

## **Estudio por espectroscopia de absorción en la región infrarroja del complejo de inclusión de un compuesto antineoplásico (metotrexato) en un cargador de fármacos magnéticamente dirigido**

Bocanegra Diaz A, Ochoa Bejarano R  
Grupo de Investigaciones en Transporte Molecular (GITRAM)  
E-mail: [gitram@unipamplona.edu.co](mailto:gitram@unipamplona.edu.co)

Recibido 18 Agosto de 2006

Aceptado 20 Octubre 2006

### **ABSTRACT**

The study of the vibrational spectra was carried out in the infrared region of the beta cyclodextrin methotrexate (MTX), inclusion complex of methotrexate – beta cyclodextrin, magnetic drug carrier and the product of the reaction – MTX-CFMD – was studied. The results obtained indicate that the methotrexate is profoundly included in the beta cyclodextrin forming a complex of inclusion 1:2. In the magnetic drug carrier (CFMD) it is partly included and forms two types of complexes – 1:1. One of the complexes formed includes the rings of pteridine in the cavity while the other leaves them outside. This combination of complexes – MTX:CFMD can turn out to be highly beneficial for the patient during the illness development and its location plus their response to chemotherapy with MTX; therefore, this has the possibility of a rapid process with location and at the same time of controlled action.

### **KEY WORDS**

Infrared Spectroscopy, Complex methotrexate – beta cyclodextrin, Complex CFMD-Methotrexate, Anti-cancerous, Antineoplastic.

### **RESUMEN**

Se realizó el estudio de los espectros vibracionales en la región infrarroja de la beta ciclodextrina, el metotrexato (MTX), el complejo de inclusión metotrexato – beta ciclodextrina, el cargador de fármacos magnéticamente dirigible (CFMD) y el producto de la reacción MTX-CFMD. Los resultados obtenidos indican que el metotrexato se incluye profundamente en la beta ciclodextrina, formando un complejo de inclusión 1:2. En el cargador de fármacos magnéticamente dirigible (CFMD) se incluye parcialmente y forma dos tipos de complejos 1:1. Uno de los complejos formados incluye los anillos de pteridina en la cavidad en tanto que el otro los deja por fuera. Esta combinación de complejos MTX:CFMD puede resultar altamente benéfica para

el tratamiento de enfermedades localizadas que respondan a la quimioterapia con MTX, pues se tiene la posibilidad de un tratamiento rápido, localizado y a la vez de acción controlada.

### PALABRAS CLAVES

Espectroscopía infrarrojo, complejo betaciclodextrina- metotrexato, complejo cfmd- metotrexato, anticancerígeno, anti - neoplásico

### INTRODUCCION

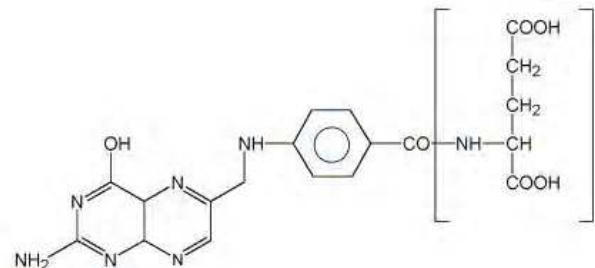
Con el propósito de conducir, acumular y liberar controladamente con mucha precisión, algunos medicamentos en regiones específicas del organismo, se han desarrollado dispositivos de alta eficiencia denominados cargadores de fármacos magnéticamente dirigibles (CFMD) (BOCANEGRA et al, 2002). Un CFMD es un dispositivo formado por dos secciones: una es la parte magnética, que permite la conducción y el control externo del dispositivo y otra la sustancia biológicamente activa (BERGEMANN et al, 1999). El uso de este tipo de dispositivos permite concentrar la acción de los medicamentos, reducir la cantidad de fármaco necesaria para obtener los resultados terapéuticos deseados y minimizar los efectos colaterales. (WOIDZWILLO et al, 2001; SCHOLLES et al, 1993; RUDGE et al, 2001; AU et al, 2001).

