

Estabilidad de un Análogo de Capsaicina. Efecto del pH sobre la Reacción de Descomposición Térmica de Vainillilamida del Acido Pelargónico (N-[4-hidroxi-3-metoxifenil-metil] nonanamida) en Solución Hidroalcohólica

Rossana L. MATIAS, Gustavo SEIN, Miriam GONZÁLEZ,
Eloy L. MANDRILE y Lázaro F. R. CAFFERATA*

Laboratorio LADECOR, División Química Orgánica y
Cátedra de Farmacognosia, Departamento de Ciencias Biológicas,
Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Calle 47 esq. 115, 1900 La Plata, República Argentina.

RESUMEN. La vainillilamida del ácido pelargónico (“capsaicina sintética”), un análogo del compuesto natural (N-[[4-hidroxi-3-metoxifenil]-metil]-8-metil-(E)-6-nonanamida), es hidrolizada rápidamente en soluciones metanólicas acuosas con valores de pH de 6,0, 8,5 y 10,5 y en un ámbito de temperaturas comprendido entre 50 °C y 100 °C. El análisis cualitativo de los principales productos de la reacción fue realizado utilizando CG-EM. La cinética de la reacción, medida utilizando espectroscopía ultravioleta, obedece una ley de pseudo primer orden y los valores observados de sus constantes de velocidad dependen tanto de la temperatura como del pH de las soluciones. La correspondiente ecuación de Arrhenius describe el efecto de la temperatura sobre la solvólisis del compuesto estudiado y permite evaluar cuantitativamente su estabilidad en solución. Por aplicación del mismo método analítico se determinó el contenido de capsaicina natural, expresada como “capsaicina sintética”, en frutos maduros de *Capsicum chacoense* Hundz.

SUMMARY. “Stability of a Capsaicin Analog. pH Effect on the Thermal Decomposition Reaction of Pelargonic Acid (N-[4-hydroxy-3-methoxyphenyl-methyl] nonanamide in Hydroalcoholic Solution”. The hydrolysis of pelargonic acid vanillylamide, an analog of natural capsaicin (N-[[4-hydroxy-3-methoxyphenyl]-methyl]-8-methyl-(E)-6-nonanamide), is a fast reaction in aqueous methanolic solutions, in the 50 °C-100 °C temperature range and at 6.0, 8.5 and 10.5 pH values. The qualitative analysis of the main reaction products were accomplished by GC-MS. The thermolysis of synthetic capsaicin follows a pseudo first-order kinetic law and the observed rate constant values depend both on the temperature and the pH of the solutions. In the above conditions the corresponding Arrhenius equations describe the temperature effect on the solvolysis rates of the studied compound and allow to evaluate quantitatively its stability in solution. The natural capsaicin contents in ripe fruits of *Capsicum chacoense* Hundz were determined as “synthetic capsaicin”, using the same analytical procedure.

PALABRAS CLAVE: Análogo de capsaicina, *Capsicum chacoense* Hundz, Cinética de reacción, Efecto del pH, Espectroscopía UV, Solvólisis.

KEY WORDS: Capsaicin analog, *Capsicum chacoense* Hundz, pH effect, Reaction kinetics, Solvolysis, UV spectroscopy.

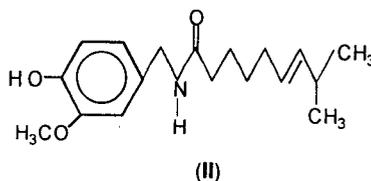
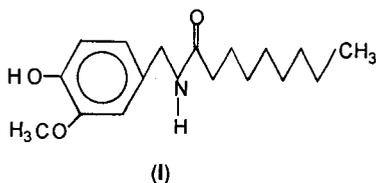
* Autor a quien se debe enviar la correspondencia. E-mail: caferata@nahuel.biol.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

Las terapias actuales, y seguramente las que se incorporen en el futuro, con capsaicinoides naturales y análogos, serán motivo de estricto seguimiento en las fases clínicas, de control de calidad y de ensayos de estabilidad. Motiva esta apreciación su complejo mecanismo de acción farmacológica, aún no totalmente dilucidado ^{1,2}, la precaria estabilidad en diversos medios, nuevas formas farmacéuticas de aplicación, dosis terapéuticas necesarias, toxicidad, etc.

