



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE BIOELECTROQUÍMICA**

**Estudio del comportamiento electroquímico de fármacos de
acción central: modafinilo y naratriptan**

PATROCINANTE

Dr. Alejandro Álvarez Lueje
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

DIRECTOR

Dr. Alejandro Álvarez Lueje
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Carolina Andrea Velasco Aguirre

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1. Reactivos y fármacos.....	11
2.2. Equipamiento y método experimental.....	11
2.2.1. Voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría cíclica	11
2.2.2. Estudios en disco rotatorio	12
2.2.3. Estudios coulométricos.....	12
2.2.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia	12
2.3. Preparación de las disoluciones	13
2.3.1. Disoluciones tampón	14
2.3.2. Disoluciones stock	14
2.3.3. Disoluciones de trabajo	14
2.4. Procedimiento analítico.....	15
2.4.3. Método de la adición estándar para modafinilo.....	15
2.4.4. Muestras sintéticas	16
2.4.5. Valoración	16
2.4.6. Uniformidad de contenido.....	17
2.4.7. Ensayos de selectividad	17
2.5. Análisis estadístico.....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Comportamiento electroquímico de naratriptan.....	19
3.2. Metodología voltamperométrica para la cuantificación de naratriptan	29
3.3. Comportamiento electroquímico de modafinilo	35
3.4. Metodología voltamperométrica para la cuantificación de modafinilo	41
4. CONCLUSIONES	46
5. REFERENCIAS	48

RESUMEN

Naratriptan presentó una señal anódica en medio acuoso en un amplio intervalo de pH (2-12), tanto por voltamperometría de pulso diferencial como voltamperometría cíclica utilizando electrodo de carbón vítreo. Esta respuesta es de carácter irreversible, controlada por difusión y probablemente causada por la oxidación del grupo indol.

Con fines analíticos se realizó voltamperometría de pulso diferencial en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 3), en donde se obtuvieron los resultados con mejor reproducibilidad. El porcentaje de recuperación fue de $102,1 \pm 1,8\%$ y los límites de detección y cuantificación de $9,5 \times 10^{-6}$ y $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Los ensayos de selectividad revelaron que la señal de oxidación no se ve afectada por la presencia de excipientes o productos de degradación. Así podemos concluir que el método presentado es útil en la determinación de naratriptan en forma farmacéutica, no requiriendo tratamiento previo de la muestra como extracción o separación. Finalmente, este método voltamperométrico fue exitosamente aplicado en la determinación de la cantidad y la uniformidad de contenido de comprimidos de naratriptan.

Por otra parte, modafinilo presentó dos señales anódicas poco definidas y de baja intensidad de corriente en medio mixto (tampón Britton-Robinson/acetronitrilo, 50/50) y tres señales bien definidas al ser estudiado por voltamperometría de pulso diferencial en acetronitrilo. Estos tres picos se presentan a elevados potenciales de oxidación: 1530 mV, 2030 mV y 2430 mV, sobre electrodo de carbón vítreo y son de carácter irreversible. Además, modafinilo experimenta transporte difusivo hacia la superficie del electrodo en acetronitrilo, con un coeficiente de difusión de $3,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

Se seleccionó la segunda señal de modafinilo a 2030 mV en acetronitrilo con fines analíticos, debido a su mejor reproducibilidad y más amplia gama de respuesta lineal. En estas condiciones, el método desarrollado por voltamperometría de pulso diferencial exhibió

figuras de mérito adecuadas para su aplicación a la cuantificación del fármaco como materia prima, empleando el método de la curva de calibración. A pesar de los valores obtenidos en el ensayo de recuperación (95,0 %), la aplicación a forma farmacéutica no tuvo la selectividad esperada. Probablemente se debió a que algún excipiente no evaluado en el ensayo de recuperación y contenido en la formulación, interfirió en la valoración de modafinilo. Este problema de la interferencia de la matriz se subsanó al emplear el método de la adición estándar

SUMMARY

Study of electrochemical behavior of centrally acting drugs: modafinil and naratriptan

Naratriptan exhibits an anodic response in aqueous media over a broad pH range (pH 2-12), as determined by differential pulse voltammetry and cyclic voltammetry using glassy carbon electrodes. This response is irreversible in nature, diffusion-controlled and probably caused by the oxidation of the naratriptan indole moiety. With analytical purposes differential pulse voltammetry technique was performed in 0.1 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer (pH=3), which elicited the most reproducible results. The percentage of naratriptan recovery was 102.1±1.8%, and the limits of detection and quantitation were 9.5x10⁻⁶ and 2.0x10⁻⁵ mol L⁻¹, respectively. Selectivity trials revealed that the oxidation signal of the drug was not disturbed by the presence of excipients or degradation products. Thus, we conclude that the method presented herein is useful for the quantification of naratriptan in pharmaceutical drugs and that this method requires no separations or extractions. Finally, this voltammetric method was successfully applied to determine the quantity and the content uniformity of naratriptan in drug tablets. A comparison of this technique to the standard high-performance liquid chromatography technique was conducted at the end of our study.

Modafinil showed two anodic signals poorly defined and low intensity in mixed media (Britton-Robinson buffer solution /acetonitrile, 50/50) and three well-defined signals to be studied by differential pulse voltammetry in acetonitrile. These three peaks are present at high oxidation potential: 1530 mV, 2030 mV and 2430 mV on a glassy carbon electrode and are irreversible. In addition, modafinil undergoes a diffusion process on the surface of glassy carbon electrode in acetonitrile, with a diffusion coefficient of 3.2x10⁻⁵ cm² s⁻¹.

For analytical purposes, the second signal of modafinil at 2030 mV in acetonitrile was selected due to its better reproducibility and widest range of linear response. Under these

conditions, the method developed by differential pulse voltammetry showed figures of merit appropriate for the application to the quantification of the drug as a raw material, using the method of calibration curve. Despite the values obtained in the recovery test (95.0%), when this method was applied to dosage form the selectivity was not expected. Probably due to an excipients not evaluated in the recovery test and contents in the formulation, interfered in the assessment of modafinil. This problem of matrix interference was corrected by using the standard addition method.

1. INTRODUCCIÓN

El derivado indólico naratriptan (N-metil-3-(1-metil-4-piperidil) indol-5-etansulfonamida, figura 1) es un agonista serotoninérgico, que actúa en los receptores 5-HT₁ produciendo vasoconstricción de las arterias craneales. Naratriptan pertenece a la familia de los *triptanes* y se cree que actúan principalmente en receptores del subtipo 5-HT_{1B} y los 5-HT_{1D}. Este fármaco se usa para el tratamiento de la fase aguda en cefaleas por ataques de migraña. Es metabolizado por las isoenzimas hepáticas del citocromo P450 y se excreta principalmente en la orina, en un 50% como fármaco inalterado y el 30% como metabolitos inactivos. Posee una vida media de eliminación de 6 horas, la que es significativamente más prolongada en pacientes con insuficiencia renal o hepática [1,2].

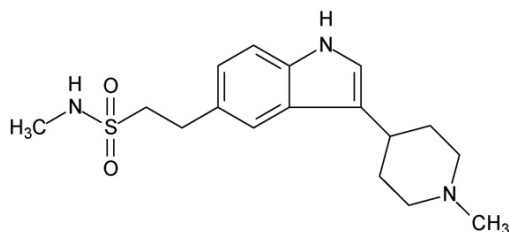


Figura 1. Estructura química de naratriptan.

Se han descrito en la literatura diversos métodos para la cuantificación de naratriptan, que incluyen cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas por electrospray en suero humano [3, 4] y cromatografía líquida con detección de fluorescencia aplicada a estudios farmacocinéticos [5]. La cromatografía capilar electrocinética micelar se ha utilizado para cuantificar naratriptan en productos farmacéuticos [6] y también se han desarrollado técnicas de cromatografía en fase reversa para investigar las impurezas durante la síntesis de naratriptan [7]. Los métodos oficiales descritos en la Farmacopea de

los Estados Unidos para la cuantificación de este fármaco, tanto en materia prima como comprimidos, es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detección UV [8].

Recientemente se han reportado algunas de las características electroquímicas de naratriptan. Específicamente en un artículo de revisión respecto de los métodos analíticos disponibles para la identificación y determinación de los *triptanes* [9], se hace referencia a una Tesis de Doctorado en la cual se habría estudiado la oxidación del fármaco y desarrollado un método por voltamperometría de pulso diferencial para su determinación. No obstante, dicho estudio no se ha publicado en la literatura científica hasta la fecha.

Por otra parte, modafinilo, (\pm)-[2-(difenil)metansulfonil]acetamida (figura 2), es un fármaco utilizado para promover el estado de alerta y en el tratamiento de patologías como la narcolepsia, síndrome de apnea obstructiva del sueño y trastornos del sueño del trabajo por turnos [1,10,11]. En el tratamiento del síndrome de narcolepsia o la apnea obstructiva del sueño, este medicamento se administra por vía oral en una dosis de 200 a 400 mg al día. Se trata de un compuesto quiral debido a su asimetría en el grupo sulfóxido, y en terapéutica se utiliza como racemato. No obstante, se ha reportado que las propiedades farmacológicas de ambos enantiómeros son distintas. Desde el año 2007, armodafinilo, el R-enantiómero de modafinilo está aprobado para tratar las mismas patologías que modafinilo [12].

Su mecanismo de acción sigue siendo controversial. Sin embargo, se ha reportado que podría deberse en parte a la inhibición de la liberación de ácido gama-aminobutírico mediante la vía serotoninérgica, adrenérgica y/o glutaminérgica [12].

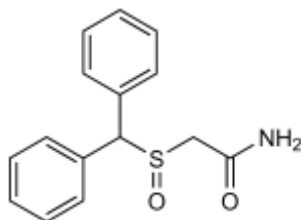


Figura 2. Estructura química de modafinilo

Modafinilo es bien absorbido en el tracto gastrointestinal luego de una dosis oral, con concentraciones plasmáticas máximas después de 2 a 4 horas. Alrededor de un 90% experimenta metabolismo hepático mediante desaminación hidrolítica, S-oxidación, hidroxilación del anillo aromático y conjugación con ácido glucurónico. Menos del 10% de la dosis administrada es excretada sin alteraciones [13].

Este extenso metabolismo hepático da origen a dos metabolitos principales, modafinilo ácido y modafinilo sulfona, ambos inactivos (figura 3) [14]; no obstante, se han identificado alrededor de seis metabolitos en cantidades menores [15]. La excreción del fármaco es principalmente por vía renal con menos del 10% de la dosis se elimina sin alterar. La vida media de eliminación después de dosis múltiples es de 15 horas [1].

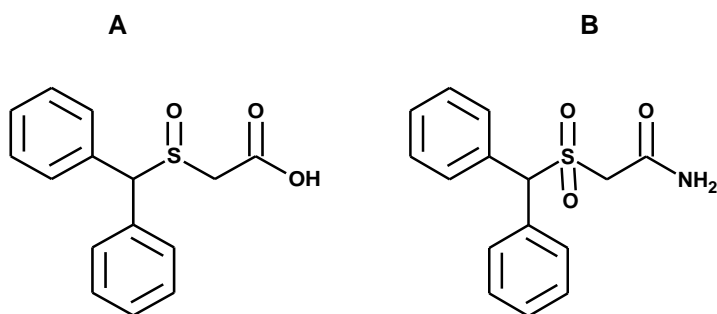


Figura 3. Estructuras químicas de los principales metabolitos de modafinilo: modafinilo ácido (A) y modafinilo sulfona (B).

