

Cristales moleculares derivados del ácido gálico y pirimidinas con posibles aplicaciones farmacéuticas

Flores Manuel Fermín¹, Barrios Alfaro Gema¹, Bernès Fluoriot Sylvain Jean², Varela-Caselis Jenaro³, Percino Zacarías María Judith⁴, Sosa-Rivadeneira Martha Virginia^{1*}

¹Centro de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). 14 Sur Esquina San Claudio, San Manuel, 72570, Puebla, México.

²Instituto de Física, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (IFBUAP). Av. San Claudio y Blvd. 18 Sur, Col. San Manuel 72570, Puebla, México.

³Centro Universitario de Vinculación y Transferencia Tecnológica, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, C.U., C.P. 72001, Puebla Pue. México.

⁴Unidad de Polímeros y Electrónica Orgánica, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Val3-Ecomcampus Valsequillo, Independencia 02 Sur 50, San Pedro Zacachimalpa, C.P. 72960 Puebla, México.

*Autor para correspondencia: martha.sosa@correo.buap.mx

Recibido:

21/julio/2019

Aceptado:

08/agosto/2019

Palabras clave:

Cristal molecular, ácido gálico, pirimidinas

Keywords:

Molecular crystal, gallic acid, pyrimidines

RESUMEN

El siguiente trabajo presenta el estudio de dos nuevos cristales moleculares derivados del ácido gálico y pirimidinas (timina y citosina). Los compuestos obtenidos se caracterizaron por difracción de rayos X de polvos y de monocristal, espectroscopía IR y mediciones TGA/DSC. La síntesis de los cristales moleculares se experimentó por medio de cristalización por evaporación del disolvente y por *slurry*. Los estudios de difracción de rayos X de monocristal nos revelaron que obtuvimos dos nuevos cristales moleculares con posibles aplicaciones farmacéuticas: **PY1** (timina/ácido gálico/H₂O) que cristalizó en un sistema monoclinico y grupo espacial *P2₁/c* y **PY2** (citosina/ácido gálico) que cristalizó en un sistema monoclinico con grupo espacial *P2₁*. La síntesis del compuesto **PY2** fue fácilmente reproducible por el método de *slurry*.

ABSTRACT

This paper presents the study of two new molecular crystals derived from gallic acid and pyrimidines (thymine and cytosine). The compounds obtained were characterized by single-crystal and powder X-ray diffraction, IR spectroscopy and TGA/DSC measurements. The synthesis of molecular crystals was realized by crystallization by evaporation of the solvent and by *slurry*. The single crystal X-ray crystallographic study revealed that we obtained two new molecular crystals with possible pharmaceutical applications: **PY1** (thymine/gallic acid/H₂O) that crystallized in a monoclinic system and space group *P2₁/c* and **PY2** (cytosine/gallic acid) which crystallized in a monoclinic system with space group *P2₁*. The synthesis of the compound **PY2** was easily reproducible by the *slurry* method.

Introducción

Los análogos y derivados de pirimidinas o nucleósidos tienen actividad citotóxica debido a su capacidad de incorporarse en el ARN/ADN e inhibir la proliferación celular y son una clase de medicamentos con actividad antitumoral que se usan comúnmente para tratar el cáncer (Peters, 2014). En la industria farmacéutica, son las propiedades biofarmacéuticas y no la toxicidad o la falta de eficacia las principales razones por las que menos del 1% de los compuestos farmacéuticamente activos salen al mercado (Aakeröy et al., 2009; Ramanathan, 2009).