La comparación del producto natural extraído de los frutos de *Capsicum*, "oleoresina de cápsico" (estandarizada por su contenido de capsaicina, sus homólogos y otros componentes), como así también la llamada "capsaicina natural" (únicamente *capsaicina* y homólogos) como también "capsaicina y análogos de síntesis", obligará a establecer parámetros inequívocos para evaluar la estabilidad, sinergismo, antagonismo y toxicidad de las correspondientes preparaciones farmacéuticas de esa droga.

La molécula de vainillilamida del ácido pelargónico (I) puede considerarse como un análogo de *capsaicina* natural (N-[[4-hidroxi-3-metoxifenil]-metil]-8-metil-(E)-6-nonenamida) (II). Sin embargo, la primera sustancia, oficialmente llamada nonivamida, no ha sido aislada hasta el presente de los extractivos del fruto de *Capsicum*.



Tanto *capsaicina* natural como sintética son drogas utilizadas en la quimioterapia de enfermedades tales como neuralgias post-herpéticas, neuropatías diabéticas, neuralgia del trigémino, artritis reumatoidea, etc. Las especialidades farmacéuticas que las contienen son pomadas y soluciones que en su aplicación sobre la piel producen rubefacción.

La función amida de las moléculas de nonivamida (I) y de *capsaicina* (II) es la responsable de la acción hipotensora de estas drogas ³. Sin embargo, dado que las estructuras completas de las dos moléculas son diferentes, es razonable esperar que sus propiedades biológicas también lo sean. En trabajos anteriores se ha estudiado la solvólisis de "*capsaicina* sintética" y su mecanismo de descomposición térmica en solución de metanol ⁴, habiéndose efectuado también la cuantificación de capsaicinoides totales en la oleoresina de cápsico ⁵.

En este trabajo se ha utilizado un método analítico de espectroscopía ultravioleta para el seguimiento de la cinética de la reacción de descomposición de "*capsaicina* sintética" en medio hidroalcohólico, evaluando así su estabilidad térmica en soluciones ácidas y alcalinas. Se ha determinado también el contenido de *capsaicina* natural en el fruto maduro de *Capsicum chacoense* Hundz.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Se utilizó "*capsaicina* sintética" (marca Fluka, número de Catálogo 876390,

análisis por HPLC > 97%) sin una purificación posterior. Todos los solventes empleados fueron de grado analítico controlados por CG.

Cinética de la solvólisis de vainillilamida del ácido pelargónico (I)

Los ensayos cinéticos se realizaron partiendo de una solución 10^{-3} M de I en metanol diluida convenientemente (10^{-5} M) con agua bidestilada. Muestras (25 mL) de estas soluciones fueron introducidas en un erlenmeyer provisto de agitación magnética y de un refrigerante de agua a temperatura ambiente colocado en condiciones de reflujo y sumergido a su vez en un baño de aceite de siliconas termostatzado ($\pm 0,5$ °C) en el ámbito comprendido entre 50 - 100 °C. En tiempos de reacción conocidos, que dependían de las condiciones experimentales, se retiraron alícuotas (5 mL) con una pipeta de vidrio calibrada provista de su punta estirada, la cual era introducida por la boca del refrigerante a fin de su extracción para realizar seguidamente el análisis espectrofotométrico de I. Estas mediciones se realizaron por triplicado, a 3 valores de pH (6,0, 8,5 y 10,5) los que se controlaron previamente a las experiencias con un instrumento marca Metrohm modelo 654 Serie 01. Los valores correspondientes de absorbancia (A) fueron monitoreados a 280 nm utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico en un espectrofotómetro marca Metrolab modelo 1700. Ese valor fue seleccionado considerando que la vainillina formada en la descomposición de I en las soluciones hidroalcohólicas prácticamente se destruye tanto en medio ácido como alcalino ⁴ y el hecho que el espectro UV de I (Figura 1) presenta un máximo de absorción a la mencionada longitud de onda.

