

ESTABILIDAD TÉRMICA DE ENDOPEROXIDOS EN SOLUCION. ASCARIDOL

*Rene Jeandupeux, Gustavo P. Romanelli y Lázaro F. R. Cafferata**,
Laboratorio LADECOR y CINDECA (CONICET), Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, (1900) La Plata,
República Argentina. e-mail: <caferata@quimica.unlp.edu.ar>

ABSTRACT.

The importance of cyclic peroxides as the substituted 1,2,4-trioxanes, 1,2,4,5-tetroxanes and endoperoxides has grown considerably in recent years ever since the naturally occurring trioxane artemisinin and some of its derivatives achieved prominence as potent antimalarial agents. Physical properties reported for ascaridole, a cyclic endoperoxide isolated from the vegetal named *Paico* and also from synthetic procedures by photooxygenation of α -terpinene, are significantly different. This led to perform the preparation of that substance by Schenck's method, but working at 0°C and doing its separation and purification at room temperature by preparative column chromatography. Excellent yields of ascaridol were obtained (ca. 80 % GC-FID) of high degree of purity (>98 %, GC; RP-HPLC; NMR, ^1H , ^{13}C). The thermal stability of ascaridole in solution is advanced, reporting the activation parameters values for the unimolecular decomposition of that substance in isopropyl alcohol.

Key words. Endoperoxides-Ascaridole- Thermal stability- Antimalarial agents

RESUMEN

La importancia de los peróxidos cíclicos como los 1,2,4-trioxanos, 1,2,4,5-tetroxanos y los endoperoxidos sustituidos ha crecido considerablemente en los últimos años.

Artemisinina es un trioxano natural y algunos de sus derivados lograron prominencia como potentes agentes antimaláricos. Las propiedades físicas informadas para ascaridol, un endoperoxido cíclico aislado del comúnmente denominado *Paico* y del obtenido sintéticamente por fotoxigenación de α -terpinene, son significativamente diferentes. En este trabajo se ha realizado la preparación de esa sustancia por el método de Schenck, pero

trabajando al 0 °C y haciendo su separación y purificación a temperatura ambiente por cromatografía preparativa en columna. Se obtuvieron excelentes rendimientos de ascaridol (GC-FID ca. 80%) de alto grado de pureza (GC >98%; RP-HPLC; NMR: ^1H , ^{13}C). Se informa también la estabilidad térmica de ascaridol en solución, estableciéndose los valores de los parámetros de activación de la descomposición unimolecular de esa sustancia en alcohol isopropílico.

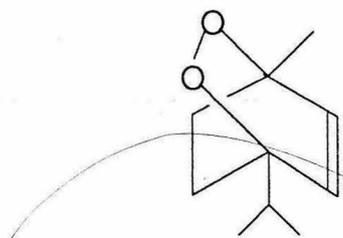
Palabras Clave. Endoperoxidos-Ascaridol- Estabilidad térmica-Antimaláricos

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

INTRODUCCION

La importancia de la síntesis, propiedades y estabilidad [1, 2] en diversos medios de los peróxidos cíclicos sustituidos (1,2,4-trioxanos, 1,2,4,5-tetroxanos y endoperoxidos) ha crecido considerablemente desde su descubrimiento y preparación en el siglo pasado, principalmente por su potencial acción terapéutica. Artemisinina es una lactona sesquiterpénica natural, perteneciente a la familia de los 1,2,4-trioxanos tricíclicos y algunos de sus derivados sintéticos han logrado destacarse como potentes agentes antimaláricos. En principio, se puede pensar que como estas moléculas son peróxidos, deberían ser térmicamente inestables. Al contrario, la mayoría de los mismos resisten calentamientos a relativamente altas temperaturas ya sea en estado sólido como en solución de ciertos solventes. Sin embargo, su descomposición térmica es muy sensible al tipo de solvente utilizado o a la presencia de iones metálicos presentes en la solución. De esta manera, artemisinina puede calentarse a 190 °C en estado sólido antes de que se descomponga, en cambio, en solución de metanol es mucho menos estable, siendo también catalizada su descomposición por iones ferroso [3].

Ascaridol (I) es un endoperóxido monoterpénico (1,4-epidioxi-*p*-menteno, 1,4-peróxido-*p*-ment-2-eno, 1-metil-4-(1-metilen)-2,3-dioxa-biciclo [2.2.2] oct-5-eno, C₁₀H₁₆O₂, CAS number 512-85-6, peso molecular 168,23 g/mol, que constituye el principal (60-80%) principio farmacológico activo del aceite volátil de *Chenopodium ambrosioides* L., Chenopodiaceae [4].



