

Artículo original

Determinación voltamétrica de citrato de sildenafil en formulaciones farmacéuticas.

Voltammetric determination of sildenafil citrate in pharmaceuticals formulations

Ortiz Reynaldo^{1*}, Nava Lismar¹, Martínez Yris¹, Weinhold Elkis¹, Paredes Andreina²

¹Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias. ²Cátedra de Materiales Dentales, Facultad de Odontología; Universidad de Los Andes, Mérida CP 5101, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido: noviembre de 2016 – Aceptado: mayo de 2017

RESUMEN

Se desarrolló un método voltamperométrico simple para la determinación de citrato de sildenafil (CS). El método se basa en la reducción catódica directa del CS sobre un electrodo de carbón vítreo modificado con una película plomo (Pb/CV) en solución reguladora de acetato. La respuesta voltamperométrica de CS sobre Pb/CV, muestra dos picos uno a $-1,15$ y otro a $-1,25$ V. Los resultados experimentales indican una excelente correlación lineal entre la corriente de pico y la concentración, en un rango de 2×10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M para ambos picos. Los límites de detección (LOD) de CS fueron $1,1 \times 10^{-6}$ y $5,2 \times 10^{-6}$ M, usando voltametría de barrido lineal y voltametría de pulso diferencial, respectivamente. El método fue aplicado con éxito a la determinación de CS en formulaciones comerciales (comprimidos y tabletas orodispersables), encontrándose valores muy similares a los declarados por el fabricante; los resultados se contrastaron con los obtenidos por un método espectrofotométrico reportado y no se encontraron diferencias estadísticas significativas.

PALABRAS CLAVES

Electrodo de película de plomo, citrato de sildenafil, determinación, voltametría.

ABSTRACT

A simple voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (SC) was developed. The method is based on the direct cathodic reduction of SC on a lead film modified glassy carbon electrode (LF/GCE) in acetate buffer. Voltammetric response of SC at LF/GCE, shows two peaks at -1.15 V and -1.25 V. Experimental results indicate an excellent linear correlation between the peak current and concentration in the range of 2×10^{-5} to $1,2 \times 10^{-4}$ M for both peaks. The detection limits (LOD) for SC were equal to 1.1×10^{-6} and 5.2×10^{-6} M, using Linear Sweep and Differential Pulse voltammetry,

respectively. The method was successfully applied to the determination of SC in pharmaceutical formulations (Pills and Orodispersible tablets) and the contents were in close agreement with those quoted by the manufacturer. The results were compared with those obtained by a reported spectrophotometric method and no statistically significant differences were found.

KEY WORDS

Lead film electrode, sildenafil citrate, determination voltammetry.

INTRODUCCIÓN

El Citrato de Sildenafil es un fármaco inhibidor selectivo del guanosín monofosfato cíclico (GMPc), específicamente de la isoenzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE5) una de las siete isoenzimas conocidas en el cuerpo humano, que es la responsable de la degradación del GMPc encontrado en el cuerpo cavernoso del pene y en el endotelio del músculo liso de los pulmones [1], de esta manera el fármaco actúa selectivamente en estas dos áreas.

El Citrato de Sildenafil (CS) (1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazolo [4,3-d] pirimidin-5-il)-4etoxifenil] sulfonil]-4-metilpiperazina citrato) (Fig. 1), es un polvo blanco cristalino con solubilidad de $3,5$ mg/mL en agua a 25 °C y peso molecular de $666,7$ g/mol. Existe una amplia gama de laboratorios especializados en la producción de este fármaco, que a nivel comercial se presenta mayoritariamente en comprimidos y tabletas, que declaran un contenido de 25 mg, 50 mg y 100 mg de CS para la administración oral. Además del ingrediente activo, cada tableta generalmente contiene excipientes como: celulosa microcristalina, fosfato dibásico de calcio anhidro, croscarmelosa de sodio, estereato de magnesio, con una cubierta pelicular de: hidroxipropil metilcelulosa, dióxido de titanio, lactosa, y triacetin.

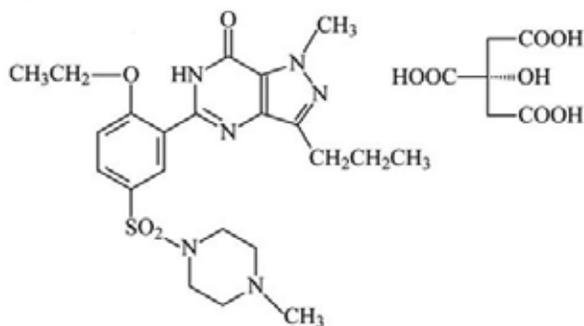


Fig. 1. Estructura molecular del Citrato de Sildenafil.

Debido a su propiedad farmacológica, el CS ha sido empleado desde 1998 en el tratamiento de la disfunción eréctil, en la hipertensión pulmonar, tromboembolismo pulmonar crónico y otras afecciones que actualmente están en estudio [2].

El CS, inicialmente fue diseñado para tratar la hipertensión pulmonar y la angina de pecho; los primeros ensayos clínicos fueron realizados en el Hospital de Morriston, en Swansea (Gales). Durante los estudios de fase I, se sugirió que la droga tenía un ligero efecto en la angina, pero que podía inducir notables erecciones de pene [3]. Debido a dichos resultados médicos, el Laboratorio Pfizer tomó la decisión de comercializar este inhibidor de la PED5, con el nombre de Viagra®, para tratar la disfunción eréctil. La patente del mismo fue obtenida en 1996 y aprobado para tal uso por la Administración de alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) el 27 de marzo 1998 [3]; desde entonces, Viagra® se había convertido en uno de los fármacos más comercializados en todo el mundo, llegando a 6 millones de prescripciones en sus primeros 6 meses. Como resultado de dicha demanda, Viagra® está entre las drogas más adulteradas en el mundo[4,5], por otra parte, la patente de fabricación de Viagra® expiró en junio de 2010, por lo cual una gran cantidad de laboratorios farmacéuticos comenzaron a producir y comercializar numerosas versiones del medicamento genérico y similares a la Viagra®; a pesar de esto, hasta donde se sabe, no existe registro de un método oficial para la determinación de CS y control de calidad de estas formulaciones, ni en las farmacopeas, ni en el compendio internacional. Por lo tanto ha sido fundamental desarrollar métodos analíticos, seguros, rápidos, simples y de bajo costo para el control de calidad de estas formulaciones, con el fin de proteger la salud de los consumidores.