Haciendo uso de un CFMD, Bocanegra y colaboradores (BOCANEGRA et al, 2006) han obtenido un sistema CFMD - Metotrexato con posibles aplicaciones en el tratamiento del cáncer. El CFMD desarrollado por Bocanegra y colaboradores está conformado por una parte magnética (ferrita de níquel zinc) y un recipiente molecular (beta ciclodextrina). Esta disposición le permite incluir y transportar moléculas en la cavidad, sin tener que enlazarlas covalentemente.

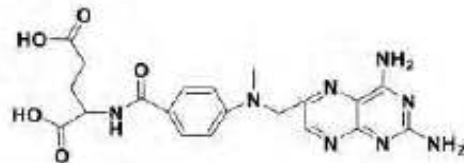
Tomando en consideración que en las membranas celulares de muchos tipos de cáncer como el de ovarios, endometrial, colorectal, etc el receptor folato es sobre expresado (SUDIMACK et al, 2000; GABIZON et al, 1999, SIROTNAK et al, 1999) y que el metotrexato (MTX) es un análogo del ácido fólico (ver figura 1) que exhibe efectos terapéuticos para

muchos tipos de células cancerígenas que sobre expresan receptores de folato en su superficie (DUTHIE, 2001), Bocanegra y colaboradores incluyeron MTX en la cavidad de la ciclodextrina que conforma el CFMD (BOCANEGRA et al, 2006), con el propósito de conducir, acumular y liberar controladamente el MTX en las cercanías de los tumores a ser tratados.

Haciendo uso de termogravimetría y análisis térmico diferencial estos investigadores demostraron la formación del complejo de inclusión CFMD:MTX.



A

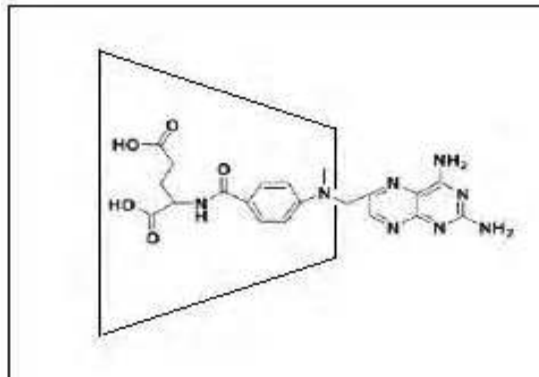


B

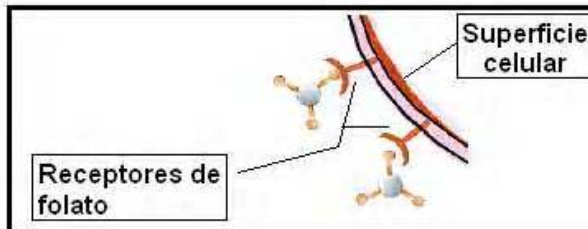
Figura 1. A) Ácido Fólico, B) Metotrexato

Sin embargo, se hace necesario conocer cual de las partes del MTX se encuentra en el interior

de la cavidad del CFMD, pues esta característica podría ser relevante al momento de aproximar el sistema a los tejidos enfermos. Si el complejo de inclusión presenta expuestos los anillos de pteridina (Figura 2A), puede esperarse una acción directa sobre los receptores de folato, tal y como fue propuesto por Kohler y colaboradores (KOHLENER et al, 2005). La interacción del dispositivo magnético con los receptores de folato según los resultados publicados por Kohler y colaboradores, se esquematizan en la figura 2B.



A



B

Figura 2. A) Representación del Complejo de inclusión MTX-CFMD con los anillos de pteridina expuestos; B) La partícula magnética modificada con MTX conduce el fármaco hasta los receptores ubicados sobre la superficie de la célula.

En este caso, el dispositivo puede interactuar con cualquier receptor de folato, en cualquier célula del organismo, sin necesidad de ser liberado del sistema CFMD:MTX. Con un sistema semejante, prácticamente no será posible controlar o eliminar los efectos secundarios derivados de la acción del fármaco libre.

Si, por el contrario, los anillos de pteridina se

encuentran incluidos en la cavidad del CFMD (Figura 3), el MTX solo podrá actuar sobre los receptores una vez liberado del sistema CFMD:MTX y aumentan las posibilidades de reducir o eliminar los efectos secundarios derivados del uso del fármaco libre. Esta segunda posibilidad aprovecharía al máximo las potencialidades del CFMD.