Desde el punto de vista analítico, existen diversos métodos para la cuantificación de modafinilo en matrices biológicas, principalmente por cromatografía líquida acoplada a detector UV [14-18] y a un espectrómetro de masas [19-22] y cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) [23,24]. La detección de modafinilo y sus principales metabolitos en orina equina y en plasma humano se ha llevado a cabo por cromatografía líquida acoplada a detector de masa (HPLC-MS) [25] y a detector UV (HPLC-UV) [26,27], respectivamente. Pocos métodos analíticos han sido descritos para su determinación en la materia prima y formas farmacéuticas. Recientemente se ha informado un ensayo indicativo de estabilidad, por el método de electroforesis en zona capilar con detector de arreglo de fotodiodo para la determinación de modafinilo a granel y sus preparados farmacéuticos [28]. Rao y cols. han reportado el desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida en fase reversa para la separación y determinación de sustancias relacionadas de modafinilo en materia prima [29]. Becue evaluó la estructura química de los productos derivados durante la síntesis de modafinilo por cromatografía líquida-espectrometría de masas [30] y Drouin y cols. han optimizado la composición de la fase móvil para la separación por cromatografía líquida de isómeros ópticos de modafinilo en una columna quiral-AGP [31]. Además, la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica (USP) emplea HPLC-UV para la cuantificación de modafinilo en la materia prima y tabletas [32]. En el mejor de nuestro conocimiento, ningún estudio electroquímico ha sido reportado en la literatura respecto a modafinilo.

En base a lo anteriormente expuesto, en esta Memoria se ha investigado el comportamiento anódico de naratriptan y modafinilo en electrodo de carbón vítreo, con el fin

de desarrollar sus correspondientes determinaciones analíticas, tanto en materia prima y comprimidos, utilizando voltamperometría de pulso diferencial.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y fármacos

Naratriptan clorhidrato (100,1% cromatográficamente puro) fue suministrado por Laboratorios Bagó (Santiago de Chile). Bagomigral[®] comprimidos (naratriptan 2,5 mg por comprimido en forma de clorhidrato, Laboratorios Bagó, Santiago de Chile) fueron adquiridos en farmacia. Modafinilo (98% cromatográficamente puro) fue proporcionado por Laboratorios Bagó (Santiago, Chile). Los comprimidos de modafinilo 100 mg (Movigil[®], Laboratorios Bagó, Santiago de Chile) fueron comprados en el mercado nacional. Melatonina se obtuvo de Sigma Aldrich.

Acetonitrilo, ácido fosfórico, trietilamina y alcohol isopropílico (grado HPLC) se obtuvieron de Merck. Todos los demás reactivos fueron de grado analítico a menos que se indique lo contrario. Para las disoluciones preparadas en agua, se utilizó agua ultrapura ($\rho = 18 \text{ cm M}\Omega$), a partir del sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore).

2.2. Equipamiento y método experimental

2.2.1. Voltamperometría de pulso diferencial y voltamperometría cíclica

Los experimentos de voltamperometría de pulso diferencial (VPD) y voltamperometría cíclica (VC), se realizaron con una estación de trabajo completamente automatizado Bioanalytical Systems (BAS) CV-50W.

Se empleó una celda BAS de 25 mL con un electrodo de carbón vítreo ($\varnothing = 3$ mm, BAS) como electrodo de trabajo. Como contraelectrodo y electrodo de referencia se utilizaron un alambre de platino y Ag/AgCl, respectivamente. Las condiciones de operación fueron las siguientes: la sensibilidad osciló entre 10 a 100 AV^{-1} , el intervalo de potencial fue 0-3000 mV y la velocidad de barrido fue 50-3000 mV s^{-1} para los experimentos de VC. La superficie del electrodo de trabajo fue pulida con alúmina de 0,3 μm y de 0,05 μm antes de cada medición [33].

2.2.2. Estudios en disco rotatorio

Para los experimentos dinámicos, fue empleado un electrodo de disco rotatorio de carbón vítreo (diámetro de 3 mm, RDE-2, BAS). La superficie del electrodo de trabajo fue pulida con alúmina de 0,3 μm y de 0,05 μm antes de cada medición [33].

2.2.3. Estudios coulométricos

Los ensayos se llevaron a cabo utilizando una estación de trabajo totalmente automatizada (BAS CV-50W), integrada por una celda de electrólisis de 100 mL; como electrodo de trabajo una malla de carbón vítreo reticulada y como electrodo de referencia y contraelectrodo, Ag/AgCl y alambre de platino, respectivamente. Para naratriptan, el potencial de electrólisis se fijó en 1000 mV en tampón Britton-Robinson 0,1 mol L^{-1} . Para modafinilo, el potencial de electrólisis se fijó en 1600 mV en acetonitrilo y perclorato tetrabutilamonio (PTBA) como electrolito soporte. Los experimentos se realizaron por duplicado.

2.2.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia

Las mediciones se llevaron a cabo en un cromatógrafo Waters[®], equipado con un controlador de bomba modelo 600 y un Detector de Arreglo de fotodiodos modelo 996. La adquisición de datos y análisis se realizaron utilizando el software Milenium[®] versión 2.1.

Para naratriptan se empleó una columna cromatográfica Waters XTerra fenil[®] (150 mm x 4,6 mm, 3,5 mm) y el inyector fue una válvula Rheodyne[®] de 20 µL. Se utilizó detección ultravioleta a 282 nm, y la columna se mantuvo a temperatura constante de 35 °C por medio de un horno Waters[®], modelo 600.

Para modafinilo se utilizó una columna cromatográfica Bondapak / Porasil C-18 (150 mm x 3,9 mm) y una precolumna C18 Kromasil 100-5C-18 (150 mm x 4,6 mm). El inyector fue una válvula Rheodyne[®] de 20 µL. Se utilizó detección ultravioleta a 220 nm, y la columna se mantuvo a temperatura constante de 40 °C por medio de un horno Waters[®], modelo 600.

Para la valoración de naratriptan se aplicó una elución isocrática mediante una fase móvil compuesta por trietilamina-tampón fosfato 0,01 mol L⁻¹ (pH 2,5) y alcohol isopropílico (90:10, v/v). El flujo se mantuvo en el 1,0 mL min⁻¹, y la temperatura de trabajo se mantuvo a 35 ± 1 °C [8]. En estas condiciones, naratriptan presentó un tiempo de retención de 6,83 ± 0,07 min.

Para la valoración de modafinilo se aplicó una elución isocrática mediante una fase móvil compuesta por mezcla de tampón fosfato-acetonitrilo (65:35). El flujo se mantuvo en el 1,0 mL min⁻¹ y la temperatura de trabajo se mantuvo a 40 ± 1 °C. En estas condiciones modafinilo presentó un tiempo de retención de 5,9 ± 0,2 min [32].

Para la identificación de los productos de degradación y electrólisis de modafinilo por HPLC se utilizó una fase móvil en gradiente cuya fase móvil compuesta por acetato de amonio-acetonitrilo 0,02 M, con 30% acetonitrilo a tiempo 0 minutos, aumentando gradualmente a un 60% a los 8 minutos luego a un 80% a los 13 minutos y finalmente desde los 13 a los 20 minutos a un 90% a 30°C [29].

2.3. Preparación de las disoluciones

2.3.1. Disoluciones tampón

Para los experimentos voltamperométricos con naratriptan se utilizó tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (mezcla equimolar de ácidos acético, fosfórico y bórico). El pH deseado se obtuvo mediante la adición de las disoluciones concentradas de NaOH o HCl. Para los experimentos de HPLC, se empleó trietilamina tampón fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (0,6 mL de ácido fosfórico en 900 mL de agua) y se ajustó a pH 2,5 con trietilamina para naratriptan [8].

Para la valoración por HPLC de modafinilo se disolvieron 6,8 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua en un matraz aforado de 1000 mL se mezclaron y diluyeron con agua hasta el volumen. El pH se ajustó a 2,3 con ácido fosfórico [32].

Para la identificación de los productos de degradación y electrólisis de modafinilo por HPLC-UV se utilizó acetato de amonio $0,02 \text{ M}$ [32].

2.3.2. Disoluciones stock

Las disoluciones stock de clorhidrato de naratriptan estándar se prepararon todos los días a una concentración constante de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Una disolución de melatonina con una concentración de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ se preparó en metanol.

Las disoluciones stock de modafinilo se prepararon a una concentración constante de $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ en acetonitrilo.

Todas las disoluciones se prepararon en el día y fueron protegidas de la luz utilizando material de vidrio ámbar.

2.3.3. Disoluciones de trabajo

Volúmenes adecuados de las disoluciones stock de naratriptan se diluyeron a 10 mL con tampón Britton Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ antes de los experimentos electroquímicos y de HPLC-UV.

Para modafinilo, se diluyeron volúmenes adecuados de las disoluciones stock a 10 mL con tampón Britton Robinson 0,1 mol L⁻¹ o acetonitrilo, previo a los experimentos electroquímicos y de HPLC-UV.

2.4. Procedimiento analítico

2.4.1. Preparación de la curva de calibración de naratriptan

Las disoluciones de trabajo en el intervalo de 8×10^{-5} a 1×10^{-3} mol L⁻¹ fueron preparados al diluir la solución stock de naratriptan con tampón Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹.

2.4.2. Preparación de la curva de calibración de modafinilo

Las disoluciones de trabajo en el intervalo de $2,510^{-4}$ - $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ fueron preparados al diluir la solución stock de modafinilo con acetonitrilo y PTBA 0,1 mol L⁻¹.

2.4.3. Método de la adición estándar para modafinilo

Se pesaron 10 comprimidos de modafinilo de 100 mg, se pulverizaron, homogeneizaron y se tomó una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de modafinilo, los que se disolvieron en 25 mL de acetonitrilo y electrolito soporte. A esta disolución se le registró su voltamperograma y posteriormente se agregaron sucesivamente alícuotas de 100, 200 y 250 μ L de una disolución stock de modafinilo, registrándose en cada caso el voltamperograma correspondiente. Los valores de corrientes de pico obtenidas de cada voltamperograma se correlacionaron con las correspondientes cantidades de modafinilo agregadas, calculándose así la cantidad de modafinilo en los comprimidos por extrapolación en esta nueva curva, cuando la corriente es igual a cero. Cada procedimiento se realizó por triplicado.

2.4.4. Muestras sintéticas

Para los estudios de recuperación, se agregaron al fármaco de acuerdo a las fórmulas de lote del fabricante, para comprimidos de naratriptan 2,5 mg (como clorhidrato), los excipientes: carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa sódica, lactosa anhidra, estearato de magnesio, hipromelosa, dióxido de titanio, triacetina, de óxido de hierro amarillo monohidrato e índigo carmín.

Para modafinilo, se agregaron al fármaco los excipientes: croscarmelosa sódica, lactosa, almidón, silicato de magnesio, talco, estearato de magnesio, povidona K-90, para los estudios de recuperación de acuerdo a las fórmulas de lote del fabricante de tabletas de modafinilo de 100 mg.

2.4.5. Valoración

Naratriptan. El contenido homogeneizado de 10 comprimidos conteniendo el equivalente a 2,5 mg de naratriptan se suspendieron en 15 mL de tampón Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹. La mezcla se agitó en un vortex por 5 minutos, para asegurar la disolución del fármaco y se llevó hasta un volumen de 20 mL, utilizando el mismo disolvente. La concentración teórica de esta disolución fue de aproximadamente $3,36 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Esta disolución fue trasladada a una celda voltamperométrica y se realizaron los registros al menos dos veces, desde 0 mV a 1700 mV. La masa de naratriptan en la disolución de la muestra fue calculada a partir de la curva de calibración estándar preparada previamente.

Modafinilo. El contenido homogeneizado de 10 comprimidos conteniendo el equivalente a 2,73 mg de modafinilo se suspendieron en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó luego durante 5 minutos en un vortex y se llevaron a un volumen de 20 mL, utilizando el mismo disolvente, para obtener una concentración teórica de 5×10^{-4} mol L⁻¹. Esta solución se trasladó a una celda voltamperométrica, y se realizaron los registros al menos dos veces

desde 0 mV a 3000 mV. La masa de modafinilo en la solución de la muestra se calculó utilizando el método la curva de calibración. En el caso de los ensayos de valoración empleando el método de la adición estándar, el procedimiento empleado es el detallado en 2.4.3.