Entre estas propiedades biofarmacéuticas, la solubilidad sigue siendo un tema clave (Blagden et al., 2007), y los medicamentos a menudo se descartan durante la producción comercial debido a esto. Mejorar la solubilidad de los medicamentos es actualmente uno de los principales desafíos para la industria farmacéutica, por ello, durante la última década ha surgido un creciente interés en el diseño de cocristales farmacéuticos, que es un método potencial para mejorar la biodisponibilidad de los medicamentos con baja solubilidad acuosa. Un cocristal se define como un cristal que se construye a partir de dos o más componentes orgánicos, que son, en sus formas puras, sólidos en condiciones ambientales. Para el diseño de estos co-cristales debe tomarse en cuenta que los grupos funcionales del IFA (Ingrediente Farmacéuticamente Activo) permitan el reconocimiento molecular por parte del agente co-cristalizante (Mirza, 2008). Los agentes formadores de co-cristales farmacéuticos más comunes son: ácidos, amidas, carbohidratos, alcoholes y aminoácidos.

Por otro lado, Sridhar y colaboradores, realizaron un estudio de cocristalización de la timina con diferentes coformadores fenólicos (catecol, resorcinol, hidroquinona y pirogalol). En este estudio hacen un análisis estructural de los diferentes cocristales obtenidos, concluyendo que los diferentes átomos donadores y aceptores presentes en la timina se comportan de diferente manera dependiendo del tipo de coformador utilizado (Sridhar et al., 2015).

En el presente trabajo, nos dimos a la tarea de investigar, analizar, y obtener cocristales derivados de pirimidinas (timina y citosina) utilizando ácido gálico como coformador, los cuales tendrían una posible aplicación farmacéutica como agentes antitumorales. Después de realizar un screening de cristalizaciones por evaporación lenta del disolvente (acetona, metanol, etanol, acetonitrilo y agua) obtuvimos dos nuevos cocristales los cuales fueron caracterizados por difracción de rayos X de polvos y de monocristal, espectroscopia IR y análisis DSC/TGA.

Metodología

Reactivos

Los reactivos y disolventes se adquirieron de la compañía Sigma-Aldrich Co., y se utilizaron sin previa purificación.

Instrumentación

El análisis por difracción de rayos-X de polvos se llevó a cabo en el modo de transmisión en un equipo de difracción Bruker D8-Advance equipado con un detector LynxEye ($\lambda_{Cu-K\alpha}=1.5406 \text{ \AA}$, monocromador: germanio). El equipo fue operado a 40 kV y 40 mA y los datos fueron colectados a temperatura ambiente en el rango de $2\theta=5-50^\circ$ (tamaño de paso 0.011° , tiempo de paso 10 s). La difracción de Rayos X de monocristal (Tabla 1) se llevó a cabo en un equipo de difracción Stoe Stadivari equipado con una microfuelle Axo ($\lambda_{Ag-K\alpha}=0.56083 \text{ \AA}$; 65 kV, 0.6 mA) y un detector Dectris Pilatus-100K. Las intensidades de difracción se midieron a temperatura ambiente, hasta una resolución $(\sin\theta/\lambda)_{\max}=0.64 \text{ \AA}^{-1}$.

Los espectros de infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Bruker Vector 22FT y se midieron en el intervalo de $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ directamente del material sintetizado.

El análisis termogravimétrico y de calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC) se realizó en un equipo NETZSCH STA 449 F3 *Jupiter* y se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ en un rango de temperatura de $20-600^\circ\text{C}$ usando una corriente de nitrógeno ($50\text{mL}/\text{min}$).

Experimentación

En un vial provisto de barra magnética se pesaron el ácido gálico y la respectiva pirimidina (timina, citosina) en una relación 1:1. Con asistencia de algunas gotas acetona se puso en agitación hasta formar una masa. Se tapó el vial y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante dos horas. Después de este lapso, se retiró la agitación y se dejó el vial abierto dejando evaporar el disolvente por completo hasta obtener los polvos.

Cristalización

En un vial se pesaron 10 mg de los polvos obtenidos en el *slurry* y 6 mL de metanol. Con ayuda de una barra magnética se puso en agitación y calentamiento hasta solubilizar por completo la mezcla. Posteriormente la solución se filtró en un nuevo vial y se tapó con una tela porosa que permitiera una evaporación lenta del disolvente hasta la obtención de los sólidos cristalinos.