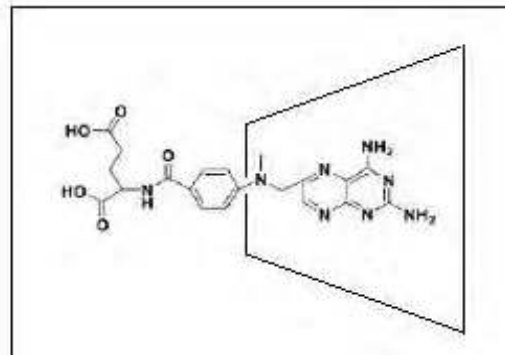


Figura 3. Representación del complejo de MTX-CFMD con los anillos de pteridina incluidos en la cavidad de la ciclodextrina que forma parte del CFMD.

Para la caracterización de compuestos de inclusión en ciclodextrinas, especialmente cuando el compuesto incluido es de carácter netamente orgánico, la herramienta preferida es la resonancia magnética nuclear (RMN) (SCHNEIDER et al, 1998). Sin embargo y dado el carácter magnético de la muestra, la RMN presentaría algunas dificultades insuperables como la superposición de campos magnéticos y consecuente aumento o disminución de valores de desplazamiento, que impedirían un verdadero análisis de la situación estudiada.

Así pues, con el propósito de obtener información en relación con la forma en que se encuentra incluida la molécula de MTX en el CFMD, se acudió a la espectroscopia de absorción en la región infrarroja, como herramienta de análisis. Esta herramienta resulta la más efectiva en el caso a tratar, por no sufrir ningún tipo de impedimento frente al carácter magnético de la muestra.

## EXPERIMENTAL

Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos

de Aldrich® en grado analítico. El cargador de fármacos magnéticamente dirigible fue formado de acuerdo a la técnica desarrollada por Bocanegra y colaboradores (BOCANEGRA et al, 2002).

### **Síntesis del complejo de inclusión del MTX en la cavidad del cargador de fármacos magnéticamente dirigible**

La síntesis del complejo CFMD:MTX fue realizada tal y como se publicó en BOCANEGRA et al, 2006. Esencialmente, se mezclaron en agua cristales de MTX y el cargador de fármacos magnéticamente dirigible, en proporción equimolar, bajo agitación continua y vigorosa a 25°C durante 2 horas. Se obtuvo un sólido magnéticamente sensible que se lavó intensamente con agua destilada y desmineralizada. Posteriormente se secó a sesenta grados centígrados. Al sólido obtenido se le realizaron medidas de espectroscopia de absorción en la región del infrarrojo (4000- 250  $\text{cm}^{-1}$ )

### **Síntesis del complejo de inclusión del MTX en beta ciclodextrina**

Para sintetizar el complejo beta ciclodextrina: MTX, se mezclaron cristales de MTX en agua y beta ciclodextrina, en proporción equimolar, bajo agitación continua y vigorosa a 25°C durante 2 horas. Se obtuvo un sólido amarillo claro que se

lavó intensamente con agua destilada y desmineralizada. Fue secado posteriormente a sesenta grados centígrados. Al sólido obtenido se le realizaron medidas de espectroscopia de absorción en la región del infrarrojo (4000- 250  $\text{cm}^{-1}$ )

### **Análisis espectroscópico de absorción en la región infrarroja**

Los espectros de absorción en la región infrarroja se tomaron en un espectrofotómetro Shimadzu Prestige XXI con transformadas de Fourier. El espectro fue registrado entre 4.000 y 250  $\text{cm}^{-1}$ . La muestra se compacto en forma de pastilla transparente usando KBr grado espectroscópico, marca PIKE.

### **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

#### **Análisis de los espectros infrarrojo de la beta ciclodextrina, del cargador de fármacos magnéticamente dirigible y del metotrexato puros**

En las figuras 1, 2 y 3 se presentan el espectro infrarrojo de la beta ciclodextrina, el CFMD y el MTX, respectivamente. Los espectros correspondientes a CFMD y BCD presentan las bandas esperadas (Bocanegra, 2003 tesis).

