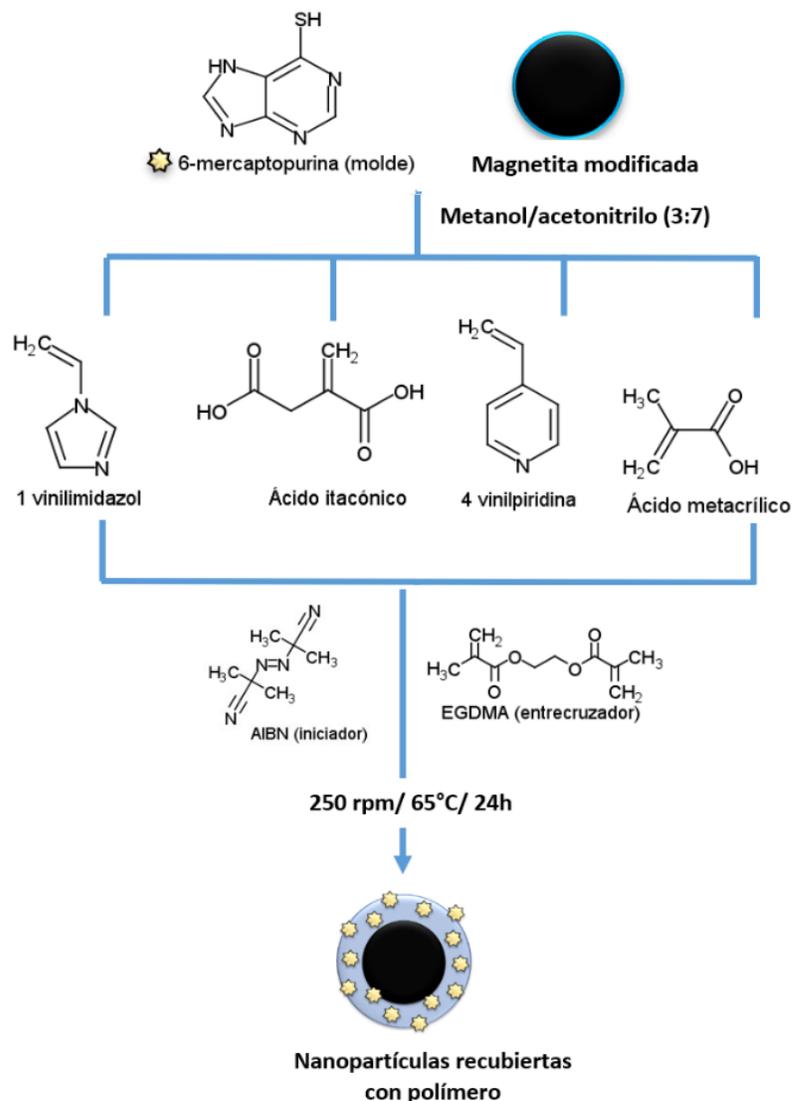


Figura 32. Esquema de la síntesis de los sistemas magnéticos recubiertos con polímeros de impronta para 6MP. Para la síntesis del sistema no improntado únicamente se evita la adición de 6MP a la mezcla.

Posterior a las síntesis de los distintos sistemas, las partículas que fueron sintetizadas en presencia de la 6MP (MMIPs), se lavaron para retirar al fármaco y llevar a cabo su caracterización y los siguientes estudios de adsorción.

7.6 Caracterización de MNIP y MMIP

Una vez que las partículas se recubrieron con polímero y que se extrajo la molécula molde (6MP) de los MMIPs, se procedió a caracterizar el sistema para saber si el recubrimiento se había realizado correctamente y conocer a su vez, las características del material

híbrido obtenido. A continuación, se describen los resultados obtenidos al someter las partículas recubiertas a diferentes análisis.

7.6.1 Espectroscopía de infrarrojo

Se realizó el análisis por FTIR de los ocho sistemas para saber si las nanopartículas de magnetita tenían recubrimiento polimérico y si el monómero, responsable del reconocimiento de la 6MP en la impronta, se encontraba presente. Por esto, se realizó una comparación de los sistemas con su respectivo monómero funcional. Los resultados de este análisis se muestran en las *Figuras 33-35*.

Figura 33. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-1VIN (negro) y MNIP-1VIN (rojo), así como para el monómero funcional 1-vinilimidazol (azul).

En la *figura 33* se puede observar la aparición de bandas en 1376 cm^{-1} (rojo) y en 1334 cm^{-1} (negro). Las bandas en 3384 cm^{-1} (MNIP-1VIN) y en 3390 cm^{-1} (MMIP-1VIN) se atribuyen a la presencia del monómero funcional 1-vinilimidazol, ya que en esta región se observan las vibraciones de tensión N–H (asimétrica y simétrica respectivamente) asociados a aminas aromáticas. Las bandas en 1615 y 1634 cm^{-1} confirman la asignación anterior, pues las bandas en estas regiones se asocian a las vibraciones de flexión N–H. Las

señales en 1334 y 1376 cm^{-1} están asociadas al estiramiento C-H fuera del plano de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) presentes en el polímero.

Finalmente, la desaparición de las bandas en 3005 y 3111 cm^{-1} en los espectros de las partículas recubiertas era de esperarse puesto que éstas corresponden al estiramiento C=C en el grupo $\text{C}=\text{CH}_2$ de la estructura del monómero funcional, mismo que es el enlace sensible a reacciones radicalarias.

Cabe mencionar que la intensidad de las bandas es muy baja en comparación con la banda en 547 cm^{-1} que es la banda característica de la magnetita asociada al estiramiento Fe-O. Esta baja intensidad de las señales se debe a que las proporciones polímero-magnetita son muy diferentes, lo cual es indicativo de que el recubrimiento sobre la nanopartícula fue menor en masa con respecto a la nanopartícula, lo que era de esperarse.

Figura 34. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-4VP (rojo) y MNIP-4VP (azul) y para el monómero funcional 4-vinilpiridina (negro).

Por otro lado, en los espectros obtenidos para los sistemas MMIP-4VP y MNIP-4VP (*Figura 34*) se observan señales de baja intensidad que nuevamente se atribuyen a que

el polímero que recubre la partícula es muy poco, sin embargo, se logran observar señales que no están presentes en el espectro de FTIR de la magnetita (*Figura 26*).

Se observan señales en 1724 cm^{-1} (MMIP-4VP) y 17237 cm^{-1} (MNIP-4VP) que corresponden al estiramiento C=O del grupo carbonilo, así como las bandas 1137 y 1263 cm^{-1} para MMIP-4VP y en 1136 y 1267 cm^{-1} para MNIP-4VP que corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del enlace C–O de los grupos éster del EGDMA, por lo tanto, estas señales son indicativas de la presencia del entrecruzador en el polímero recubriendo las nanopartículas. Las bandas en 545 y 553 cm^{-1} demuestran la presencia de las partículas de magnetita al ser representativo del estiramiento del enlace Fe-O como se ha mencionado anteriormente.

Figura 35. Espectros de FTIR para los sistemas MMIP-ITA (rojo) y MNIP-ITA (azul), así como para el monómero funcional ácido itacónico (negro).

En la *Figura 35*, para los sistemas híbridos en los que se utilizó ácido itacónico como monero funcional, se observan las señales en 534 (MMIP-ITA) y 548 cm^{-1} (MNIP-ITA) debida al estiramiento Fe-O de la magnetita. Por otro lado, las señales en 1331 y 1437 cm^{-1} para MNIP-ITA, y en 1324 y 1423 cm^{-1} para MMIP-ITA se atribuyen a la presencia

del grupo ácido carboxílico y están asociados a la torsión y al estiramiento del grupo carboxilo respectivamente.

Debido a que las señales son de baja intensidad, no es posible asignar más bandas que refuten la presencia del polímero sobre las nanopartículas.

Figura 36. Espectros de FTIR para los sistemas MNIP-MA (azul) y MNIP-MA (rojo), así como para el monómero funcional ácido metacrílico (negro).

Finalmente, en la *Figura 36* para los sistemas MMIP-MA y MNIP-MA, se observan las bandas en 1722 y 1724 cm^{-1} que corresponde al estiramiento -C=O del grupo carbonilo, así como bandas en 1141 y 1263 cm^{-1} (rojo) y en 1136 y 1257 cm^{-1} (azul) que corresponden a los estiramientos simétricos y asimétricos del grupo C-O del EGDMA. Al igual que en los espectros descritos anteriormente, la presencia de las nanopartículas de magnetita se comprueba por la señal presente en 546 y 551 cm^{-1} .

7.6.2 Difracción de rayos X de polvos

La difracción de rayos X de los sistemas se llevó a cabo con el fin de identificar si existía algún cambio en la estructura cristalina de las partículas de magnetita después de recubrirlas con los distintos polímeros.

Las caracterización de los rayos X de polvos y la identificación de fase se llevaron a cabo con la ayuda del software MATCH! ®. Se utilizó como referencia el PDF número 00-019-0629 y se observó correlación con magnetita.

Los difractogramas obtenidos para los sistemas sintetizados se muestran en las *figuras 37–40*.

Figura 37. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA. En la esquina superior derecha se observa el ajuste Gaussiano realizado al pico de máxima intensidad (área sombreada).

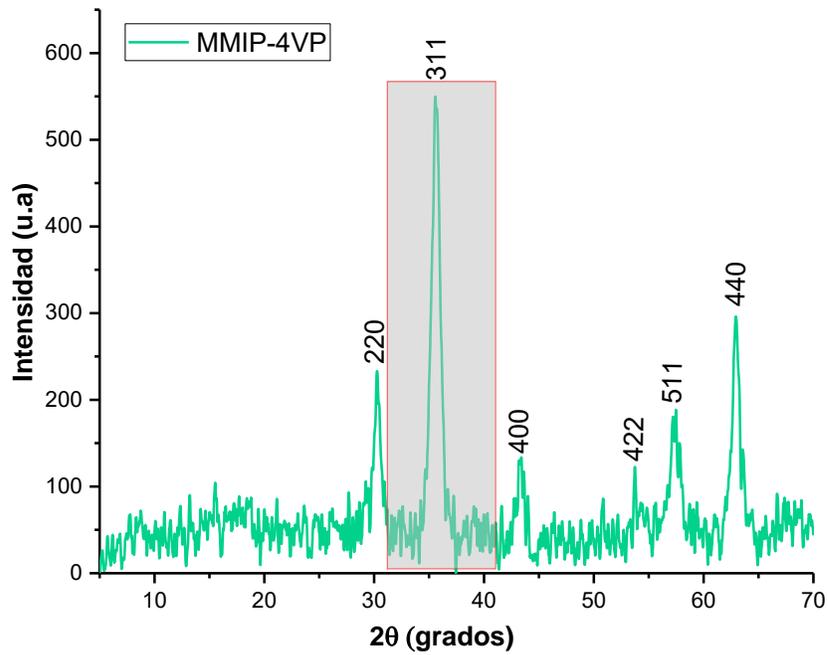


Figura 38. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema MMIP-4VP. En la esquina superior derecha se observa el ajuste Gaussiano realizado al pico de máxima intensidad (área sombreada).

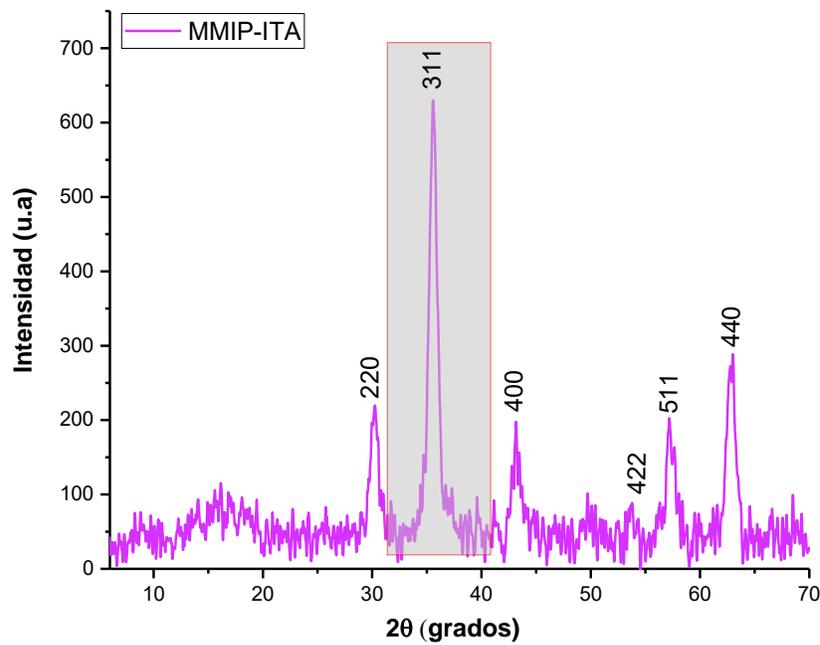


Figura 39. Difractograma de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA. En la esquina superior derecha se observa el ajusta Gaussiano realizado al pico de máxima intensidad (área sombreada).

Figura 40. Difractograma de rayos X de polvos para el sistema MMIP-MA. En la esquina superior derecha se observa el ajuste Gaussiano realizado al pico de máxima intensidad (área sombreada).

Los picos de difracción con los Índices de Miller asociados (220), (311), (400), (422), (511) y (440) reflejan los planos cristalinos característicos de la magnetita con una estructura de espinela cúbica para todos los sistemas.

Los difractogramas de rayos X se utilizaron también para calcular el tamaño promedio de cristalita de las nanopartículas. Analizando los datos con ayuda del programa OriginPro® 2016 y aplicando la ecuación de Scherrer (*Ecuación 15*). Se realizó el ajuste Gaussiano al pico de máxima intensidad de cada difractograma correspondiente al plano 311 para obtener el ancho a la mitad de la altura.

Los tamaños de cristalita obtenidos para todos los sistemas por este método se presentan en la *Tabla 5* y se puede comprobar que la magnetita no sufre cambios estructurales durante la síntesis del recubrimiento polimérico.

Tabla 5. Tamaño promedio de cristalita para los sistemas sintetizados obtenidos aplicando la ecuación de Scherrer.

Sistema	2 θ (°)	FWHM	Diámetro promedio (nm)
MAG	35.57	0.93	9.42
MIP-4VP	35.62	0.97	9.03
MIP-MA	35.56	0.93	9.41
MIP-1VIN	35.61	0.95	9.22
MIP-ITA	35.59	0.89	9.80

7.6.3 Análisis elemental

El análisis elemental de cada sistema se llevó a cabo para conocer en qué proporción está presente el material orgánico con respecto a las partículas. La *tabla 6* muestra los porcentajes obtenidos para los elementos carbono, nitrógeno e hidrógeno.

Tabla 6. Porcentajes en peso de C, H y N para los sistemas sintetizados. En rojo se resaltan los sistemas con mayor porcentaje de nitrógeno.

Sistema	Carbono (%)	Nitrógeno (%)	Hidrógeno (%)
MAG	0.30	0.37	0.49
MMIP-MA	1.20	0.69	0.55
MNIP-MA	1.64	0.42	0.84
MMIP-4VP	2.20	0.85	0.92
MNIP-4VP	2.17	1.69	0.65
MMIP-ITA	1.04	0.52	0.58
MNIP-ITA	0.94	0.78	0.55
MMIP-1VIN	0.74	1.57	0.65
MNIP-1VIN	1.07	0.86	0.74

Esta técnica permitió corroborar la presencia de material orgánico en los sistemas. Se observa que los porcentajes de C, H y N son muy pequeños, con valores de no más del 2.2% en peso de carbono, que es el elemento principal presente en el polímero. Esto era de esperarse, pues se busca que las partículas estén recubiertas por una capa delgada

de polímero, por lo que su contribución a la masa total del sistema será mínima. Por otro lado, se comprueba la presencia de los monómeros funcionales 1-vinilimidazol y 4-vinilpiridina al observar los mayores porcentajes en peso para el nitrógeno en los sistemas en los que se utilizaron dichos monómeros en la síntesis, estos números están resaltados en rojo en la tabla. En el caso del sistema MMIP-MA, el porcentaje alto de nitrógeno, que fue incluso mayor al obtenido en las partículas solas, se atribuye a la presencia de la 6MP en el polímero, lo cual no es de extrañar tratándose de un MIP.