En la literatura se reportan numerosos métodos para la identificación, caracterización y cuantificación de CS en varias matrices, entre ellos están los basados en la cromatografía líquida de alto rendimiento con detección ultravioleta (HPLC-UV) [5-7], cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [8-10],

espectroscopia UV-Visible[11-15], resonancia magnética nuclear[16], difracción de rayos x [17], espectrofluorometría [18] y espectrometría de masas de alta resolución [19].

Los métodos más utilizados hoy día para el control de calidad del CS [20,21], se basan en HPLC-UV debido al hecho de que esta técnica proporciona un análisis robusto y selectivo. También permite el análisis del ingrediente activo en muestras complejas. Aunque las técnicas cromatográficas son las más utilizadas en el control de calidad farmacéutico de drogas, estas implican análisis de altos costos, complejidad de operación y alto consumo reactivos, lo que genera gran cantidad de desechos y en muchos casos se requiere de la separación previa del analito para su determinación. También algunas empresas de medicamentos usan la técnica de espectroscopia UV-visible para control de calidad, debido a la sencillez del método.

La molécula de sildenafil es susceptible a reaccionar vía electroquímica tanto a oxidación como a reducción, debido a la presencia en su estructura de grupos funcionales electroquímicamente activos; el grupo oxidable es el anillo de piperazina, sin embargo, este mecanismo aún no ha sido estudiado detalladamente.

El mecanismo de reducción electroquímica ha sido bien estudiado y se ha propuesto que puede ocurrir sobre el grupo sulfonilo para producir sulfóxido y / o sobre el carbonilo del anillo pirimidínico para generar un grupo alcohólico [22] (Fig. 2); debido a esto, en las últimas décadas, se han publicado algunos trabajos que han enfocado su objetivo en el estudio de las propiedades y determinación electroquímica del CS.

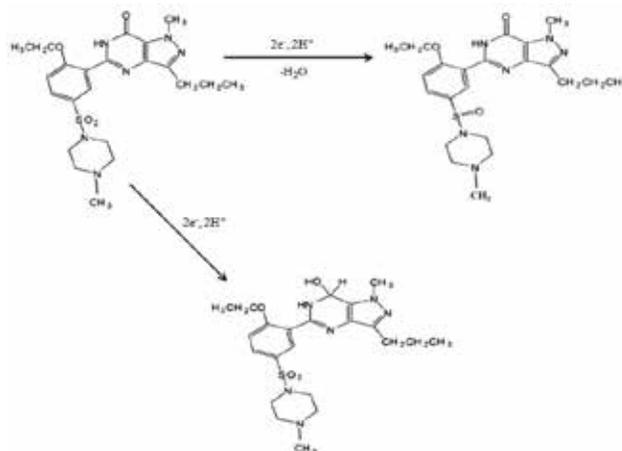


Fig. 2. Esquema de reacción I.

En el año 2000, Berzas y col. [19], estudiaron el comportamiento electroquímico del CS mediante voltametría, sobre un electrodo de gota colgante de mercurio y en el año 2004 estos mismos investigadores [22], reportaron la aplicación de la voltametría de onda cuadrada tanto directa como adsorbtiva sobre electrodo de gota colgante de mercurio

para la determinación de CS y de su metabolito (UK-103,320), en muestras biológicas (orina y suero humano). Realizaron curvas de calibración mediante voltametría adsorptiva con un tiempo de acumulación de 10 s para la determinación de CS en muestras de orina y suero sanguíneo, obteniendo límites de detección en el orden de 10^{-8} M, demostrando que el CS y su metabolito se pueden determinar en este tipo de muestras a bajos niveles de concentración.

También en el año 2004, Özkan y colaboradores [9], estudiaron la oxidación electroquímica del CS sobre Carbón Vítreo usando voltametría cíclica y propusieron un método para la determinación rápida del CS en formulaciones farmacéuticas, mediante voltametría cíclica (VC), voltametría de pulso diferencial (VPD) y de onda cuadrada (VOC). Determinaron que las condiciones más adecuadas para las cuantificaciones de CS, era usando como medio electrolítico dos soluciones buffer de fosfato distintas; una a pH 2,0 y otra a pH 3,5, obteniendo, curvas de calibración lineales y límites de detección [35,36] de $5,9 \times 10^{-6}$, $6,9 \times 10^{-7}$ y $6,8 \times 10^{-7}$ M para VC, VPD y VOC respectivamente a pH 2 y $1,6 \times 10^{-6}$, $1,0 \times 10^{-6}$, $1,1 \times 10^{-6}$ M para VC, VPD y VOC respectivamente a pH 3,5.

Posteriormente en el año 2010, Tyszcuk y Korolczuk [23], desarrollaron un método voltamétrico altamente sensible y simple para la determinación de CS, basado en la acumulación por adsorción de CS en un electrodo de carbón vítreo modificado con una película delgada de plomo (Pb/CV) y luego una etapa de redisolución mediante un barrido catódico, utilizando voltametría de onda cuadrada. Como medio electrolítico utilizaron una solución reguladora de ácido acético / acetato de sodio a pH 5. Los resultados experimentales luego de la optimización del tiempo y potencial de acumulación, mostraron una excelente correlación lineal entre la corriente pico y la concentración de CS en el intervalo de entre 2×10^{-9} a $1,5 \times 10^{-7}$ M, utilizando 30 s como tiempo de acumulación a un potencial de -0,75 V. Reportan límites de detección (LOD) 9×10^{-10} M y $4,5 \times 10^{-9}$ M. El método propuesto fue aplicado a la determinación de CS en dos formulaciones farmacéuticas (Viagra® 25 y Viagra® 50) obteniéndose valores de recuperación de 102 y 101%.