2.4.6. Uniformidad de contenido

Para este ensayo se utilizaron no menos de 10 comprimidos comerciales de naratriptan (Bagomigral® 2,5 mg de naratriptan en forma de clorhidrato por comprimido). Cada comprimido fue suspendido de forma independiente en 15 mL de tampón Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ y homogeneizado en un vortex, y llevado a un volumen final de 20 mL, utilizando el mismo disolvente. Cada disolución de la muestra fue trasladada a una celda voltamperométrica y se registró el voltamperograma al menos dos veces de 0 mV a 1700 mV. La masa de naratriptan en la disolución de la muestra fue calculada a partir de la curva de calibración estándar preparada previamente. El mismo procedimiento se siguió para el análisis de HPLC, con el paso adicional de filtración antes de la inyección.

2.4.7. Ensayos de selectividad

Naratriptan

Hidrólisis. Un total de 37,19 mg de naratriptan se disolvió en 10 mL de disolución de HCl 1 mol L⁻¹ o NaOH 1 mol L⁻¹ en un matraz de destilación de 50 mL para la hidrólisis ácida o alcalina, respectivamente. Cada disolución se hirvió durante una hora a reflujo.

Fotólisis. Una disolución naratriptan con una concentración aproximada de 1,2 mg L⁻¹ en tampón Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ fue expuesto a luz artificial durante 48 horas.

Oxidación química. A una disolución de naratriptan 5×10⁻⁴ mol L⁻¹ en tampón Britton-Robinson, se añadió 1 mL de H₂O₂ al 30% (v/v).

Volúmenes adecuados de cada disolución obtenida a partir de los experimentos de degradación fueron mezclados con disolución tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para generar una concentración teórica de naratriptan de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Las muestras de estos estudios fueron almacenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y protegido de la luz antes del análisis voltamperométrico. Cada muestra se analizó por duplicado.

Modafinilo

Hidrólisis. 27,34 mg modafinilo se disolvieron en 10 mL de disolución de HCl 1 mol L^{-1} o NaOH 1 mol L^{-1} en un matraz de destilación de 50 mL, la para la hidrólisis ácida o alcalina, respectivamente. Cada solución se hirvió durante 1 hora a reflujo. A continuación, las muestras fueron llevadas a sequedad por medio de rotavaporación al vacío.

Fotólisis. Una solución modafinilo con una concentración aproximada de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en acetonitrilo fue expuesto a luz artificial durante 48 horas.

Oxidación química. Una disolución de modafinilo $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en acetonitrilo se burbujeó con oxígeno por 2 horas.

Volúmenes adecuados de cada solución obtenida a partir de los experimentos de degradación se mezclaron con acetonitrilo, para generar una concentración teórica de modafinilo de $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. En el caso de las muestras sólidas provenientes de los ensayos de hidrólisis, se llevó a sequedad y se restituyó en acetonitrilo con PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como electrolito soporte. Las muestras de estos estudios fueron almacenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ y protegido de la luz antes del análisis voltamperométrico. Cada muestra se analizó por duplicado.

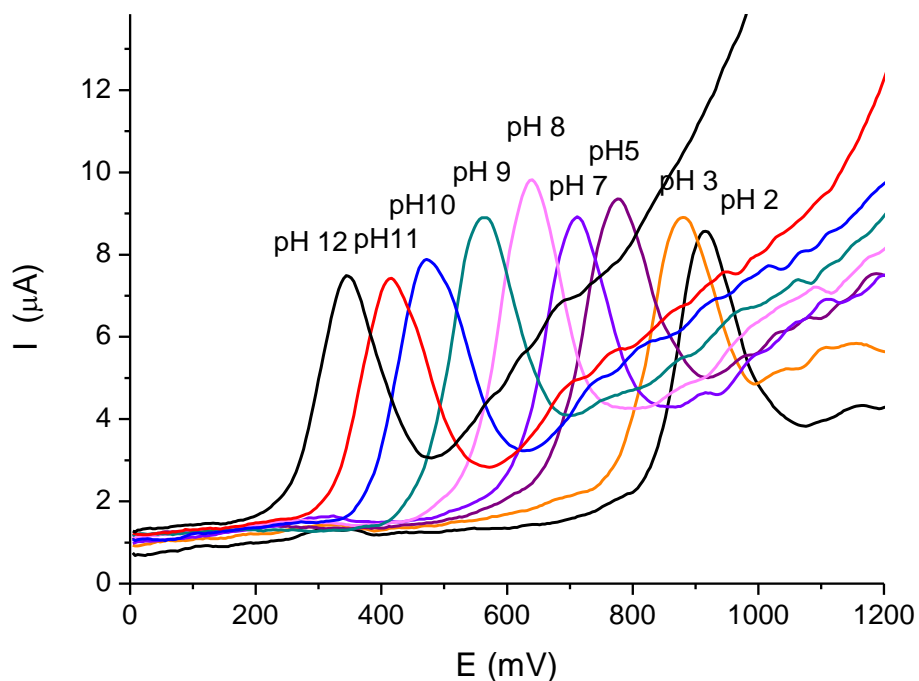
2.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos (prueba F para la proporción de varianza y la prueba t de Student) se realizaron utilizando el software GraphPad Prism[®] versión de 5.00 para Windows.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento electroquímico de naratriptan

Naratriptan exhibe respuesta anódica en medio acuoso (tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) cuando se estudió por voltamperometría de pulso diferencial con electrodo de carbón vítreo. Esta respuesta se produce en un amplio intervalo de pH (2-12) y muestra un pico bien definido que se desplaza a potenciales menores a medida que aumenta el pH. La figura 4 muestra la evolución de los voltamperogramas de pulso diferencial de naratriptan



con el pH.

Figura 4. Voltamperogramas de pulso diferencial de una disolución de naratriptan $3,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a diferentes pHs en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

El potencial de pico varió linealmente con el pH para todo el intervalo ensayado, con dos quiebres a pH 4 y pH 9, que se deberían probablemente a un cambio en el equilibrio de protonación-desprotonación de la especie electroactiva (figura 5A). El valor de pK_a reportado de naratriptan es de 9,7 para su nitrógeno piperidinilo, que coincide con el quiebre en 9 observado en el gráfico E_p vs pH [34]. Por otra parte, el quiebre a pH 4 podría explicarse en base al pK_a de la agrupación radical indolil, el cual tiene un valor de 4,3 para el catión radical del triptófano (ácido 2-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico) como compuesto de referencia [35, 36]. Sobre pH 4 los potenciales de pico se desplazan levemente a valores menos positivos, a medida que aumenta el pH. Este comportamiento prácticamente pH-independiente tiene una relación lineal (E_p vs pH), con una pendiente de -24 mV por unidad de pH. Esto podría deberse a que con la disminución de protones con el aumento del pH, se favorece la oxidación de naratriptan, por lo que se observa una disminución en los potenciales de pico. Los comportamientos de los potenciales de pico se definen por las siguientes regresiones lineales:

$$\text{pH } 2 - 4: \quad E_p = -24 \text{ pH} + 981,3 \text{ (} r = 0,991\text{);}$$

$$\text{pH } 4 - 9: \quad E_p = -63,4 \text{ pH} + 1146,3 \text{ (} r = 0,997\text{);}$$

$$\text{pH } 9 - 12: \quad E_p = -76 \text{ pH} + 1254 \text{ (} r = 0,998\text{)}$$

La corriente de pico se mantiene estable entre pH 2 y 7 y aumenta ligeramente a un pH de 8. Esto es seguido por un leve aumento a pH 9, que se estabiliza a partir de pH 10. La evolución de la corriente de pico con el pH se muestra en la figura 5B.

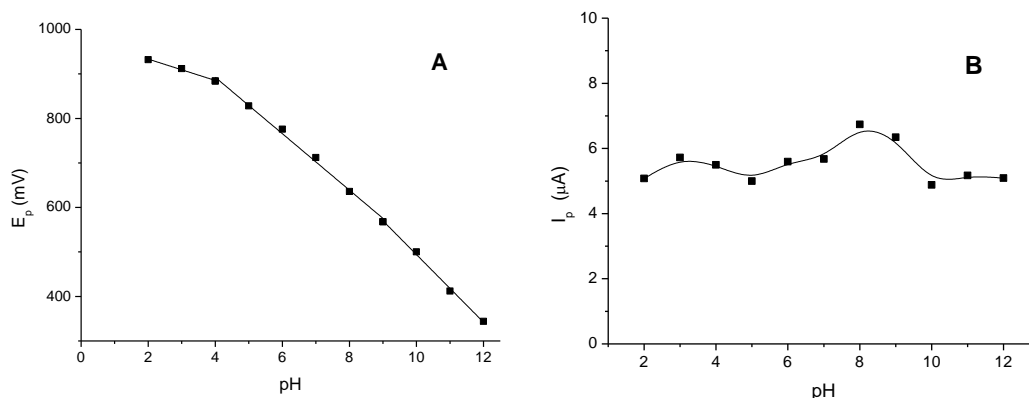


Figura 5. Efecto del pH sobre (A) E_p e (B) I_p , de una solución de naratriptan $3,84 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

En los experimentos de voltamperometría cíclica, realizados a pH 3, 7 y 10, y velocidades de barrido entre 50 y 3000 mV s^{-1} , no se observaron picos en los barridos de vuelta. Esto sugiere que la oxidación de naratriptan tiene un carácter irreversible. Por otra parte, una nueva señal anódica aparece a velocidades de barrido elevadas, a pH 7 y 10 (figura 6). Esto podría ser explicado si la oxidación en el electrodo de carbono vítreo corresponde a un proceso multielectrónico, que involucra un proceso de tipo EQ (electroquímico-químico). Si este fuera el caso, entonces después de cada etapa de oxidación habría una pérdida de un protón o un ataque de un nucleófilo (lo más probable un ataque de agua). La dependencia de las corrientes de pico (I_p) y potenciales de pico con la velocidad de barrido (v) fueron estudiados en el intervalo 50-3000 mV s^{-1} a pHs 3, 7 y 10. Estos estudios con la velocidad de barrido, permiten demostrar si los procesos que ocurren en el electrodo de carbono vítreo se encuentran bajo el control de la difusión o la adsorción. Se obtuvo una relación lineal entre la corriente pico y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para cada pH estudiado. Las relaciones correspondientes están dadas por: **pH 3:** I_p (μA) = $0,475v^{1/2}$ (mV s^{-1}) + 5,2 ($r = 0,986$); **pH 7:** I_p (μA) = $0,86v^{1/2}$ (mV s^{-1}) + 3,3 ($r = 0,992$); **pH 10:** I_p (μA) = $1,18v^{1/2}$ (mV s^{-1}) - 0,71 ($r = 0,995$)

