

Estabilidad Térmica de 1,2,4-trioxanos: - Una Nueva Generación de Antimaláricos

René JEANDUPEUX y Lázaro F. R. CAFFERATA *

División Química Orgánica, PROGRAMA LADECOM (CONICET),
Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata,
Calle 47 esq. 115, (1900) La Plata, Argentina

RESUMEN. Se han evaluado las estabilidades térmicas en solución de sustancias que funcionalmente poseen el anillo molecular de 1,2,4-trioxano: *trans*-3,3-dimetil-5,6-tetrametilen-1,2,4-trioxa-ciclohexano (*Ia*) y *cis*-6-fenil-5,6-(2-fenilpropiliden)-3,3-tetrametilen-1,2,4-trioxaciclohexano (*Ib*), relacionándolas con datos de la termólisis de la droga antimalárica natural *artemisinina* (*I*). De esta manera la estabilidad térmica de *I* en etanol a 78 °C resulta *ca.* 54 veces menor que la de *Ia* y *ca.* 5 veces mayor que la de *Ib* en metanol. Se consideran también otros procesos que modifican la estabilidad de este tipo de sustancias en solución y que determinan la mejor forma de administrarlas con fines terapéuticos.

SUMMARY. "Thermal Stability of 1,2,4-trioxanes: A New Antimalarial Generation". The thermal stabilities in solution of compounds with the molecular ring of 1,2,4-trioxane: *trans*-3,3-dimethyl-5,6-tetra methylene-1,2,4-trioxacyclohexane (*Ia*) and *cis*-6-phenyl-5,6-(2-phenylpropiliden)-3,3-tetramethylene-1,2,4-trioxacyclohexane (*Ib*) were related to data for the thermolysis of the natural antimalarial drug *artemisinine* (*I*). Thus the thermal stability of *I* in ethanol at 78 °C is *ca.* 54 times lower than *Ia* and *ca.* 5 times higher than *Ib* in methanol. Other processes that modify the stabilities of those type of substances in solution, which determine the best way to supply them for therapeutic purposes, are also considered.

INTRODUCCION

Luego de cuarenta años de haberse dictaminado la casi total erradicación de la malaria o paludismo, actualmente esta enfermedad representa una gran amenaza para Afganistán, Brasil, Camboya, China, India, Indonesia, Sri Lanka, Tailandia, Vietnam y diversas partes de Africa. Recientemente se ha informado sobre la aparición de casos de malaria en el norte de nuestro país, enfermedad prácticamente desconocida en la región. "Dos niños mueren de malaria [en el mundo] cada minuto", se ha publicado en el periódico francés *Le Figaro*, siendo de dos millones la cifra anual de víctimas mortales, mayor que la de muertos por SIDA. Se estima que cerca de 270 millones de personas están infectadas con el *Plasmodium falciparum*.

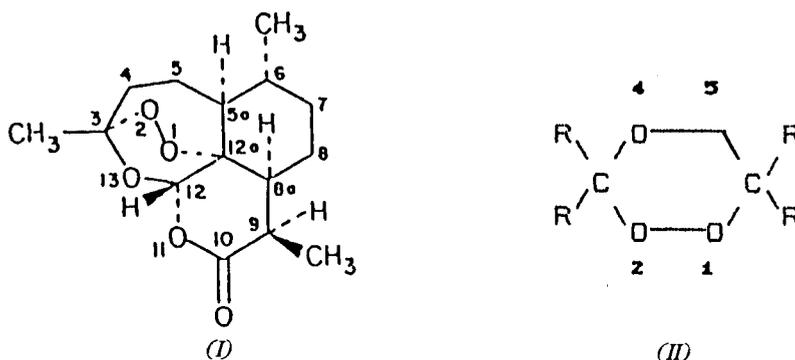
* Autor a quien dirigir la correspondencia.

PALABRAS CLAVE: 1,2,4-Trioxanos, Agentes antimaláricos, Estabilidad Térmica.

KEY WORDS: 1,2,4-Trioxanes, Antimalarial Agents, Thermal Stability.

parum, aunque se cree que el grupo de riesgo lo componen alrededor de 2.200 millones de personas. ¿Cómo es posible que la malaria, en una época eliminada o muy bien controlada para el 90 % de la población mundial, amenace hoy a más del 40 % de la humanidad? Es evidente que el paludismo no podría brotar sin el causante de la infección, el mosquito *Anopheles gambiae*. Resulta lógico que si la población del insecto portador se modificara, cambiaría la incidencia de dicha enfermedad. Los pequeños aumentos de temperatura producidos en el planeta, atribuidos a la contaminación ambiental, afectan en gran medida la población de insectos y tienen un grave efecto en la incidencia de la malaria. Por otra parte, puede pensarse también que la malaria ha recrudecido por la limitación en el uso del DDT como insecticida en la lucha contra los mosquitos.

