

Tesis de Posgrado

Estabilidad de benzodiazepinas : estudios de Alprazolam y compuestos derivados

Gallardo Cabrera, Cecilia

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gallardo Cabrera, Cecilia. (2000). Estabilidad de benzodiazepinas : estudios de Alprazolam y compuestos derivados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3313_GallardoCabrera.pdf

Cita tipo Chicago:

Gallardo Cabrera, Cecilia. "Estabilidad de benzodiazepinas : estudios de Alprazolam y compuestos derivados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3313_GallardoCabrera.pdf



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

ESTABILIDAD DE BENZODIAZEPINAS
Estudios de Alprazolam y compuestos derivados

Cecilia Gallardo Cabrera

Directora de Tesis: Dra. Norma Sbarbati Nudelman
Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica, FCEyN.

Tesis presentada para optar al Título
de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Año 2000

*A mis amigas:
Julia y Mercedes*

*A Pili:
A su alegría y grata compañía*

*Agradezco a la Dra Norma Nudelman
por la asistencia, colaboracion y apoyo en
estos cortos y largos años.*

De manera especial agradezco a mis compañeros de laboratorio: Alejandro, Graciela, Guadalupe, Raquel, Cecilia y Hernan, por su ayuda, que muchas veces avanzó más allá de las paredes de nuestro laboratorio.

También agradezco:

A COLCIENCIAS por la beca de doctorado.

A la Universidad de Buenos Aires, especialmente al Depto de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por abrirme las puertas y darme el espacio para el desarrollo de actividades de investigación.

A los integrantes del UMYMFOR y Al LANAIS-CONICET 500 por los espectros realizados.

Al Dr. Pedro Aramendia por la realización de los espectros de fluorescencia

Al Laboratorio Gador por las muestras suministradas.

Resumen:

Se ha estudiado la estabilidad de 1,4 benzodiazepinas frente a diferentes factores ambientales. En primer lugar se estudian cinéticamente las reacciones de solvólisis de varias *o*-aminobenzofenonas, los principales productos de degradación hidrolítica de Diazepam, (en estudios previos se había caracterizado cinco *o*-aminobenzofenonas de la degradación por hidrólisis ácida de diazepam). El mecanismo de formación de estas cinco *o*-aminobenzofenonas sigue un esquema complejo, en el presente estudio se describen los resultados de mediciones cinéticas realizados bajo diferentes condiciones de reacción, cálculo de las constantes de velocidad mediante la aplicación de un programa de calculo iterativo para proponer mecanismos de reacción consistentes con los resultados encontrados y diversas experiencias adicionales para confirmar los mismos.

Por otra parte, también se presentan los resultados de los estudios de estabilidad de Alprazolam, (8-cloro-1-metil-6-fenil-4*H*-s-triazo-[4,3- α][1,4]benzodiazepina), cuyo mecanismos de degradación es completamente diferente a las anteriores 1,4 benzodiazepinas ya que no es susceptible a la hidrólisis. Se estudió la estabilidad de este compuesto en diferentes condiciones de descomposición severas, mostrándose lábil solamente a la acción de la luz. Se aislaron los múltiples productos formados de este proceso de fotodegradación en soluciones de Alprazolam en medio acuoso y metanólico, mediante la aplicación de cromatografía de capa preparativa y se caracterizó los principales. Los resultados encontrados indican que el mecanismo de fotólisis es diferente de acuerdo al solvente. En solución acuosa se encontraron productos provenientes de la contracción del anillo diazepínico a un anillo de seis miembros, otro proveniente de la decloración de Alprazolam y otro de hidrólisis; mientras que en metanol predominaron dos compuestos provenientes de solvólisis.

Se estudio mediante HPLC y Espectrofotometria de Fluorescencia la influencia del pH de las soluciones en la velocidad de descomposición, en orden a determinar las (k_{obs}). Observándose que la fotodegradación es dependiente del pH de la solución: la velocidad de descomposición aumenta a medida que se disminuye el pH bajo condiciones naturales de estrés.

Para concluir este trabajo se estudio la fotodegradación de Alprazolam en comprimidos comerciales, mediante un método de HPLC previamente validado. Dos de los productos aislados se forman bajo condiciones de radiación en estado sólido y bajo el influjo de la radiación solar.