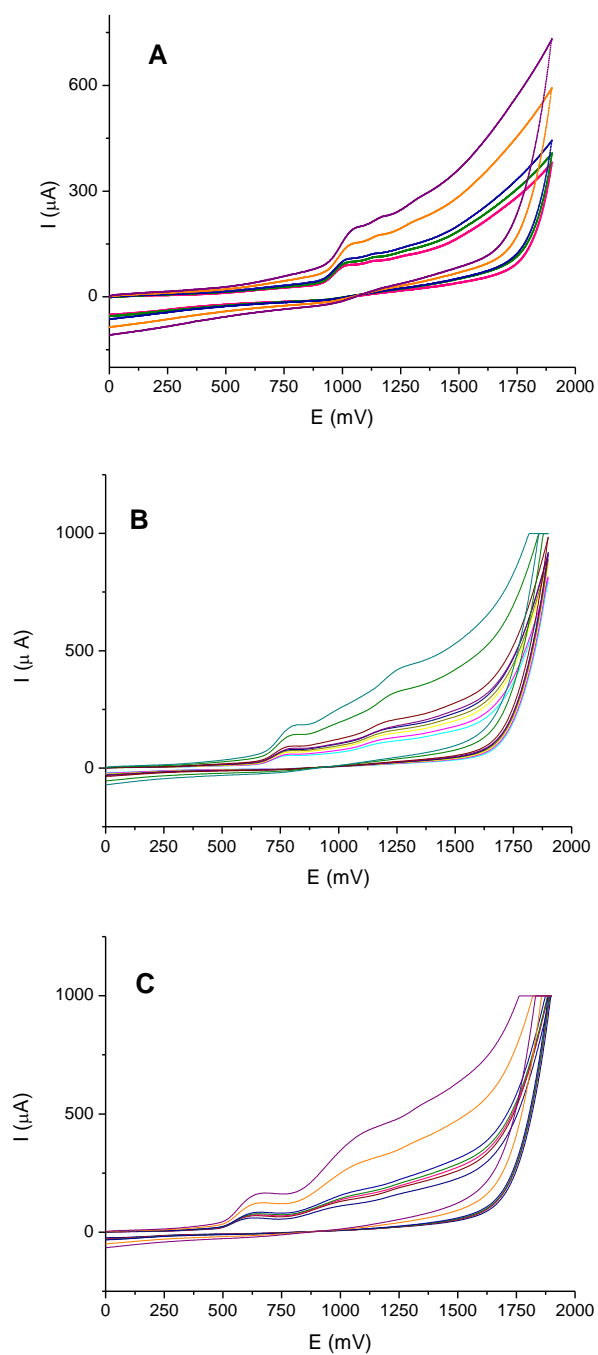


Figura 6. Voltamperogramas cíclicos de una disolución de naratriptan $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a diferentes velocidades de barrido entre 50 y 3000 mV s^{-1} . (A) $\text{pH } 3$, (B) $\text{pH } 7$ y (C) $\text{pH } 10$.

La gráfica del logaritmo de la corriente de pico ($\log I_p$) versus el logaritmo de la velocidad de barrido ($\log v$) dio líneas rectas en el mismo intervalo de velocidades de barrido previamente descrito (figura 7). Las relaciones lineales entre corrientes y velocidades de barrido están descritas por las siguientes expresiones:

$$\text{pH 3: } \log I_p = 0,40 \log v - 5,8 \quad (r = 0,989);$$

$$\text{pH 7: } \log I_p = 0,44 \log v - 5,8 \quad (r = 0,994);$$

$$\text{pH 10: } \log I_p = 0,51 \log v - 5,9 \quad (r = 0,996)$$

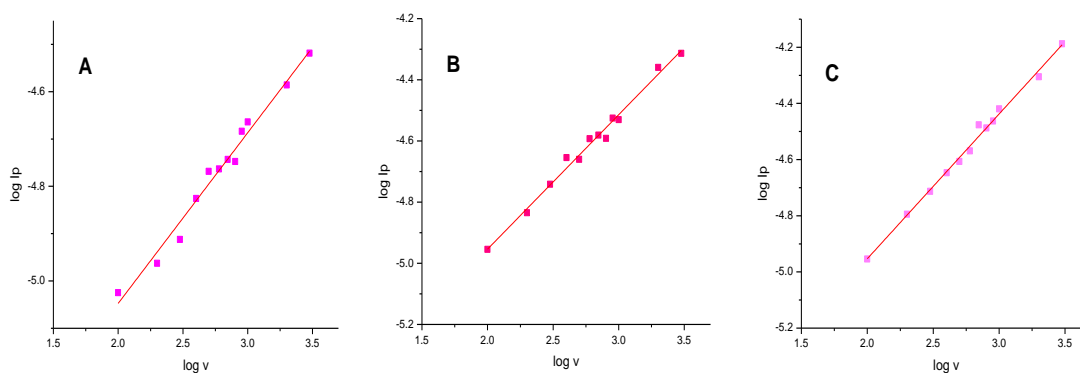


Figura 7. Gráficas del logaritmo de la corriente de pico ($\log I_p$) versus el logaritmo de la velocidad de barrido ($\log v$) a pH 2 (A), pH 7 (B) y pH 10 (C).

Las pendientes obtenidas estuvieron muy cerca del valor teórico esperado de 0,5 para una reacción de la especie en disolución controlado exclusivamente por difusión [37]. Tanto el coeficiente de correlación de I_p frente a $v^{1/2}$ como la pendiente de $\log I_p$ frente a $\log v$ confirman el carácter del proceso controlado por difusión. Los valores de la función de corriente de pico ($I_p / v^{1/2}$) vs $\log v$ fueron constantes con el aumento de velocidades de barrido en el intervalo de 50-3000 mV s^{-1} . Este comportamiento sugiere que la electrooxidación de naratriptan está exenta de complicaciones de adsorción en la superficie del electrodo [38, 39].

Los experimentos coulométricos para determinar el número de electrones transferidos durante la oxidación de naratriptan no tuvieron éxito. Esto se debió probablemente a la presencia de reacciones secundarias que se producen durante la electrólisis del fármaco. Además, la electrólisis fue seguida por HPLC-DAD (figura 8), y se observó que el área correspondiente al naratriptan disminuye en un 23% después de dos horas de electrólisis y una nueva señal aparece en tiempos de retención bajos (6,83 min para naratriptan vs 6,12 min, respectivamente). Por otra parte, el espectro UV del producto de la electrólisis conservó su máximo a 231 nm, que coincide con el de naratriptan. La señal a 285 nm desapareció, y se observa un incremento en la absorbancia en la región de los 320 nm. Estas características espectrales dieron a la disolución un color amarillento.

El aumento de la absorbancia en la región sobre 300 nm se podría atribuir a la formación de dímeros con una gran conjugación π [40,41]. Cuando consideramos el comportamiento electroquímico informado anteriormente para un compuesto relacionado, sumatriptan [42] y los datos de la literatura, en relación con la oxidación anódica de compuestos que contienen nitrógeno [43], probablemente la electrooxidación de naratriptan se debe a la oxidación de su agrupación indol.

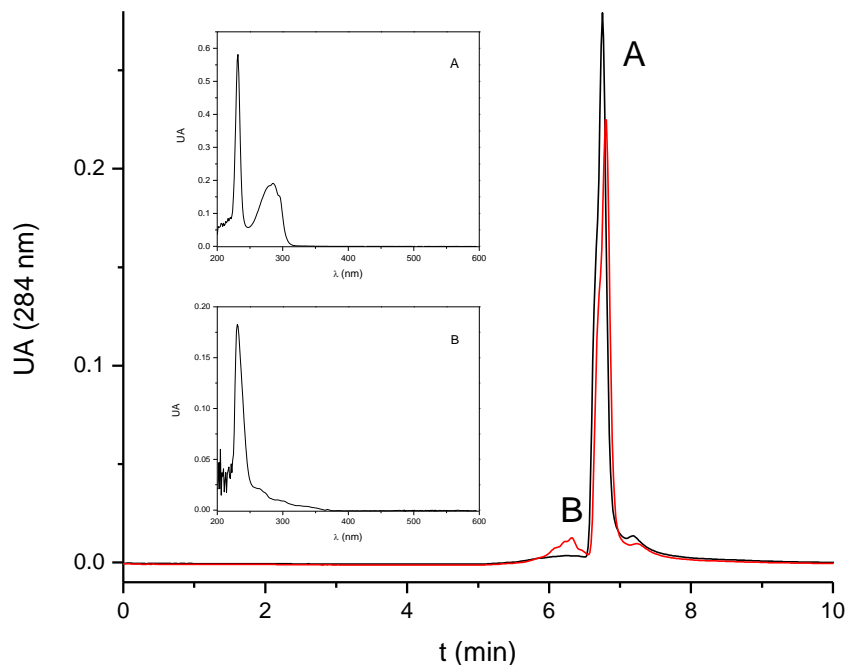


Figura 8. Cromatogramas de la electrólisis de naratriptan a tiempo cero (—) y 2 horas (—). Insertos: espectros UV de cada señal.

Para identificar al grupo responsable de la oxidación, naratriptan se comparó con un fármaco con estructura similar (melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina, figura 9), por voltamperometría de pulso diferencial y en electrodo de disco rotatorio (EDR). Ambos compuestos presentan señales anódicas a potenciales similares. Esto demuestra que la agrupación indol participa en la electrooxidación de naratriptan. Por otra parte, un comportamiento similar se observó cuando las muestras fueron evaluadas y comparadas mediante la técnica de voltamperometría EDR, que mostró que dos electrones se transfieren en la oxidación electroquímica de naratriptan.