Resultados y discusión

Análisis por difracción de rayos X de monocristal

Los datos cristalográficos para ambos cristales moleculares se encuentran resumidos en la Tabla 1.

El cocrystal denominado **PY1**, se formó a partir de la cristalización del producto de *slurry*. El análisis estructural del cristal molecular denominado **PY1** nos permitió observar que este compuesto cristalizó en un sistema monoclinico y grupo espacial $P2_1/c$.

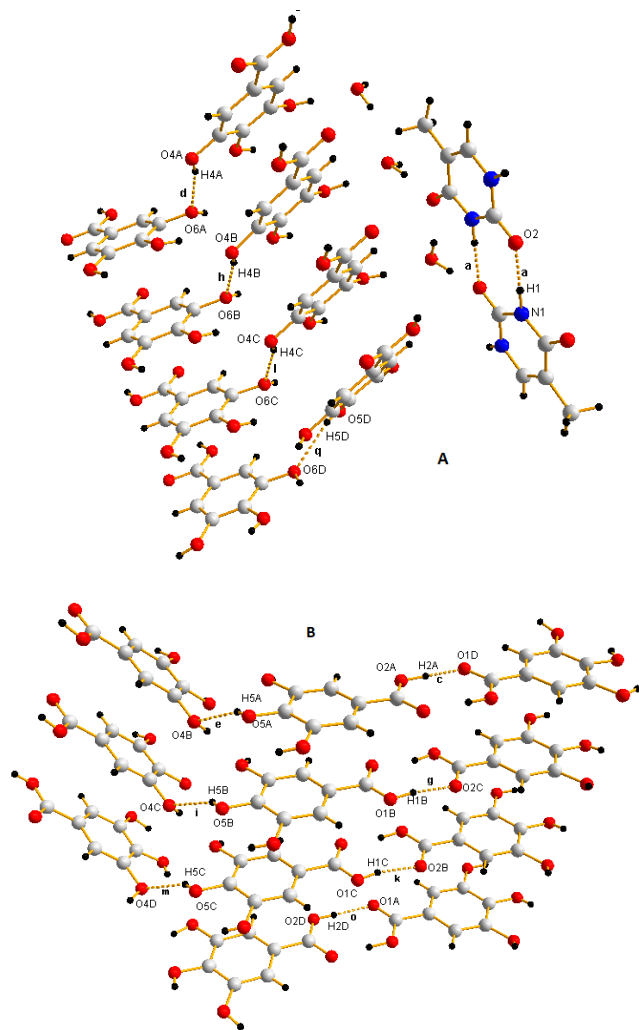


Figura 1. Estructura cristalina para **PY1**.

La unidad asimétrica se encuentra compuesta por una molécula de timina, 4 de ácido gálico y 4 de agua. Como se puede observar en la Figura 1, es una estructura compleja de un nuevo compuesto cocrystalino. Analizando el conjunto de gráficos, hay 26 descriptores de primer orden: **a** ($N1H1 \cdots O2$, 1.830 Å), **d** ($O4AH4A \cdots O6A$, 2.011 Å), **h** ($O4BH4B \cdots O6B$, 2.057 Å), **l** ($O4CH4C \cdots O6C$, 2.206 Å), Figura 1A y **c** ($O2AH2A \cdots O1D$, 1.603 Å), **e** ($O5AH5A \cdots O4B$, 2.053 Å), **g** ($O1BH1B \cdots O2C$,

1.719 Å), **i** ($O5BH5B \cdots O4C$, 2.123 Å), **k** ($O1CH1C \cdots O2B$, 1.796 Å), **m** ($O5CH5C \cdots O4D$, 2.045 Å), **o** ($O2DH2D \cdots O1A$, 1.782 Å), **q** ($O5DH5D \cdots O6D$, 2.379 Å), **r** ($O6DH6D \cdots O4A$, 2.310 Å) Figura 1B; los descriptores restantes corresponden a los enlaces de hidrógeno formados con el agua y que se omitieron para mayor claridad. Además de 105 descriptores de segundo orden.