Palabras claves: *o*-aminobenzofenonas, Alprazolam, estabilidad, fotodegradación.

Abstract:

The stability of 1,4-benzodiazepines was studied under several environmental conditions. First of all, kinetic solvolytic studies were carried out with several o-aminobenzophenones, which are the main hydrolytic degradation products of diazepam (in previous studies five o-aminobenzophenones were characterized from diazepam under acidic hydrolysis conditions). The present study describes kinetic determinations carried out under different reaction conditions to elucidate the complex mechanism of formation of these five o-aminobenzophenones. An iterative procedure was developed for the calculation of the several reaction constants involved in the reaction of each o-aminobenzophenone, a complete reaction scheme consistent with all the observed results was proposed and new experiments carried out to confirm the proposed steps and the likely intermediate involved.

On the other hand, studies carried out on the stability of Alprazolam, (8-chloro-1-methyl-6-phenyl-4H-s-triazolo-[4,3- α] [1,4] benzodiazepine), are described. The behaviour of this triazolobenzodiazepine is completely different from other 1,4-benzodiazepines, since it is not sensitive to hydrolysis. The stability of alprazolam was studied under several stress condition; it was found that this drug is only sensitive to light irradiation. The several products formed under the photodegradative processes of alprazolam solutions in aqueous as well as methanolic solutions were isolated by thin layer chromatography and the main degradation products were fully characterized. The observed results indicate that the photolysis mechanism is highly dependent of the solvent. In aqueous solution products arisen from the diazepine ring contraction to a more stable six-membered ring, other formed by alprazolam dechlorination and another from hydrolysis were observed. On the contrary, two different products were obtained from the methanolic photodegradation. The influence of pH on the rate of degradation was studied by HPLC and by fluorescence spectrometry. The k_{obs} is pH dependent, it was observed that the rate of degradation increases as the pH decreases.

Finally, the photodegradation of Alprazolam tablets was studied by an HPLC method previously validated. It was observed that the two main products are formed by irradiation by sun light in the solid state.

Key-words: o-aminobenzophenones, Alprazolam, stability, photodegradation

INDICE GENERAL

Capítulo 1: Estabilidad de Benzodiazepinas.....	4
1.1 Introducción.....	6
1.2 Relación estructura-actividad.....	6
1.3 Principales características del Alprazolam.....	10
1.4 Mecanismo de acción.....	11
1.5 Métodos de valoración.....	13
1.6 Degradación de medicamentos.....	15
1.6.1 Tendencias en los ensayos de estabilidad.....	16
1.6.2 Desarrollo de Estudios de estabilidad.....	18
1.6.3 Métodos fisicoquímicos.....	20
 REFERENCIAS.....	 21
Capítulo 2: Degradación Hidrolítica y Térmica de Alprazolam.	26
2.1 Antecedentes.....	28
2.2 Hidrólisis de Alprazolam.....	30
2.3 Hidrólisis de Alprazolam en condiciones severas.....	37
2.4 Termólisis de Alprazolam.....	38
2.5 Oxidación de Alprazolam.....	38
2.6 Estudios de degradación de comprimidos de Alprazolam en ambiente húmedo.....	39
2.7 CONCLUSIONES.....	42
 REFERENCIAS.....	 42
Capítulo 3: Solvólisis de o-Aminobenzofenonas.....	44
3.1 Antecedentes.....	46
3.2 Análisis Cinético.....	48
3.3 Modelos Cinéticos.....	48
3.4 Reacción de la 2-(N-metil)amino-5-clorobenzofenona.....	51
3.5 Reacción de la 2-amino-5-clorobenzofenona.....	55
3.6 Reacción de la 2-(N-metil)amino-3,5-diclorobenzofenona.....	58
3.7 Reacción de la 2-(N-metil)amino-5-clorobenzofenona bajo condiciones especiales.....	61
3.8 Consideraciones Mecánicas.....	62
3.9 Propuesta de un intermediario “nitrenio”.....	65
3.10 Evidencias experimentales.....	66
 REFERENCIAS.....	 69
Capítulo 4: Fotoestabilidad de Medicamentos.....	72
4.1 Importancia de los estudios de fotoestabilidad.....	74