La *artemisinina* o *qinghaosu* (I) es un antimalárico natural presente en hojas y flores de *Artemisia annua* L., estudiada también por varios grupos de investigadores de nuestro país ¹⁻⁴. Su molécula corresponde a una lactona sesquiterpénica (función epidióxido) que posee el anillo molecular de 1,2,4-trioxano (II).



Los peróxidos cíclicos mencionados constituyen una numerosa familia de compuestos que generalmente ejercen acción antimalárica y cuya síntesis y propiedades farmacológicas son estudiadas actualmente intensivamente en diversas partes del mundo ⁵. Si bien se sabe que tanto los extractos acuosos como alcohólicos de la hierba *Artemisia annua* L. carecen de efectos terapéuticos contra el paludismo, los obtenidos en éter etílico, acetona y éter de petróleo a temperaturas relativamente bajas, producen buenos resultados. Inicialmente la acción específica de estos compuestos se atribuyó a la presencia en sus moléculas de la mencionada función peróxido cíclico, ya que la hidrogenación catalítica de *artemisinina* origina *deoxoartemisinina* (Figura 1) que carece del mencionado efecto terapéutico. Además, la estructura de *dihidroartemisinina*, sustancia obtenida por reducción con NaBH_4 corresponde con la de un 1,2,4-trioxano con excelente actividad antimalárica ^{6,7}.

Estudios recientes sobre la relación entre estructura y reactividad de este tipo de moléculas han demostrado que la presencia del anillo de 1,2,4-trioxano es fundamental para dicho efecto terapéutico ⁸. En lo que respecta al mecanismo de acción de estas drogas se ha llegado a proponer que las mismas actúan primariamente sobre la integridad de las membranas del *Plasmodium falciparum* ⁹. La estabilidad térmica de *artemisinina* ha sido evaluada ¹⁰ analizando sus productos de termólisis aunque sin establecerse los valores de los parámetros cinéticos de la re-

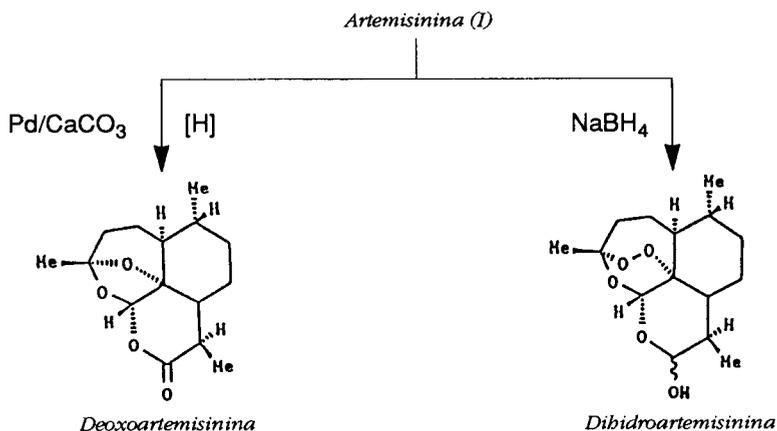


Figura 1. Reacciones de reducción de *artemisinina*.

acción. Esta droga constituye una molécula sorprendentemente estable hasta 150 °C en solventes neutros, descomponiéndose a menores temperaturas en soluciones ácidas o básicas. Los productos más abundantes de su calentamiento (190° C) durante 10 minutos, son los indicados en la Figura 2 ¹¹.

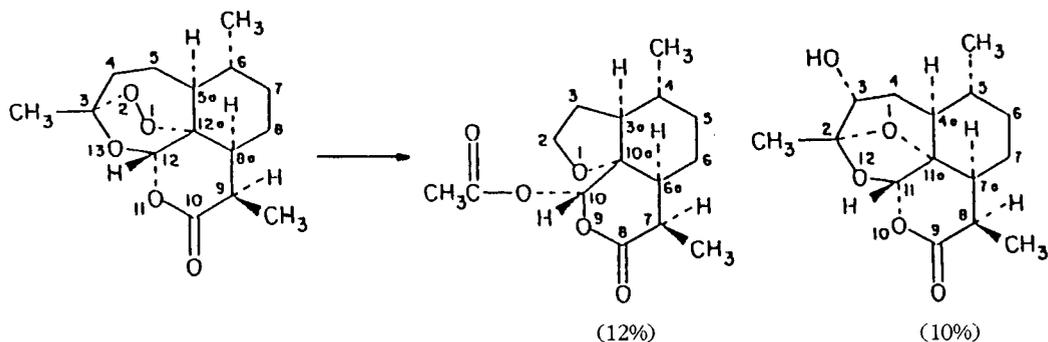


Figura 2. Rendimientos de productos en la termólisis de *artemisinina*.