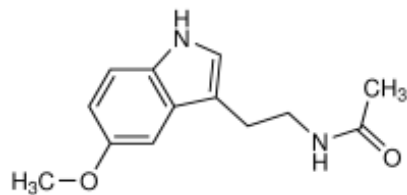
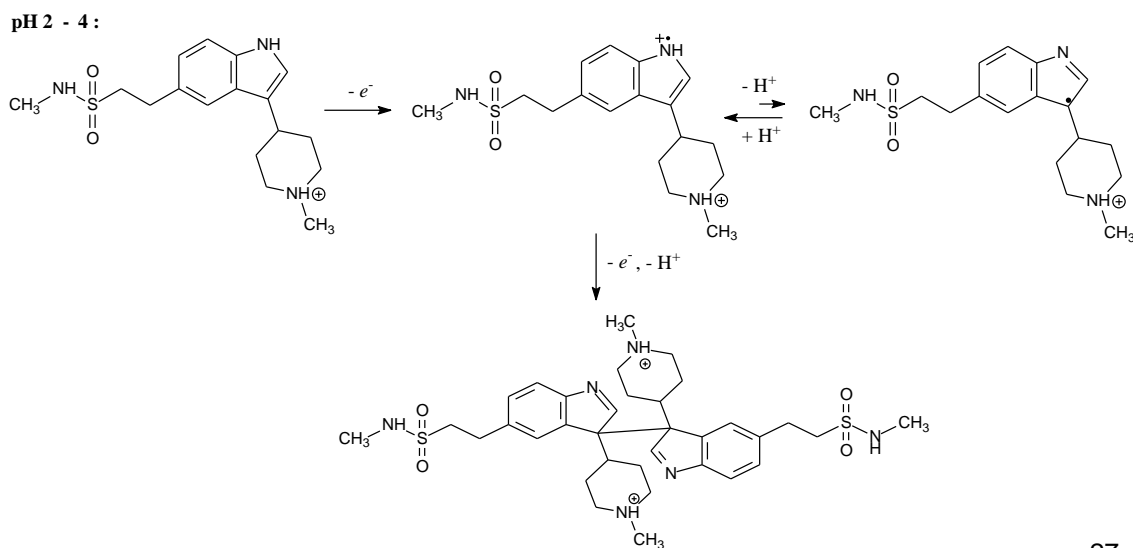
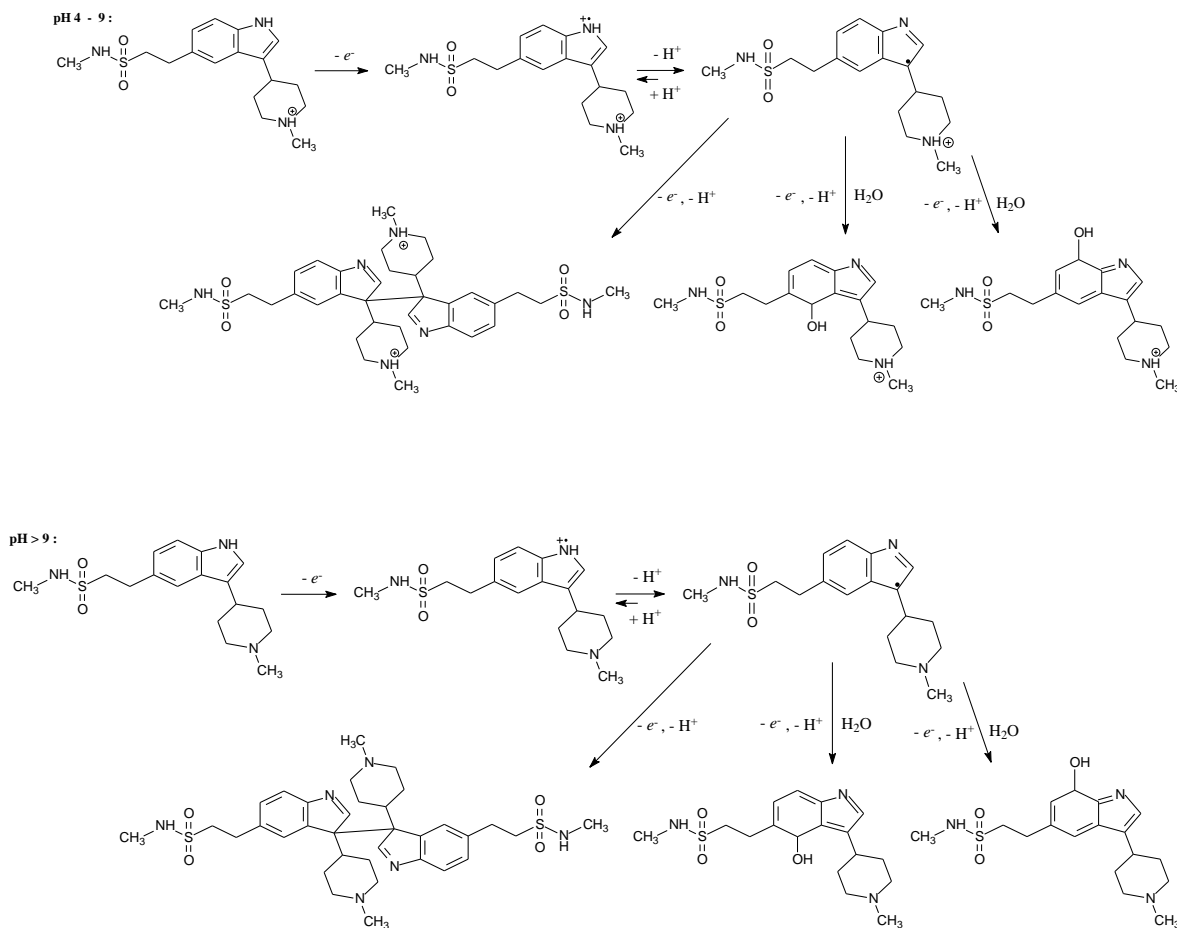


Figura 9. Estructura química de melatonina.

Estos resultados permiten suponer que la oxidación se produce en el átomo de nitrógeno del anillo indol, que es electroactivo, tanto en medios ácidos como básicos. Estos resultados indican que la oxidación de naratriptan está relacionada con el átomo de nitrógeno en su anillo indol. Se espera que este mecanismo de oxidación involucre $1e^-$ y $1H^+$, como lo sugiere el valor de la pendiente obtenida de la ecuación Ep-pH a valores de pH superiores a 4. En este proceso, el primer paso consiste en un proceso de un solo electrón que produce un catión radical, que se oxida por la pérdida de un segundo electrón y un protón. Esto puede generar una quinonimina que es susceptible al ataque nucleofílico. Así podría ser posible una dimerización, tras la obstrucción de un electrón por el acoplamiento radical-radical o sustrato-radical [44,45]. Según esta hipótesis, se propone un mecanismo para el electrooxidación de naratriptan en el siguiente esquema:





Usando EDR se obtuvo el coeficiente de difusión de naratriptan. Para reacciones irreversibles, la relación entre la de corriente límite y la velocidad de rotación está dada por la ecuación de Levich [36]:

$$I_{\text{lim}} = 0.62nFAD^{2/3}v^{-1/6}\omega^{1/2}C,$$

donde n , M , A , D , v , ω y C son el número de electrones, constante de Faraday, la superficie del electrodo (cm^2), coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), la viscosidad cinemática ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), velocidad de rotación (rad s^{-1}) y la concentración de sustrato (mol cm^{-3}), respectivamente. El

coeficiente de difusión de naratriptan se obtuvo de la pendiente de la curva de Levich (I_{lim} vs $\omega^{1/2}$) (figura 10). El valor medio de D resultó ser $1,26 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para $n = 2$ electrones.

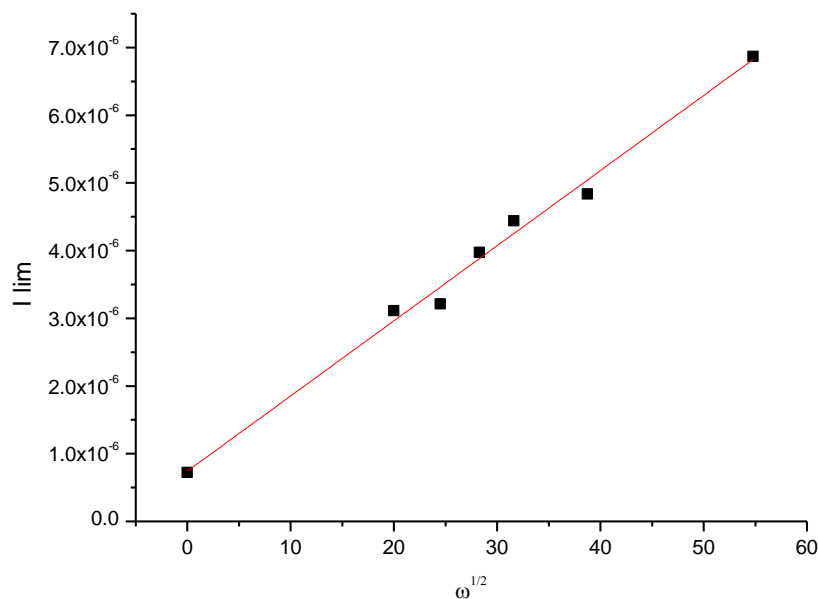


Figura 10. Efecto de la velocidad de rotación sobre la corriente límite en una solución de naratriptan $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

3.2. Metodología voltamperométrica para la cuantificación de naratriptan

Sobre la base de la respuesta electroquímica de naratriptan, se propone un nuevo método para su determinación. Con fines analíticos, fue seleccionada la técnica de la VPD en tampón Britton-Robinson en $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3. En estas condiciones, la corriente pico se mantiene estable con el pH (figura 5B), la señal está bien resuelta (figura 4) y la señal tiene mayor repetibilidad que a los demás valores de pH. Además, la señal varía linealmente con la concentración de naratriptan entre $7,5 \times 10^{-5}$ y $7,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Los límites de detección (LD) y los de cuantificación (LC) del método se calcularon mediante la media (Y_b) y la

desviación estándar (S_b) de la respuesta estimada en blanco, la pendiente de la curva de calibración (m) y las proporciones señal/ruido de 3 y 10, de acuerdo con las siguientes expresiones [46]:

$$LD = \left[\frac{(Y_b + 3 \cdot S_b)}{m} \right] \quad LC = \left[\frac{(Y_b + 10 \cdot S_b)}{m} \right]$$

Las reproducibilidades intra e inter día fueron adecuadas, con desviaciones estándar inferiores al 3%. En la tabla 1 se resumen los parámetros analíticos.

Para comprobar que el método desarrollado es selectivo, fueron ensayados los excipientes utilizados en la formulación oral (carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa sódica, lactosa anhidra, estearato de magnesio, hipromelosa, dióxido de titanio, triacetina, monohidrato de óxido de hierro amarillo y carmín índigo) y llevados a cabo los ensayos clásicos de degradación forzada (hidrólisis, exposición a la luz artificial y oxidación) [46].

En los ensayos de degradación no se observó efecto sobre la señal voltamperométrica de naratriptan, durante la oxidación química o la hidrólisis alcalina (figura 11). Sin embargo, cuando la disolución con el fármaco fue expuesta a la luz día, se observó un 15% de disminución del pico de oxidación de naratriptan, no apareciendo ninguna nueva señal en el voltamperograma (figura 12).

Además, la señal del fármaco no se ve perturbada por la presencia de excipientes. En consecuencia, se concluye que el método desarrollado tiene la selectividad adecuada para su uso como herramienta de cuantificación de naratriptan en productos farmacéuticos, sin necesidad de separación previa o extracciones.

Tabla 1. Parámetros analíticos para el método voltamperométrico desarrollado.

Parámetro	VPD (E = 912 mV ± 8 mV)
Reproducibilidad intradía, CV (%)	2,7 ^a - 1,2 ^b
Reproducibilidad entre días, CV (%)	2,9 ^a - 1,4 ^b
Recuperación (%) ± d.e.	102,1 ± 1,8 ^c
Intervalo de concentración (mol L ⁻¹)	7,5×10 ⁻⁵ - 7,5×10 ⁻⁴
Curva de calibración (I _p , μA; C, mol L ⁻¹)	I _p = 28234×C + 1,91976 (r = 0,9997; n = 12)
Límite de detección (mol L ⁻¹)	9,5×10 ⁻⁶
Límite de cuantificación (mol L ⁻¹)	2,0×10 ⁻⁵

^aNivel de concentración de 2,5×10⁻⁴ mol L⁻¹; ^bNivel de concentración de 4,8×10⁻⁴ mol L⁻¹; ^cPromedio de 10 determinaciones a un nivel de concentración de 4,8×10⁻⁴ mol L⁻¹

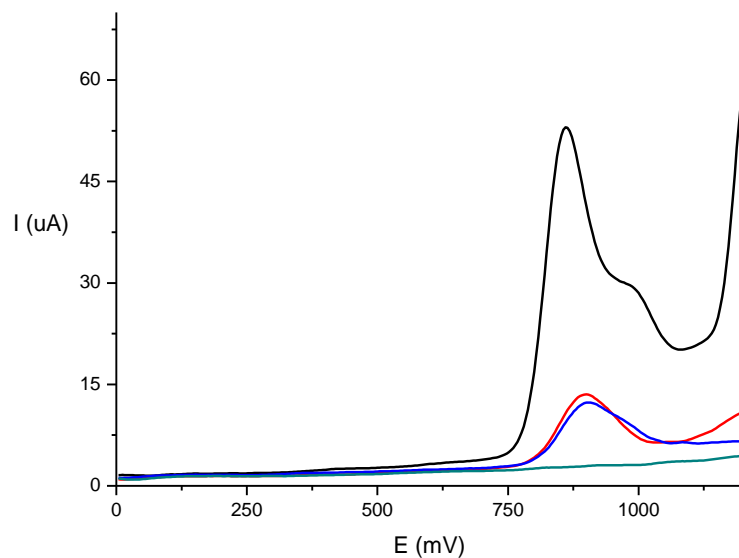


Figura 11. Voltamperogramas de pulso diferencial de los ensayos de degradación acelerada (en tampón Britton-Robinson pH 3). Naratriptan estándar 5×10^{-4} mol L⁻¹ (—), hidrólisis ácida (—), hidrólisis básica (—), blanco (—)

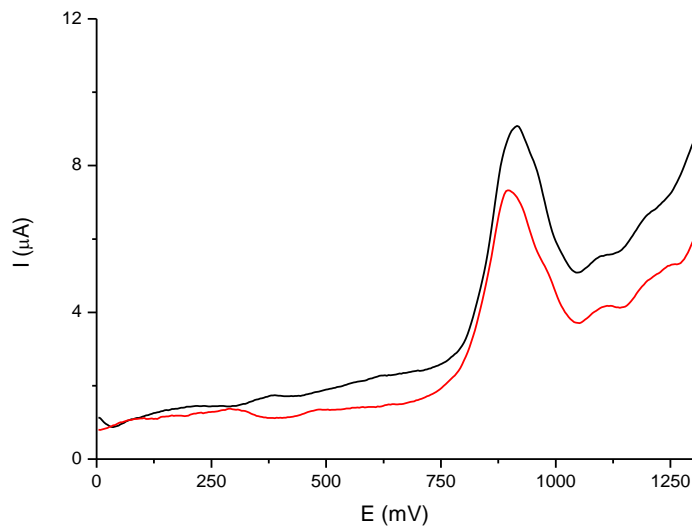


Figura 12. Voltamperogramas de pulso diferencial de los ensayos de degradación acelerada (en tampón Britton-Robinson pH 3). Naratriptan estándar $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—) y luego de 2 horas de exposición a la luz (—).