El espectro IRTF de MTX presenta tres bandas fuertes en 1635, 1600 y 1564  $\text{cm}^{-1}$  y una banda

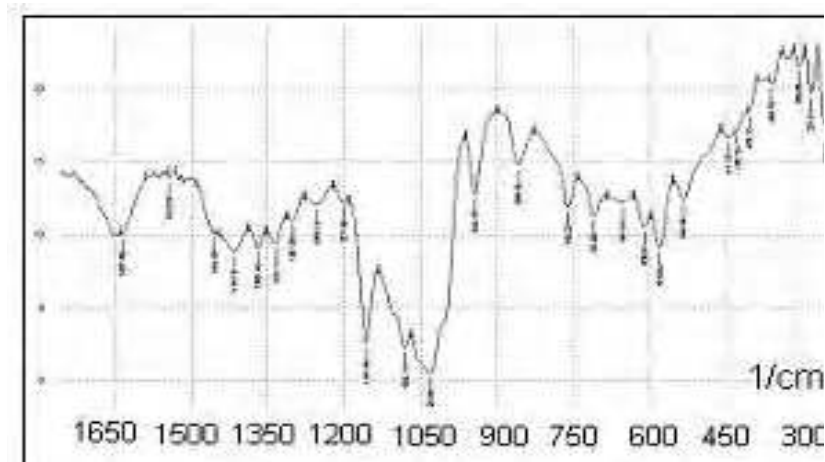


Figura 1. Espectro de absorción en la región infrarroja (1700 - 250  $\text{cm}^{-1}$ ) para la beta ciclodextrina

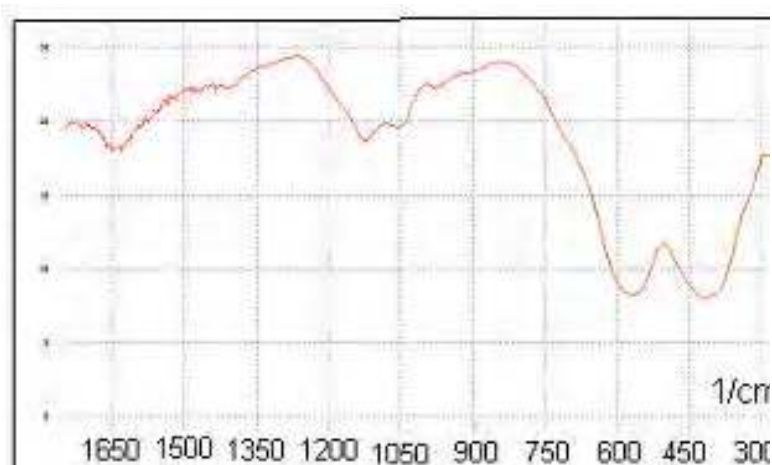


Figura 2. Espectro de absorción en la región infrarroja (1700 - 250  $\text{cm}^{-1}$ ) para el CFMD

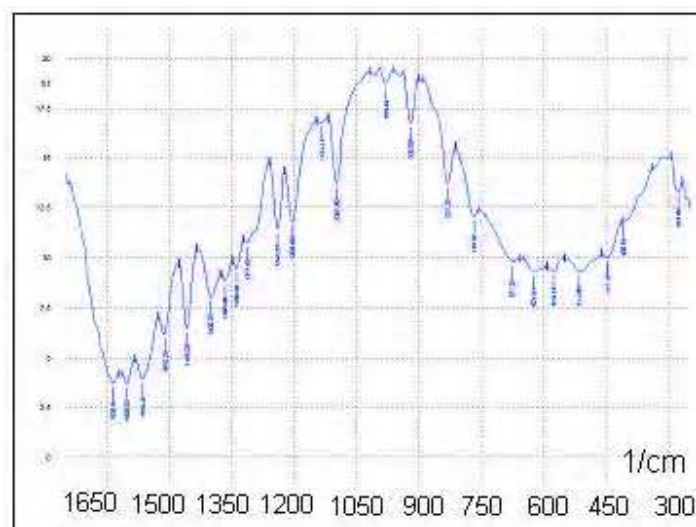


Figura 3. Espectro de absorción en la región infrarroja (1700 - 250  $\text{cm}^{-1}$ ) para el MTX

solapada en  $1664 \text{ cm}^{-1}$  en la región donde se espera encontrar los estiramientos N-H y C=O (Figura 4).