En este trabajo se evalúan parámetros cinéticos provenientes del estudio de la descomposición térmica en solución de 1,2,4-trioxanos sustituidos: *trans*-3,3-dimetil-5,6-tetrametil-1,2,4-trioxaciclohexano (IIa) y *cis*-6-fenil-5,6-(2-fenil-propilideno)-3,3-tetrametil-1,2,4-trioxaciclohexano (IIb) (Figura 3), comparándolos con el valor estimado de la constante específica de descomposición térmica de artemisinina (I) en etanol teniendo en cuenta información bibliográfica ¹⁰.

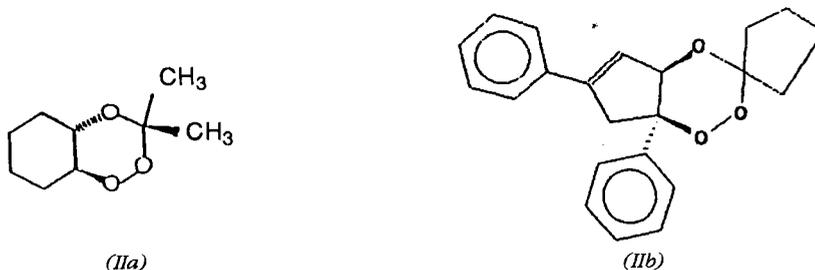


Figura 3. Fórmulas estructurales de 1,2,4-trioxanos sustituidos estudiados en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

1,2,4-trioxanos

El *trans*-3,3-dimetil-5,6-tetrametilen-1,2,4-trioxa-ciclohexano, (*IIa*) fue sintetizado por un método conocido ¹² mediante la reacción de epoxidación catalítica de ciclohexeno con agua oxigenada en presencia de acetona.

El *cis*-6-fenil-5,6-(2-fenilpropiliden)-3,3-tetrametilen-1,2,4-trioxa-ciclohexano (*IIb*) fue suministrado gentilmente por el Profesor Charles W. Jefford de la Universidad de Ginebra, Suiza.

Solventes utilizados

De calidad reactivos analíticos, purificados según técnicas apropiadas y controlada su pureza por cromatografía gaseosa.

Métodos cinéticos

Tubos de Pyrex cerrados en un extremo (8 cm de largo x 8 mm de diámetro externo) fueron cargados con *ca.* 1 ml de la solución del 1,2,4-trioxano correspondiente (*ca.* 0,002 M) en el solvente de reacción, degasificados en la línea de vacío (-190 °C) y luego sellados con la llama de un soplete. Estas ampollas se sumergían en un baño de aceite de silicona termostatzado ($\pm 0,1$ °C), extrayéndose las mismas a tiempos convenientemente determinados y deteniendo la descomposición del trioxano por inmersión en un baño a 0 °C. Las determinaciones de las concentraciones remanentes de los trioxanos correspondientes en las soluciones se realizaron por cromatografía gaseosa capilar (CGC) en el caso de *IIa*, y por cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) para *IIb*.

Cromatografía gaseosa capilar (CGC)

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida marca Heliflex (RSL-150, Bonded FSOT) de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno (0,25 μ m de espesor de película líquida) a 100 °C instalada en un cromatógrafo gaseoso marca Hewlett-Packard modelo 5840 A, con el inyector a 120 °C y equipado con detector FID. Se empleó nitrógeno como gas portador y el método cuantitativo del patrón interno (naftaleno) a fin de determinar las concentraciones del trioxano *IIa* en las soluciones provenientes de las termólisis.

Cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC)

El análisis del trioxano *IIb* se realizó utilizando un cromatógrafo líquido marca Pharmacia-LKB provisto con una columna Spherisorb Superpac RP-C18 (2,5 μ m, 4,0 mm x 100 mm) a 25 °C. La fase móvil fue acetonitrilo (70% v/v -agua), con un caudal de 1,0 ml/min (presión 5,2 mPa); las muestras, convenientemente diluidas (1:100) con la fase móvil, y el patrón interno adicionado (naftaleno) se inyectaron (20 μ l) en el instrumento con su detector UV a una longitud de onda de 254 nm.