Para el año 2011, Frag E. y colaboradores [24], realizaron un trabajo comparativo de la electroactividad de un electrodo convencional de pasta de carbón y un electrodo de carbón serigrafiado, para la determinación de CS en tabletas de formulaciones farmacéuticas, encontrando que ambos electrodos muestran una respuesta lineal para un intervalo de concentración entre $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ M, con una buena reproducibilidad. Mediante determinación potenciométrica obtuvieron límites de detección de $9,0 \times 10^{-8}$ y $3,5 \times 10^{-7}$ M para el electrodo convencional de pasta de carbón y el electrodo de carbón serigrafiado respectivamente.

En otro trabajo realizado por Hanna y col. en el año 2012 [25], se reporta un método rápido y sencillo para la determinación de CS, empleando voltametría de redisolución catódica, en una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 4,5)

en presencia de oxígeno, usando un electrodo de trabajo, carbón vítreo (GCE) con una película de bismuto depositada ex situ (BIFE), encontrando un límite de detección de $1,8 \times 10^{-8}$ M usando 120 s de tiempo de acumulación, con lo cual obtuvieron una buena correlación lineal en el rango de concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ M.

En este mismo año, López y col. [3]; estudiaron la determinación del CS en diversas formulaciones farmacéuticas mediante el análisis por inyección de flujo (FIA) con detección amperométrica de pulsos múltiples, usando un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) como electrodo de trabajo; en el estudio se alcanzó un límite de detección en el orden de 10 nmol/L, con una desviación estándar relativa de menos del 0,2% para una concentración de CS de $4,5 \times 10^{-5}$ M.

Delolo y colaboradores en 2014 [26], proponen la construcción de un sensor electroquímico para la detección de analitos orgánicos; en este caso CS y acetaminofén. Para ello usaron un electrodo de carbón vítreo modificado con una película de Rutenio-Quitosano, el cual fue preparado mediante la liofilización de una solución contentiva del complejo mer-[$\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{H}_2\text{O})$] y quitosano en cloruro de metileno. Obtuvieron valores de límite de detección y cuantificación de 10,7 y 35,6 μM respectivamente a pH 1,0.

Más recientemente en el año 2015, Farghali y col. [27]. Fabricaron un sensor electroquímico para la determinación de citrato de sildenafil, mediante electrodeposición de nanopartículas de oro (AuNPs) sobre un electrodo de carbono vítreo serigrafiado (SPGCE); utilizaron voltametría cíclica para caracterizar el comportamiento redox del CS en ausencia y presencia de AuNPs. Observaron una mejor respuesta del electrodo SPGCE para la determinación CS en presencia de AuNPs. Las corrientes de pico para CS en AuNPs / SPGCE muestran una respuesta lineal en el intervalo de concentración de $1,8 \times 10^{-6}$ a $3,3 \times 10^{-5}$ M con buena reproducibilidad. Obtuvieron un límite de detección de $5,2 \times 10^{-10}$ M y encontraron que concentraciones altas de ácido ascórbico y ácido úrico no interfieren en las determinaciones. El sensor modificado se aplicó con éxito para la determinación de CS en muestras de orina humana artificial y formulaciones farmacéuticas.

En el 2016, Ochiai y col. [28], propusieron un sensor potenciométrico sensible y selectivo para la determinación indirecta de CS, consistente de películas de polipirrol (PPy) dopadas con iones citrato, para lo cual, electropolimerizaron pirrol en presencia de iones citrato en condiciones galvanostáticas, sobre la superficie de un electrodo de grafito. En condiciones optimizadas, el dispositivo presenta un rango dinámico lineal para concentraciones de iones citrato que varían desde 0,034 hasta 1,7 mM con una pendiente de Nernst de $57,2 \text{ mV.dec}^{-1}$ y un límite de detección de 30 μM . El sensor potenciométrico desarrollado, se aplicó para la determinación de CS en formulaciones farmacéuticas y los resultados se compararon con un método espectrofotométrico, obteniéndose una buena concordancia para un nivel de

confianza del 95%.

Como se mencionó anteriormente, el citrato de sildenafil, es una sustancia que ha causado un altísimo impacto a nivel mundial, desde su aparición en el mercado de medicamentos y más aún, desde que su patente fue liberada y comenzaron a aparecer una gran cantidad de genéricos en diversas presentaciones, por lo cual, es de especial interés implementar técnicas de análisis cuantitativo para la determinación del fármaco por diferentes vías en diversas matrices; las técnicas electroanalíticas, han demostrado ser herramientas valiosas para realizar estudios cualitativos y cuantitativos, permitiendo proponer una metodología accesible y viable para realizar análisis directos, rápidos, sensibles y de bajo costo para principios activos en formulaciones farmacéuticas.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología electroanalítica que permita la aplicación de un método alternativo para el análisis de CS en distintas formulaciones farmacéuticas, mediante la reducción catódica de esta molécula en medio acuoso, empleando las técnicas de voltametría de barrido lineal y voltametría de pulso diferencial, utilizando como electrodo de trabajo, películas delgadas de Pb electrodepositadas sobre carbón vítreo. Para validar el método, los resultados se compararon con los obtenidos mediante una técnica basada en espectroscopia UV-visible reportada [29,30].

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos utilizados fueron de alta pureza y grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura. Como electrólito soporte, se utilizó una solución reguladora de acetato 0,05 M (pH=4,5) y para la electrodeposición de películas de Pb, se emplearon soluciones de acetato de plomo. Para la validación por espectroscopia UV-visible, de soluciones de CS en metanol.