La banda solapada en  $1664 \text{ cm}^{-1}$  puede asociarse al grupo cetónico presente en la molécula (SILVERSTEIN, 1997).

Las bandas fuertes ubicadas en  $1635$  y  $1600 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a los estiramientos N-H (SUSUKI, 1963). La presencia de dos bandas para el mismo estiramiento se puede explicar

por el ambiente químico para cada uno de los residuos amínicos. El residuo que se encuentra entre los dos nitrógenos del anillo, presenta mayor densidad electrónica sobre el átomo de nitrógeno y por lo mismo, la fuerza de enlace N-H será mayor, motivando un estiramiento a menor frecuencia ( $1635 \text{ cm}^{-1}$ ). El otro residuo genera la banda a menor número de onda ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ). El estiramiento N-H del nitrógeno adyacente al grupo cetónico se presenta en  $1510 \text{ cm}^{-1}$  por encontrarse entre dos extremos C=O.

El estiramiento COO- asimétrico se puede

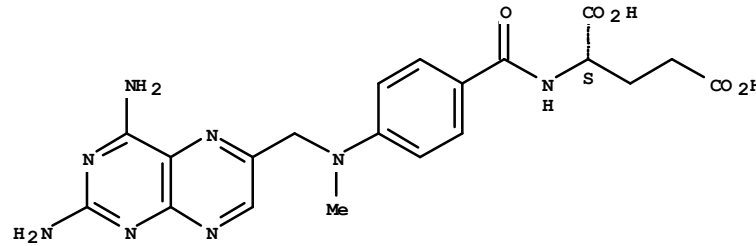


Figura 4. Estructura química del metotrexato

asociar con la banda en  $1564\text{ cm}^{-1}$ . Esta frecuencia se presenta siempre que el ácido carboxílico se encuentra disociado (Bocanegra, 1998, tesis).

El estiramiento  $\text{COO}^-$  simétrico correspondiente a los dos residuos carboxílicos de la molécula de MTX, se observan en  $1400\text{ cm}^{-1}$ , como se ha observado en los ácidos carboxílicos alifáticos disociados (BOCANEGRA, 1998).

La banda en  $1456\text{ cm}^{-1}$  corresponde a estiramientos metálicos (SUSUKI, Ref 20 de tesis maestría)

#### Análisis infrarrojo del complejo metotrexato - betaciclodextrina

En la figura 5 se presenta el espectro de absorción en el infrarrojo correspondiente al complejo de inclusión MTX-BCD.

Una vez se ha incluido el MTX en la BCD, se observa el desplazamiento de la banda en  $1635\text{ cm}^{-1}$  del MTX libre, a  $1628\text{ cm}^{-1}$  y el desplazamiento de la banda de  $1600\text{ cm}^{-1}$  del MTX libre a  $1604\text{ cm}^{-1}$  en el complejo de inclusión, bandas que corresponden a los estiramientos N-H (SUSUKI, 1963). Ambos fenómenos se pueden explicar por la presencia del anillo de pteridina en el interior de la cavidad de la BCD. La formación de puentes de hidrógeno entre el hidrógeno amínico y alguno de los grupos hidroxilos de la BCD, extraería densidad electrónica del enlace N-H motivando un incremento en la frecuencia de estiramiento N-H. La posición del segundo residuo amínico en las proximidades del anillo de electrones en el interior de la cavidad (Figura 6), generaría repulsiones electrostáticas sobre el par de electrones no enlazantes del nitrógeno, originando un incremento de densidad electrónica del enlace N-H cuando el grupo amino intente