A fin de evaluar las constantes de velocidad de reacción de descomposición térmica de I a los diferentes pH de las soluciones, los datos correspondientes de absorbancia fueron tratados por medio de una ley cinética de primer orden.

El efecto de la temperatura sobre la solvólisis de I se evaluó por medio de la aplicación de la ecuación de Arrhenius y los valores de las energías de activación correspondientes se calcularon por un método computacional de regresión lineal.

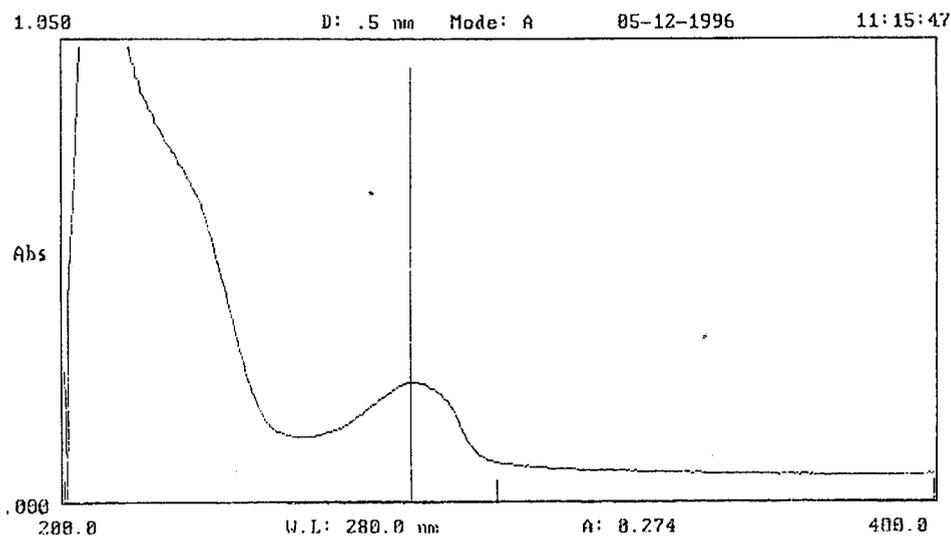


Figura 1. Espectro UV de vainillilamida del ácido pelargónico (0,00001 M) en un disolvente constituido por una mezcla de metanol-agua (1:100, v/v).

File : C:\NPCHEM\1\DATA\CAPSA1.D
 Operator : caffe
 Acquired : 20 Jun 95 9:27 am using AcqMethod CAPSA
 Instrument : 5972 LADE
 Sample Name : capsas + MeOH
 Misc Info : 1 uL
 Vial Number: 1

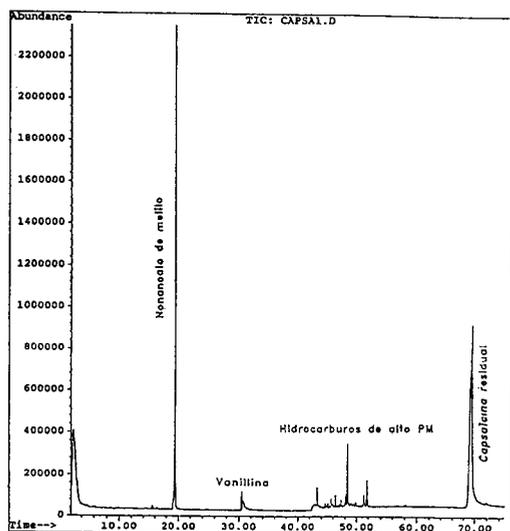


Figura 2. Cromatograma (CG-EM) correspondiente a la identificación de los productos de la solvólisis a 100 °C de "capsaicina sintética" (0,001 M) en solución de metanol.

zó un extracto en *n*-hexano de las mismas, previamente neutralizadas y posteriormente secado con Na₂SO₄ anhidro. En las solvólisis de **I** llevadas a cabo en medio ácido (pH = 6) y alcalino (pH = 12) no se observó la presencia de vainillina como producto de reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las soluciones iniciales de **I** estuvieron libres de sustancias provenientes de su descomposición. Los productos más abundantes de la termólisis de **I** a 100 °C en solución metanólica (0,001 M) son: éster metílico del ácido pelargónico y vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído). En mucho menor proporción se observan algunos hidrocarburos de alto peso molecular, ácidos grasos libres y sus ésteres metílicos, de peso molecular también relativamente elevado (Tabla 1).