(I)

I fue aislado independientemente por Nelson [5] y Wallach [6] del vegetal denominado vulgarmente *Paico* ("pie de ganso", "Epazote", "Aritasou", "Yerba de Santa María", "Wormseed", según los países donde se lo cultiva). Sus infusiones y decocciones preparadas con diferentes solventes todavía se continúan aplicando para el tratamiento popular de varias afecciones parasitarias, aunque existen discrepancias sobre su efectividad y grado de toxicidad [4].

En este trabajo se ha verificado un método utilizado para la síntesis química de ascaridol, describiéndose su obtención mediante la fotooxidación de α -terpineno, teniendo como base el método original de Schenck [7]. Sin embargo, se han modificado la temperatura a que se lleva a cabo la reacción y la metodología empleada para la purificación del producto. Esto resulta fundamental para el logro de una sustancia de suficiente pureza, apropiada para determinar fehacientemente su estabilidad térmica en solución.

PARTE EXPERIMENTAL

Solventes utilizados

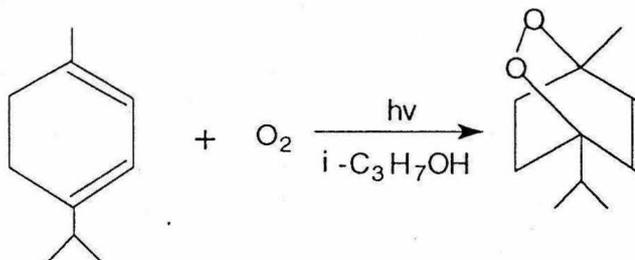
Fueron de calidad analítica, convenientemente purificados [8] para los ensayos cinéticos que se realizaron.

Preparación de I

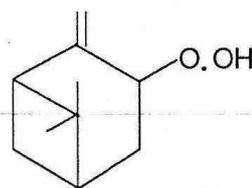
Se efectuó a menor temperatura que la indicada anteriormente (-40 °C [7]), utilizando alcohol isopropílico como solvente y suministrando intensa radiación solar: α -terpineno (Sigma, T-225, 98% CGL) 5 g (29,7 mmoles) disuelto en 200 mL de

alcohol isopropílico (Baker, p.a), adicionado de 0,1 g de azul de metileno (Fluka, purum) como agente fotosensibilizante, fueron colocados en un vaso de precipitados (Pyrex, 500 mL) en el cual, con agitación mecánica, también se hizo burbujear una corriente de oxígeno, exponiendo la mezcla en periodos sucesivos a intensa radiación solar (48 h), rodeada de un baño de hielo-NaCl (ca. 0°C).

(1)



El progreso de la preparación de I (ec 1) se controló efectuando análisis TLC sobre láminas de aluminio-gel de sílice (marca Merck, tipo F 254), eluyéndose con una mezcla de acetato de etilo (5 % v/v)-*n*-hexano. Se pudo constatar durante todo el curso de la reacción una única mancha (TLC, R_f = 0,43) de color amarillo claro mediante detección UV a 254 nm. El ensayo confirmatorio del carácter peroxidico de la sustancia se realizó con el revelador que contiene vainillina [7]. Una vez que no se observaba un incremento de la intensidad de la mancha correspondiente a I, la solución se cargó en una columna de gel de sílice (2,5 cm d.i. x 25 cm de longitud) previamente activada por calentamiento a 120°C. Se procedió a la separación de I pasando éter etílico hasta aparición de una ligera tonalidad azul (correspondiente a la presencia de azul de metileno en las fracciones eluidas). Estos líquidos fueron evaporados a presión reducida (*Rotavapor*), obteniéndose un residuo claro y viscoso a temperatura ambiente (p. congelamiento ca 3 °C; lit. 3 °C [7]; RMN, ¹H [11]. Se pudo constatar también la presencia de hidroperóxido de *trans*-pinocarveylo (II, hidroperóxido de 6,6-dimetil-2-metilen- biciclo [3.1.1] hepten-3-ilo, C₁₀H₁₆O₂, CAS Number 129263-38-3 / 22321-84-3, TLC R_f ca 0,20) como impureza del producto.



(II)

Este análisis (ca 1 %) se realizó utilizando RP-HPLC, mediante la inyección del producto de la reacción de fotooxidación de α -terpineno en un cromatógrafo líquido marca Pharmacia-LKB (Bromma), modelo 2249, provisto con una columna Spherisorb Superpack RP-C18 (2 μ m de diámetro de partícula, 4,0 mm d.i. y 10 cm de longitud) a 25 °C.