Finalmente, el hecho de que los porcentajes obtenidos en las partículas de magnetita fueran diferentes de cero se atribuye al agua de adsorción presente en la superficie de las nanopartículas¹⁰⁴ y a residuos de disolvente.

7.6.4 Determinación del tamaño de partícula y potencial Z por el método de dispersión dinámica de luz

La determinación del tamaño de partícula para los sistemas sintetizados se llevó a cabo haciendo dispersiones de aproximadamente 2 mg/mL de cada sistema en agua desionizada. Las partículas se sonicaron durante 10 min antes de su medición.

Al mismo tiempo que se midió el tamaño de partícula, se llevó a cabo la medición del potencial Z de los sistemas con el fin de conocer su estabilidad en una dispersión. Los resultados se muestran a continuación.

Como se observa en la *Tabla 7*, en general las partículas recubiertas tanto MMIPs como MNIPs presentaron tamaños de partícula en el intervalo de 130 a 230 nm. Estos valores son muy grandes considerando que el tamaño de las partículas de magnetita es de alrededor de 10 nm por lo que se sugiere la formación de aglomerados pues la técnica mide el radio hidrodinámico de las partículas.¹⁰⁵

Tabla 7. Tamaño de partícula y potencial Z obtenidos para todos los sistemas por la técnica de DLS.

Sistema	Tamaño promedio (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
MMIP-MA	193.5	0.396	-18.0
MNIP-MA	145.9	0.363	-9.4
MMIP-ITA	136.6	0.358	-11.7
MNIP-ITA	229.9	0.410	-17.5
MMIP-1VIN	141.5	0.353	-15.7
MNIP-1VIN	125.5	0.265	-26.8
MMIP-4VP	147.3	0.341	-16.0
MNIP-4VP	184.8	0.444	-16.4

El PDI en todos los sistemas fue menor a 0.5, por lo que se considera que las muestras analizadas fueron tendían a ser poco polidispersas, es decir, se tenía una sola población de tamaños en mayor proporción.

Finalmente, para los sistemas evaluados, se obtuvieron valores de potencial Z negativos en todos los casos, pero nunca menor que -30 mV; de acuerdo a la literatura, se considera que las nanopartículas con un potencial Z entre -10 y +10 mV son casi neutras y aquellas con potenciales Z mayores a +30 mV y menores de -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y aniónicas respectivamente.¹⁰⁶ De esta forma, los sistemas con valores entre -30 y +30 mV, como lo es en este caso, tienden a formar aglomerados al presentar una repulsión electrostática débil entre partículas.

7.6.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)

Para tener una mejor visualización de los sistemas sintetizados y una idea más certera de los tamaños de partícula, se llevó a cabo la observación de las muestras por TEM y SEM. El análisis de las micrografías obtenidas se realizó con el software Gatan DigitalMicrograph® 3.01.598.0. Se observaron aglomerados de alrededor de 50 nm. Al mismo tiempo, se realizó un análisis por contraste z para comprobar la presencia del polímero pues las imágenes obtenidas permiten diferenciar fases de acuerdo con el peso atómico del material que lo compone.

Las micrografías de los sistemas se muestran a continuación.

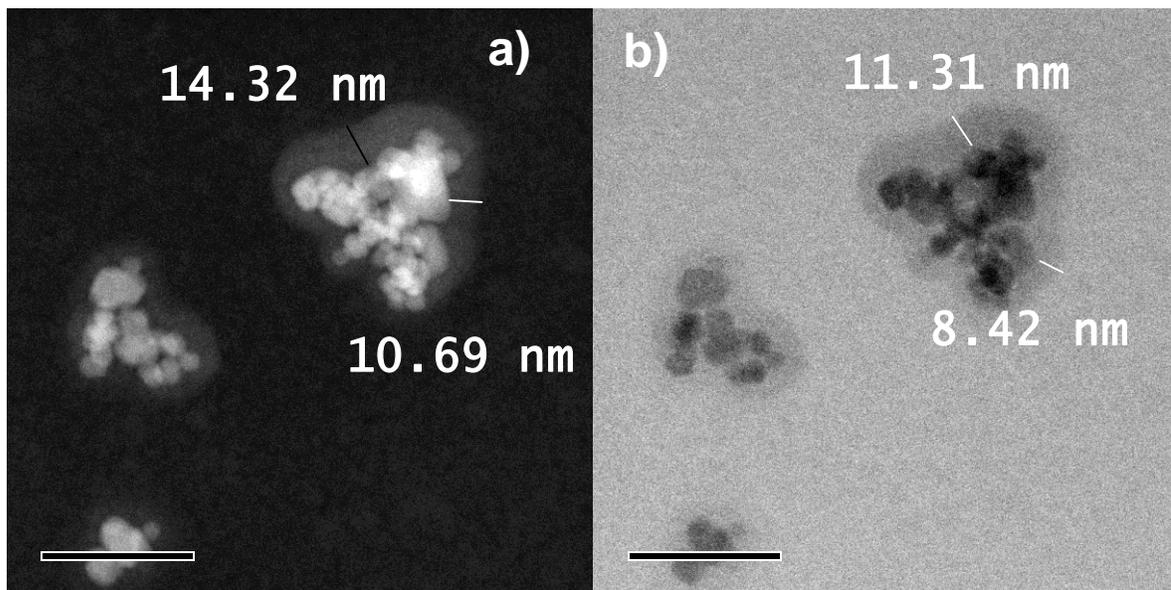


Figura 41. Micrografías TEM del sistema MMIP-MA por contraste z. a) campo oscuro y b) campo claro

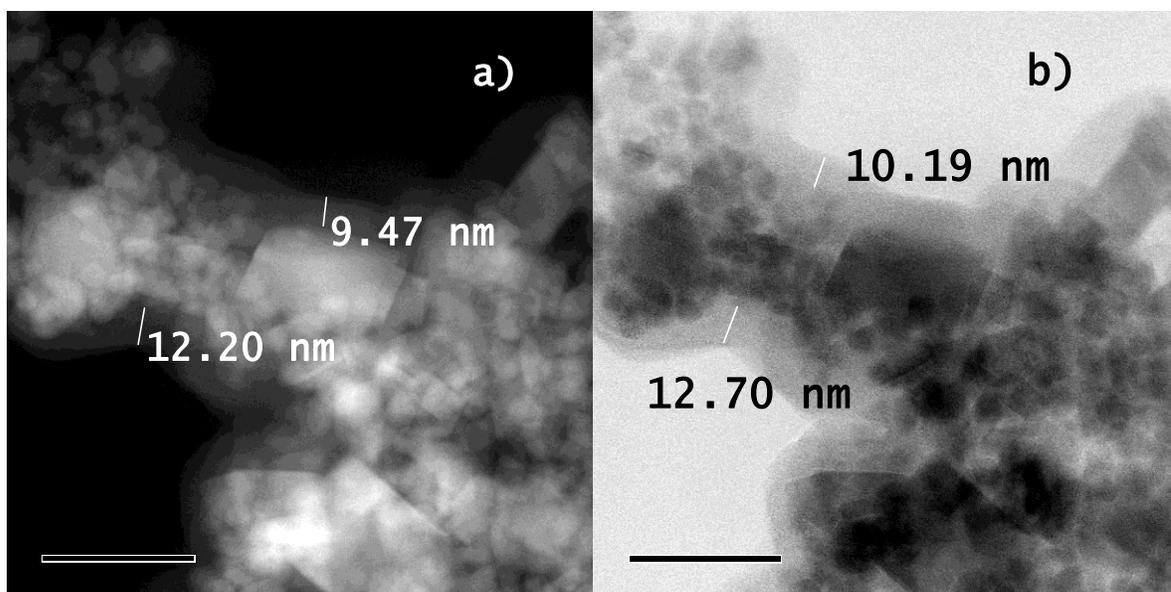


Figura 42. Micrografías TEM del sistema MMIP-4VP por contraste z. a) campo oscuro y b) campo claro.

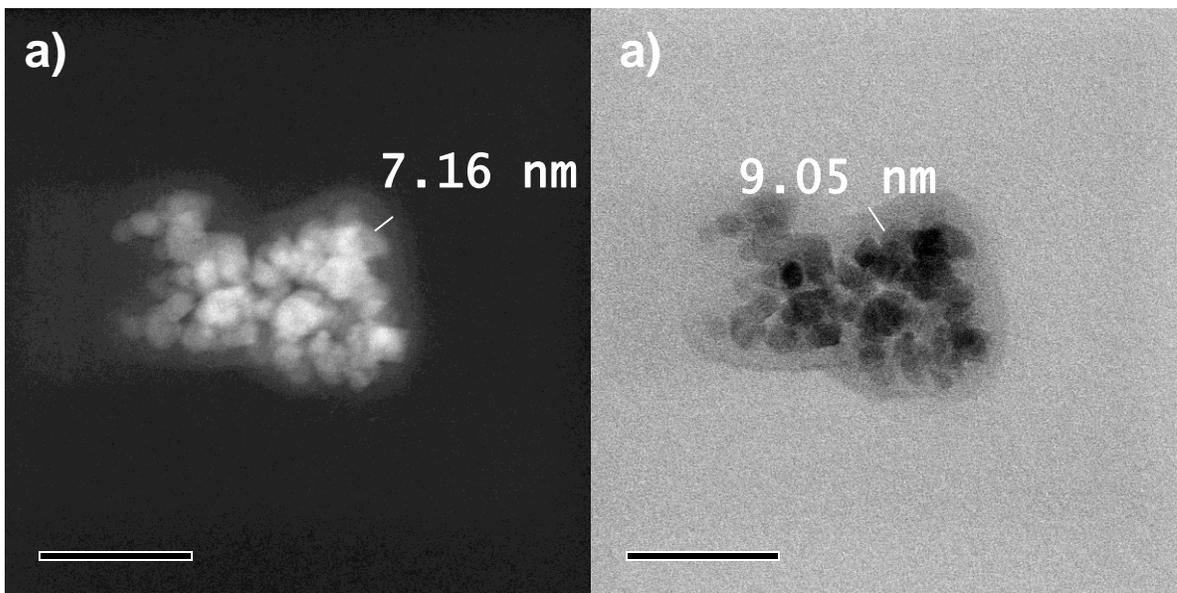


Figura 43. Micrografías de TEM para el sistema MMIP-1VIN por la técnica de contraste z. a) campo oscuro y b) campo claro.

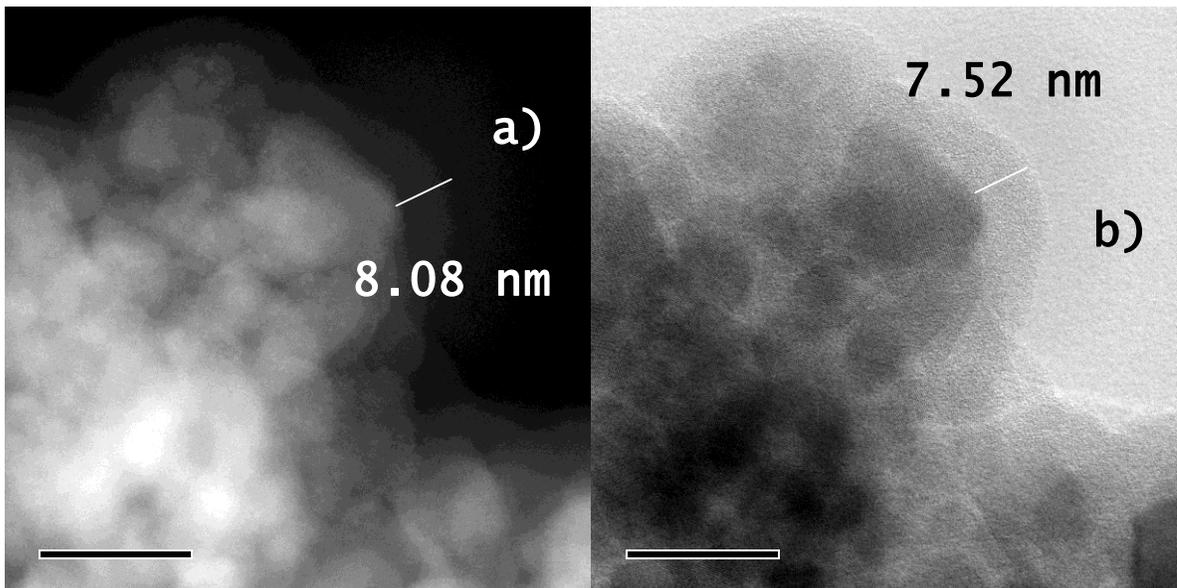


Figura 44. Micrografías de TEM para el sistema MMIP-ITA por la técnica de contraste z. a) campo oscuro y b) campo claro.

En las *Figuras 41-44*, se observan en general, nanocompositos formados de aglomerados de nanopartículas recubiertas con polímero. La técnica de contraste z en campo oscuro y campo claro permite diferenciar las fases presentes en el material. Para todos los sistemas, a la izquierda (*Figuras 41-44 a*), la fase del material con mayor peso

atómico se muestra más brillante que los de menor peso atómico y en las imágenes de la derecha (*Figuras 41-44 b*), la fase de mayor peso molecular se observa más oscura. Debido a que el hierro tiene un peso molecular mucho más grande que el carbono (elemento predominante en el polímero) se asume que el halo difuso alrededor de las partículas es el polímero. El grosor del recubrimiento polimérico no fue uniforme en todos los casos, observándose de entre 8 y 10 nm, encontrando en algunos casos valores más grandes (14.32 nm en el sistema MMIP-MA)

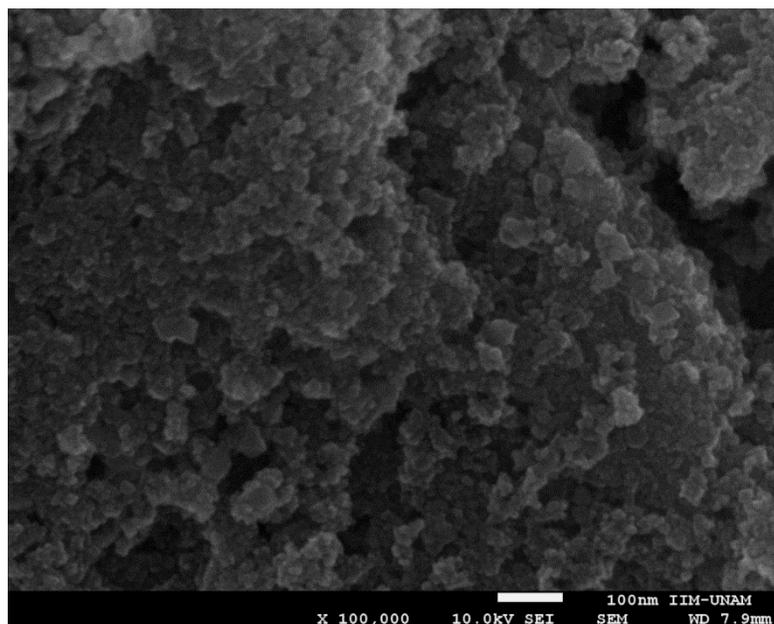


Figura 45. Micrografía de SEM para el sistema MMIP-MA.