Tabla 1. Datos cristalográficos para los compuestos **PY1** y **PY2**.

Datos ^a cristalográficos	PY1	PY2
Fórmula	C ₃₃ H ₃₈ N ₂ O ₂₆	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₆
PM (g mol ⁻¹)	878.65	281.23
Sistema	Monoclinico	Monoclinico
Grupo	$P2_1/c$	$P2_1$
Tamaño del cristal/mm ³	0.224 x 0.159 x 0.076	0.476 x 0.078 x 0.052
Forma/color	Laminas/Incoloro	Laminas/Incoloro
Temp. (K)	295	295
<i>a</i> (Å)	13.6036(11)	7.6934(10)
<i>b</i> (Å)	27.9094(13)	6.4967(5)
<i>c</i> (Å)	10.2970(8)	12.0162(14)
α (°)	90	90
β (°)	106.130(6)	107.395(9)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	3755.5(5)	573.12(11)
<i>Z</i>	4	2
μ (mm ⁻¹)	0.082	0.081
ρ_{calcd} (g cm ⁻³)	1.554	1.630
<i>F</i> (000)	1832	292
<i>R</i> ₁ ^[b, c]	0.0459	0.0366
<i>wR</i> ₂ ^[d, e]	0.1189	0.0900
<i>GOF</i>	0.693	0.878

^a $\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073$ Å. ^b $F_0 > 4 \sigma(F_0)$. ^c $R = \sum ||F_0| - |F_c|| / \sum |F_0|$. ^dAll data. ^e $R_w = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)]^{1/2}$

El compuesto denominado **PY2** cristalizó de una solución de los polvos obtenidos en el *slurry* en acetona. El análisis estructural de **PY2** permitió conocer que cristalizó en un sistema monoclinico y grupo espacial $P2_1$. La unidad asimétrica se encuentra compuesta por el ácido gálico y la citosina en una relación 1:1 (Figura 2). Se puede observar que una molécula de citosina se encuentra unida por un lado a una molécula de ácido gálico mediante un enlace tipo **b** ($O5H5 \cdots O8$, 2.146 Å) y una molécula de citosina por medio del enlace de hidrógeno tipo **c** ($N1H1 \cdots O8$, 1.985 Å) y por el otro lado, a otra molécula de ácido gálico formando un enlace de hidrógeno tipo **e** ($N3+H3A \cdots O1$, 1.888 Å). En este caso, el enlace formado incluye la transferencia de un hidrógeno de ácido gálico al nitrógeno N3 de la citosina.

También se puede notar que otra molécula de citosina se enlaza de la misma forma al ácido gálico formando un enlace de tipo **f** ($N3+H3B\cdots O1$, 1.816 Å). En este caso, se forma un doble puente con un segundo enlace de hidrógeno de tipo **d** ($N2H2A\cdots O2$, 1.916 Å). Finalmente, dos moléculas de ácido gálico se unen entre sí, mediante un enlace de tipo **a** ($O4H4\cdots O2$, 1.697 Å).

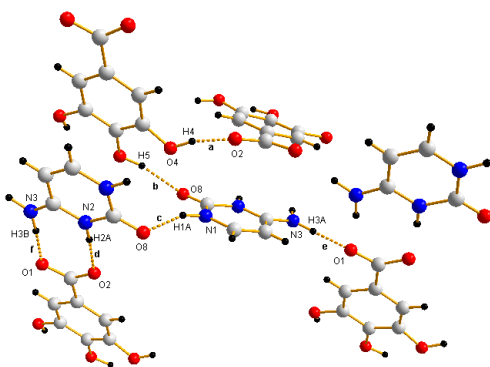


Figura 2. Estructura cristalina para PY2.