Equipos. Los estudios electroquímicos se realizaron en un potenciostato/galvanostato modelo Autolab PST050, controlado mediante el programa VoltaMaster versión 4 de Radiometer, se utilizó una celda de un compartimiento de 20 mL de capacidad y tres electrodos. El electrodo de trabajo consistió en un electrodo de carbón vítreo empotrado en vidrio con un área geométrica expuesta de 0,29 cm², el cual fue cuidadosamente pulido a espejo con alúmina de 1 hasta 0,3 μm de tamaño de partícula, luego sometido a ultrasonido por 5 minutos y lavado con agua ultra pura, en cada medida este electrodo, fue modificado con una película delgada de plomo depositada *in situ*. El electrodo de referencia empleado fue un electrodo de Ag/AgCl (KCl saturado) por lo cual todos los potenciales son referidos a este electrodo; como electrodo auxiliar se utilizó un alambre de platino en espiral.

Los estudios de validación por espectroscopia UV-visible se realizaron en un espectrofotómetro Perkinelmer modelo lambda 25 de doble haz, acoplado a un sistema computarizado y controlado mediante el programa UV WinLab.

RESULTADOS

Tomando en cuenta los reportes bibliográficos [23-25], se eligió como medio electrolítico para estudiar la reducción de citrato de sildenafil (CS), una solución reguladora de acetato de sodio / ácido acético 0,05 M (pH = 4,5). Dicha reacción de reducción se ensayó en este medio tanto sobre el electrodo de CV desnudo, como sobre una película delgada de Pb depositada *in situ* sobre este mismo electrodo (Pb/CV). La película de Pb fue depositada añadiendo al electrolito soporte una cantidad de solución de acetato de plomo 0,1 M suficiente para que la concentración de Pb²⁺ en solución fuese 0,24 mM, y aplicando un pulso de potencial de -1,1 V durante 60 segundos, previo a la realización del barrido voltamétrico; estas condiciones son los recomendados por la bibliografía para obtener una película homogénea, estable y reproducible [23].

En la figura 3 se muestran los voltogramas obtenidos sobre CV y Pb/CV luego de realizar un barrido catódico entre -0,75 y -1,4 V a una velocidad de barrido (v) de 20 mV.s⁻¹, en el medio electrolítico, en ausencia y en presencia de CS 1×10⁻⁴ M. En los blancos no se observan respuestas atribuibles a procesos faradaicos importantes, que puedan interferir con el proceso de reducción del CS, solamente se observa una ligera corriente de fondo, posiblemente debida a la reacción de reducción de los iones hidronio. En presencia de CS 1×10⁻⁴ M se aprecian las ondas catódicas que se pueden atribuir a la reducción de la molécula de sildenafil (base) [10,24,25,27]; sobre CV se observa un pico catódico bien definido a un potencial de -1,22 V y una onda con un máximo de corriente a aproximadamente -1,34 V; por otro lado sobre Pb/CV se observan dos picos mejor definidos y cuyos potencial de pico se desplazan a valores menos negativos (-1,15 y -1,25 respectivamente), mostrando así que la reducción del sildenafil está más favorecida sobre la superficie de Pb.

Queda claro en la figura 4, que al utilizar el electrodo Pb/CV se obtiene una mejor definición de los picos atribuidos a la reducción de la molécula de sildenafil, así como un incremento en la corriente y un desplazamiento del potencial de reducción a valores más negativos, lo cual desde el punto de vista analítico es ventajoso, ya que la señal del analito se puede medir con mayor precisión. Por estas razones, se escogió como electrodo de trabajo para las determinaciones, el electrodo de Pb/CV. En el gráfico inserto en la figura 3, se observa que los valores de la corriente (Ip) para el pico a -1,25 V son independientes del tiempo de adsorción del sildenafil sobre la película de Pb, contrariamente a lo reportado por la bibliografía [19,22], probablemente debido a que a los valores de concentración aquí estudiados, la película de Pb se saturada de sildenafil adsorbido a tiempos muy cortos, por lo que el proceso que controla la reducción

del sildenafil, es el transporte de masa por difusión, por tal razón las determinaciones se realizaron mediante VBL, sin aplicar un periodo de adsorción, previo al barrido de reducción.

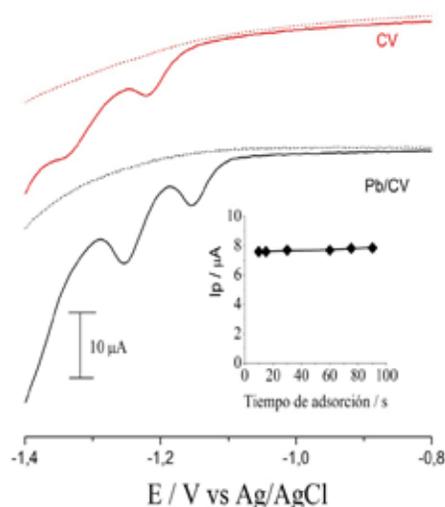


Fig. 3. Voltametría de barrido lineal de una solución de CS 1×10^{-4} M entre -0,75 y -1,4 V sobre los electrodos de CV y Pb/CV, en solución reguladora de acetato 0,05 M (pH=4,5), $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Inserto: Influencia del tiempo de adsorción sobre la corriente de reducción (segundo pico catódico) para el electrodo de Pb/CV.

Reproducibilidad de la película de Pb/CV. El área del electrodo debe ser reproducible entre cada medida, por lo cual se investigó la reproducibilidad en la formación de la película de Pb sobre la cual se lleva a cabo la reacción de reducción del CS, se procedió a depositar la película en las condiciones indicadas anteriormente, a -1,1V durante 60s; posteriormente se realizó un barrido hasta -1,45 V en el medio electrolítico en ausencia de CS y luego se hizo un barrido inverso hasta 0,5 V para oxidar y disolver totalmente la película de Pb formada; en la figura 3, se presenta la respuesta voltamétrica generada por este proceso, donde se puede observar el pico de redisolución anódica del Pb, a -0,4 V; este proceso se repitió varias veces para confirmar que cada vez se obtenían las mismas corrientes de redisolución, lo cual es indicativo de que en cada proceso, se forman películas de Pb prácticamente idénticas. En el inserto de la figura 4, se puede observar que la carga medida mediante el área debajo del pico de redisolución, permanece dentro de un valor de cerca de 1000 μC con una variación que no supera el 0,1 %, por lo cual se puede asegurar que la formación de la película de Pb bajo estas condiciones es reproducible y reversible desde el punto de vista electroquímico.