La *Figura 45* muestra la micrografía de SEM para el sistema MMIP-MA. Para todos los sistemas se obtuvieron micrografías similares. Se observan aglomerados de estructuras de formas irregulares debido a la presencia del polímero por lo que no es posible realizar un análisis estructural de las partículas, ni obtener dispersiones del tamaño de partícula con este método.

7.6.6 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS)

Un análisis semicuantitativo de la cantidad de polímero que recubría las nanopartículas se llevó a cabo por medio de la técnica EDS. Cuando el haz de electrones interacciona

con la muestra, esta última emite rayos X característicos que son colectados por un detector EDS especial y con los que se pueden realizar análisis elementales. Con esta técnica se obtienen proporciones con respecto al peso atómico de los elementos presentes en la muestra. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el sistema MMIP-MA.

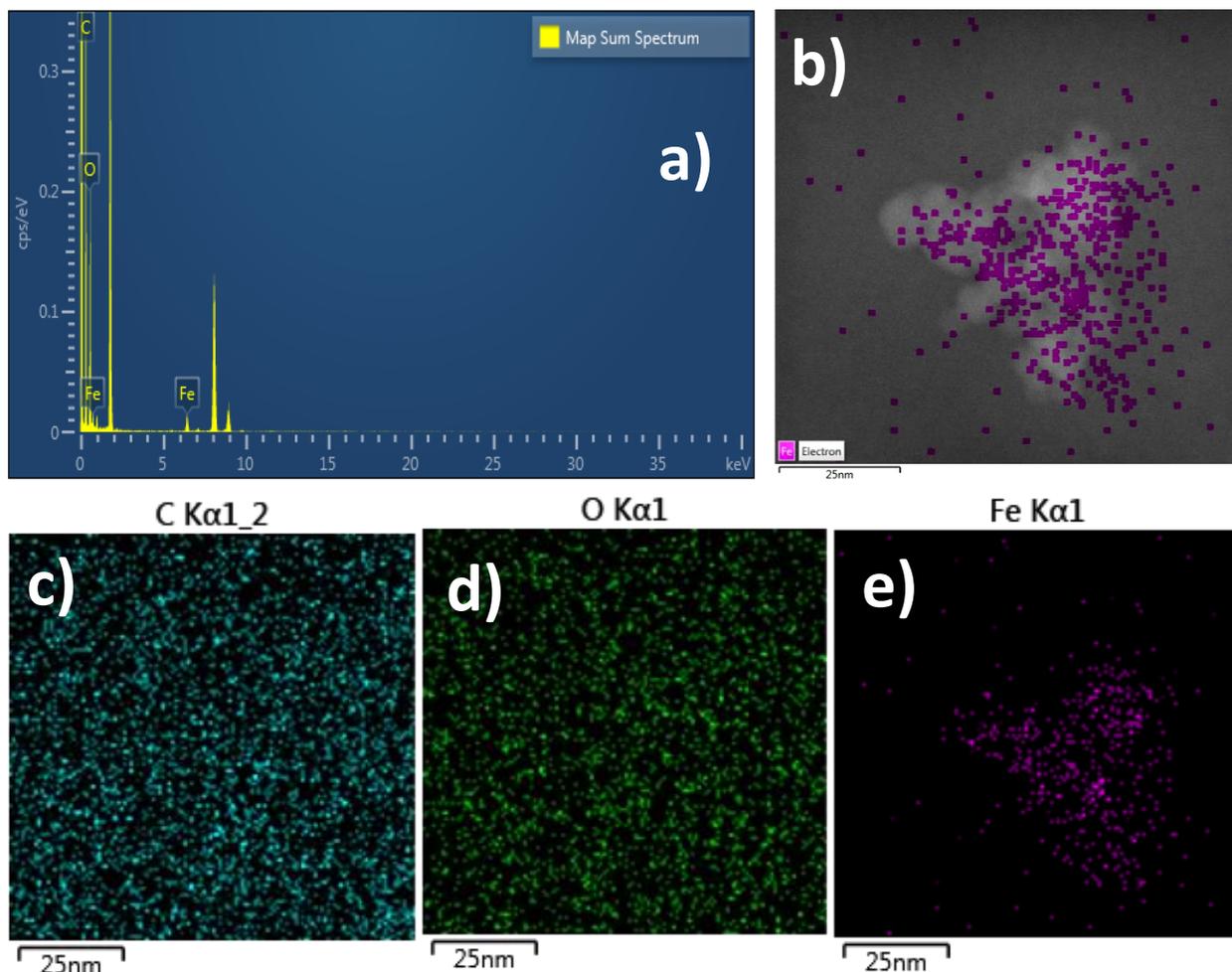


Figura 46. Análisis por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) para el sistema MMIP-MA. **a)** espectro de rayos X generado al escanear la imagen. **b)** imagen de STEM utilizada para realizar el análisis. Se realizó el mapeo de la distribución y la proporción relativa (intensidad) de C, O y Fe. **c)** Mapeo de carbono, **d)** Mapeo de oxígeno y **e)** Mapeo de hierro.

En la *Figura 46* se observan los elementos presentes en la muestra MMIP-MA. El EDS se realizó buscando los elementos que demostraran la presencia de las nanopartículas y del recubrimiento, por lo que se tienen imágenes del mapeo de hierro, carbono y oxígeno. Con esto se demuestra que el recubrimiento observado en las imágenes de STEM es polímero. La cantidad de hierro en la muestra es suficiente para que en la imagen “e” se aprecie la concentración de hierro de las nanopartículas, sin embargo, a pesar de que el contraste muestra claramente la capa polimérica, los mapeos de carbono y oxígeno “c”

y “d” respectivamente de la *Figura 46*, muestran solo ruido de fondo y no se define nada sobre las nanopartículas, esto se debe a que la masa del polímero es proporcionalmente pequeña, con respecto al óxido de hierro, por esto la resolución no es suficiente.

7.6.7 Análisis térmico (TGA y DSC)

Una vez que se demostró la presencia del recubrimiento polimérico sobre las nanopartículas de magnetita por las técnicas anteriores, se llevó a cabo el análisis de las propiedades térmicas de los polímeros sobre la nanopartícula.

Debido a que el sistema que se pretende diseñar está direccionado a la liberación de fármacos, es de suma importancia caracterizar el polímero que recubre las nanopartículas para conocer su estabilidad. Siendo así, se llevaron a cabo estudios de termogravimetría (TGA) y de DSC, cuyos resultados se muestran a continuación:

Figura 46. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido para magnetita sin recubrir.

En la *Figura 46*, se muestra el correspondiente análisis de DSC para la magnetita. Se observan dos picos pequeños de naturaleza exotérmica, la cual puede asociarse al desprendimiento de agua fisisorbida (pico en 146°C) y quimisorbida (en 360°C) como reportan algunos autores.¹⁰⁷

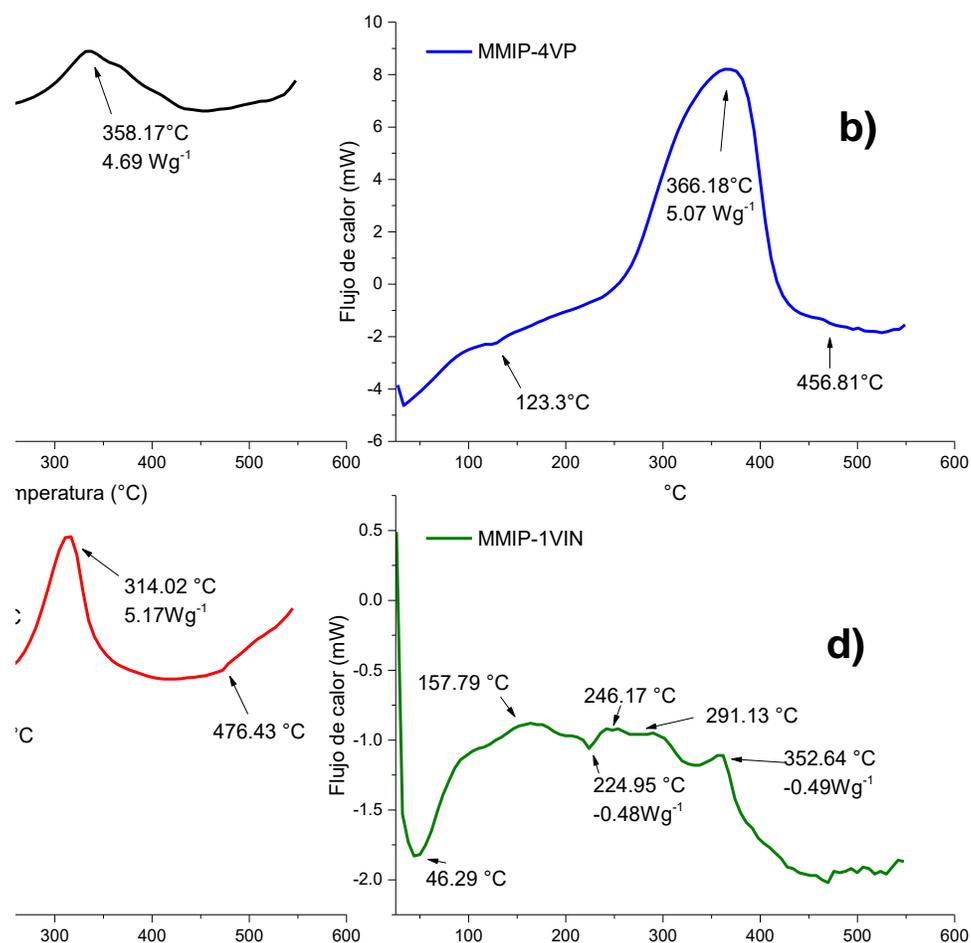


Figura 47. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para los sistemas híbridos a base de distintos monómeros funcionales. Tomando en cuenta que cada par MMIP-MNIP fue sintetizado en las mismas condiciones y con las mismas proporciones de monómero funcional y entrecruzador, se asume que las propiedades térmicas no cambian entre sí tratándose del mismo polímero.

Por otro lado, la *Figura 47* muestra los termogramas de DSC para los sistemas formados por los cuatro distintos monómeros funcionales evaluados. En todos los casos, se observa la presencia de un pico exotérmico entre 314 y 366°C, que se atribuye a la cristalización u oxidación del polímero, seguido por un pico endotérmico que se atribuye al proceso de descomposición, pues las temperaturas observadas son muy altas y además, se han reportado temperaturas de descomposición de 400 °C en otros trabajos.¹⁰⁸. Estas temperaturas no fueron tan altas en los polímeros sintetizados sin nanopartículas (referirse a la *Figura 19*), por lo que se puede decir que el polímero sobre las nanopartículas se estructura de forma distinta que como lo hace sin interacción de las nanopartículas, lo cual modifica las propiedades térmicas.

7.6.8 Análisis termogravimétrico

El TGA se puede utilizar para conocer la relación entre la masa del material y la temperatura y para evaluar la estabilidad térmica y la composición de un material. Para observar diferencias en la pérdida de peso entre los sistemas MNIPs y MMIPs, estos últimos se analizaron sin retirar el fármaco del polímero. A continuación, en la *Figura 47*, se presentan los resultados de este análisis para todos los sistemas.

Para todos los sistemas se observa una pérdida de peso de alrededor del 2% entre 100 y 120°C, lo cual se asocia a pérdida de disolvente de la superficie de los sistemas.¹⁰⁹ Posterior a la primera caída de la curva se observa una segunda pérdida de peso que se vuelve más pronunciada y que es debida a la descomposición del material orgánico presente en la muestra.

Los sistemas MMIPs perdieron más masa que los MNIPs, lo cual se atribuye a la presencia del fármaco en el polímero. Los sistemas MMIP-4VP y MMIP-MA presentaron una mayor pérdida de peso con respecto a los otros sistemas MMIP, siendo del 12% contra alrededor del 6% para MMIP-1VIN y MMIP-ITA. Esto puede deberse a que estos sistemas tienen una mayor cantidad de fármaco adsorbido o a que el polímero que recubre las partículas se encuentra presente en mayor cantidad. Esto último se pudo comprobar con las microscopías presentadas anteriormente, en donde se observaron nanocompositos con una capa de polímero más gruesa en estos sistemas.

Por último, se observa que las temperaturas de descomposición de los MMIP-1VIN y MMIP-ITA se desplazan con respecto a sus respectivos NIP, lo cual se puede atribuir a que la presencia del fármaco provoca una mayor estabilidad en el polímero al interactuar mejor con la red polimérica.

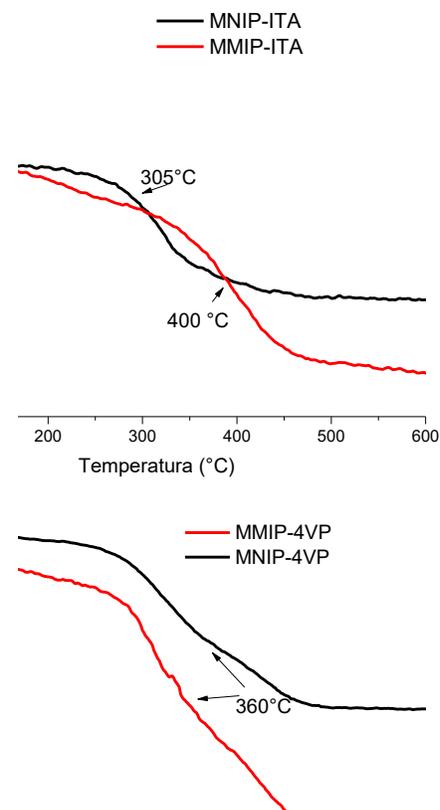


Figura 47. Resultados obtenidos de TGA para los distintos sistemas. Condiciones: 20°C/min, 30-600°C

7.7 Síntesis del sistema híbrido por hipertermia de las nanopartículas de magnetita.

Cuando las partículas superparamagnéticas como la magnetita son sometidas a la presencia de un campo magnético alterno, presentan el fenómeno de hipertermia magnética. Este fenómeno puede ser aprovechado para iniciar la reacción de polimerización en la superficie de la nanopartícula y así obtener sistemas mejor definidos en el recubrimiento superficial de la nanopartícula. Se espera que el calentamiento de las partículas alcance temperatura suficiente para iniciar la formación de radicales libres a través de la descomposición del iniciador (AIBN) en la mezcla de reacción, cuando se realiza la síntesis del recubrimiento polimérico.

De esta forma, se realizó la síntesis del sistema NIP-HPT sometiendo la mezcla de reacción reportada anteriormente en la metodología, a un campo magnético alterno de 107KHz y 17.7 gauss y a temperatura ambiente y sin la presencia de la 6MP. La reacción

se llevó a cabo durante 24 h, tiempo por el que se mantuvo aplicado el campo magnético alterno. Después de este tiempo las partículas se lavaron para retirar los residuos de la reacción y se llevó a cabo su caracterización.

7.7.1 Caracterización del sistema

Las técnicas utilizadas para caracterizar este sistema fueron las mismas que se han descrito anteriormente. Se presentan a continuación los resultados obtenidos para cada una de dichas técnicas.

7.7.1.1 Espectroscopia de infrarrojo (24 h) y análisis elemental.

Para comprobar si se había llevado a cabo el recubrimiento polimérico de las nanopartículas con este nuevo método, se realizó un análisis por espectroscopía de infrarrojo y el análisis elemental. Los espectros obtenidos se muestran en la *Figura 48*.

Figura 48. FTIR para magnetita (negro), monómero funcional ácido metacrílico (azul) y para el sistema MNIP-MA-HPT.

La presencia de las nanopartículas de magnetita se comprueba por la señal presente en 552 cm^{-1} , asociada al estiramiento del enlace Fe-O de la magnetita.