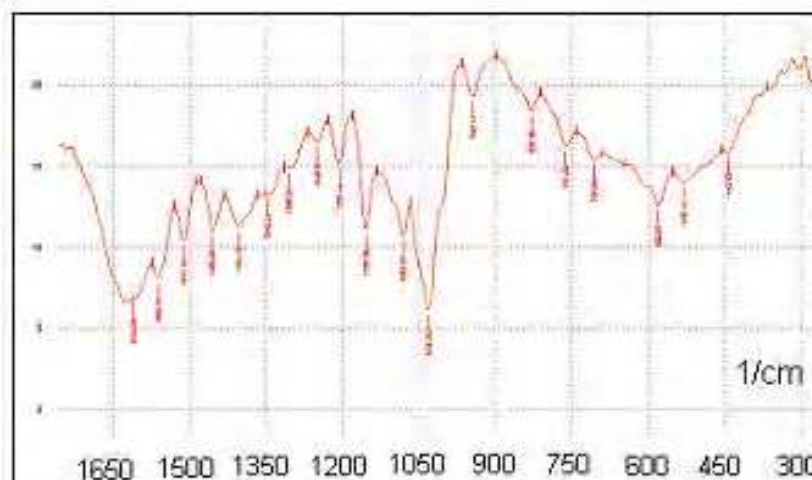


Figura 5. Espectro de absorción en la región infrarroja ( $1700 - 250\text{ cm}^{-1}$ ) para el complejo de inclusión MTX-BCD.

redistribuir la nube electrónica. Ese aumento de densidad electrónica en el enlace hará que aumente la fuerza de enlace y por lo mismo disminuya la frecuencia de vibración.

El estiramiento asimétrico COO<sup>-</sup> que se observa en el MTX a 1564 cm<sup>-1</sup> pasó a observarse en 1562 cm<sup>-1</sup> en el complejo MTX-BCD, debido posiblemente a la reducción de densidad electrónica experimentada por el C=O del COO<sup>-</sup>, originada al formar enlaces de hidrógeno con los grupos OH del borde de la cavidad. El hecho de que no se presenten dos vibraciones, una en 1564 cm<sup>-1</sup> y otra en 1562 cm<sup>-1</sup> en el espectro infrarrojo del complejo MTX-BCD, conduce a pensar que la molécula ha doblado su extremo carboxilado para formar los puentes de hidrógeno con los dos grupos carboxilatos.

El estiramiento C-H del grupo metilo pasó de 1456 cm<sup>-1</sup> en el MTX a 1454 cm<sup>-1</sup> en el

complejo. El incremento de frecuencia de vibración en el estiramiento C-H del grupo metilo indica la formación de enlace de hidrógeno entre el nitrógeno enlazado al metilo y un grupo hidroxilo de la BCD. La formación de dicho enlace, teniendo al nitrógeno como donante electrónico, extrae densidad electrónica del mismo y obliga a desplazar la nube electrónica de los enlaces C-H en la dirección del átomo más electronegativo.

Tomando en consideración que toda la molécula de MTX no cabe en una sola BCD, es de esperar que haya una inclusión tipo 1:2 (Figura 7) debido a que las frecuencias de vibración de los grupos carboxilatos al igual que la del grupo amino indican que todas las partes de la molécula de MTX se encuentran incluidas.

### Análisis infrarrojo del complejo de inclusión metotrexato - cargador de fármacos magnéticamente dirigible

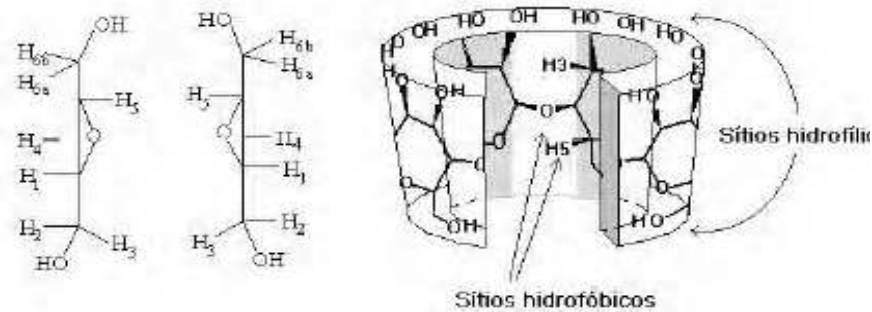


Figura 6. Representación esquemática de las posiciones de los átomos de hidrógeno y O-glicosídicos en la cavidad de la ciclodextrina.