Condiciones de la reacción	Principales productos observados
Metanol (43 h)	nonanoato de metilo, vainillina, octanoato de metilo, hexadecanoato de metilo.
Metanol acuoso ^a (7 h)	hexadecano, dotriacontano, nohadecano.
Metanol acuoso ^b (7 h)	nonanoato de metilo, octanoato de metilo

^a reacción a pH = 12 y posterior extracción de los productos con *n*-hexano.

^b reacción a pH = 12 y posterior extracción de los productos con *n*-hexano habiendo llevado previamente el medio a pH = 5

Tabla 1. Productos de reacción observados en la descomposición a 100 °C de capsaicina sintética (0,001 M) en metanol.

Análisis de los productos de reacción

La identificación de los productos de la termólisis de **I** (10⁻³ M) a 100 °C, llevada a cabo en ampollas de vidrio Pyrex selladas con la llama de un soplete, previo enfriamiento de las mismas a -190 °C, ya sea en metanol (durante 43 h, Figura 2) o en metanol acuoso a pH = 12 (durante 7 h), se realizó por cromatografía gaseosa - espectrometría de masa (CG-EM).

Para estos fines se empleó un instrumento marca Hewlett-Packard Serie II Plus, modelo 5890, equipado con una columna capilar de sílice fundida recubierta con metilfenilsilicona, de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, conectada a un detector selectivo de masa (MSD) modelo 5972 A. En el análisis de los productos de reacción de **I** en las soluciones alcalinas por agregado de NaOH acuoso (pH = 12) se utili-

En las soluciones de la reacción llevada a cabo en medio hidroalcohólico alcalino (pH = 12), tanto el ácido nonanoico, intermediario supuestamente formado, o su éster metílico efectivamente observado en la termólisis de **I** en metanol (Tabla 1), se transforman en la sal sódica del ácido pelargónico, sustancia que permanecería en la fase acuosa durante el proceso de extracción con n-hexano. Sin embargo, es razonable suponer que la etapa inicial de la solvólisis de **I** en las soluciones hidroalcohólicas, que es el medio donde se realizaron los estudios cinéticos de este trabajo, puede representarse por la ecuación 1:



Por su parte, la 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina, probable intermediario en la solvólisis de **I** (ecuación 1) originaría vainillina (sólo efectivamente observada en la reacción en metanol, Tabla 1) mediante una ruptura térmica oxidativa de la amina (por el oxígeno del aire presente en las soluciones) formando el aldehído correspondiente (vainillina) con un átomo menos de carbono en su molécula ⁶. Sin embargo, esta sustancia resulta inestable tanto en medio ácido como alcalino, ya que prácticamente no se observa su presencia en los análisis (CG-EM) realizados. Precisamente un método recomendado de valoración de esta sustancia ⁷ se fundamenta en su inestabilidad en medio alcalino. Estos hechos justifican la forma de monitorear la concentración de capsaicina remanente en las soluciones efectuando la medición de la absorbancia (A) en las experiencias cinéticas de este trabajo. Los hidrocarburos y ésteres metílicos de alto peso molecular observados en la solvólisis de **I** (Tabla 1) probablemente provienen de la termólisis degradativa de los ácidos grasos intermediarios de la reacción.

La cinética de la solvólisis de **I** se investigó en soluciones con valores de pH de 6,0, 8,5 y 10,5 y hasta conversiones que no superaron *ca* 30% de su concentración inicial. Todos los experimentos realizados en este caso respondieron a una ley cinética de pseudo primer orden, cuyos valores de constantes de velocidad de reacción se indican en la Tabla 2.