Por otro lado, la señal en 3395 cm^{-1} que presenta el sistema NIP-HPT se debe al estiramiento O-H del grupo ácido carboxílico, misma que se confirma por la aparición de

la banda en 1608 cm^{-1} . Se observa además la aparición de otras señales que son de baja intensidad y anchas, por lo que se dificulta su asignación a vibraciones específicas.

Al realizar el análisis elemental del sistema NIP-HPT se obtuvieron los siguientes porcentajes en peso: C, 2.8 %, N, 0.24 % e H, 0.7 %. Con este análisis se confirmó la presencia de polímero sobre las nanopartículas al haberse obtenido un porcentaje de carbono (elemento principal en el polímero) mayor que el reportado anteriormente para la magnetita que es de 0.295 %.

7.7.1.2 Difracción de rayos X

Con el fin de comprobar que la estructura cristalina de la magnetita no sufrió cambios tras haber sido expuesta al campo magnético alterno, se llevó a cabo el análisis de rayos X de polvos para el sistema NIP-HPT. El difractograma obtenido (*Figura 49*) se analizó con ayuda del programa MATCH!-Phase identification from powder diffraction ver. 3.5.0.99®, dando magnetita de acuerdo con el PDF número 00-019-0629.

Figura 49. Patrón de difracción de rayos X de polvos para el sistema NIP-HPT. En la parte sombreada se muestra el pico de máxima intensidad utilizado para el ajuste Gaussiano que se observa en la esquina superior derecha.

Los picos de difracción con los Índices de Miller asociados (220), (311), (400), (422), (511) y (440) reflejan los planos cristalinos característicos de la magnetita.

Se realizó el ajuste Gaussiano al pico de máxima intensidad en 35.59° con ayuda del software OriginPro® obteniendo un ancho a la mitad de la banda de 0.89592. Los datos se sustituyeron en la ecuación de Scherrer y se obtuvo de esta forma un tamaño promedio de cristalita de 9.73 nm.

7.7.1.3 Tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz

Se determinó el tamaño de partícula y el potencial Z del sistema NIP-HPT a 3 y 24 horas (NIP-HPT-3H y NIP-HPT-24H), de las partículas control a 1 y 24 horas (CNT-1H y CNT-24H), así como de las partículas funcionalizadas con ácido metacrílico (FUN-HPT) por DLS. Las muestras se resuspendieron en agua desionizada y se sonicaron por 10 minutos antes de su medición. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Resultados de tamaño de partícula y potencial z obtenidos por DLS.

Sistema	Tamaño (nm)	PDI	Potencial z
FUN-HPT	640.1	0.566	-18.7
CNT-1H	474.7	0.470	-15.1
CNT-24H	651.7	0.504	-0.2
NIP-HPT-3H	648.0	0.598	-13.7
NIP-HPT-24H	669.3	0.504	-14.5

Para todas las etapas de la polimerización por hipertermia y para las partículas control (sin uso de hipertermia) se obtuvieron tamaños de alrededor de 600 nm. Se observa un ligero aumento del tamaño de partícula conforme aumenta el tiempo de la síntesis (funcionalizadas: 640 nm; después de 3 horas: 648 nm y después de 24 horas: 669 nm).

El PDI obtenido en todos los casos fue cercano a 0.5 o mayor, o que indica polidispersidad de las muestras analizadas. Por último, el potencial Z de todas las

muestras fue negativo y nunca menor que -30 mV, lo que indica que las partículas son inestables en dispersión y tienden a aglomerarse.

7.7.1.4 Cantidad de polímero formado alrededor de las nanopartículas a través del tiempo por TEM

Se tomaron muestras de las partículas a $t=0$, $t=1$ h y $t=24$ h mientras se llevaba a cabo la síntesis del polímero por hipertermia y se realizó su observación por TEM. El tiempo cero se refiere a las partículas de magnetita funcionalizadas con ácido metacrílico, es decir, después de haber estado en contacto con ácido metacrílico y con exposición al campo magnético de 107 KHz y 17.7 gauss durante dos horas. Para las muestras de 1 y 24 h, se tomaron 2 mL de la mezcla de reacción y se realizaron tres lavados con acetonitrilo separando magnéticamente las partículas para remover los residuos.

Las micrografías obtenidas se muestran a continuación:

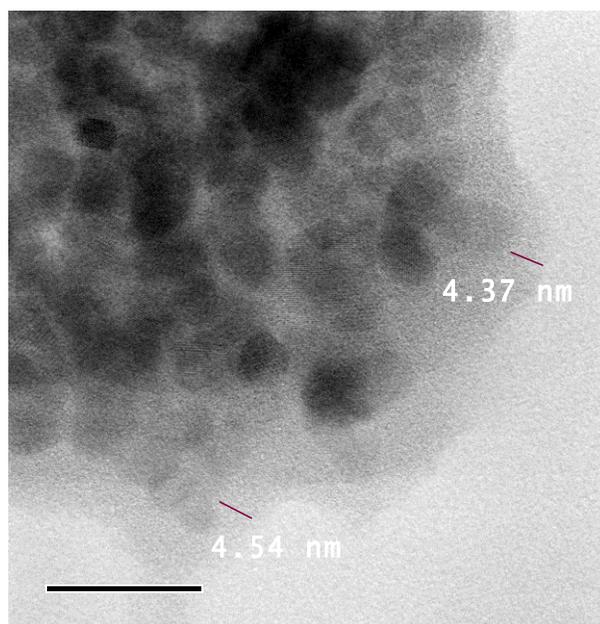


Figura 50. Partículas de magnetita funcionalizadas con ácido metacrílico con hipertermia magnética.

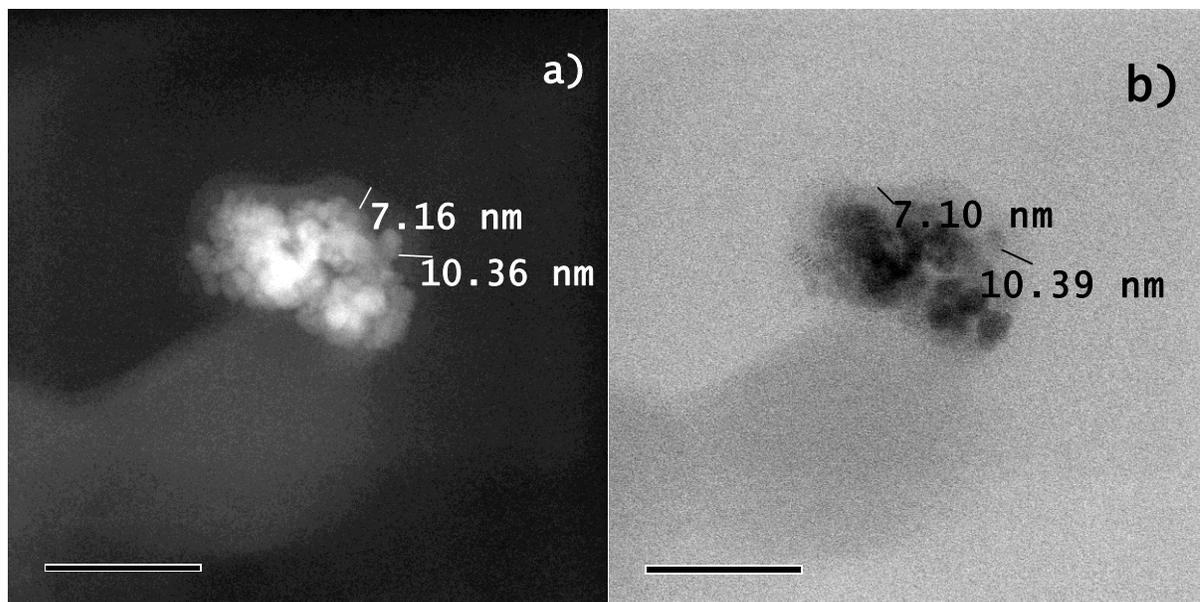


Figura 51. Imágenes de contraste z del sistema NIP-HPT después de 1 hora de reacción.

El recubrimiento polimérico en las partículas funcionalizadas (*Figura 50*) se observó de un grosor menor que para las partículas polimerizadas con hipertermia por una hora (*Figura 51*), pasando de aproximadamente 4.5 nm a 7 nm por lo que se puede decir que la reacción de polimerización fue exitosamente inducida por el efecto de la hipertermia magnética de las nanopartículas. En las imágenes obtenidas para una hora de reacción, se observa la formación de una gran cantidad de polímero que no recubre de forma uniforme los aglomerados de nanopartículas.

Se observó que a las 24 horas (*Figura 52*) había formación de grandes aglomerados de partículas recubiertas por polímero de alrededor de 300 nm e incluso se encontraron estructuras formadas por polímero con nanopartículas incrustadas (ver anexo 2).

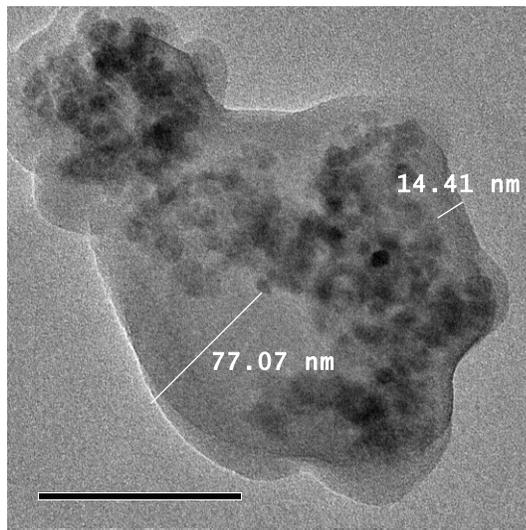


Figura 52. Micrografía de TEM para el sistema NIP-HPT después de 24 horas de reacción con exposición al campo magnético alterno.

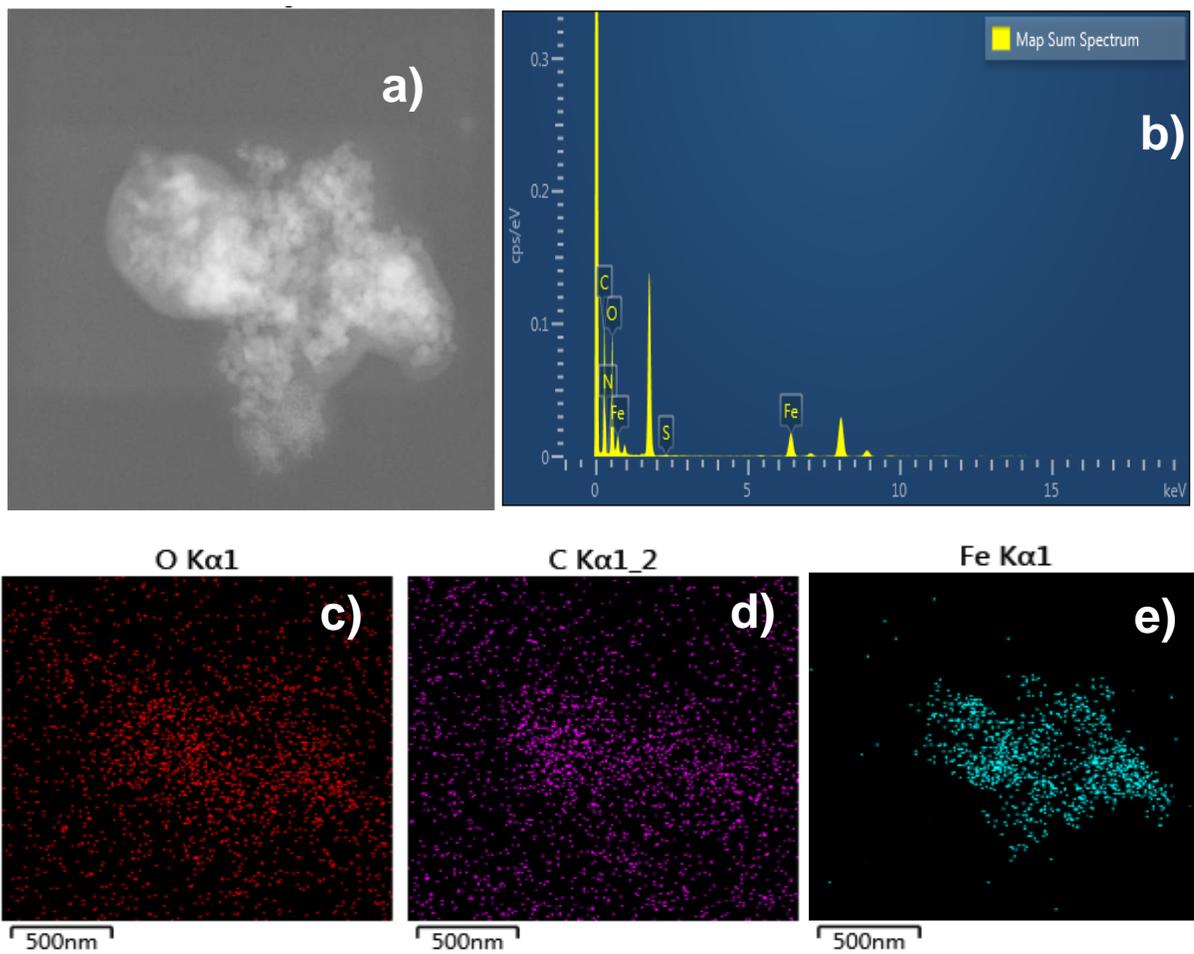


Figura 53. Análisis EDS para el sistema sintetizado por hipertermia NIP-HPT después de 24 horas de reacción.

El análisis de EDS realizado sobre el sistema NIP-HPT que se muestra en la *Figura 53 a)* demostró la presencia de polímero recubriendo las nanopartículas. En *c)*, *d)* y *e)* las regiones de color representan las zonas en donde se encuentran presentes los átomos de oxígeno, carbono y hierro respectivamente. Se observa que la región de mayor intensidad en *c)* y *d)* se superponen con el hierro. Los porcentajes obtenidos para cada elemento por esta técnica son: carbono: 50.35%, oxígeno: 37.58% y hierro: 11.07%. Estos resultados concuerdan con la imagen mostrada anteriormente, donde se observa una capa de polímero muy gruesa.

7.7.2 Magnetometría. Curvas de histéresis de los sistemas

Las propiedades magnéticas de los sistemas sintetizados fueron estudiadas por magnetometría de muestra vibracional. Las curvas de histéresis de todos los sistemas a 300 K se muestran en la *Figura 54*. Como se puede observar, no hay una histéresis apreciable en ninguna de las muestras, lo que sugiere que los sistemas son superparamagnéticos.

Figura 54. Curvas de histéresis a 300 K para todos los sistemas MIP y para la magnetita.

Los valores de magnetización de saturación de los sistemas fueron de aproximadamente 60 emu/g, mientras que, para las partículas de magnetita sin recubrir, se obtuvo una magnetización de saturación de aproximadamente 100 emu/g, es decir, la magnetización de saturación disminuye en los sistemas recubiertos, lo que coincide con otros trabajos reportados.⁸²

Al ser el valor de magnetización dependiente de la masa, se puede decir que aproximadamente un 40% de la masa de los sistemas MMIP evaluados es polímero.

7.8 Estudios de adsorción de los sistemas sintetizados con y sin el uso de hipertermia magnética.

Los estudios de adsorción de los sistemas generados con los diferentes monómeros funcionales, tanto NIP como MIP se realizaron como se muestra en la *Figura 55*.

Se utilizaron concentraciones de 6MP en MeOH/MeCN (3:7) en un rango de 5×10^{-6} a 6×10^{-5} M (0.85-10.21 mg 6MP/L) para tener 10 puntos de la isoterma. Cada concentración se evaluó por triplicado.