La fase móvil en este caso fue metanol (75% v/v)-agua, con un caudal de 0,5 mL/min (presión 11,2 mPa) y las muestras analizadas se inyectaron (20 μ L) manualmente empleando un detector diferencial de índice de refracción, marca LKB (Bromma), modelo 2142 e integrador de la misma marca modelo 2221 (I, RT ca 3,3 min; II, RT ca 2,2 min).

Determinación de la estabilidad térmica de I en alcohol isopropílico

Tubos de Pyrex cerrados en un extremo (8 cm de largo x 4 mm d.e.) fueron cargados con ca. 0,3 mL de la solución de I (ca. 0,002 M) en propanol-2.

Estas soluciones se degasificaron en la línea de vacío (-190 °C) y los tubos que las contenían sellados con la llama de un soplete. Las ampollas se sumergieron en un baño de aceite de silicona termostatzado (\pm 0,1 °C), extrayéndose las mismas a tiempos convenientemente determinados y deteniendo la descomposición de I por inmersión en un baño a 0 °C. La determinación de sus concentraciones remanentes se realizó por cromatografía gaseosa (CG-FID).

Análisis de los productos de la termólisis de I

Soluciones de I (ca. 0,02 M) en alcohol isopropílico se cargaron (2 mL) en ampollas de Pyrex que fueron selladas (-190 °C) a la llama y luego calentadas a 160 °C por periodos de 2 horas. El principal producto orgánico observado en la termólisis de I fue propano, el cual fue identificado comparando el valor de su retención cromatográfica (CG-FID) con el de muestras auténticas. Esto corresponde con lo ya informado [10] en la pirólisis de I. Sin embargo, es probable que su formación involucre intermediarios de reacción, conclusión que resulta al observar los cromatogramas obtenidos en las experiencias cinéticas. Dado el carácter gaseoso de ese producto no se determinó cuantitativamente su concentración en la solución.

Métodos analíticos utilizados en las experiencias cinéticas

Se utilizó una columna *megabore* de sílice fundida (10 m de longitud, 540 μ m de d.i.) a 70°C, instalada en un cromatógrafo gaseoso marca Hewlett-Packard, modelo 5890, Serie II Plus, con nitrógeno como gas portador (VL 30 cm/s), inyector a 90 °C y detector FID a 250 °C. En este análisis el RT de I correspondió a ca 11 min.

Métodos de cálculo

Los valores de las constantes de velocidad de la reacción de descomposición térmica de I (k_{exp}) fueron calculados utilizando una ley cinética de primer orden, estimándose la bondad del ajuste por regresión lineal por cuadrados mínimos. Los parámetros de activación de la reacción unimolecular inicial se obtuvieron aplicando el método de la ecuación de Arrhenius y los correspondientes límites de error con un método computacional [12].

LOS RESULTADOS Y SU DISCUSION

La cinética de la descomposición térmica de I en solución de alcohol isopropílico obedece una ley cinética de pseudo-primer orden hasta conversiones de ca 80 % (Figura 1).

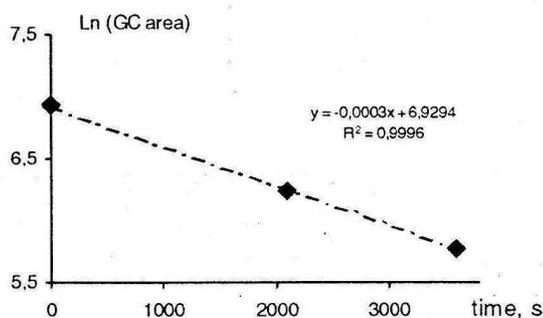
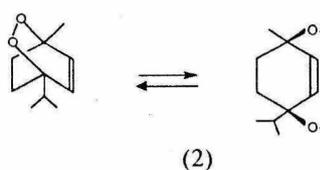


Fig. 1. Típica representación gráfica mediante una ecuación de primer orden de la termólisis de ascaridol en alcohol isopropílico, a 140,0 °C.

Puesto que las concentraciones iniciales utilizadas en las experiencias cinéticas fueron suficientemente pequeñas, es razonable suponer que las constantes de velocidad de reacción (k_{exp}) corresponden en realidad a la descomposición unimolecular de la molécula de I con formación de un biradical (ec. 2).