Métodos de cálculo utilizados

Los valores de las constantes de velocidad de reacción (k_{obs}) fueron calculados utilizando una ley cinética de primer orden, estimándose la bondad del ajuste

con un método de regresión lineal por cuadrados mínimos. Los parámetros de activación de las reacciones de térmolisis se obtuvieron aplicando el método de la ecuación de Arrhenius.

RESULTADOS Y SU DISCUSION

La determinación de la estabilidad térmica de *artemisinina*, en etanol a ebullición (78 °C) durante un período de 48 horas ¹⁰, permite efectuar una estimación de su constante específica de termólisis ($k_{EtOH} = 1,3 \times 10^{-6} \text{ seg}^{-1}$). Este resultado significa que *ca.* 20% de la droga se destruye por dicho tratamiento, lo que justifica la escasa acción antimalárica de los extractos de *Artemisia annua* L. obtenidos en ese solvente.

Datos cinéticos de la termólisis de los 1,2,4-trioxanos sustituidos considerados en este trabajo (Figura 3), como así también el valor de la constante de velocidad de reacción estimado para *artemisinina* se muestran en la Tabla 1.

Sustancia	$10^6 \times k_{obs} / \text{seg}^{-1}$	Valores relativos
<i>Ila</i>	0,024	1
<i>Artemisinina</i>	1,3 ^b	<i>ca.</i> 54
<i>Iib</i>	6,8	<i>ca.</i> 283

Tabla 1. Constantes de velocidad de descomposición térmica ^a de 1,2,4-trioxanos sustituidos en solución de metanol, a 78° C. ^a calculadas aplicando una ecuación cinética de primer orden; ^b valor estimado en solución de etanol (análisis por TLC) ¹⁰, utilizando para el cálculo un factor preexponencial "normal" de la reacción unimolecular correspondiente.

Considerando el efecto de la temperatura sobre las reacciones de descomposición de los trioxanos *Ila* y *Iib* resultan los valores de los parámetros de las ecuaciones de Arrhenius correspondientes en dos solventes de distintas características fisicoquímicas (metanol y tolueno) (Tabla 2).

Trioxano	Solvente	E_a kcal.mol ⁻¹	Ln A (seg ⁻¹)
<i>Ila</i>	Metanol	33	29
<i>Ila</i>	Tolueno	37	32
<i>Iib</i>	Metanol	42	48
<i>Iib</i>	Tolueno	38	34

Tabla 2. Parámetros de la ecuación de Arrhenius de la termólisis unimolecular de 1,2,4-trioxanos en solución.

Estos resultados, que si bien pueden asignarse razonablemente a la ruptura homolítica de la función peróxido cíclico de las moléculas correspondientes con formación inicial de un biradical intermediario (Figura 4), demuestran que en la termólisis de los 1,2,4-trioxanos considerados existe un significativo efecto de solvente en la reacción.

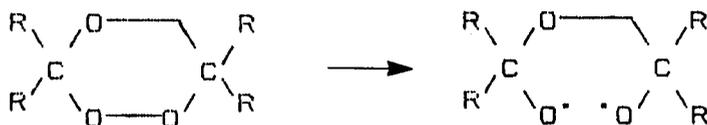


Figura 4.

El biradical intermediario (Figura 4) se descompone a su vez originando diferentes productos, cuyos rendimientos dependerían también de la naturaleza del medio de reacción ¹³. Probablemente la descomposición térmica de *artemisinina*, por pertenecer esta sustancia a la misma familia de peróxidos cíclicos estudiados experimentalmente en este trabajo, ocurre por un camino de reacciones análogo en la mayoría de los solventes apróticos (*t.e.* éter de petróleo, éter etílico).

Por otra parte, se ha informado ¹³ que la función peróxido de los 1,2,4-trioxanos es susceptible también al ataque por diferentes especies reactivas (iones, radicales libres y moléculas de determinados solventes), que originan la ruptura del anillo molecular mediante las denominadas reacciones de descomposición inducida, procesos estos que llevan asociados generalmente menores valores de las energías de activación que los correspondientes a su disociación unimolecular (Tabla 2). Es un hecho conocido que la estabilidad de algunas drogas en solución disminuye significativamente aún en condiciones de temperatura de reacción y concentraciones que resultan mucho menores que las correspondientes a su termólisis unimolecular. En el caso de *artemisinina*, en una solución metanólica de carbonato de potasio a temperatura ambiente la ruptura de su anillo lactónico produce intermediarios de tipo hidroperoxídicos que finalmente originan agua oxigenada entre los productos de reacción; no obstante, en un medio ácido fuerte, también a la misma temperatura, su anillo molecular con la función peróxido podría fragmentarse también por un proceso de naturaleza concertado ¹⁴.