Finalmente, el método desarrollado se aplicó tanto a la valoración como al ensayo de la uniformidad de los comprimidos de naratriptan. En comparación se llevó a cabo también el análisis oficial de la Farmacopea, por HPLC-UV. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para estos ensayos. Ellos muestran una buena concordancia, sin diferencias estadísticamente significativas (evaluada con la prueba F para la proporción de varianzas y la prueba t de Student con una $p = 0,1106$). Además, en la tabla 3 se muestran los resultados relativos a la uniformidad de contenido para los comprimidos de naratriptan. Como se puede observar en esta tabla, todos los comprimidos analizados están dentro de $\pm 4,6\%$ de las cantidades declaradas.

Tabla 2. Resultados de la valoración de naratriptan en comprimidos comerciales^{1,2}.

	Naratriptan (%)	d.e. (%)	C.V. (%)
VDP	105,3	0,990	0,94
HPLC	102,7	0,874	0,85

¹Bagomigral® (comprimidos recubiertos; cantidad declarada: 2,5 mg de naratriptan como clorhidrato)

²Cada valor representa el promedio de dos muestras ensayadas por triplicado.

Tabla 3. Resultados del ensayo de uniformidad de contenido para naratriptan comprimidos, utilizando el método propuesto y el método HPLC¹.

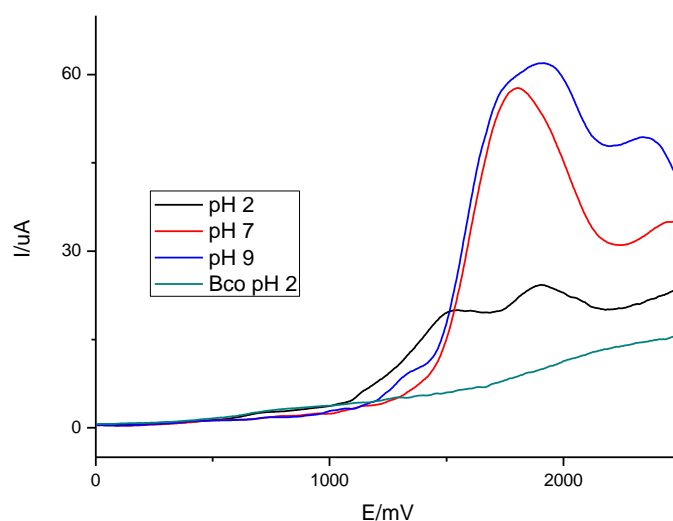
Comprimido	Porcentaje encontrado	
	VPD	HPLC
1	100,8	102,8
2	97,2	97,9
3	97,1	100,2
4	99,0	100,7
5	101,1	101,9
6	104,1	104,6
7	101,8	102,8
8	99,9	101,5
9	99,6	101,3
10	98,7	99,5
Promedio	99,9	101,3
d.e.	2,13	1,89
C.V. %	2,13	1,87

¹Bagomigral® comprimidos recubiertos (cantidad declarada: 2,5 mg de naratriptan como clorhidrato)

Esto cumple con el requisito de la Farmacopea para la uniformidad de contenido de comprimidos, que permite una tolerancia de la dosis de $\pm 15\%$ [8]. A través de una comparación de los resultados obtenidos en el ensayo de uniformidad de contenido, mediante la aplicación de una prueba F Snedecor (proporción de la varianza) y luego la prueba t de Student, se concluye que no hay diferencias significativas entre ellos y que son estadísticamente equivalentes.

3.3. Comportamiento electroquímico de modafinilo

Modafinilo es un fármaco que posee escasa solubilidad en medio acuoso y al estudiar su comportamiento electroquímico en medio mixto (tampón Britton-Robinson/acetonitrilo, 50/50) por voltamperometría de pulso diferencial, presentó dos señales poco definidas y de baja intensidad. En la figura 13 se muestra el efecto del pH en la respuesta anódica del modafinilo. Como puede verse en esta figura, a pH 2 se observan dos señales de baja intensidad de corriente, que se funden en una sola señal a medida que aumenta el pH y además se debe destacar que dichas señales a pH más alcalinos exhiben una pobre



repetibilidad.

Figura 13. Voltamperogramas de pulso diferencial de una disolución de modafinilo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a diferentes pHs en tampón Britton-Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ /acetonitrilo (50/50)

Por esta razón se optó por llevar a cabo los experimentos de electrooxidación en un medio no acuoso. Se ensayaron distintos medios (dimetilformamida, dimetilsulfóxido, acetonitrilo) y distintos electrolitos soporte (perclorato de tetrabutylammonio,

hexafluorofosfato de tetrabutylammonio). Al respecto, sólo se observó respuesta de oxidación cuando se empleó acetonitrilo como disolvente, probablemente debido a que es el que tiene la mayor ventana de oxidación de los tres disolventes ensayados. Respecto a los electrolitos soporte, se observa una respuesta análoga de modafinilo en acetonitrilo, tanto con perclorato como con hexafluorofosfato, con potenciales de oxidación muy cercanos. La diferencia entre ambos electrolitos soporte está dada fundamentalmente en que cuando se emplea perclorato de tetrabutylammonio, se obtienen respuestas con mayor intensidad de corriente. En consecuencia, y de acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó acetonitrilo como disolvente y perclorato de tetrabutylammonio (PTBA) como electrolito soporte, para los estudios posteriores en medio no acuoso.

Modafinilo presenta tres señales anódicas bien definidas al ser estudiado por voltamperometría de pulso diferencial en acetonitrilo. Los tres picos se presentan a elevados potenciales de oxidación: 1530 mV, 2030 mV y 2430 mV, sobre electrodo de carbón vítreo (figura 14).

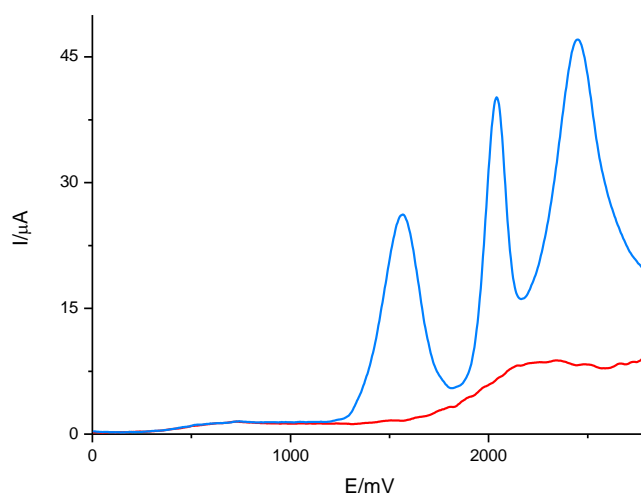


Figura 14. Voltamperograma de pulso diferencial de una disolución de modafinilo $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ en rojo: disolución blanco (acetonitrilo, PTBA 0,1 mol L $^{-1}$).

La electrooxidación de modafinilo también fue estudiada por voltamperometría cíclica. Los experimentos se llevaron a cabo a distintas velocidades de barrido (100–3000 mVs^{-1}), no exhibiendo señales en los barridos de vuelta, demostrando que la oxidación que sufre modafinilo en la superficie del electrodo es de carácter irreversible (figura 15).

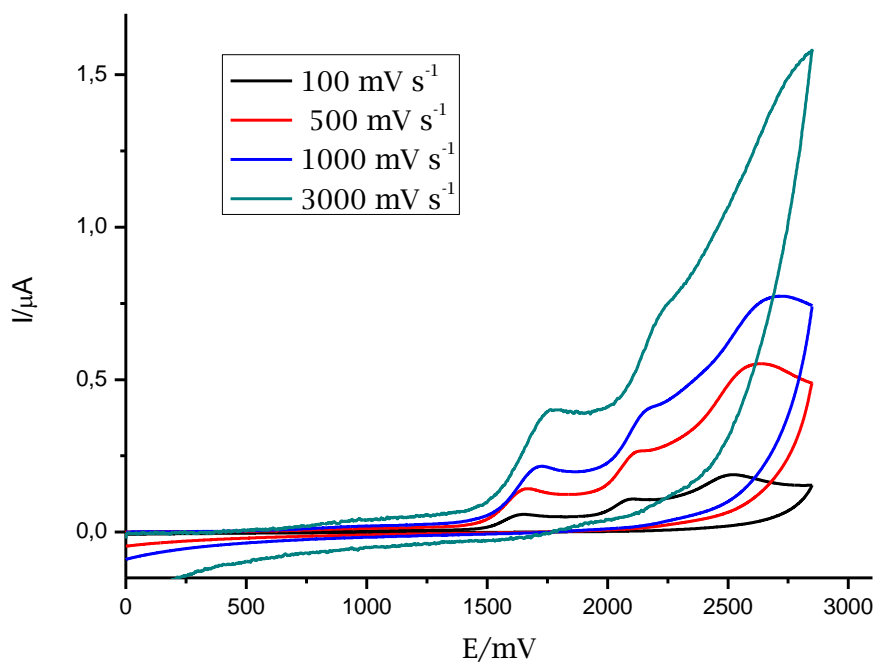


Figura 15. Voltamperogramas cíclicos de una disolución de modafinilo $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ en acetonitrilo, PTBA $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a diferentes velocidades de barrido entre 100 y 3000 mV .

Además la gráfica del logaritmo de la corriente de pico ($\log I_p$) versus el logaritmo de la velocidad de barrido ($\log v$), presenta una relación lineal en el mismo intervalo de velocidades de barrido previamente descrito. Dicha relación lineal entre corriente y velocidad de barrido está descrita por la siguiente expresión:

$$\log I_p = 0,434 \log v + 0,846 \quad (r^2 = 0,9995).$$

La pendiente obtenida es cercana a 0,5, dejando en evidencia que modafinilo experimenta un transporte difusivo hacia el electrodo. Por otra parte, al graficar la corriente de pico vs la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, se obtuvo la siguiente correlación lineal:

$$I_p(\mu A) = 0,475v^{1/2} (\text{mV s}^{-1}) + 5,2 (r = 0,986).$$

Los valores de correlación de I_p vs. $v^{1/2}$ y la pendiente del gráfico $\log I_p$ vs. $\log v$ confirman que el proceso es controlado por difusión [37]. Además, los valores de función de corriente ($I_p/v^{1/2}$) vs. $\log v$ fueron constantes con el incremento de la velocidad de barrido, en el intervalo de 50 a 3000 mV s^{-1} . Este comportamiento sugiere que el electrooxidación de modafinilo está libre de fenómenos de adsorción. [38,39].

De la estructura química de modafinilo (figura 2), las agrupaciones sulfóxido y amida podrían ser las responsables de la conducta anódica observada. Al respecto, existe escasa información sobre la oxidación de estos grupos en la literatura y mayoritariamente es de derivados de tipo aromático, a diferencia de modafinilo que es de tipo alquilo.