Temperatura °C	pH	10 ⁵ x k _{obs} ^a s ⁻¹
52	6,0	2,9 ± 0,9
70	6,0	3,9 ± 0,5
80	6,0	4,0 ± 0,3
100	6,0	4,3 ± 0,4
50	8,5	4,6 ± 0,8
70	8,5	6,7 ± 0,2
100	8,5	12,2 ± 0,7
50	10,5	4,5 ± 0,2
100	10,5	6,6 ± 0,4

^a valores promedio expresados con sus correspondientes errores

Tabla 2. Valores de la constante de velocidad de reacción de pseudo primer orden de solvólisis de *capsaicina* sintética (10⁻⁵ M), determinados a 280 nm

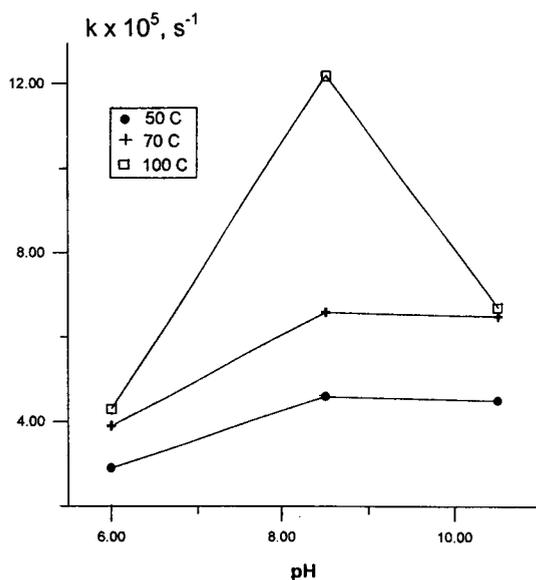


Figura 3. Perfiles cinéticos de la solvólisis de *capsaicina* sintética (0,00001 M) a diferentes temperaturas y valores de pH de las soluciones hidroalcohólicas.

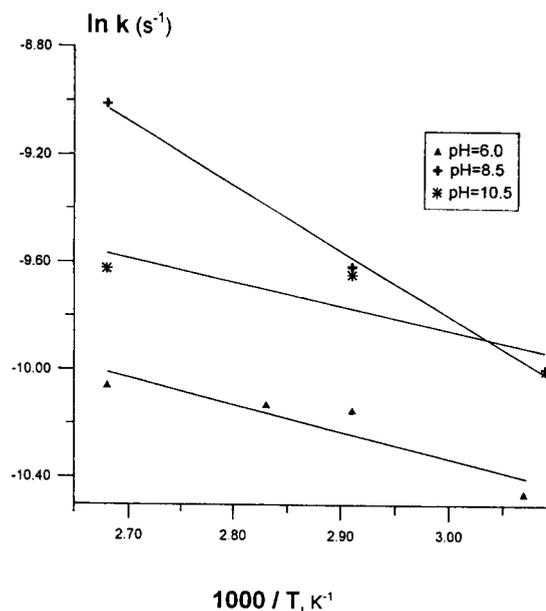


Figura 4. Representación de la ecuación de Arrhenius para la solvólisis de *capsaicina* sintética a diferentes valores de pH de las soluciones.

Considerando las concentraciones relativamente pequeñas de **I** en las soluciones iniciales, los valores de las constantes de velocidad de reacción observadas (Tabla 2) pueden atribuirse al paso determinante de la solvólisis de esa sustancia a los diferentes pH examinados (ecuación 1). Es evidente que la molécula de “*capsaicina* sintética” se degrada relativamente con mayor rapidez a un pH de 8,5 a las temperaturas investigadas, mientras que es más estable a valores de pH 6,0 y 10,5 (Figura 3).

Por otra parte, la influencia de la temperatura sobre la solvólisis de **I**, a un mismo valor de pH, se puede expresar empleando la representación de la ecuación de Arrhenius (Figura 4).