El análisis de las reacciones mencionadas de 1,2,4-trioxanos, que incluye en este caso el de una sustancia que intrínsecamente es, desde el punto de vista térmico, extraordinariamente estable (*artemisinina*), pone en evidencia que sus moléculas frente a determinadas especies (algunos solventes, hidrogeniones o aniones) presentan diferentes grados de estabilidad. Evidentemente esto trae como consecuencia la formación de sustancias que, en general, no poseen la actividad terapéutica específica característica de este tipo de peróxidos cíclicos.

CONCLUSIONES

En solución de metanol y a una misma temperatura, la estabilidad térmica del 1,2,4-trioxano sustituido *Iia* resulta *ca.* 283 veces mayor que la del *Iib* (Tabla 1). Esta diferencia se corresponde con distintos valores de los parámetros de las ecuaciones de Arrhenius de sus reacciones de termólisis unimolecular (Tabla 2), que reflejan distintas características (grados de libertad) entre los correspondientes estados fundamentales y de transición de sus reacciones. De esta manera se pone en evidencia un significativo efecto del medio sobre la estabilidad térmica de las moléculas de los 1,2,4-trioxanos mencionados.

La estabilidad térmica del antimalárico natural *artemisinina* (*I*) en etanol a 78 °C es *ca.* 54 veces mayor que la de *Iia* y *ca.* 5 veces mayor que la de *Iib* en metanol (Tabla 1).

El significativo efecto de la naturaleza del medio de reacción sobre la estabilidad en solución de los 1,2,4-trioxanos estudiados permite obtener conclusiones sobre la forma en que este tipo de sustancias deberían vehiculizarse y/o administrarse para producir una acción terapéutica óptima.

Agradecimientos. Al Prof. Dr. Charles W. Jefford de la Universidad de Ginebra, Suiza, por haber suministrado gentilmente el trioxano *Iib*. Al Ing. Qco. Marcelo S. Aguilera, miembro de la Carrera del Personal de Apoyo del CONICET, por su colaboración en las determinaciones cinéticas. Al Prof. Dr. César A.N. Catalán, Director del Instituto de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de San Miguel de Tucumán, por haber suministrado a los autores importante información bibliográfica sobre *artemisinina*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lampona, M.E.P. de, M.L.T. de Delfini, E.C. de Riscalca & C.A. Catalán (1990) *An. Asoc. Quím. Argent.* **78**: 333-40
2. Baldini, O., M.L.M. Bros & L. Bruno Blanch (1991) *Jornadas Científicas de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica*, Buenos Aires
3. Retamar, J.A. (1992) *Memoria Anual del IPNAYS*, Univ. Nac. Litoral, Santa Fe
4. Spegazzini, E. & M. Nájera (1989) *Acta Farm. Bonaerense* **8**: 95-100
5. Jefford, C.W. (1988) *Eur. Pat. Appl. EP* 286, 316
6. Liu, J.-M., M.-Y. Ni, J.-F. Fan, Y.-Y. Tu, Z.-H. Wu, Y.-L. Wu & W.-S. Chou (1979) *Acta Chim. Sinica* **37**: 129-32
7. Rong, Y.J., B. Ye, C. Zhang & Y.L. Wu (1993) *Chinese Chemical Letters* **4**: 859-60
8. Rong, Y.J. & Y.L. Wu (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 2149-50
9. Ellis, D.S., Z.L. Li, H.M. Gu, W. Peters & B.L. Robinson (1985) *Ann. Tropical Med. Parasit.* **79**: 367-9
10. Klayman, D.L., A.J. Lin, N. Acton, J.P. Scovill, J.M. Hoch, W.K. Milhons, A.D. Theoharides & A.S. Dobek (1984) *J. Nat. Products* **47**: 715-7
11. Lin, A.J., D.L. Klayman, J.M. Hoch, J.V. Silverton & C.F. George (1985) *J. Org. Chem.* **15**: 4504-8
12. Payne, G.B., C.W. Smith (1957) *J. Org. Chem.* **22**: 1682-5
13. Cafferata, L.F.R. (1993) "Reactivities of six-membered rings cyclic peroxides of the trioxanes, tetraoxanes and trioxazines families of compounds" en *Trends in Organic Chemistry* (L. Menon, ed.), Capítulo 4, págs. 773-91, Council of Scientific Research Integration, Trivandrum, India
14. Zeng, M.Y., L.N. Li, S. Chen, F. Li, X.T. Liang, M. Chen & J. Clardy (1983) *Tetrahedron* **39**: 2941-6