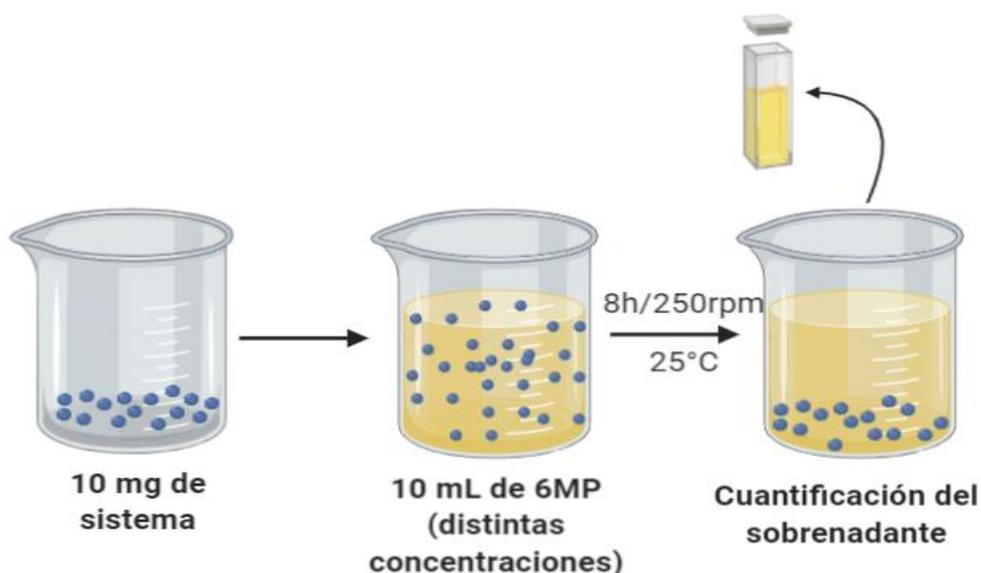


Figura 55. Esquema del procedimiento realizado para los estudios de adsorción.

Se decidió utilizar la mezcla MeOH/MeCN (3:7) para propiciar que la mayor cantidad de 6MP se una a los sitios específicos de la impronta, esto de acuerdo con los estudios hechos previamente para el polímero sin nanopartículas, el fármaco tiene que estar soluble y sus interacciones con el disolvente no deben ser fuertes. Es importante tener esto en mente puesto que el enfoque de impronta molecular utilizado en este trabajo es un enfoque del tipo no covalente, es decir, los sitios específicos de los polímeros de impronta reconocen a la 6MP con enlaces débiles del tipo puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas. Se utilizó MeOH como uno de los disolventes de la mezcla debido a la baja solubilidad de la 6MP en disolventes orgánicos.

El primer paso para obtener isothermas de adsorción es realizar las cinéticas de adsorción de los sistemas con el fin de encontrar el tiempo requerido para que el sistema alcance el equilibrio. Para esto, 10 mg de sistema se pusieron en contacto con 10 mL de una disolución de 6MP a una concentración conocida. Las partículas se incubaron con agitación a 25 °C. Se tomaron muestras a 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24 horas separando las partículas del medio con ayuda de un imán de neodimio y se cuantificó la cantidad de fármaco en el sobrenadante por espectroscopía UV-Vis con la curva de calibración del anexo1.

La capacidad de adsorción (Q , mg/g) de cada sistema se calculó con la siguiente ecuación:⁸⁰

$$Q = \frac{(C_0 - C_i)V}{m} \dots \dots \dots (16)$$

Donde C_0 (mg/L) y C_i (mg/L) son las concentraciones de 6MP al inicio y al equilibrio respectivamente, V (L) es el volumen del medio, y m (g) es el peso del sistema.

Se encontró que, a las 8 horas de adsorción, los sistemas alcanzan el equilibrio, por lo que no adsorben más fármaco.

Las isothermas se construyeron manteniendo iguales las cantidades de sistema y volumen del medio que para el experimento anterior. Se calculó la capacidad de adsorción a 8 horas y se graficaron contra las concentraciones evaluadas correspondientes.

Cabe mencionar que las concentraciones evaluadas para la construcción de las isothermas de adsorción fueron las más bajas que el método de cuantificación permitió,

con el fin de evaluar las características de los sitios de alta afinidad de la impronta molecular. Siendo así, si se utilizan concentraciones más altas, se tiene la formación de multicapas de 6MP adsorbido que se observan en las isotermas como mesetas. En el anexo 3 se tiene el ejemplo de esto. Las isotermas obtenidas para todos los sistemas evaluados se presentan a continuación en la *Figura 56*:

Figura 56. Isotermas de adsorción para los diferentes sistemas MMIPs y MNIPs. Cada punto de la isoterma fue tomado a las 8 horas manteniendo condiciones de agitación (250 rpm) y temperatura (25°C).

Se realizó el ajuste a distintos modelos de las isotermas para conocer las características de la adsorción. Los ajustes obtenidos para cada sistema se presentan en la *Figura 57*.

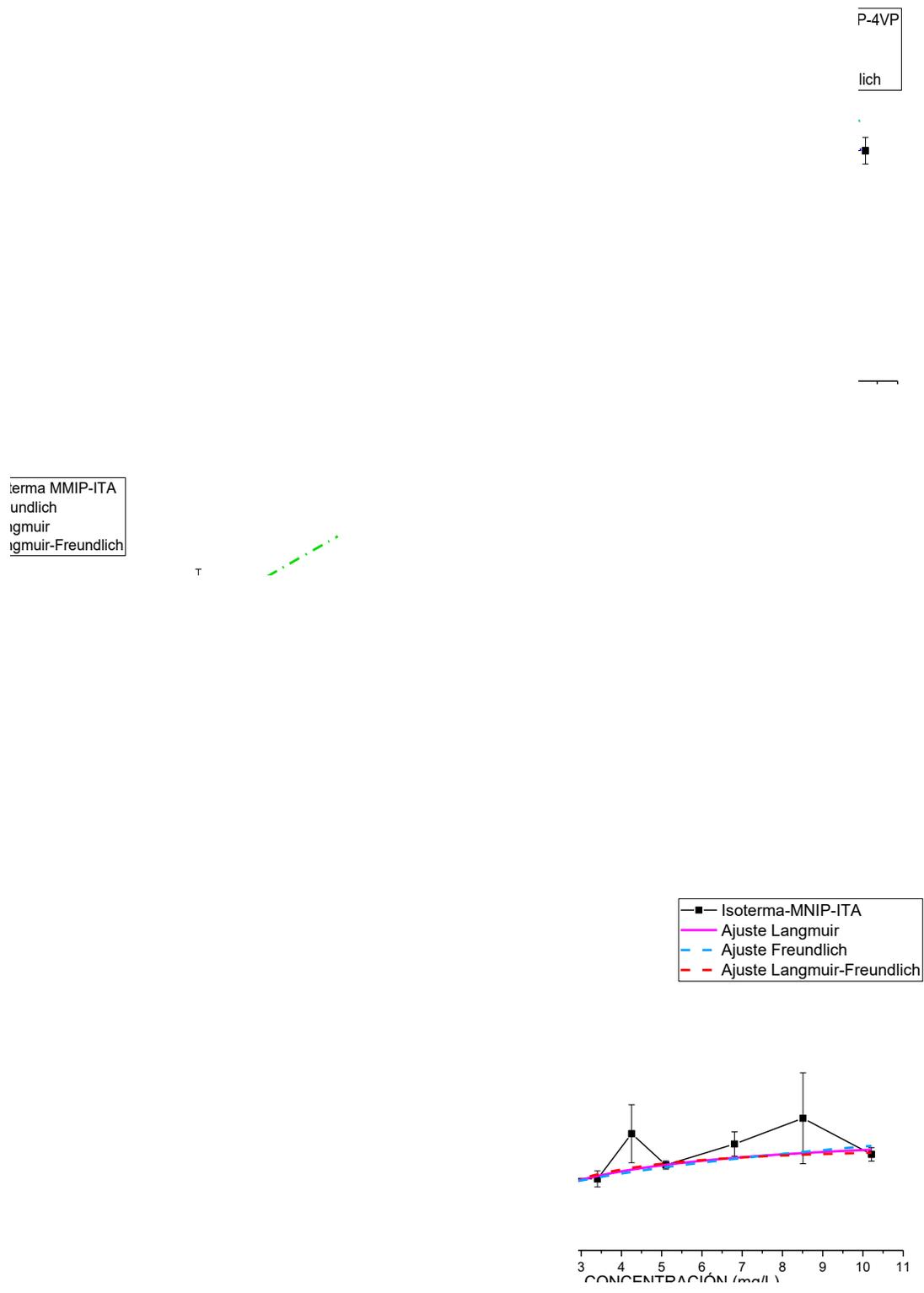


Figura 57. Isothermas de adsorción de 6MP obtenidas para los sistemas MMIPs y MNIPs con sus respectivos ajustes a los modelos de Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich.

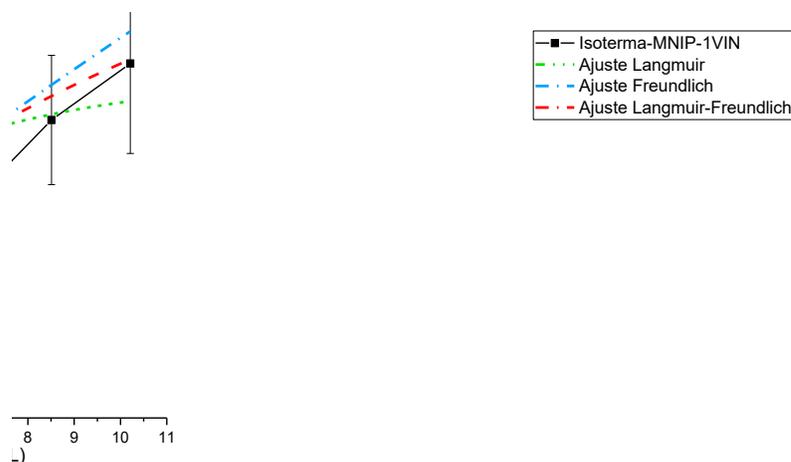


Figura 57 (continuación). Isotermas de adsorción de 6MP obtenidas para los sistemas MMIPs y MNIPs con sus respectivos ajustes a los modelos de Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich.

Los modelos utilizados para los ajustes fueron Langmuir, Freundlich y Langmuir-Freundlich debido a que son estos los modelos que describen mejor el mecanismo de adsorción sobre los MIPs según la literatura.⁸⁶

Los coeficientes de correlación obtenidos para cada isoterma modelada para cada sistema, se presentan en la *Tabla 9*. Y los parámetros obtenidos asociados a cada modelo se presentan en la *Tabla 10*.

Tabla 9. Coeficientes de determinación obtenidos del ajuste de las isotermas de adsorción a diferentes modelos. Los números en rojo representan al modelo de mejor ajuste.

Sistema	Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
MMIP-MA	0.988	0.992	0.992
MMIP-ITA	0.996	0.985	0.996
MMIP-1VIN	0.959	0.942	0.976
MMIP-4VP	0.932	0.922	0.958
MNIP-MA	0.977	0.986	0.985
MNIP-ITA	0.851	0.739	0.878
MNIP-1VIN	0.926	0.934	0.936
MNIP-4VP	0.923	0.900	0.953

De acuerdo con el coeficiente de correlación obtenido, se observa que en la mayoría de los casos las isotermas se ajustan mejor al modelo de Langmuir-Freundlich, con

excepción del sistema MNIP-MA que tiene un mejor ajuste a la isoterma de Freundlich. Cabe mencionar que, aunque es así, la diferencia entre coeficientes de correlación con modelo Langmuir-Freundlich es mínima.

Tabla 10. Coeficientes asociados a los modelos utilizados de los ajustes de isoterma.

Coeficientes	MMIP-MA	MNIP-MA	MMIP-ITA	MNIP-ITA	MMIP-1VIN	MNIP-1VIN	MMIP-4VP	MNIP-4VP
Langmuir								
qs	6.43 ± 0.59	3.38 ± 0.27	6.83 ± 0.58	0.81 ± 0.08	10.94 ± 2.79	1.03 ± 0.07	13.49 ± 6.07	5.14 ± 2.04
b	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.097 ± 0.01	0.46 ± 0.14	0.06 ± 0.02	0.52 ± 0.11	0.03 ± 0.02	0.07 ± 0.04
Freundlich								
a	0.61 ± 0.02	0.497 ± 0.02	0.60 ± 0.01	0.32 ± 0.05	0.57 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.36 ± 0.06
m	0.75 ± 0.02	0.62 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.33 ± 0.08	0.85 ± 0.04	0.37 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.82 ± 0.09
Langmuir-Freundlich								
N	18.97 ± 22.42	203.72 ± 16674.7	5.59 ± 1.17	0.69 ± 0.07	4.84 ± 0.90	1.68 ± 2.03	3.60 ± 0.73	2.23 ± 0.44
a	0.02 ± 0.03	6.31E-5 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.55 ± 0.11	0.24 ± 0.08	0.11 ± 0.47	0.30 ± 0.12	0.32 ± 0.10
m	0.82 ± 0.09	0.62 ± 0.31	1.05 ± 0.06	1.57 ± 0.51	1.39 ± 0.18	0.59 ± 0.43	1.60 ± 0.30	1.67 ± 0.34

La isoterma de Langmuir-Freundlich describe sistemas heterogéneos, es decir, superficies con sitios de unión de distintas afinidades. El hecho de que el mejor ajuste haya sido para este modelo era de esperarse, ya que se ha demostrado que los sistemas MIP suelen generar sitios de distinta afinidad dependiendo de cómo interactúa la molécula molde (6MP en este caso) con los monómeros funcionales durante la etapa de prearreglo. Esto es especialmente cierto para los MIP que se basan en el enfoque no covalente ya que pueden existir distintos sitios donde existan interacciones.

En la *Tabla 10* se presentan los parámetros para los modelos evaluados. Para el caso de la isoterma de Langmuir-Freundlich, N, es el parámetro relacionado al número total de sitios de unión de alta afinidad. Si se comparan los sistemas con polímeros de la misma naturaleza (MMIPs vs MNIPs), se observa que los sistemas MMIP tienen un parámetro

N más grande que el de sus respectivos MNIP. Lo anterior es evidencia de la correcta formación de sitios específicos para la 6MP en los sistemas MMIPs.

Por otro lado, la heterogeneidad del material esta dado por el parámetro m y se observa que de los sistemas que ajustan a Langmuir-Freundlich, solo los sistemas MMIP-MA y MNIP-1VIN son heterogéneos al tener una $m < 1$. La heterogeneidad puede ser debida al recubrimiento no uniforme del polímero sobre las partículas observada anteriormente en las microscopías de TEM.

Finalmente, el parámetro a , está relacionado con los sitios de unión de mediana afinidad (k_0) presentes en el material evaluado. Estos sitios de unión pueden calcularse con la expresión: $k_0 = a^{1/m}$. En la *Tabla 11* se presentan los valores de K_0 para los sistemas que ajustan a Langmuir-Freundlich.

Tabla 11. Sitios de unión de mediana afinidad calculados para los sistemas ajustados a la isoterma Langmuir-Freundlich

$k_0 = a^{1/m}$	MMIP-MA	MMIP-ITA	MNIP-ITA	MMIP-1VIN	MNIP-1VIN	MMIP-4VP	MNIP-4VP
K_0	5.95E-3	0.149	0.687	0.355	0.025	0.470	0.505

La tendencia que aplica para la mayoría de los pares MMIP-MNIP es que la k_0 calculada es mayor en los sistemas no improntados que en los improntados, debido a que a estos últimos demostraron tener un mayor número de sitios de alta afinidad.