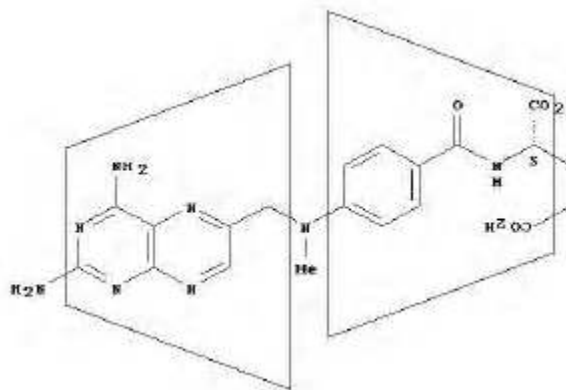


Figura 7. Esquema representativo del complejo MTX-BCD 1:2

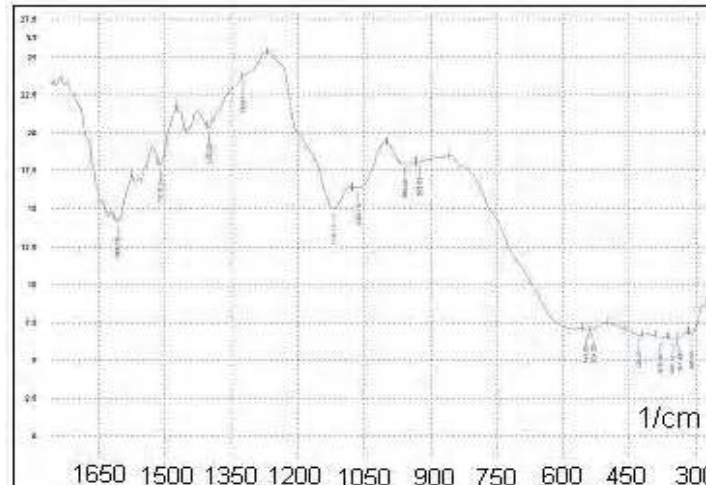


Figura 8. Espectro de absorción en la región infrarroja (1700 - 250  $\text{cm}^{-1}$ ) para el complejo de inclusión MTX-CFMD.

En la figura 8 se presenta el espectro de absorción en el infrarrojo correspondiente al complejo de inclusión MTX-CFMD.

De la misma manera que se observó en el espectro infrarrojo del complejo MTX-BCD, se presenta un desplazamiento de la banda de 1635  $\text{cm}^{-1}$  del MTX libre, a 1630  $\text{cm}^{-1}$  en el complejo MTX-CFMD. De igual forma, la banda de 1600  $\text{cm}^{-1}$  en el MTX libre pasa a 1606  $\text{cm}^{-1}$  en el complejo de inclusión. Como ya fue explicado en el análisis del complejo de inclusión MTX-BCD, estos cambios vibracionales pueden ser considerados evidencias de la inclusión del MTX en la cavidad de la ciclodextrina, que en este caso se encuentra formando parte del CFMD.

El estiramiento C-H del grupo metilo pasó de 1456  $\text{cm}^{-1}$  en el MTX a 1456 y 1454  $\text{cm}^{-1}$  en el complejo MTX-CFMD. Estos resultados pueden ser interpretados como la presencia de dos formas de inclusión de la molécula de MTX en la cavidad del residuo de BCD que conforma el CFMD: una en la cual los anillos de pteridina se encuentran encapsulados dentro del CFMD (Figura 3) y otra en la cual estos se encuentran fuera de la misma (Figura 2A).

Otra opción podría ser la existencia de residuos de MTX libre en la superficie del CFMD, pero

el análisis térmico (BOCANEGRA et al, 2006) descarta esta posibilidad.

## CONCLUSIONES

El análisis infrarrojo muestra que el MTX se incluye profundamente en la beta ciclodextrina formando un complejo 1:2, presentando entonces una muy buena posibilidad de controlar los desagradables malestares estomacales derivados del uso del MTX libre, pues la BCD conducirá el medicamento hasta la mucosa misma, donde será liberado. Una vez liberado el MTX de la BCD, los efectos secundarios derivados de su capacidad para ocupar receptores de folato no podrán ser controlados. Es ahí donde resulta importante el uso del CFMD.