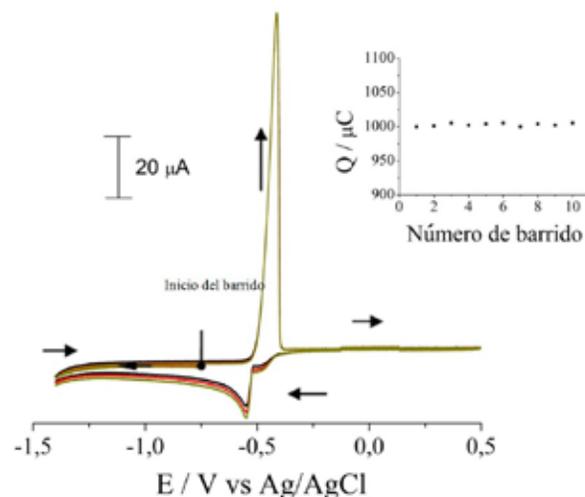


Fig. 4. Respuesta voltamétrica del proceso de deposición y redisolución de una película de Pb sobre el electrodo de CV a partir de una solución de acetato de plomo 2×10^{-4} M en una solución reguladora de acetato a pH=4,5. Potencial de deposición = -1,1 V; Tiempo de deposición = 60 s. Inserto: Carga asociada al pico de redisolución, obtenida para varios barridos consecutivos

Influencia de la concentración de CS en la intensidad de corriente. Para estudiar la influencia de la concentración de CS sobre la intensidad de los picos catódicos, se realizaron experimentos de VBL bajo las condiciones ya definidas y se realizaron barridos en soluciones desde 2×10^{-5} hasta $1,2 \times 10^{-3}$. En la figura 5 se muestran los voltagramas obtenidos y la curva resultante de graficar la I_p del pico a -1,25 V. Se puede observar un aumento creciente de las intensidades de corriente sin embargo a partir de concentraciones de cerca de 2×10^{-4} M, se produce un cambio en la pendiente de la curva I_p vs [CS] obteniéndose dos zonas lineales, una entre $2,0 \times 10^{-5}$ y $1,5 \times 10^{-4}$ y otra entre $4,0 \times 10^{-4}$ y $1,2 \times 10^{-3}$.

Para la realización de curvas de calibración, se escogió la zona lineal a más bajas concentraciones, con miras a que el método propuesto no solo pueda ser aplicado a la determinación de CS en fármacos, sino también en muestras donde el mismo se encuentre en concentraciones más bajas.

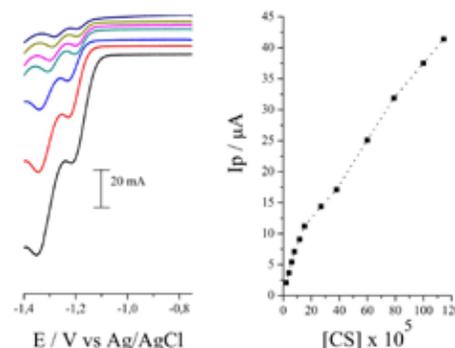


Fig. 5. A) Voltagramas de barrido lineal a partir de una solución de CS 1×10^{-3} M con variación de la concentración entre $4,2 \times 10^{-5}$ M hasta $1,0 \times 10^{-3}$ M, entre -0,75 y -1,4 V sobre el electrodo de Pb/CV, en solución reguladora de acetato 0,05 M (pH=4,5). B) Curva I_p vs [CS].

Curva de calibración mediante voltametría de barrido lineal (VBL) y voltametría de pulso diferencial (VPD). Se realizaron curvas de calibración sencilla y por adición de estándar, tanto por voltametría de barrido lineal, como por voltametría de pulso diferencial entre -0,75 y -1,4 V, en el intervalo de concentraciones de CS de 2×10^{-5} hasta $1,2 \times 10^{-4}$ M, en la figura 6A, se muestran

los voltagramas obtenidos VBL con una $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$ y en la figura 6B, los obtenidos mediante VPD, con Ancho de pulso (Δt) = 5 ms, Altura de pulso (ΔE) = 100 mV y $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$ (los parámetros instrumentales para la realización de la VPD fueron optimizados previamente hasta encontrar la señal más intensa, con una solución de CS 1×10^{-4} M).

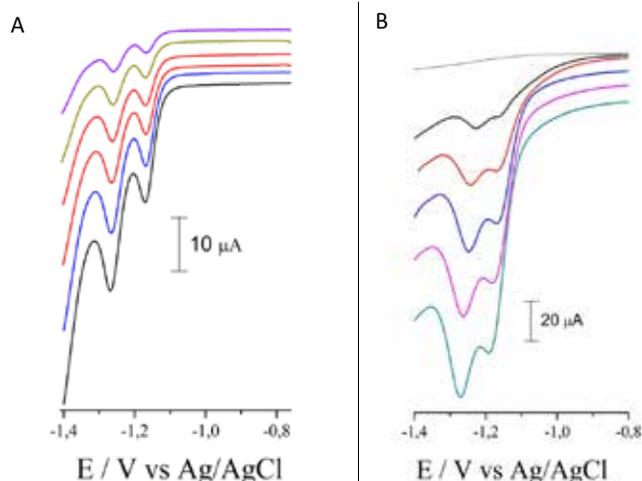


Fig. 6. Voltagramas de barrido lineal (A) y de pulso diferencial (B), para las curvas de calibración sencilla en un intervalo de concentraciones de 2×10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M.