7.9 Estudios de liberación *in vitro* de los sistemas

Antes de comenzar los estudios de liberación, 70 mg de cada sistema se pusieron en contacto con 50 mL de una disolución de 6MP 5×10^{-3} M en MeOH/MeCN (3:7). Los sistemas se mantuvieron en agitación a 250 rpm con temperatura controlada de 25°C y se dejaron adsorbiendo fármaco durante 12 horas. Al pasar este tiempo, se separaron las partículas con ayuda de un imán y se realizó un enjuague con 20 mL de MeOH agitando durante 1 minuto para retirar el fármaco que no estaba propiamente adsorbido a la superficie de los sistemas. Las partículas se separaron magnéticamente y se decantó el sobrenadante.

Para llevar a cabo los estudios de liberación de los sistemas, 10 mg de cada uno de estos se pusieron en contacto con 40 mL de Buffer de fosfatos a pH= 7,4 asegurando condiciones sink (mantener concentraciones del fármaco en el medio menores a su concentración de saturación). La temperatura se mantuvo a 37°C para simular condiciones fisiológicas y se agitó a 250 rpm durante la duración del estudio. La *Figura 58* muestra un procedimiento general de cómo se llevó a cabo el experimento.

Se tomaron muestras a 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24 y 30 horas, cuantificando la cantidad de 6MP liberada por espectroscopía UV-vis con ayuda de la curva de calibración en buffer de fosfatos que se presenta en el anexo 1.

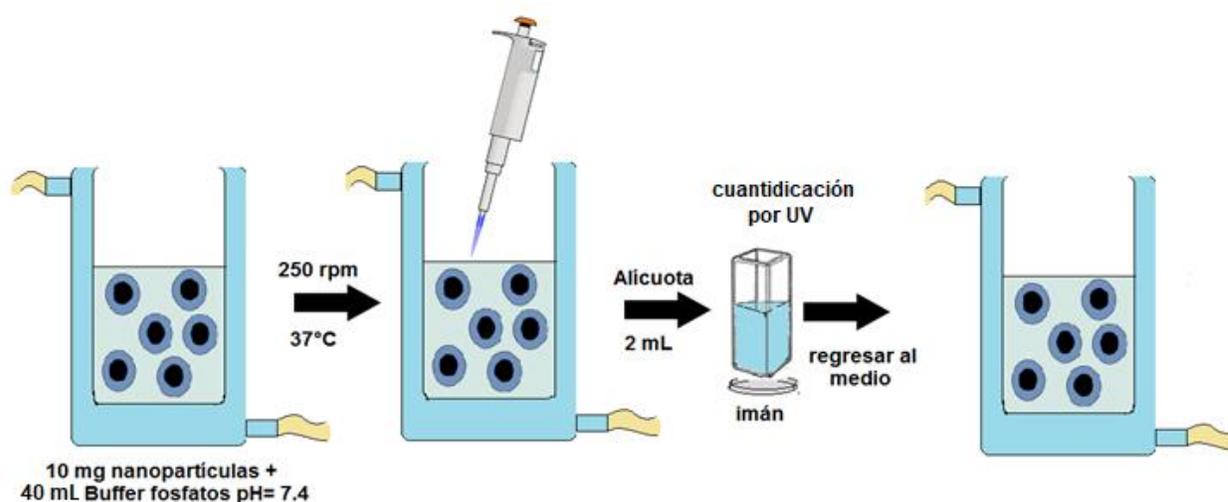


Figura 58. Esquema del procedimiento seguido para realizar los estudios de liberación de los sistemas sintetizados.

Las cinéticas obtenidas se ajustaron a distintos modelos estadísticos con el fin de conocer el mecanismo que gobierna la liberación de la 6MP de los sistemas. Los parámetros estadísticos de los ajustes a modelos se presentan en las *Tablas 12-19*.

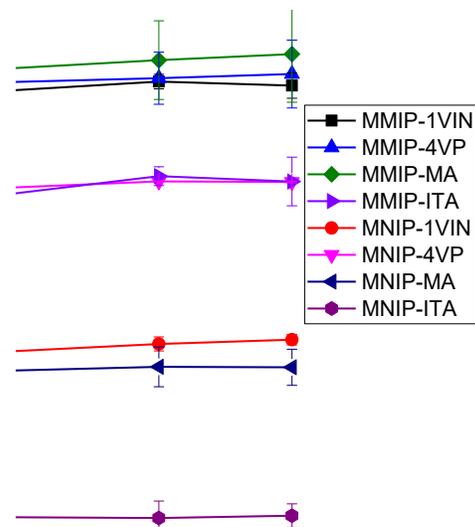


Figura 59. Perfiles de liberación de los sistemas sintetizados. Buffer de fosfatos pH=7,4, 37°C y t=30h.

La *Figura 59* muestra los perfiles de liberación presentados para todos los sistemas sintetizados. Se observa que, a pesar de haber realizado un lavado con metanol antes de comenzar los estudios de liberación, todos los sistemas presentan un efecto *burst* muy pronunciado en los primeros tiempos de medición, siendo hasta del 60% en algunos sistemas.

Por otro lado, se observa una notable diferencia ente la cantidad liberada de 6MP de los sistemas MMIPs y la cantidad de 6MP liberada en los sistemas MNIPs, siendo estos últimos los sistemas que liberan todo el fármaco adsorbido en tiempos más cortos debido a que las interacciones de la 6MP con la superficie donde no hay sitios específicos, serán más débiles, por lo que se liberará enseguida.

En las *Tablas 12-19* se muestran los parámetros estadísticos de ajuste a modelo que se obtuvieron al ajustar la cinética de liberación de cada sistema a distintos modelos.

Tabla 12. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-1VIN.

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-4.394	0.751	0.991	0.607	0.751
MSC	-3.341	-0.211	2.981	-0.823	-0.365
AIC	139.764	100.340	58.846	108.301	102.343
SS	40025.155	1928.696	67.959	3050.820	1929.115

Tabla 13. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-1VIN

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-4.645	0.905	0.964	0.992	0.905
MSC	-3.3647	0.725	1.532	2.706	0.557
AIC	130.838	81.768	72.079	57.990	83.776
SS	46006.348	770.734	290.968	64.445	771.226

Tabla 14. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-MA.

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-4.983	0.756	0.980	0.999	0.756
MSC	-3.621	-0.423	1.903	4.840	-0.590
AIC	129.837	91.455	63.550	28.297	93.456
SS	42322.753	1727.756	142.953	5.427	1727.959

Tabla 15. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-ITA

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-4.503	0.403	0.978	0.996	0.403
MSC	-3.373	-1.151	1.992	3.290	-1.306
AIC	138.018	109.138	68.279	51.405	111.145
SS	34994.677	3794.768	140.409	28.186	3796.877

Tabla 16. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema MIP-4VP

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-5.155	0.704	0.976	0.9997	0.704
MSC	-3.738	-0.702	1.662	5.648	-0.856
AIC	140.711	101.247	70.522	18.700	103.250
SS	43049.449	2068.049	166.852	2.278	2068.525

Tabla 17. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-MA

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coeficiente de determinación (r^2)	-4.967	0.593	0.975	0.994	0.593
MSC	-3.591	-0.906	1.731	2.765	-1.073
AIC	128.757	96.541	64.898	52.489	98.542
SS	38681.422	2639.588	159.939	40.748	2639.899

Tabla 18. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-4VP

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coefficiente de determinación (r^2)	-3.178	0.703	0.336	0.9996	-0.754
MSC	-3.844	-1.202	-2.204	4.934	-2.977
AIC	106.321	79.894	89.921	18.533	97.642
SS	33930.145	2414.865	5388.815	2.867	14245.051

Tabla 19. Parámetros estadísticos de ajuste a modelo del sistema NIP-ITA

Parámetros	Orden cero	Primer orden	Korsmeyer-Peppas	Peppas-Sahlin	Hopfenberg
Coefficiente de determinación (r^2)	-4.960	0.577	0.942	0.994	0.577
MSC	-3.245	-0.601	1.233	3.159	-0.755
AIC	139.855	105.477	81.643	56.608	107.479
SS	40304.721	2863.482	392.512	42.058	2863.862

Al comparar los parámetros estadísticos de los ajustes a modelo para cada sistema, se observó que, para todos los sistemas, con excepción del sistema MNIP-1VIN el modelo que mejor se ajusta a los perfiles de liberación presentados es el de Peppas-Sahlin, esto se comprobó porque para este modelo se obtuvo el mayor coeficiente de determinación (r^2), el mayor criterio de selección de modelo (MSC), la menor suma de cuadrados (SS) y el menor criterio de akaike (AIC).

El modelo Peppas-Sahlin sugiere dos mecanismos de liberación del fármaco del sistema: por difusión de Fick, que está relacionada al parámetro k_1 , y por un aumento en el área de contacto del sistema con el medio debido al hinchamiento de la matriz polimérica, lo que aumenta la movilidad del fármaco hacia el medio. Este último mecanismo se asocia al parámetro k_2 .

En la *Tabla 20* se presentan los parámetros calculados para el ajuste del modelo de Peppas-Sahlin de todos los sistemas.

Tabla 20. Parámetros calculados para el ajuste no lineal Peppas-Sahlin de los diferentes sistemas.

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

Sistema	k_1	K_2	n
MMIP-MA	106.715	-27.527	0.116
MNIP-MA	97.801	-21.907	0.094
MMIP-1VIN	114.988	-32.553	0.140
MMIP-ITA	94.153	-22.562	0.119
MNIP-ITA	102.475	-30.542	0.194
MMIP-4VP	109.128	-29.631	0.094
MNIP-4VP	132.141	-43.347	0.102

Se observa que, para todos los sistemas evaluados, el parámetro k_1 presenta el mayor valor, por lo que se asume que el mecanismo que gobierna la liberación es exclusivamente la difusión de Fick. Esto se corrobora al analizar los valores obtenidos para el parámetro k_2 donde se observan valores negativos para todos los sistemas, lo cual quiere decir que la contribución del mecanismo de liberación por relajación de las cadenas poliméricas es despreciable o simplemente no tiene contribución.

Los valores del parámetro n corroboran lo dicho anteriormente, pues para todos los sistemas evaluados se obtuvieron valores de $n < 0.5$ lo que indica un mecanismo de liberación dado por difusión de Fick.

7.9.1 Estudios de liberación con hipertermia magnética

Se realizaron los estudios de liberación de los sistemas MMIP en presencia de un campo magnético alterno con el fin de evaluar si existe un cambio en los perfiles de liberación *in vitro* debido al efecto de hipertermia que presentan las nanopartículas de magnetita en estas condiciones.

Se colocaron 10 mg de cada sistema en 40 mL de buffer de fosfatos, la temperatura del medio se mantuvo a 37°C con el fin de evaluar únicamente el efecto de la hipertermia en la liberación. Inmediatamente después de agregar las partículas al medio, se colocó el

vaso en el equipo generador de campo magnético alterno y se encendió durante el tiempo que se midió la liberación (8h).

Se tomaron muestras en los mismos intervalos de tiempo utilizados para las liberaciones *in vitro* (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24 horas). Se cuantificó la cantidad de 6MP liberada por el método espectroscópico de UV-Vis. Los perfiles de liberación de los sistemas se muestran en la *Figura 60*.

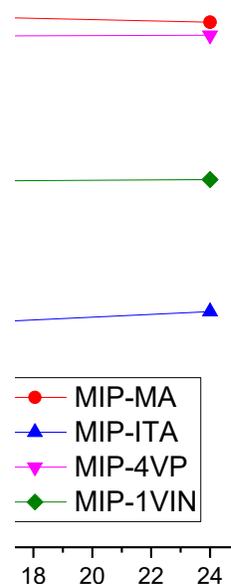


Figura 60. Perfiles de liberación para los sistemas MMIPs en presencia de un campo magnético alterno.

Se observa un menor efecto *burst* (liberación rápida del fármaco al inicio del perfil de liberación) en el sistema MMIP-ITA. La cantidad de fármaco que se libera cuando se aplica hipertermia es menor a la que se libera cuando no se someten a campos alternos.

De acuerdo con la *Tabla 21*, la cantidad liberada de 6MP por cada sistema fue menor cuando se aplicó la hipertermia independientemente del tiempo y a pesar de que ambos ensayos se realizaron partiendo del mismo lote de sistemas con 6MP adsorbida, por lo que la cantidad máxima a liberar es la misma en las liberaciones convencionales y en las de hipertermia.

Tabla 21. Cantidad de 6MP liberada para los sistemas MMIPs con y sin el uso de hipertermia durante la liberación.

Sistema	Cantidad de 6MP máxima liberada con hipertermia (mg)	Cantidad máxima liberada Sin hipertermia (mg)	Diferencia (sin hipertermia - con hipertermia)
MIP-MA	8.84	12.20	3.36
MIP-ITA	3.25	9.48	6.23
MIP-4VP	8.58	12.10	3.52
MIP-1VIN	5.92	11.00	5.08

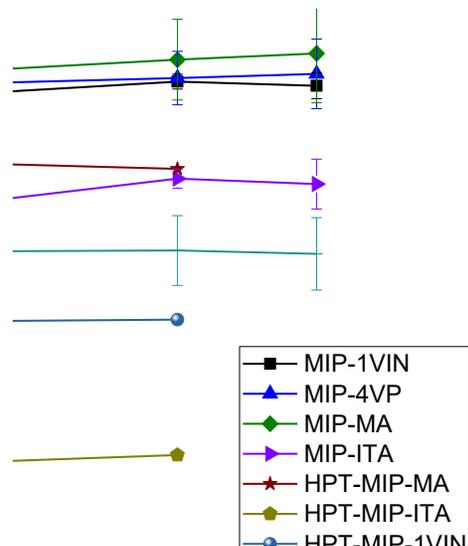


Figura 61. Gráfico comparativo de los perfiles de liberación obtenidos para los sistemas MMIP con y sin la aplicación de hipertermia magnética.

Como se observa en la *Figura 61*, la cantidad máxima de 6MP liberada por cada sistema es distinta dependiendo de las condiciones de liberación (37°C para los sistemas MIP y 37°C + campo magnético alterno para los sistemas HPT-MIP), esto se puede atribuir a que la hipertermia generada por las nanopartículas al ser expuestas a un campo magnético alterno produce un cambio en la estructura del polímero, lo cual dificulta la salida del fármaco.

La teoría anterior es respaldada en este trabajo con los análisis de DSC de los sistemas MMIPs y MNIPs puesto que se observa un cambio estructural del polímero cuando se alcanzan temperaturas de alrededor de 300 °C. De esta forma, si el polímero modifica su asociación, se hará más difícil para el fármaco salir del sistema, es por ello que se observa una cantidad liberada menor que cuando no se aplica el campo magnético alterno.

8. Conclusiones

Se sintetizaron y caracterizaron distintos polímeros por la técnica de impronta molecular para el reconocimiento específico del fármaco 6-mercaptopurina con los monómeros funcionales: ácido metacrílico, 4-vinilpiridina, 1-vinilimidazol y ácido itacónico.

Los experimentos de adsorción de los polímeros demostraron que no hubo diferencia significativa en la cantidad de 6-mercaptopurina absorbida con relación al medio de síntesis, pero sí con respecto al medio de adsorción y al monómero utilizado.

Se lograron sintetizar partículas superparamagnéticas de magnetita por el método de coprecipitación, con tamaños de partícula de aproximadamente 10 nm.

Se sintetizaron y caracterizaron sistemas híbridos compuestos de nanopartículas de magnetita recubiertas con polímeros de impronta molecular y utilizando los monómeros funcionales: ácido metacrílico, ácido itacónico, 4-vinilpiridina y 1-vinilimidazol.