En el CFMD, el MTX también forma complejos de inclusión, aunque estos complejos solo incluyan una parte de la molécula de interés. Como se esperaba, una parte de los complejos de inclusión formados presentan los anillos pteridínicos en el interior de la cavidad y resultan de gran importancia para el tratamiento localizado por que de esa forma solo reaccionaran con el receptor una vez sean trasladados, acumulados y liberados en las proximidades del tejido de interés. El otro complejo formado, que presenta los anillos expuestos, es el acompañante perfecto para el anterior pues, mientras se espera la



controlado por el uso de campos magnéticos externos para conducirlo y acumularlo en las cercanías del tumor a tratar. Esa combinación de situaciones está generando una poderosa herramienta para el tratamiento de tumores cancerígenos que responden a la quimioterapia con MTX, reduciendo los efectos secundarios que se presentan cuando se usa la droga libre.

Aunque los resultados obtenidos desde el punto de vista químico son alentadores, es necesario realizar pruebas in vitro e in vivo para

confirmar las capacidades reales de los complejos de inclusión formados en el tratamiento de enfermos de cáncer u otras enfermedades localizadas que puedan ser tratadas con MTX.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la Liga NorteSantandereana de Lucha Contra el Cáncer, por la donación del principio activo metotrexato, usado para el desarrollo del presente trabajo

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Bergemann C, Muller-Schulte D, Oster J, Brassard L, Lubbe A.S, (1999), Magnetic ion-exchange nano- and microparticles for medical, biochemical and molecular biological applications. *J. Magn. Mat.* 194 : 45

Bocanegra-Diaz A, (1997), Síntesis en estado sólido y propuesta estructural del sistema circonio - aluminio - glicina (ZAG), Tesis Maestría

Bocanegra-Diaz A, Mohalle N.D.S, Sinisterra R.D. (2002) Complex material using beta Cyclodextrins and Nickel-Zinc ferrite to obtain a Magnetically Targetable Drug Carrier, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 711, HH 3.30.1.

Bocanegra-Diaz A, (2003), Preparação e caracterização de nanocompósitos formados por ciclodextrinas e óxidos de Fe, Ni e Zn, Tese doutoral

Bocanegra-Diaz A, Ochoa Bejarano, R., Caracterización térmica del complejo de inclusión de un compuesto anticancerígeno (metotrexato) en un cargador de fármacos magnéticamente dirigido, *Revista CLON*, 4 N1 Pag. 36 - 43 (2006) in press

Duthie, S. J. (2001). Nutrition, Folic-acid-mediated inhibition of human coloncancer cell growth, 17:736  
Gabizon, A.; Horowitz, A. T.; Goren, D.; Tzemach, D.; Mandelbaum- Shavit, F.; Qazen, M. M.; Zalipsky, S.; (1999), Bioconjugate Chem., Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies, 10:289

Kohler, N., Sun, C., Wang, J., Zhang, M. (2005). *Langmuir*, Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells, 21: 8858

Rudge S, Peterson C, Koda J, Stevens S, Catterall L, (2001). Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC), *J Control. Rel.*, 74, 335

Scholes P.D, Coombes A.G.A, Illum L, Davis S.S, Vert M, Davies M.C, (1993), The preparation of sub-200 nm poly (lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery. *J. Control. Rel.*, 25: 145

Schneider, H. J. Hacket, F., Rüdiger, V. (1998), NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, 98:1755

Silverstein, R. M., Webster, F. X. (1997) "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 6ª Edición. John Wiley and Sons, Inc., New York,

Sirotnak, F. M.; Tolner, B. (1999). Annu. Rev. Nutr., Carrier-mediated membranetransport of folates in mammalian cells. 19: 91.

Sudimack, J.; Lee, R. J. (2000). Adv. Drug Delivery Rev., Targeted drug delivery via the folate receptor. 41:147

Susuki, S., Shimanouchi, T. (1963), Normal vibrations of glicine and deuterated glycine molecules, 19, 1195

Woiszwilllo J.E, Brown L.R, Scott T. L, Di J, Subhalter J, Blizzard C. D, Riske F.J, (2001). U.S. Pat. 6.268.053