Los valores relativamente pequeños de las energías de activación de la solvólisis de “*capsaicina* sintética” a los diferentes valores de pH de las soluciones investigadas (E_a en el ámbito 2-5 kcal.mol⁻¹) permiten concluir que en su mecanismo intervienen procesos de naturaleza catalítica. Probablemente aniones hidroxilo e hidrogeniones participan en la descomposición de esa sustancia en solución hidroalcohólica, lo que está de acuerdo con la funcionalidad química de la molécula de capsaicina⁸. Dado que esa función es la principal característica estructural tanto de las moléculas del producto natural como del sintético, es razonable esperar un comportamiento similar en la estabilidad en solución de capsaicina natural.

Aislamiento y determinación cuantitativa de capsaicinoides del fruto de Capsicum chacoense Hundz

En estudios anteriores realizados con otras especies de *Capsicum* se han informado valores muy variables del contenido de los diferentes capsaicinoides encontrados; por ello, para poder efectuar un análisis comparativo de los resultados,

es importante especificar el tratamiento preliminar a que ha sido sometido el material original examinado, el proceso seguido de extracción del producto natural, la posterior purificación del extractivo y los métodos de cuantificación utilizados.

Los frutos maduros de *Capsicum chacoense* Hundz, recolectados durante el verano de 1996 en la Provincia de Jujuy (Argentina) fueron secados en estufa a 40 °C durante 10 días y luego convenientemente molidos. Las cantidades empleadas de muestra seca variaron entre 2 y 4 g, realizándose una única extracción con 15-20 mL de CHCl₃ y calentamiento a reflujo durante 10 minutos ⁹.

La purificación del extractivo se realizó por cromatografía semipreparativa en capa fina utilizando como fase estacionaria sílica gel y éter etílico como fase móvil. Se empleó como solución patrón "*capsaicina* sintética" (10⁻³ M) en metanol y se efectuaron siembras de 20 µL del extractivo clorofórmico como así también del estándar utilizado. La detección se realizó con dicloroquinoncloroimida (DCC) en "spray" al 1% en metanol. El revelado también pudo ser realizado con radiación UV (254 nm), observándose en este caso una cierta fluorescencia según la concentración de capsaicinoides en el extractivo y en la solución patrón utilizada. (R_f = 0,78). Finalmente, la fracción correspondiente a los capsaicinoides se dispersó en 2 mL de metanol, se filtró convenientemente por membrana inerte procediéndose a su análisis posterior.

Dado que los capsaicinoides en general muestran un máximo de absorción a 280 nm con un espectro cualitativamente similar al de "*capsaicina* sintética" (Figura 1), se realizaron curvas de calibración con soluciones patrón de esta sustancia (concentraciones (1,4 x 10⁻⁵ M) en metanol. Las diferentes muestras del material estudiado (*Capsicum chacoense* Hundz) contienen (0,30 ± 0,03 g%) de capsaicinoides totales en los frutos maduros y secos analizados, valores expresados como "*capsaicina* sintética".

Agradecimientos. Los autores agradecen el apoyo del CONICET, mediante el financiamiento del PROGRAMA LADECOM-12346 y a la Universidad Nacional de La Plata y Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por los subsidios recibidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Clapham, D.E. (1997) *Nature* **389**: 783-4
2. Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine & D. Julius (1997) *Nature* **389**: 816-24
3. Cordell, G.A. & O.E. Araujo (1993) *Ann. Pharmacother.* **27**: 330-6
4. Cafferata, L.F.R., G. Sein & E.L. Mandrile (1997) *Boll. Chim. Farm.* **136**: 237-43
5. Mandrile, E. L., G. O. Sein, C. A. Gardinali & L.F.R. Cafferata (1998) *Acta Farm. Bonaerense* **17**: 5-10
6. March, J. (1985) "*Advanced Organic Chemistry*", 3a. Edición, pág.1084, John Wiley & Sons, New York
7. *British Pharmacopeia*, en "General Notices", Ed. 1998 (versión en CD para ordenadores)
8. Bender, M. L., (1960) *Chem. Reviews* **60**: 53-113
9. Wagner, H., S. Bladt & E. M. Zgainski, (1984) "*Plant Drug Analysis*" (traducción de A. Scott), págs. 247-251, Springer-Verlag, Berlin