Se realizó la síntesis del recubrimiento polimérico de las nanopartículas utilizando hipertermia magnética, sometiendo a las partículas a un campo magnético alterno de 109 KHz y 17.7 gauss.

Las isothermas de adsorción de los sistemas ajustaron mejor al modelo de Langmuir-Freundlich. Los valores N de estos ajustes, demostraron que se tiene un mayor número de sitios específicos en los sistemas MMIPs que en los MNIPs.

Los perfiles de liberación *in vitro* tuvieron el mejor ajuste a modelo para Peppas-Sahlin y se demostró que la liberación era por difusión de Fick. La completa liberación del fármaco se dio a las 7 horas.

Se obtuvo una menor cantidad de fármaco liberada al someter los sistemas a hipertermia magnética.

9. Perspectivas

- Realizar estudios de asociación de la 6MP con los monómeros funcionales para poder describir la estequiometría del complejo formado.
- Complementar la caracterización de los polímeros de impronta sintetizados, determinando su peso molecular y su polidispersidad.
- Optimizar las proporciones de polímero-nanopartículas de magnetita en la síntesis del recubrimiento polimérico mediada por hipertermia magnética.
- Realizar estudios de liberación de los sistemas con hipertermia magnética a distintas frecuencias.
- Realizar estudios de toxicidad *in vivo* para determinar la dosis del sistema de acuerdo con la cantidad de fármaco adsorbido.

10. Referencias bibliográficas

- 1 Organization), W. W. H. *Cáncer*, <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>> (2018).
- 2 (INEGI), I. N. d. E. y. G. *CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2017*, <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCION_NES2017.pdf> (2018).
- 3 Fang, J.-Y. & Al-Suwayeh, S. A. Nanoparticles as delivery carriers for anticancer prodrugs. *Expert Opinion on Drug Delivery* **9**, 657-669, doi:10.1517/17425247.2012.679927 (2012).
- 4 Karimi, M. *et al.* Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 1457-1501, doi:10.1039/C5CS00798D (2016).
- 5 Karim, K. *et al.* How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 1795-1808, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.013> (2005).
- 6 Sellergren, B. & Allender, C. J. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 1733-1741, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.010> (2005).
- 7 Li, R., Feng, Y., Pan, G. & Liu, L. Advances in molecularly imprinting technology for bioanalytical applications. *Sensors (Switzerland)* **19**, doi:10.3390/s19010177 (2019).
- 8 Kim, H. *et al.* Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid-conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Scientific reports* **7**, 41090 (2017).
- 9 Zhang, R. *et al.* Selective binding of heparin oligosaccharides in a magnetic thermoresponsive molecularly imprinted polymer. *Talanta* **201**, 441-449, doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.050> (2019).
- 10 Xu, C., Shen, X. & Ye, L. Molecularly imprinted magnetic materials prepared from modular and clickable nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **22**, 7427-7433 (2012).
- 11 Mody, V. V. *et al.* Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor. *Applied Nanoscience* **4**, 385-392 (2014).
- 12 Lee, J.-H., Kim, J.-w. & Cheon, J. Magnetic nanoparticles for multi-imaging and drug delivery. *Molecules and cells* **35**, 274-284 (2013).
- 13 Sun, C., Lee, J. S. & Zhang, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* **60**, 1252-1265 (2008).
- 14 Dinc, M., Esen, C. & Mizaikoff, B. Recent advances on core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for biomacromolecules. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **114**, 202-217, doi:10.1016/j.trac.2019.03.008 (2019).
- 15 Drugbank. *Mercaptopurina*, <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01033>> (2005).
- 16 Chien, Y. *Novel drug delivery systems*. (CRC Press, 1991).
- 17 Liu, D., Yang, F., Xiong, F. & Gu, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics* **6**, 1306 (2016).
- 18 Siepmann, J., Siegel, R. A. & Rathbone, M. J. *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*. (Springer, 2012).
- 19 Langer, R. New methods of drug delivery. *Science* **249**, 1527-1533, doi:10.1126/science.2218494 (1990).
- 20 Ghosh, T. K. & Jasti, B. R. *Theory and practice of contemporary pharmaceuticals*. (CRC press, 2004).
- 21 Jain, A. K. & Thareja, S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* **47**, 524-539 (2019).

- 22 Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S. & Bhalgat, C. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **19**, 129-141, doi:10.1016/j.jsps.2011.04.001 (2011).
- 23 Kobayashi, H., Watanabe, R. & Choyke, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* **4**, 81 (2014).
- 24 Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev* **65**, 71-79, doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002 (2013).
- 25 Stylianopoulos, T. EPR-effect: utilizing size-dependent nanoparticle delivery to solid tumors. *Therapeutic delivery* **4**, 421-423 (2013).
- 26 Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 4607-4612, doi:10.1073/pnas.95.8.4607 (1998).
- 27 Choi, H. S. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165-1170, doi:10.1038/nbt1340 (2007).
- 28 Rizvi, S. A. A. & Saleh, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* **26**, 64-70, doi:https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012 (2018).
- 29 Jawahar, N. & Meyyanathan, S. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International Journal of Health & Allied Sciences* **1**, 217 (2012).
- 30 Alvarez-Lorenzo, C. & Concheiro, A. *Smart materials for drug delivery*. Vol. 1 (Royal Society of Chemistry, 2013).
- 31 García-Calzón, J. A. & Díaz-García, M. E. Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B: Chemical* **123**, 1180-1194, doi:https://doi.org/10.1016/j.snb.2006.10.068 (2007).
- 32 Yilmaz, E., Schmidt, R. H. & Mosbach, K. in *Molecularly Imprinted Materials* 40-73 (CRC Press, 2004).
- 33 Arshady, R. & Mosbach, K. Synthesis of substrate - selective polymers by host - guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* **182**, 687-692 (1981).
- 34 Oral, E. & Peppas, N. A. Dynamic studies of molecular imprinting polymerizations. *Polymer* **45**, 6163-6173 (2004).
- 35 Ramström, O. & Ansell, R. J. Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future. *Chirality* **10**, 195-209 (1998).
- 36 Andersson, H. S. *et al.* Study of the nature of recognition in molecularly imprinted polymers, II: influence of monomer-template ratio and sample load on retention and selectivity. *Journal of Chromatography A* **848**, 39-49 (1999).
- 37 Schmidt, R. H., Belmont, A.-S. & Haupt, K. Porogen formulations for obtaining molecularly imprinted polymers with optimized binding properties. *Analytica chimica acta* **542**, 118-124 (2005).
- 38 Cormack, P. A. & Elorza, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of chromatography B* **804**, 173-182 (2004).
- 39 Davies, M. P., De Biasi, V. & Perrett, D. Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* **504**, 7-14, doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00812-2 (2004).
- 40 Tamayo, F. G., Turiel, E. & Martín-Esteban, A. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A* **1152**, 32-40, doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.095 (2007).
- 41 Nicholls, I. A. Thermodynamic Considerations for the Design of and Ligand Recognition by Molecularly Imprinted Polymers. *Chemistry Letters* **24**, 1035-1036, doi:10.1246/cl.1995.1035 (1995).

- 42 Yungerman, I. & Srebnik, S. Factors contributing to binding-site imperfections in imprinted polymers. *Chem. Mater.* **18**, 657-663 (2006).
- 43 Goodwill, P. W. *et al.* X - space MPI: magnetic nanoparticles for safe medical imaging. *Adv. Mater.* **24**, 3870-3877 (2012).
- 44 Tombácz, E., Turcu, R., Socoliuc, V. & Vékás, L. Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **468**, 442-453, doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.030> (2015).
- 45 Li, K., Nejadnik, H. & Daldrup-Link, H. E. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. *Drug Discovery Today* **22**, 1421-1429, doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.04.008> (2017).
- 46 Amiri, M., Salavati-Niasari, M. & Akbari, A. Magnetic nanocarriers: Evolution of spinel ferrites for medical applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **265**, 29-44, doi:[10.1016/j.cis.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.01.003) (2019).
- 47 Bakhtiary, Z. *et al.* Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: Possibilities and challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **12**, 287-307, doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.019> (2016).
- 48 Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews* **112**, 5818-5878, doi:[10.1021/cr300068p](https://doi.org/10.1021/cr300068p) (2012).
- 49 Pankhurst, Q. A., Thanh, N. T. K., Jones, S. K. & Dobson, J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, 224001, doi:[10.1088/0022-3727/42/22/224001](https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/22/224001) (2009).
- 50 Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306-4334, doi:[10.1039/C2CS15337H](https://doi.org/10.1039/C2CS15337H) (2012).
- 51 Krishnan, K. M. Biomedical nanomagnetism: a spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy. *IEEE transactions on magnetism* **46**, 2523-2558 (2010).
- 52 Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S. & Sen, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 24-46, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.05.006> (2011).
- 53 Mahmoudi, M., Simchi, A., Milani, A. S. & Stroeve, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **336**, 510-518, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.04.046> (2009).
- 54 Byrne, J. D., Betancourt, T. & Brannon-Peppas, L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1615-1626, doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.005> (2008).
- 55 Mertz, D., Sandre, O. & Begin-Colin, S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **1861**, 1617-1641 (2017).
- 56 Banerjee, S. K. & Moskowitz, B. M. in *Magnetite biomineralization and magnetoreception in organisms* 17-41 (Springer, 1985).
- 57 Kolhatkar, A., Jamison, A., Litvinov, D., Willson, R. & Lee, T. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. *International journal of molecular sciences* **14**, 15977-16009 (2013).
- 58 Hervault, A. & Thanh, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **6**, 11553-11573 (2014).
- 59 Cornell, R. & Schwertmann, U. *The Iron Oxides: Structure, properties, reactions, occurrences and uses.*--Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (2003).
- 60 Akbarzadeh, A., Samiei, M. & Davaran, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett* **7**, 144-144, doi:[10.1186/1556-276X-7-144](https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-144) (2012).
- 61 Cavaliere, R. *et al.* Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies. *Cancer* **20**, 1351-1381 (1967).

- 62 Chen, Y. *et al.* Low-dose chemotherapy of hepatocellular carcinoma through triggered-release from bilayer-decorated magnetoliposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **116**, 452-458, doi:https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.01.022 (2014).
- 63 Li, L. *et al.* Improved intratumoral nanoparticle extravasation and penetration by mild hyperthermia. *Journal of Controlled Release* **167**, 130-137, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.01.026 (2013).
- 64 Chen, J. *et al.* Thermosensitive liposomes with higher phase transition temperature for targeted drug delivery to tumor. *Int. J. Pharm.* **475**, 408-415, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.009 (2014).
- 65 Fortin, J.-P., Gazeau, F. & Wilhelm, C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *European Biophysics Journal* **37**, 223-228 (2008).
- 66 Suto, M. *et al.* Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1493-1496 (2009).
- 67 Abenojar, E. C., Wickramasinghe, S., Bas-Concepcion, J. & Samia, A. C. S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International* **26**, 440-448, doi:https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2016.09.004 (2016).
- 68 Cherukuri, P., Glazer, E. S. & Curley, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev* **62**, 339-345, doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.006 (2010).
- 69 Moskowitz, B. M. in *Environmental Magnetism Workshop (IRM)*. 48 (Inst. for Rock Magnetism Univ. of Minn., Minneapolis, Minn).
- 70 Duguet, E., Delville, M.-H. & Mornet, S. Synthesis and Characterisation of Iron Oxide Ferrite Nanoparticles and Ferrite-Based Aqueous Fluids. *Magnetic Nanoparticles: From Fabrication to Clinical Applications*, 47 (2012).
- 71 Daou, T. J. *et al.* Hydrothermal Synthesis of Monodisperse Magnetite Nanoparticles. *Chem. Mater.* **18**, 4399-4404, doi:10.1021/cm060805r (2006).
- 72 Xu, J. *et al.* Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. *J. Magn. Magn. Mater.* **309**, 307-311, doi:https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.07.037 (2007).
- 73 Bharde, A. *et al.* Bacterial Aerobic Synthesis of Nanocrystalline Magnetite. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 9326-9327, doi:10.1021/ja0508469 (2005).
- 74 Revia, R. A. & Zhang, M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Materials Today* **19**, 157-168, doi:https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.08.022 (2016).
- 75 Hajba, L. & Guttman, A. The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: Toward handheld diagnostic devices. *Biotechnology Advances* **34**, 354-361, doi:https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.02.001 (2016).
- 76 Mou, X., Ali, Z., Li, S. & He, N. Applications of Magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery System. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **15**, 54-62, doi:10.1166/jnn.2015.9585 (2015).
- 77 Tietze, R. *et al.* Magnetic nanoparticle-based drug delivery for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **468**, 463-470, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.022 (2015).
- 78 Schleich, N., Danhier, F. & Pr at, V. Iron oxide-loaded nanotheranostics: Major obstacles to in vivo studies and clinical translation. *Journal of Controlled Release* **198**, 35-54, doi:https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.024 (2015).
- 79 Bagheri, A. R. *et al.* Dummy molecularly imprinted polymers based on a green synthesis strategy for magnetic solid-phase extraction of acrylamide in food samples. *Talanta* **195**, 390-400, doi:10.1016/j.talanta.2018.11.065 (2019).
- 80 Cheng, Y. *et al.* Synthesis and characterization of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers for selective recognition and determination of quercetin in apple samples. *Food Chem.* **287**, 100-106, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.069 (2019).

- 81 Chen, L. *et al.* Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. *Journal of Chromatography A* **1216**, 3710-3719, doi:10.1016/j.chroma.2009.02.044 (2009).
- 82 Attallah, O. A., Al-Ghobashy, M. A., Ayoub, A. T. & Nebsen, M. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for simultaneous extraction and determination of 6-mercaptopurine and its active metabolite thioguanine in human plasma. *Journal of Chromatography A* **1561**, 28-38, doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.038 (2018).
- 83 Rivas, J., Bañobre-López, M., Piñeiro-Redondo, Y., Rivas, B. & López-Quintela, M. A. Magnetic nanoparticles for application in cancer therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **324**, 3499-3502, doi:https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2012.02.075 (2012).
- 84 Dorniani, D. *et al.* Preparation and characterization of 6-mercaptopurine-coated magnetite nanoparticles as a drug delivery system. *Drug design, development and therapy* **7**, 1015-1026, doi:10.2147/DDDT.S43035 (2013).
- 85 Kubo, T. *et al.* Magnetic Field Stimuli-Sensitive Drug Release Using a Magnetic Thermal Seed Coated with Thermal-Responsive Molecularly Imprinted Polymer. *ACS Biomaterials Science and Engineering* **5**, 759-767, doi:10.1021/acsbomaterials.8b01401 (2019).
- 86 Umpleby, R. J. *et al.* Characterization of the heterogeneous binding site affinity distributions in molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B* **804**, 141-149, doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.01.064 (2004).
- 87 Umpleby, R. J., Baxter, S. C., Chen, Y., Shah, R. N. & Shimizu, K. D. Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir–Freundlich Isotherm. *Anal. Chem.* **73**, 4584-4591, doi:10.1021/ac0105686 (2001).
- 88 Umpleby, R. J. *et al.* Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta* **435**, 35-42, doi:https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01211-3 (2001).
- 89 Costa, P. & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **13**, 123-133 (2001).
- 90 Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. & Chowdhury, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* **67**, 217-223 (2010).
- 91 Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. & Peppas, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* **15**, 25-35, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9) (1983).
- 92 Ambrosio, P. J. S. *Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tetraetil ortosilicato y recubiertas con acrilatos para uso como vehículo de doxorubicina.* Licenciatura thesis, UNAM, (2013).
- 93 Putz, H. & Brandenburg, K. Match! *Phase Identification from Powder Diffraction CRYSTAL IMPACT, Bonn, Germany: Crystal Impact GbR* (2003).
- 94 Lara-Zenteno, J. R. *Efecto del calentamiento por inducción magnética sobre la liberación de ácido fólico mediante un sistema de nanopartículas magnéticas recubiertas por polímeros de impronta molecular.* licenciatura thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, (2019).
- 95 Petcharoen, K. & Sirivat, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Materials Science and Engineering: B* **177**, 421-427, doi:https://doi.org/10.1016/j.mseb.2012.01.003 (2012).
- 96 Liu, X. *et al.* Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. *J. Magn. Magn. Mater.* **306**, 248-253, doi:https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.03.049 (2006).
- 97 Parmar, H. *et al.* Size Dependent Heating Efficiency of Iron Oxide Single Domain Nanoparticles. *Procedia Engineering* **102**, 527-533, doi:https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.01.205 (2015).
- 98 Mürbe, J., Rechtenbach, A. & Töpfer, J. Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* **110**, 426-433 (2008).