De los ajustes lineales de las curvas de calibrado I_p vs $[CS]$ se obtuvieron los valores de pendiente (m) y su desviación estándar (S_m), el corte en la ordenada (b) y su desviación estándar (S_b), los cuales permiten obtener los parámetros de calidad como son la sensibilidad, la precisión de la técnica, necesarias para determinar los

límites de detección ($LOD = 3S_b/m$) y de cuantificación ($LOQ = 10S_b/m$)

En la tabla 1, se puede apreciar los parámetros de calidad obtenidos a partir de la curva de calibración sencilla y la desviación estándar del blanco obtenida experimentalmente

TABLA 1
Características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas mediante VBL y VPD.

Técnica	R	Sensibilidad (m) $\times 10^5$ $L.mol^{-1}$	S_m $\times 10^5$	Intercepto (b) $mol.L^{-1}$	S_b	LOD $\times 10^6$ $mol.L^{-1}$	LOQ $\times 10^6$ $mol.L^{-1}$
VBL	0,9998	0,644	0,004	1,435	0,024	1,1	3,7
VPD	0,9972	2,354	0,062	3,323	0,638	5,2	8,1

Comparando las características analíticas de ambas curvas, encontramos una mayor sensibilidad por VPD, sin embargo los límite de detección y cuantificación obtenidos por VBL son menores, además los tiempos de análisis por VBL son mucho menores, debido a que la velocidad de barrido que se puede usar es mayor. Por estas razones se escogió para las determinaciones de CS en las formulaciones farmacéuticas, la VBL. Por otro lado se investigó la influencia de la matriz de la muestra, mediante la realización de curvas de calibración por adición de estándar para cada formulación, para lo cual, se pulverizaron 5 pastillas de cada medicamento y se pesó la cantidad necesaria de electrolito soporte para preparar

una solución de concentración nominal de CS 0,14 mM, tomando en cuenta la cantidad declarada por el fabricante de 50 mg de sildenafil base, equivalente a 70,23 mg de CS. Por otro lado se preparó una solución de CS patrón 1×10^{-3} M, con las cuales se prepararon 6 soluciones con un volumen fijo de 0,5 mL de solución de muestra de medicamento y volúmenes variables desde 0,5 hasta 3 mL con incrementos de 0,5 mL de solución patrón de CS 1×10^{-3} M y todo llevado a 25 mL, de tal manera las concentraciones de estándar variaban entre 2×10^{-5} a $1,2 \times 10^{-4}$ M.

En la figura 7 se muestran las CCAE obtenidas para cada medicamento, superpuestas a la CCS.

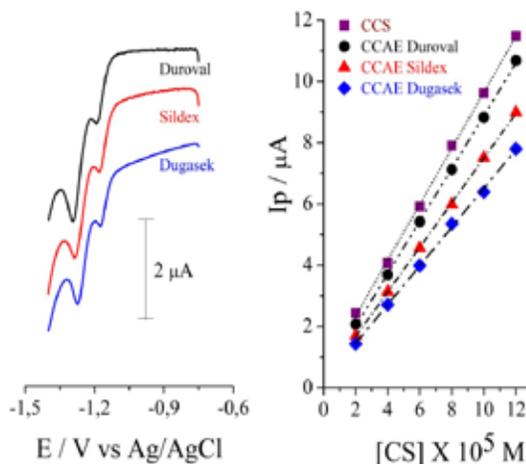


Fig. 7. Voltagramas de soluciones de los medicamentos de concentración nominal $2,8 \times 10^{-5}$ M y curvas de calibración sencilla y por adición de estándar.

Mediante el análisis estadístico, aplicando la prueba de t-Student [31,32], se obtiene que para un nivel de confianza del 95 %, la diferencia entre las pendientes de las CCAE y la CCS es significativa ya que $t_{exp} > t_{critico}$, por lo cual, existen interferencias de matriz que afectan las mediciones: $t_{critico} = t_{(\alpha, \sigma)} = t_{(0,05, 4)} = 2,13$

Para los tres medicamentos los valores de t_{exp} calculados son:

$$t_{Sildex} = 575,9; t_{Duroval} = 213,3 \text{ y } t_{Dugasek} = 78,7.$$

Por lo tanto se debe aplicar, la curva de calibración por adición de estándar para las determinaciones.

En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos por ajuste lineal de las CCAE.

TABLA 2
Resultados de la regresión lineal para las CCAE. $I_p = b + m[CS]$.

Fármaco	m $\times 10^5$ ($L \cdot mol^{-1}$)	Sm $\times 10^5$	b ($mol \cdot L^{-1}$)	Sb	R	[CS] $\times 10^5$ (M)		Recuperación %
						Nominal	Encontrada	
Duroval	0,9162	0,0090	2,622	0,060	0,9996	2,80	2,86 \pm 0,09	102,1 \pm 3,2
Sildex	0,7061	0,0024	2,003	0,015	0,9999		2,84 \pm 0,08	101,3 \pm 2,8
Dugasek	0,6003	0,0013	1,761	0,008	0,9999		2,93 \pm 0,05	104,8 \pm 1,8

El error de la concentración extrapolada, fue calculado mediante la expresión de error estándar de regresión y el intervalo de error se expresa para un límite de confianza del 95 % [32].

Validación por espectroscopia UV-visible. Como se ha mencionado anteriormente, la validación por espectroscopia

UV-visible, se realizó mediante un método reportado en la bibliografía [29,30]. Se prepararon soluciones en un intervalo de $1,05 \times 10^{-5}$ a 2×10^{-5} M de CS; y a cada solución se le midió la absorbancia a 294 nm (máximo de absorbancia); cada máximo de absorbancia se midió cinco veces y con los promedios se construyó una curva de calibración sencilla (figura 8), cuyas características analíticas se muestran en la tabla 3.