Se ha descrito la oxidación electroquímica del fármaco albendazol, un metilariltio derivado (5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il carbamato), generando los correspondientes derivados sulfóxido y sulfona, por la técnica de electrólisis a potencial controlado en carbón vítreo como electrodo de trabajo [47]. Del mismo modo, para el fármaco isoniazida (isonicotinhidrazida) se ha observado un pico anódico, que se atribuye a la oxidación irreversible de la fracción amida de la molécula del fármaco [48].

En otro estudio, Shono y cols. informaron respecto de la electrooxidación de una serie de amidas en metanol, vía dos electrones, como un método práctico para introducir un grupo metoxilo a la posición vecina al átomo de nitrógeno. Estos estudios también sugirieron que el paso de iniciación de la oxidación implica la transferencia de electrones, a partir del par de electrones del átomo de nitrógeno, al ánodo. Todas las amidas estudiadas poseen potenciales de oxidación sobre 2000 mV (vs SCE), en acetonitrilo y platino como electrodo de trabajo [49].

Anteriormente, O'Donnell y Mann describieron un estudio detallado de la oxidación anódica de una variedad de amidas primarias, secundarias y terciarias en disolución de acetonitrilo y electrodo de platino. Sobre la base de análisis de productos, experimentos de coulombimetría a potencial controlado y voltamperometría cíclica, y un examen del efecto de la concentración de agua, postulan un mecanismo, encontrando que en la electrooxidación de amidas primarias sólo un electrón está involucrado en el proceso subsiguiente de reacción radicalaria, a diferencia con amidas secundarias y terciarias, en el que se observó dos electrones en el proceso de oxidación [50].

Con el propósito de determinar el número de electrones transferidos en la oxidación de modafinilo se llevaron a cabo experimentos de electrólisis a potencial controlado. Las primeras electrólisis se realizaron a 2000 mV, donde no se pudo determinar el número de electrones. Puede ser que esto se haya debido a que tras la oxidación se generaran reacciones secundarias, comunes cuando se lleva a cabo la electrólisis de una molécula orgánica a potenciales tan elevados. No obstante, cuando se realizó esta electrólisis a 1600 mV, se determinó que 1,6 electrones están involucrados en la primera señal anódica.

Cuando esta electrólisis fue seguida por HPLC-UV (figura 16) se observaron tres situaciones: a) el pico correspondiente al modafinilo (tr 5,9 min) desaparece después de 2,5 horas de electrólisis, b) aparecen una serie de señales a elevados tiempos de retención a las 2,5 horas de electrólisis, mas no se observan al cabo de las 7 horas de electrólisis y c) una serie de nuevas señales aparecen a bajos tiempos de retención, seguidas de una señal de intensidad similar a modafinilo, a un tr de 14 min.

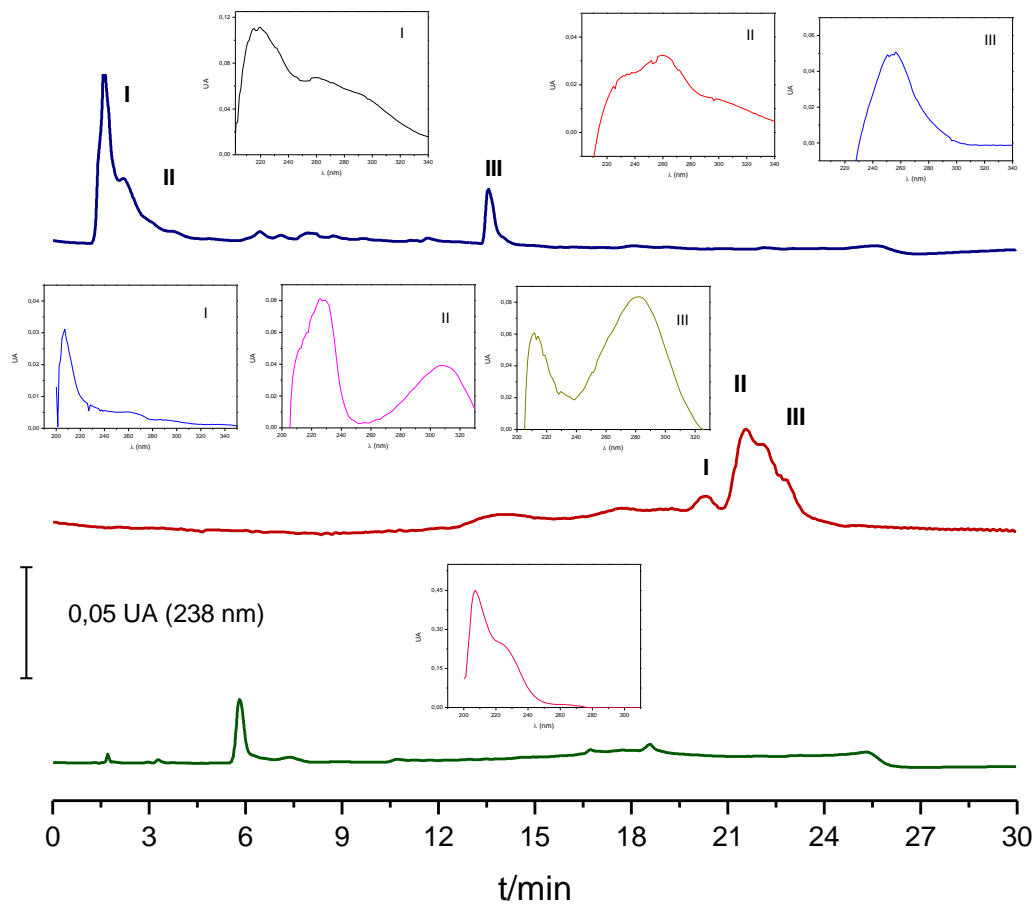


Figura 16. Cromatogramas de electrólisis de modafinilo. Tiempo 0 (—), tiempo 2,5 h (—), tiempo 7 h (—)

Al comparar los espectros UV de cada nueva señal generada con los de datos obtenidos de literatura, podemos postular que cada señal se correspondería con los derivados modafinilo ácido y modafinilo sulfona, respectivamente [29].

Teniendo en cuenta el resultado de 1,6 electrones obtenidos en los estudios coulométricos, utilizando el electrodo de disco rotatorio se obtuvo el coeficiente de difusión correspondiente a la primera señal de oxidación de modafinilo en acetonitrilo. Para reacciones irreversibles, la relación entre la corriente límite y la velocidad de rotación está dada por la ecuación Levich, previamente descrita para naratriptan. De esta forma, y empleando un valor de viscosidad cinemática de $4,02 \times 10^{-4}$ (cm² s) para acetonitrilo, se obtuvo un coeficiente de difusión de $3,2 \times 10^{-5}$ (cm² s⁻¹) para modafinilo, de la pendiente de la gráfica de Levich (I_{lim} vs $\omega^{1/2}$).

3.4. Metodología voltamperométrica para la cuantificación de modafinilo

De las condiciones experimentales ensayadas, se seleccionó la segunda señal de modafinilo a 2030 mV en acetonitrilo con fines de análisis, debido a su mejor reproducibilidad y respuesta lineal. En estas condiciones, la corriente pico se mantiene estable, la señal está bien resuelta y presenta mejor repetibilidad que la señales 1 y 3. Además, la señal varía linealmente con la concentración de modafinilo entre $2,5 \times 10^{-4}$ y $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Los límites de detección (LD) y los de cuantificación (LC) del método se calcularon mediante la media (Y_b) y la desviación estándar (S_b) de la respuesta estimada en blanco, de acuerdo con expresiones informadas previamente para naratriptan [46]. Las reproducibilidades intra e inter día fueron adecuadas, con desviaciones estándar relativas inferiores al 3%. En la tabla 4 se resumen los parámetros analíticos obtenidos.

Tabla 4. *Parámetros analíticos para el método voltamperométrico desarrollado.*

Parámetro	VPD (E =2030mV ± 6 mV)
Reproducibilidad intradía, CV (%)	0,4% ^a
Reproducibilidad entre días, CV (%)	1,8% ^a
Recuperación (%) ± d.e.	95,0 ± 6,4 ^b
Intervalo de concentración (mol L ⁻¹)	2,5×10 ⁻⁴ - 2,5×10 ⁻³
Curva de calibración (I _p , μA; C, mol L ⁻¹)	I(μA)=2,518×10 ⁻³ ×C(M) - 0,0178 r=0,9996
limite de detección (mol L ⁻¹)	1,88×10 ⁻⁴
limite de cuantificación (mol L ⁻¹)	2,03×10 ⁻⁴

^aNivel de concentración de 5×10⁻⁴ mol L⁻¹; ^bPromedio de 10 determinaciones a un nivel de concentración de 5×10⁻⁴ mol L⁻¹

Para comprobar la selectividad del método propuesto, se ensayaron los excipientes típicos utilizados en las formulaciones orales y además modafinilo fue sometido a ensayos de degradación acelerada (hidrólisis, la exposición a la luz artificial y oxidación). Ninguno de los excipientes ensayados interfirió con la señal analítica de modafinilo, encontrando una recuperación media de 95,0 ± 6,4%.

Por otra parte, en los ensayos de degradación acelerada los resultados obtenidos fueron los siguientes: a) no se observó ningún cambio en el voltamperograma del ensayo de oxidación, b) se observó una disminución de la señal analítica y la aparición de nuevas señales en el ensayo de fotodegradación, c) Para el ensayo de hidrólisis se encontró una disminución en la primera y tercera señal de modafinilo, pero sin efecto sobre la señal analítica. A partir de estos experimentos, podemos concluir que el método voltamperométrico propuesto exhibe una selectividad adecuada para ser usada como herramienta de

cuantificación de modafinilo en el sector farmacéutico, sin necesidad de separación previa o extracciones. En la figura 17 se muestran los voltamperogramas representativos de cada ensayo de degradación forzada.

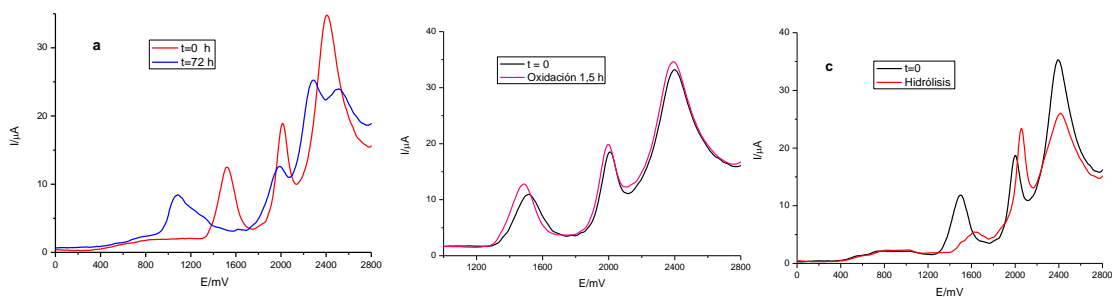


Figura 17. Voltamperogramas de pulso diferencial de ensayos de degradación acelerada de modafinilo $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. a) fotólisis, b) oxidación y c) hidrólisis.

Finalmente, el método desarrollado se aplicó tanto a la valoración como al ensayo de la uniformidad de los comprimidos de modafinilo. En comparación se llevó a cabo también el análisis por HPLC. Los resultados obtenidos de estos ensayos se presentan en las tablas 5 y 6.