- 99 Lu, W., Shen, Y., Xie, A. & Zhang, W. Green synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **322**, 1828-1833 (2010).
- 100 Monshi, A., Foroughi, M. R. & Monshi, M. R. Modified Scherrer equation to estimate more accurately nano-crystallite size using XRD. *World journal of nano science and engineering* **2**, 154-160 (2012).
- 101 Brice-Profeta, S. *et al.* Magnetic order in γ -Fe₂O₃ nanoparticles: a XMCD study. *J. Magn. Magn. Mater.* **288**, 354-365 (2005).
- 102 López-López, M. T., Durán, J. D. G., Delgado, A. V. & González-Caballero, F. Stability and magnetic characterization of oleate-covered magnetite ferrofluids in different nonpolar carriers. *Journal of Colloid and Interface Science* **291**, 144-151, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.04.099> (2005).
- 103 Viota, J., Durán, J., González-Caballero, F. & Delgado, A. Magnetic properties of extremely bimodal magnetite suspensions. *J. Magn. Magn. Mater.* **314**, 80-86 (2007).
- 104 Grillo, M. E., Finnis, M. W. & Ranke, W. Surface structure and water adsorption on Fe₃O₄ (111): Spin-density functional theory and on-site Coulomb interactions. *Physical Review B* **77**, 075407 (2008).
- 105 Hackley, V. & Clogston, J. Measuring the size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. *NIST Special Publication* **1200**, 6 (2007).
- 106 Clogston, J. D. & Patri, A. K. in *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery* 63-70 (Springer, 2011).
- 107 Aliahmad, M. & Moghaddam, N. N. Synthesis of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles by thermal-decomposition of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Materials Science-Poland* **31**, 264-268 (2013).
- 108 Ruela, A. L. M., Figueiredo, E. C. & Pereira, G. R. Molecularly imprinted polymers as nicotine transdermal delivery systems. *Chem. Eng. J.* **248**, 1-8, doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.12.106> (2014).
- 109 Maity, D., Choo, S.-G., Yi, J., Ding, J. & Xue, J. M. Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, 1256-1259, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2008.11.013> (2009).

Anexo 1. Curvas de calibración del fármaco 6 mercaptopurina en distintos medios.

Curva de calibración de 6MP en medio MeOH

Figura 62. Curva de calibración de la 6MP en MeOH

Tabla 22. valores estadísticos del ajuste de la curva de calibración

Intercepto (b)	-0.01189
Pendiente (m)	19580.7152
r²	0.9983

Tabla 23. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH y sus valores de absorbancia.

Concentración (M)	Absorbancia (327 nm)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5.00E-06	0.091	0.09	0.11
1.00E-05	0.166	0.161	0.19515
1.45E-05	0.255	0.249	0.27156
2.05E-05	0.399	0.389	0.38296
2.50E-05	0.484	0.48	0.45212
3.00E-05	0.576	0.573	0.54146
3.33E-05	0.656	0.651	0.63764
4.00E-05	0.79	0.787	0.71628
4.44E-05	0.879	0.88	0.82868
5.00E-05	0.992	0.988	0.89669
5.33E-05	1.08	1.01	0.95524
6.10E-05	1.217	1.19	1.03218

Curva de calibración de 6MP en medio MeOH/MeCN (3:7)

Figura 63. Curva de calibración de 6MP en medio MeOH/MeCN (3:7)

Tabla 24. Valores estadísticos del ajuste de la curva de calibración

Intercepto (b)	-0.008
Pendiente (m)	18503.549
r²	0.9991

Tabla 25. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH/MeCN (3:7) y sus valores de absorbancia.

Concentración (M)	Absorbancia (329 nm)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5.00E-06	0.086	0.08515	0.08256
7.50E-06	0.142	0.13122	0.12487
1.00E-05	0.188	0.17518	0.18138
1.50E-05	0.275	0.2674	0.2721
2.00E-05	0.358	0.35558	0.36252
2.50E-05	0.44	0.45171	0.45627
3.00E-05	0.524	0.56093	0.52008
4.00E-05	0.844	0.72812	0.74267
5.00E-05	1.01	0.94852	0.95456
6.00E-05	1.237	1.14344	1.16282

Curva de calibración de 6MP en Buffer de fosfatos pH= 7,4

Figura 64. Curva de calibración de 6MP en medio buffer de fosfatos 0.1M, pH=7,4

Tabla 26. Valores estadísticos del ajuste de la curva de calibración

Intercepto (b)	-0.0041
Pendiente (m)	19671.3238
r²	0.9998

Tabla 27. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración en MeOH y sus valores de absorbancia.

Concentración (M)	Absorbancia (320 nm)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
5.05E-06	0.10319	0.09497	0.09548
7.50E-06	0.14205	0.14457	0.14358
1.00E-05	0.2	0.19014	0.19317
1.50E-05	0.30275	0.29437	0.29327
2.00E-05	0.38519	0.38111	0.38714
2.50E-05	0.49694	0.48233	0.49127
3.00E-05	0.59685	0.58508	0.58823
4.00E-05	0.78427	0.77521	0.77333
5.00E-05	0.99488	0.98017	0.99093

Diagrama de distribución de especies del fármaco 6-mercaptopurina

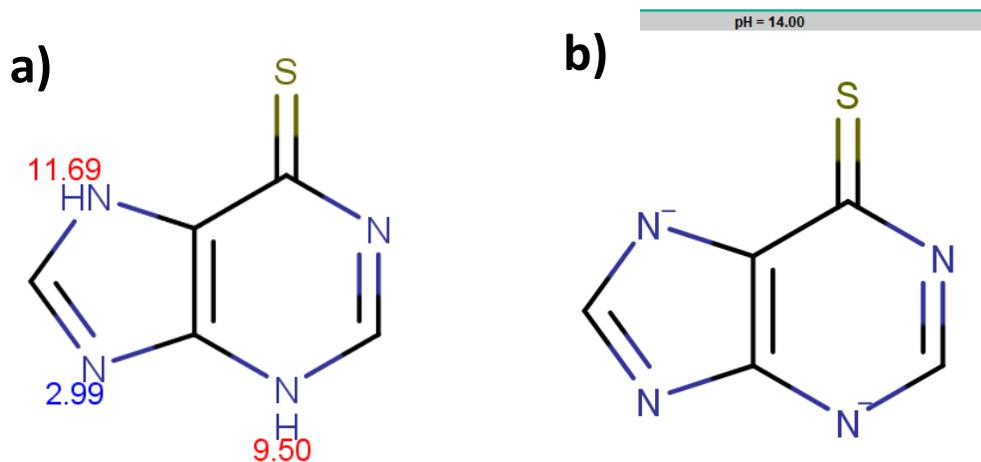


Figura 65. a) Estructura y pKa's del fármaco 6-mercaptopurina. b) Especie predominante a pH=14

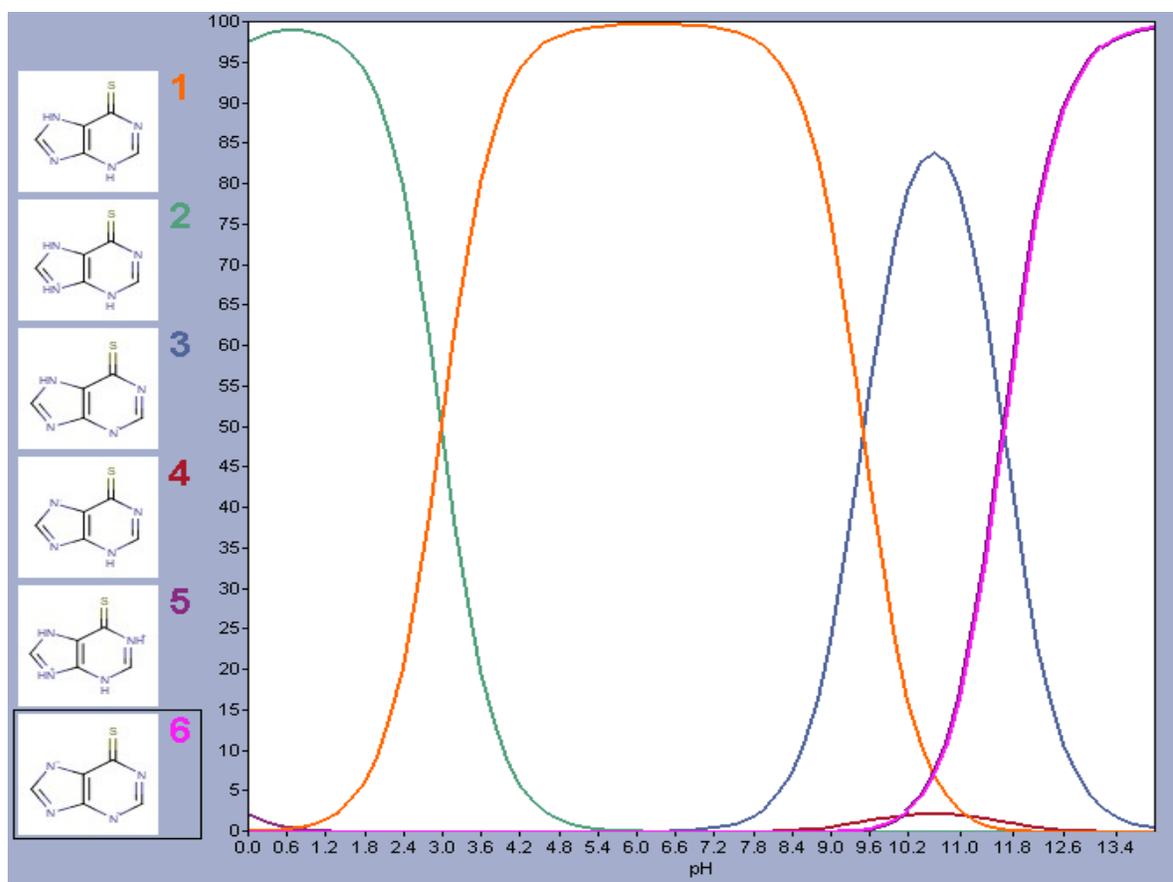


Figura 66. Diagrama de variación de especies del fármaco 6-mercaptopurina en función del pH.

Anexo 2. Análisis cualitativo de la formación del recubrimiento polimérico sobre las nanopartículas de magnetita por hipertermia.

Partículas de magnetita recubiertas con un polímero de ácido metacrílico/EGDMA.

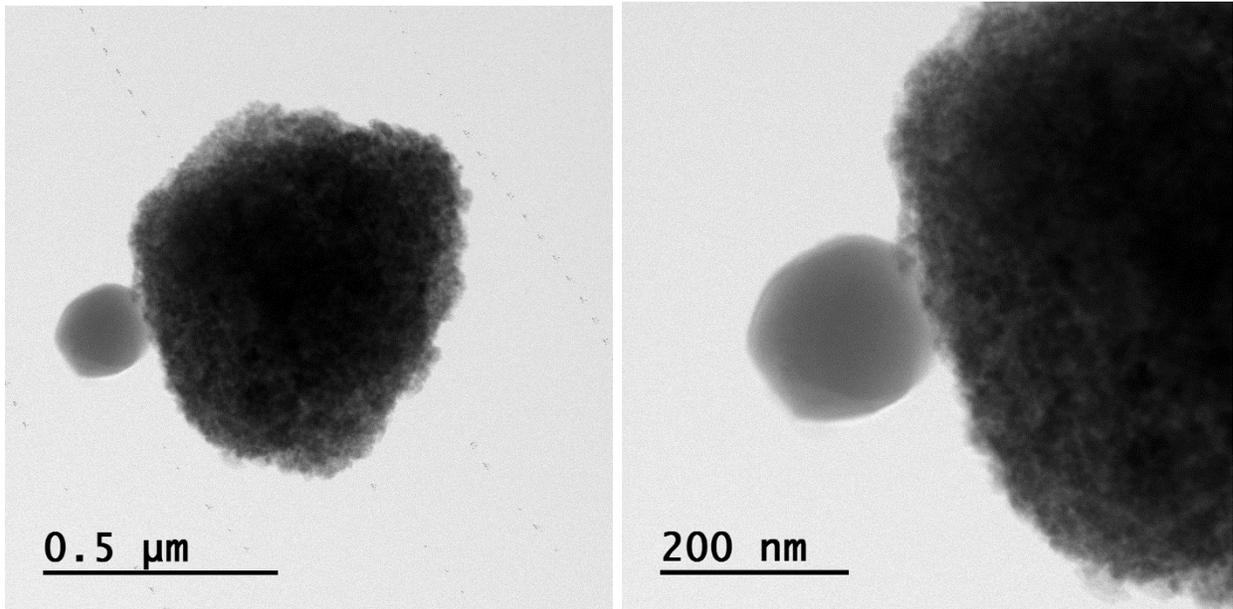


Figura 67. Micrografías para las partículas con 24 horas de exposición al campo magnético alterno.

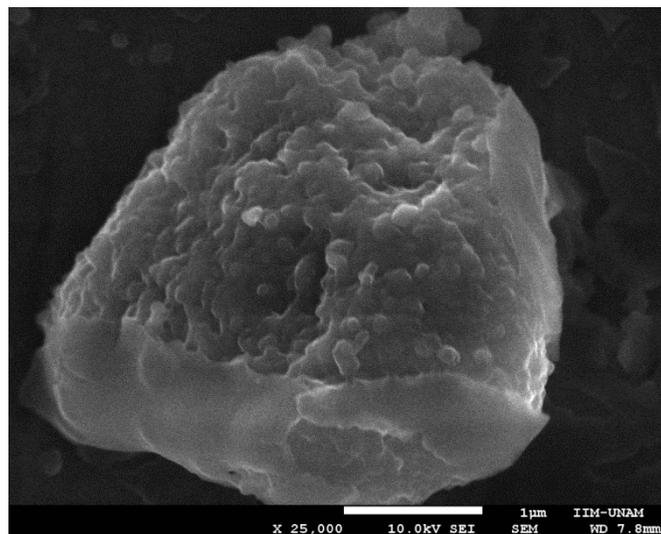


Figura 68. micrografía SEM para el sistema MMIP-MA después de 24 horas de exposición al campo magnético durante la síntesis del polímero.

Anexo 3. Isotermas de adsorción de los sistemas imprimados a concentraciones altas.

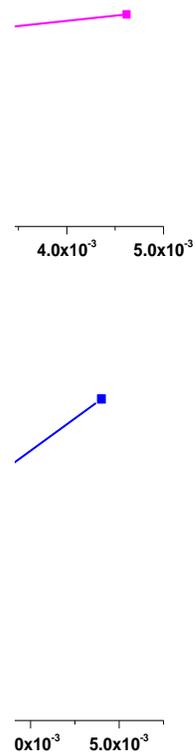


Figura 69. Isotermas de adsorción para los sistemas MMIP a concentraciones altas (6×10^{-5} a 5×10^{-3} M)