Análisis por difracción de rayos X de polvos

Los patrones de difracción de rayos X de polvos (PXRD) de los productos resultantes **PY1** (ácido gálico/timina) y **PY2** (ácido gálico/citosina) se compararon con los patrones de difracción de rayos X de polvos simulados obtenidos a partir del estudio de Rayos X de monocristal (Figura 3). Se pudo observar que para el producto **PY2** obtenido por *slurry* se logró obtener la misma fase cristalina del monocristal. Sin embargo, la fase cristalina observada en el patrón de rayos X de polvos obtenido del producto del experimento por *slurry* de **PY1** no coincide con la fase cristalina del patrón simulado generado a partir del monocristal **PY1**.

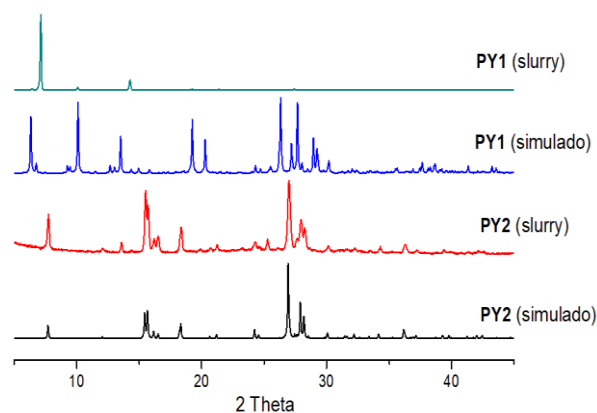


Figura 3. Comparación entre los patrones de difracción de rayos X de polvos de los productos de *slurry* **PY1** y **PY2** con los patrones de DRXP simulados a partir de la DRXS de los monocristales.

Análisis por espectroscopía IR

Los compuestos obtenidos de los *slurrys* se estudiaron por espectroscopía IR. Para los compuestos **PY1** y **PY2** se observan bandas que indican la presencia de un nuevo compuesto. (Figura 4). En el caso del compuesto **PY1** Las bandas correspondientes a los grupos C=O de amida en la timina (1653 cm^{-1}) y del ácido gálico (1695 cm^{-1} , 1626 cm^{-1}) se encuentran desplazadas (1698 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} , 1610 cm^{-1}) sin embargo, al igual que en el análisis de difracción de rayos X de polvos, no corresponde a la misma estructura obtenida del monocristal. Para el caso de **PY2** las bandas correspondientes a los grupos C=O de amida en la citosina (1648 cm^{-1} , 1611 cm^{-1}) y del ácido gálico (1695 cm^{-1} , 1626 cm^{-1}) también se encuentran desplazadas en el nuevo compuesto (1715 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1631 cm^{-1}). En este caso se pueden observar bandas anchas en el rango $2203\text{--}2970\text{ cm}^{-1}$ y entre $2970\text{--}3292\text{ cm}^{-1}$ que indican vibraciones de tensión de un sistema de enlace de hidrógeno intermolecular $N^+-H\cdots O$ y $N^+-H\cdots O$. Además, se presentan bandas que hacen proponer la formación de sales formadas por la transferencia de protones por parte del ácido gálico el nitrógeno del grupo amino presente en la citosina. Estas bandas se encuentran situadas entre $1435\text{--}1469\text{ cm}^{-1}$ (simétrica) y $1600\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ (asimétrica) que indican la presencia de aniones.