Por lo tanto, el efecto de la temperatura, en el ámbito 120,0 °C-160,0 °C (Fig.2).

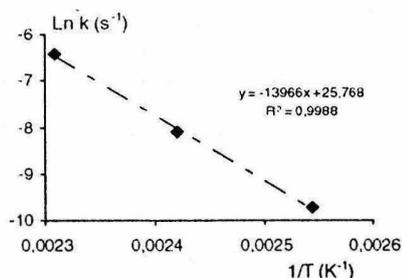


Figura 2. Representación de la ecuación de Arrhenius correspondiente a la termólisis unimolecular de ascaridol en alcohol isopropílico

Sobre la constante de velocidad de la termólisis (cc. 2) permiten establecer los valores de los parámetros de activación ($\Delta H^\ddagger = 26,9 \pm 0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$; $\Delta S^\ddagger = -8,0 \pm 0,8 \text{ cal.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; $\Delta G^\ddagger = 30,2 \pm 0,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) de la etapa determinante de la descomposición térmica de I en solución de alcohol isopropílico.

CONCLUSIONES

La obtención de ascaridol por fotooxidación de α -terpineno a ca. 0 °C y con radiación solar y su posterior elución de columnas de gel sílice con éter etílico, resulta el método de elección para obtener en definitiva una sustancia de excelente calidad (RP-HPLC. CG. RMN) adecuada para estudios cinéticos y otras aplicaciones. Los parámetros de activación de la termólisis unimolecular de ascaridol obtenidos en alcohol isopropílico resultan similares a los esperados para la ruptura de su puente endoperoxídico y corresponden a la etapa determinante de la velocidad de reacción en el mecanismo de descomposición térmica en solución.

Es interesante mencionar también que tanto el ascaridol natural como el producto sintético son ópticamente inactivos, aún tratándose de una molécula quiral constituyendo una mezcla racémica. De esta manera se puede suponer que existe una similitud de caminos seguidos en la formación de

esta sustancia tanto en la naturaleza como en el laboratorio, suposición que promovió numerosas investigaciones realizadas por distintos grupos de trabajo para conocer la biosíntesis de ascaridol [13].

BIBLIOGRAFIA

- 1) L. F. R. Cafferata, J. J. P. Furlong, en *Advances in Oxygenated Processes*, A. L. Baumstark, Ed. JAI Press Inc., Greenwich, CT, Vol. 4, 81-105 (1995).
- 2) L. F. R. Cafferata, C. W. Jefford, *Molecules* 2001, 6, 699.
- 3) C. W. Jefford, M. G. H. Vicente, Y. Jacquier, F. Favarger, J. Mareca, P. Millasson-Schmidt, G. Brunner and U. Burger, *Helv. Chim. Acta*, 79, 1475 (1996).
- 4) a) L. E. Camponovo, A. J. Bandoni, en *Farmacología* (Materia Médica y Terapéutica), Tomo I, pp. 522-526. Ed. López & Etchegoyen S.R.L., 1955, Buenos Aires, Argentina; b) Marta T. Nájera, Etilé D. Spegazzini, *Revista Farmacéutica*, 126, 7-16 (1984).
- 5) E. B. Nelson, *J. Am. Chem. Soc.*, 33, 1404 (1911); *ibid* 35, 84 (1913).
- 6) O. Wallach, *Ann.* 392, 59 (1912).
- 7) a) G. O. Schenck, K. G. Kinkel, H. J. Mertens, *Liebig Ann. Chem.*, 584, 23 (1953); b) G. O. Schenck, *Angew. Chem.*, 64 (1), 12 (1952).
- 8) A. Weissberger, L. Proskauer, R. Riddick: A. Toops en *Techniques of Organic Chemistry*, Vol VII, Organic Solvents. Physical Properties and Methods of Purification, 2nd Ed. Interscience, New York (1965).
- 9) G. Knappe, D. Pateri, *Z. Anal. Chem.*, 190, 386 (1962).
- 10) W. Bergman, M.J. Mc Lean, en *Transanular Peroxides*, Capítulo 2. Ascaridol, *Chem.Rev.*, 38, 367 (1941).
- 11) "High Resolution NMR Spectra Catalogue", Varian Associates, Palo Alto, California, 1962, Spectrum N° 276.
- 12) S. Huyberechts, A. Halleux, P. Kruys, *Bull.Soc. Chem. Belg.*, 64, 203 (1955).
- 13) M. A. Johnson, R. Crotegu, *Arch. Biochem.-Biophys.* 235 (1) 254 (1984)