TABLA 3.
Características analíticas de la curva de calibrado obtenida mediante espectroscopia UV-Visible $A = b + m[CS]$.

R	m $\times 10^5$ $L \cdot mol^{-1}$	Sm $\times 10^5$	B $mol \cdot L^{-1}$	Sb	LOD $\times 10^6$ $mol \cdot L^{-1}$	LOQ $\times 10^6$ $mol \cdot L^{-1}$
0,9995	14752	161	0,048	0,007	0,068	0,114

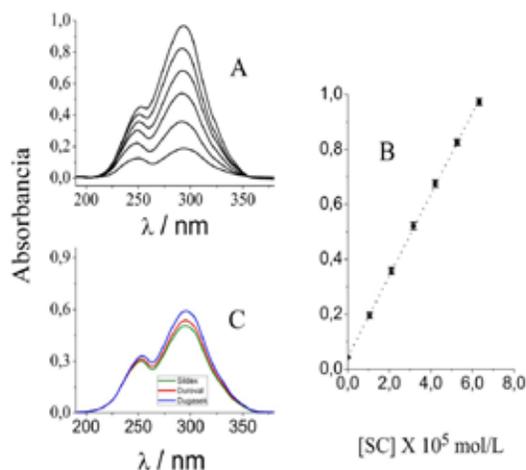


Fig. 8. Espectros UV-visible obtenidos para: A) soluciones patrón de CS entre $1,05$ a $6,32 \times 10^{-5}$ M en metanol. B) Curva de calibración sencilla y C) Espectros obtenidos para las soluciones de cada formulación farmacéutica de concentración nominal $3,5 \times 10^{-5}$ M.

Posteriormente para el análisis de las formulaciones farmacéuticas en estudio, se prepararon soluciones pesando 3 pastillas de cada medicamento y realizando diluciones sucesivas usando metanol como solvente, hasta obtener una concentración nominal de CS de $3,1 \times 10^{-3}$ M de acuerdo al valor declarado de CS por el fabricante. Con el promedio de 5 repeticiones del máximo de absorbancia a 294 nm se determinó la concentración de CS de cada solución de formulación farmacéutica, y se aplicó la prueba de contraste $F^{(31,32)}$, para verificar si existe diferencia significativa entre

las desviaciones estándar de ambas técnicas antes calculadas, obteniéndose como resultados los mostrados en la tabla IV, calculados para un límite de confianza del 95 % y 4 grados de libertad, encontrándose que no hay diferencia significativa para el nivel de confianza establecido.

Por otro lado al contrastar los resultados de concentración y recuperación por ambas técnicas, se observa que para todos los casos t_{exp} es menor que $t_{critico}$ para todos los casos, por lo cual se establece que ambas técnicas arrojan resultados que estadísticamente no difieren significativamente.

TABLA IV.

Concentraciones obtenidas por el método espectrofotométrico y resultados de contraste con el método electroquímico.

Fármaco	[CS] Nominal $\times 10^5$	[CS] \pm LC Obtenida $\times 10^5$	Recuperación %	$F_{critico}$	$F_{exp.}$	$t_{critico}$	$t_{exp.}$
Sildex	3,5	$3,56 \pm 0,060$	$101,51 \pm 4,70$	9,61	2,28	2,78	0,674
Dugasek		$3,75 \pm 0,059$	$107,17 \pm 4,38$		1,80		0,061
Duroval		$3,68 \pm 0,059$	$105,24 \pm 4,49$		1,38		0,516

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló una propuesta metodológica para la determinación de citrato de Sildenafil en formulaciones farmacéuticas (comprimidos y tabletas orodispersables). La estrategia de trabajo utilizada para la preparación de estándares y muestras para el caso de los estudios electroquímicos realizados en medio acuoso, así como también las experiencias realizadas por espectroscopia UV-visible utilizando metanol como solvente; propiciaron el desarrollo de un método de análisis simple, rápido y de bajo costo.

Bajo las condiciones de trabajo seleccionadas se construyeron curvas de calibración sencilla y de adición de estándar para evaluar el comportamiento lineal del CS en

el rango de concentraciones seleccionado, para los cuales se observó que las pendientes de las CCAE mostraron diferencias significativas con las correspondientes a la CCS por voltametría de barrido lineal, indicando estos resultados que el método propuesto si presenta interferencias de tipo físico y químico por parte de la matriz de la muestra.

Los porcentajes de recuperación obtenidos tanto para la técnica de VBL como para la de espectroscopia UV-visible revelan que la concentración de CS encontrada en las dos técnicas muestra una buena concordancia con los valores declarados en la etiqueta del producto. Mostrando la prueba de *t-student*, que estadísticamente las dos técnicas proporcionan resultados que no difieren significativamente para las soluciones estudiadas de CS. Las figuras de mérito relacionadas con sensibilidad, precisión y exactitud; confieren