De la información que se desprende de dichas tablas, es que por el método voltamperométrico previamente desarrollado y validado, se encuentra un 30% menos del valor declarado de modafinilo en los envases comerciales, tanto en el ensayo de valoración como en el de uniformidad de contenido, ambos comparados con HPLC. Pese a que para el ensayo de recuperación se emplearon los excipientes clásicos para una forma farmacéutica sólida, en los comprimidos comerciales existe la presencia de uno o más excipientes (desconocidos), que interfieren en la determinación voltamperométrica de modafinilo. Puesto que los valores obtenidos por HPLC se acercan al valor teórico (alrededor de un 100%), el

efecto de los excipientes no estaría dado por una retención del principio activo en la fase de solubilización. En consecuencia, con toda probabilidad lo que estaría ocurriendo es que uno o más excipientes estarían bloqueando la superficie del electrodo de carbono vítreo, impidiendo el acceso de modafinilo, o bien que generen un cambio de viscosidad importante en el medio de trabajo, de tal forma que afecten el coeficiente de difusión del analítico y con ello una pérdida constante de alrededor de un 30% en las determinaciones.

Tabla 5. *Ensayo de valoración para modafinilo¹ (método de la curva de calibración)*

	%	d.e. (%)	CV (%)
VPD	71,8	1,5	1,5
HPLC	98,1	2,3	2,3

¹Comprimidos de 100 mg de modafinilo

Tabla 6. *Ensayo de Uniformidad de contenido para modafinilo¹*

	VPD (%)	HPLC (%)
Promedio	71,6	100,5
d.e. (%)	3,2	3,0
CV (%)	3,2	3,0

¹Comprimidos de 100 mg de modafinilo

Para subsanar este problema y eliminar el efecto de matriz se recurrió al método de adición estándar en lugar de la curva de calibración. Este método es particularmente útil cuando no se conocen por completo los componentes de la matriz, y consiste en la adición de cantidades crecientes del analito de interés a una cantidad fija de muestra. Para esto se pesaron 10 comprimidos de modafinilo, se pulverizaron, homogeneizaron y se tomó una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de modafinilo, los que se disolvieron en 25 mL de acetonitrilo y electrolito soporte. A esta disolución se le registró su voltamperograma y posteriormente se agregaron sucesivamente alícuotas de 100, 200 y 250 μ L de una

disolución stock de modafinilo, registrándose en cada caso el voltamperograma correspondiente. Los valores de corrientes de pico obtenidas de cada voltamperograma se correlacionaron con las correspondientes cantidades de modafinilo agregadas, calculándose así la cantidad de modafinilo en los comprimidos por extrapolación en esta nueva curva, cuando la corriente es igual a cero ($I_p (\mu A) = 1178 C (\text{mol L}^{-1}) - 0,1735$). Los resultados del ensayo de valoración se presentan en la tabla 7. Como puede observarse de esta tabla, ahora sí los resultados obtenidos por voltamperometría de pulso diferencial y HPLC son comparables y cercanos ambos al valor declarado de modafinilo.

Tabla 7. *Ensayo de valoración para modafinilo¹ (método de adición estándar)*

	%	d.e. (%)	CV (%)
VPD	96,5	1,7	1,7
HPLC	98,1	2,3	2,3

¹Comprimidos de 100 mg de modafinilo

4. CONCLUSIONES

- Naratriptan exhibe respuesta anódica en medio acuoso (disolución tampón Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹) cuando se estudió por voltamperometría de pulso diferencial con electrodos de carbón vítreo.
- La onda de oxidación es pH dependiente, desplazándose a potenciales más negativos a medida que aumenta el pH.
- El potencial varió linealmente con el pH con dos quiebres a pH 4 y 9, que se deberían probablemente a un cambio en el equilibrio de protonación-desprotonación de la especie electroactiva.
- La oxidación de naratriptan es de carácter irreversible.
- El proceso de oxidación en el electrodo de carbón vítreo es de carácter difusivo.
- De acuerdo al comportamiento electroquímico y la comparación con una molécula análoga (melatonina) se propone un mecanismo de oxidación para el grupo indólico de naratriptan, vía dos electrones.
- Basado en el estudio electroquímico se seleccionó pH 3 en tampón Britton-Robinson para desarrollar una metodología analítica por voltamperometría de pulso diferencial.
- La metodología desarrollada exhibió figuras de mérito y selectividad adecuadas para su uso como herramienta de cuantificación de naratriptan en productos farmacéuticos, sin necesidad de separación previa o extracciones.
- La metodología desarrollada se aplicó a la determinación de la valoración y uniformidad de contenido de comprimidos comerciales de naratriptan.
- La oxidación de modafinilo en disolución tampón Britton-Robinson/acetonitrilo, 50/50 por voltamperometría de pulso diferencial, presentó dos señales poco definidas y de baja intensidad.

- Modafinilo presenta tres señales anódicas bien definidas al ser estudiado por voltamperometría de pulso diferencial en acetonitrilo. Los tres picos se presentan a elevados potenciales de oxidación: 1530 mV, 2030 mV y 2430 mV, sobre electrodo de carbón vítreo
- Modafinilo experimenta un proceso de difusión en la superficie del electrodo de carbón vítreo.
- Los experimentos de electrolisis a potencial controlado a 1600 mV revelaron una transferencia de 1,6 electrones.
- El coeficiente de difusión para modafinilo es de $3,2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, derivado de la pendiente de la gráfica de Levich (I_{lim} vs $\omega^{1/2}$).
- Se seleccionó la segunda señal de modafinilo a 2030 mV en acetonitrilo con fines de análisis, debido a su reproducibilidad mejor y más amplia gama de respuesta lineal.
- El método desarrollado por voltamperometría de pulso diferencial exhibió figuras de mérito adecuadas para su aplicación a la cuantificación de modafinilo como materia prima, empleando el método de la curva de calibración.
- El método desarrollado por voltamperometría de pulso diferencial no tuvo la selectividad adecuada para su aplicación a la determinación de modafinilo en formas farmacéuticas, ya que los excipientes contenidos en la formulación interfirieron en los ensayos de valoración.
- El problema de la interferencia de la matriz se subsanó al emplear el método de la adición estándar.

5. REFERENCIAS

- [1] S. Sweetman (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, Pharmaceutical Press, London, 2005, (Electronic version, Edition 2005).
- [2] P.J. Goadsby, A.R. Charbit, A.P. Andreou, S. Akerman, P.R. Holland, *Neuroscience* 161 (2009) 327.
- [3] B.D. Duléry, M.A. Petty, J. Schoun, M. David, N.D. Huebert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1009.
- [4] K. Vishwanathan, M.G. Bartlett, J.T. Stewart, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 168.
- [5] M.L. Christensen, S.K. Eades, E. Fuseau, R.D. Kempsford, S.J. Phelps, L.J. Hak, *J. Clin. Pharmacol.* 41 (2001) 170.
- [6] K.D. Altria, R. McLean, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18 (1998) 807.
- [7] U. Sampath Kumar, V. Ravi Sankar, S. Bharani Kumar, M. Pandi Prabhu, S. Mahender Rao, *Org. Process Res. Dev.* 13 (2009) 468.
- [8] USP 30-NF 25, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA, 2007.
- [9] C. Saka, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 39 (2009) 32.
- [10] M.J. Minzenberg, C.S. Carter. *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 1477–1502.
- [11] J.W. Young, M.A. Geyer. *Biol. Psychiatry.* 67 (2010) 784–787.
- [12] M. Goswami, S. R. Pandi-Perumal, M. J. Thorpy. *Narcolepsy: A Clinical Guide*. Springer New York. 2010, Part 4, 287-294
- [13] Jr. P. Robertson, E.T. Hellriegel. *Clin Pharmacokinet.* 42 (2003) 123–137.

- [14] S.H. Gorman. *J. Chromatogr. B*, 767 (2002) 269–276.
- [15] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* 2004. The Pharmaceutical Press. 2005. Electronic version.
- [16] S.H. Gorman, *J. Chromatogr. B* 730 (1999) 1–7.
- [17] H.A. Schwertner, S.B. Kong. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 475–479.
- [18] Q.B. Cass, T. Ferreira Galatti. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 937–944.
- [19] F. Badouda, E. Grataa, L. Perrenouda, M. Saugya, S. Rudazb, J.-L. Veuthey. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4423–4433.
- [20] K. Deventer, O.J. Pozo, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 5819–5827.
- [21] G.J. Murray, J.P. Danaceau. *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 3857–3864.
- [22] S.M.R. Stanley, H. Ching Foo. *J. Chromatogr. B*, 836 (2006) 1–14.
- [23] Y.L. Tseng, V. Uralets, C.-T. Lin, F.-H. Kuo. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 1042–1045.
- [24] S. Strano-Rossia, C. Colamonicia, F. Botrè. *Anal. Chim. Acta* 606 (2008) 217–222.
- [25] A.R. Makinney, C.J. Suann, A.M. Stenhouse, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1217–1220
- [26] P. Bernat, F. Robles, Bernord Do, *J. Chromatogr. B* 706 (1998) 295–304.
- [27] G. Moachon, D. Matinier, *J. Chromatogr. B* 654 (1994) 91–96.
- [28] K.M. Al Azzam, B. Saad, H.Y. Aboul-Enein, A.A. Elbashir. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Tech.* 33 (2010) 167 – 178.

- [29] R.N. Rao, D.D. Shinde, M.V.N. Kumar Talluri. *Talanta* 73 (2007) 407–414.
- [30] Th. Becue, *J Chromatogr.* 557 (1991) 489–494.
- [31] J.E. Drouin, M. Broquaire, *J Chromatogr.* 605 (1992) 19–31.
- [32] USP 32-NF 27. United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville M.D. USA, 2008.
- [33] I.F. Hu, D.H. Karweik, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.* 188 (1985) 59.
- [34] J.L. Castro, I. Collins, M.G.N. Russell, A.P. Watt, B. Sohal, D. Rathbone, M.S. Beer, J.A. Stanton, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 2667.
- [35] X. Shen, J. Lind, Gabor. Merényi, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 4403.
- [36] S. Solar, N. Gtoff, P.S. Surdhar, D.A. Armstrong, A. Singh, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 3639.
- [37] D.K. Gosser (Ed.), *Cyclic Voltammetry*, VCH, New York, 1994.
- [38] E.R. Brown, R.F. Large, A. Weissberger, B.W. Rossiter (Eds.), *Physical Methods of Chemistry*, Wiley Interscience, Rochester, New York, 1964, p. 423.
- [39] R.N. Goyal, V.K. Gupta, M. Oyama, N. Bachheti, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 65.
- [40] R.N. Goyal, A. Sangal, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 2135.
- [41] Y.A. Udum, M. Dödükçü, F. KöHeli, *React. Func.I Polym.* 68 (2008) 861.
- [42] K. Sagar, Z.M.F. Alvarez, C. Hua, R.M. Smyth, R. Munden, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2 (1992) 17.
- [43] H. Lund, in: H. Lund, O. Hammerich (Eds.), *Organic Electrochemistry*, 4th Ed., Marcel Dekker, New York, 2001, p. 454.

- [44] A. Anne, J. Moiroux, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 2816.
- [45] K.Q. Ling, T. Ren, J.D. Protasiewicz, L.M. Sayrea, *Tetrah. Lett.* 43 (2002) 6903.
- [46] O.A. Quattrochi. S.A. De Andrizzi, R.F. Laba, *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica*, Artes Gráficas Farro, SA, Argentina, 1992.
- [47] R. Galvão de Lima, P. Sueli Bonato, R. Santana da Silva. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 337-343.
- [48] E. Hammam, A.M. Beltagib, M.M. Ghoneim. *Microchem. J.* 77 (2004) 53–62.
- [49] T. Shono, Y. Matsumura, K. Tsubata, K. Uchida, T. Kanazawa, K Tsuda. *J. Org. Chem.* 49 (1984) 3711-3716.
- [50] J.F. O'donnell, C.K. Mann. *J. Electroanal. Chem.* 13 (1967) 157-162.