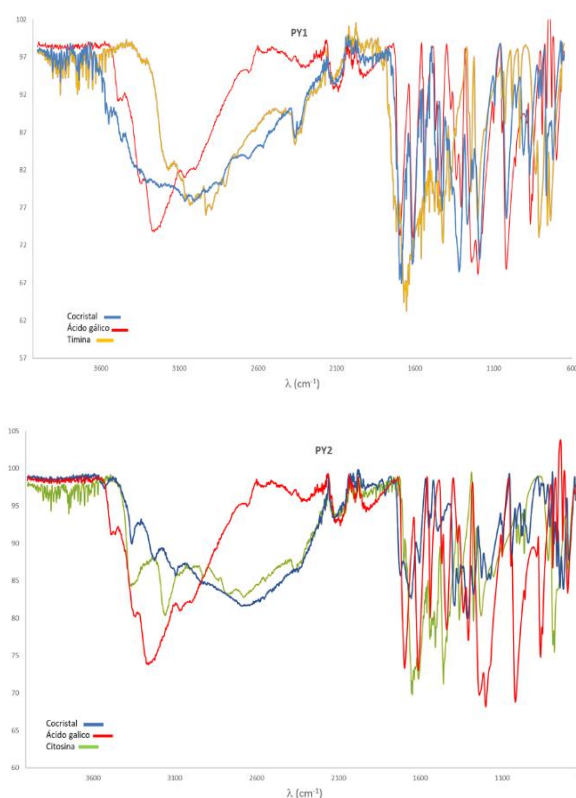


Figura 4. Comparación de los espectros de IR de los reactivos y los cristales moleculares **PY1** y **PY2**.

El análisis termogravimétrico y de calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC)

La grafica TGA/DSC para **PY2** se muestra en la Figura 5. En la curva TGA se empieza a observar pérdida de masa a aproximadamente 230°C atribuido al proceso de degradación del cristal molecular. Debido a que los puntos de sublimación ocurren a 261°C para el ácido gálico y a 316°C para la citosina, se puede proponer que estos van acompañados de otro proceso de transformación solido-solido (pico endotérmico a 238°C) atribuido a la disociación del cristal molecular.

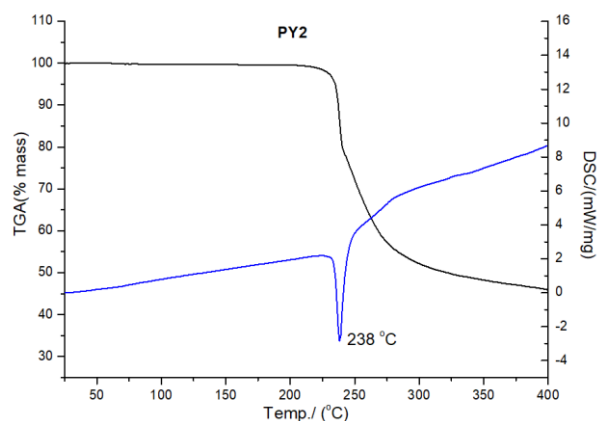


Figura 5. Termograma TGA/DSC para el producto **PY2**.

Conclusiones

Se lograron obtener 2 cristales moleculares derivados del ácido gálico con la timina y la citosina de forma reproducible y en buenos rendimientos mediante las técnicas de cristalización por evaporación de disolvente y de *slurry* para el caso de **PY2**. A pesar de realizar varios intentos para la obtención de **PY1** por *slurry* no se logró por lo que se continuará con su experimentación.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas y al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por las facilidades prestadas para la realización de los análisis de IR. El proyecto CONACyT 268178 permitió el estudio de monocristales.

Referencias

- Aakerõy C. B., Forbes S., Desper J. (2009). Using Cocrystals to Systematically Modulate Aqueous Solubility and Melting Behavior of an Anticancer Drug. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 17048-17049.
- Blagden N., de Matas M., Gavan P. T., York P. (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Deliv Rev.* 59, 617-630.

Mirza S., Miroshnyk I., Heinamaki, J., Yliruusi, J. (2008). Co-crystals: an emerging approach for enhancing properties of pharmaceutical solids. *Dosis* 24, 90-96.

Peters G. J. (2014). Novel developments in the use of antimetabolites. *Nucleos Nucleot Nucl.* 33, 358-374.

Ramanathan R. (2009). Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 1ª Ed. Wiley & Sons.

Sridhar B., Babu Nanubolu J., Ravikumar K. (2015). Four cocrystals of thymine with phenolic cofomers: influence of the cofomer on hydrogen bonding. *Acta Cryst. C*, 71, 602-609.