a ambas técnicas un perfil adecuado para ser utilizado en el control de calidad de este tipo de productos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a instituciones y personas que contribuyeron al logro de este trabajo: CDCHTA fondo ZD-LEQ-C-94 y CEP-ULA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Falconi P. Perfil farmacológico del Sildenafil. *Rev Farmacol Terap.* 1999; 6(1-2): 43-46.
- [2] Sarjanovich RJ, Lema L. ¿Sildenafil para todos? *Insuf Card.* 2010; 5(1): 32-41.
- [3] Lopes A, Cássia R, Damos F, Santos A. Determination of Sildenafil Citrate (Viagra®) in various pharmaceutical formulations by flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. *J Braz Chem Soc.* 2012; 23(10): 1800-1806.
- [4] Reepmeyera JC, d'Avignonb DA. Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs. *J Pharma Biomed Anal.* 2009; 49(1): 145-150.
- [5] Abd-Elbary A, Foda NH, El-Gazayerly ON. Stability Indicating High Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Sildenafil Citrate in Bulk and in Formulations. *Chromatogr.* 2004; 59: 561-566.
- [6] Changqin X, Minqiong T, Jian L, Chen-ru Y, Guangya L. Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *J Chromatog B.* 2013; 931: 111-116.
- [7] El-Gindy A E, Shokry E, Farouk M, El-Aziz LA. Validated methods for determination of sildenafil citrate in the presence of its potential impurities. *J Sci Res.* 2010; 2(4): 262-278.
- [8] Tacqui A, Ludes B. HPLC-MS for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in biological fluids. Application to the salivary excretion of sildenafil after oral intake. *J Anal Toxicol.* 2003; 27(2): 88-94.
- [9] Özkan S, Uslu B, Zuman P. Electrochemical oxidation of Sildenafil Citrate (Viagra) on carbon electrodes. *Anal Chim Acta.* 2004; 501(2): 227-233.
- [10] Weinert P, Pezza L, Pezza HR. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. *Quim Nova.* 2008; 31(5): 1112-1116.
- [11] Issa YM, El-Hawary WF, Youssef AF, Senosy AR. Spectrophotometric determination of sildenafil citrate in pure form and in pharmaceutical formulation using some chromotropic acid azo dyes. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010; 75(4): 1297-1303.
- [12] Amin AS, Moustafa M E, El-Dosoky RMS. Colorimetric determination of sildenafil citrate (Viagra) through ion-associate complex formation. *J AOAC Int.* 2009; 92(1): 125-130.
- [13] Harikrishna K, Nagaralli BS, Seetharamappa J. Extractive spectrophotometric determination of sildenafil citrate (viagra) in pure and pharmaceutical formulations. *J Food Drug Anal.* 2008; 16(1): 11-17.
- [14] Altiokka G, Atkosar Z, Sener E, Tunçel M. FIQA of sildenafil citrate using UV-detection. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 25(2): 339-342.
- [15] Wawer I, Pisklak M, Chilmoneczyk Z. ¹H, ¹³C, ¹⁵N NMR analysis of sildenafil base and citrate (Viagra) in solution, solid state and pharmaceutical dosage forms. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(5): 865-870.
- [16] Maurin JK, Plucinski F, Mazurek AP, Fijalek Z. The usefulness of simple X-ray power diffraction analysis for counterfeit control-the Viagra example. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 43(4): 1514-1518.
- [17] Chien CW, Gómeza RA, Fernandez LP. Determination of sildenafil by preconcentration on surfactant coated polymeric resin followed by spectrofluorimetry. *J Pharm Anal.* 2013; 3: 173-179.
- [18] Khalil SM. Applications of ion associates for the microdetermination of vardenafil using atomic emission spectrometry. *Microchim Acta.* 2007; 158(3): 233-238.
- [19] Berzas JJ, Rodriguez J, Castañeda G, Villaseñor MJ. Voltammetric behavior of sildenafil citrate (Viagra) using square wave and adsorptive stripping square wave techniques. Determination in pharmaceutical products. *Anal Chim Acta.* 2000; 417(2): 143-148.
- [20] Staden RS, Staden JF, Aboul-Enein HY. Diamond paste-based electrodes for the determination of sildenafil citrate (Viagra). *J Solid State Electrochem.* 2010; 14(6): 997-1000.
- [21] Rodríguez-Fariñas N. Determinación de compuestos de interés farmacológico en fluidos biológicos por técnicas electroforéticas y electroquímicas. [Tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, España. 2004.
- [22] Rodríguez J, Berzas JJ, Castañeda G, Rodríguez N. Determination of sildenafil citrate (viagra) and its metabolite (UK-103,320) by square-wave and adsorptive stripping square-wave voltammetry, Total determination in biological samples, *Talanta* 2004; 62(2): 427-432.
- [23] Tyszczyk K, Korolczyk M. Voltammetric method for the determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical formulations. *Bioelectrochemistry.* 2010; 78(2): 113-117.
- [24] Frag E, Mohamed G, Alelaiwi H. Electro-analytical determination of sildenafil in Viagra tablets using screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *J Electroanal Chem.* 2011; 659(2): 121-127.
- [25] Sopha H, Hocevar S, Pihlar B, Ogorevc B. Bismuth film electrode for stripping voltammetric measurement of sildenafil citrate. *Electrochim Acta.* 2012; 60: 274-277.
- [26] Delolo F, Rodriguez C, Silva M, Dinelli L, Delling F, Zukerman J, Batista A. A New Electrochemical Sensor

Containing a Film of Chitosan-Supported Ruthenium: Detection and Quantification of Sildenafil Citrate and Acetaminophen. *J Braz Chem Soc.* 2014; 25(3): 550-559.

[27] Farghali RA, Ahmed Rasha A. Gold Nanoparticles-Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Voltammetric Determination of Sildenafil Citrate (Viagra) in Pure Form, Biological and Pharmaceutical Formulations. *Int J Electrochem Sci.* 2015; 10: 1494-1505.

[28] Leticia M. Ochiai EH, Bindewald P, Mengarda LH, Marcolino-Junior MF. Disposable potentiometric citrate sensor based on polypyrrole-doped films for indirect determination of sildenafil in pharmaceuticals formulations. *J Appl Polym Sci.* 2016, 133(32): 43762.

[29] Sparsha N, Ravindra R, Venkatesh P, Hepcykala R. Development of new and rapid method for UV spectrophotometric determination of sildenafil in marketed formulations. *Der Pharm Lett.* 2012; 4 (6): 1756-1759.

[30] Audu SA, Ogunbameru W, Musa AS, Abdulraheem RO, Abdulraheem R. Quantitative determination of sildenafil citrate in commercial tablet dosage form marketed in maiduguri metropolitan council (MMC). *Inter Res J Phar.* 2012; 3(9): 91-93.

[31] Miller J; Miller J. *Estadística para Química Analítica.* 2da ed. Madrid: Addison Wesley Iberoamericana; 1993.

[32] Miller JN, Miller JC. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica.* 4ta ed. Madrid: Pearson Prentice Hall; 2004.