4.2	Objetivos y utilidad de estos estudios.....	74
4.3	Antecedentes.....	74
4.4	Reglamentación de los estudios de fotoestabilidad.....	76
4.4.1	Estudios de fotoestabilidad para la droga pura.....	76
4.4.2	Estudios de fotoestabilidad para el producto farmacéutico.....	77
4.5	Fotoestabilidad de benzodiazepinas.....	78
REFERENCIAS.....		83
Capítulo 5: Productos de fotodegradación de Alprazolam.		
Aislamiento y Caracterización.....		86
5.1	Aislamiento de fotoproductos formados en medios acuosos.....	88
5.1.1	Resolución del extracto I	88
5.1.2	Resolución del Sólido I	90
5.2	Caracterización de Productos de Degradación.....	91
5.2.1	Compuesto 1.....	91
5.2.2	Compuesto 2.....	95
5.2.3	Compuesto 3.....	98
5.2.4	Compuesto 4.....	102
5.2.5	Compuesto 5.....	105
5.2.6	Compuesto 6.....	107
5.3	Fotodegradación de Alprazolam en metanol. Aislamiento y Elucidación estructural de los productos.....	109
REFERENCIAS.....		112
Capítulo 6: Estudios Cinéticos de Alprazolam en Solución.....		
6.1	Fotodegradación de Alprazolam. Seguimiento del decaimiento....	114
6.2	Mediciones de Absorbancia.....	120
6.3	Seguimiento por Fluorescencia.....	121
6.4	Elección de lámpara para uso cinético.....	125
6.4.1	Generalidades sobre actinómetros.....	125
6.4.2	Método de validación propuesto.....	125
6.4.3	Calibración de la lámpara usada.....	126
6.5	Mecanismos de formación de los productos de degradación de Alprazolam.....	127
6.5.1	Hidrólisis.....	128
6.5.2	Fotoquímica.....	128
6.5.2.1	Reacciones llevadas a cabo en solución de buffer fosfato-citrato.....	129
6.5.2.2	Reacciones llevadas a cabo en presencia de metanol...	135
6.5.2.3	Reacciones en fase sólida.....	139
6.6	CONCLUSIONES.....	140
REFERENCIAS.....		141

Capítulo 7: Fotoestabilidad de Alprazolam en Medicamentos...	144
7.1 Introducción.....	146
7.2 Consideraciones sobre fotoestabilidad de formas farmacéuticas sólidas.....	146
7.3 Análisis de comprimidos irradiados artificialmente.....	147
7.4 Desarrollo y validación del método de cuantificación.....	148
7.4.1 Estandarización del método de cuantificación.....	148
7.4.2 Validación del método.....	153
7.5 Estudio de Fotoestabilidad de Formulaciones Farmacéuticas de Alprazolam.....	156
7.6 Medidas se fluorescencia en comprimidos.....	164
7.7 CONCLUSIONES.....	165
REFERENCIAS.....	166
Capítulo 8: Sección Experimental.....	168
8.1 Materiales y Métodos.....	170
8.1.1 Equipos.....	170
8.1.2 Purificación de Solventes.....	171
8.2 Síntesis de Productos de degradación.....	172
8.2.1 Síntesis de 2-(N-metil) amino-5-clorobenzofenona.....	172
8.2.2 Síntesis de 2-amino-5-clorobenzofenona.....	173
8.2.3 Síntesis de 2-amino-3,5-diclorobenzofenona.....	173
8.2.4 Síntesis de 2-(N-metil) amino-3,5-diclorobenzofenona....	174
8.2.5 Sintesis de 2-Cloro-9,10-acridinona.....	176
8.2.6 Sintesis de 2-Cloro-10-metil-9,10-acridinona.....	176
8.2.7 Sintesis de 2,4-Dicloro-metil-9,10-acridinona.....	177
8.2.8 Sintesis de 2-4-Dicloro-9,10-acridinona.....	177
8.2.9 Sintesis de triazolaminoquinolina.....	177
8.3 Métodos de valoración de aminobenzofenonas.....	178
8.4 Estudios Cinéticos de aminobenzofenonas.....	178
8.5 Degradación de Alprazolam por Hidrólisis.....	181
8.6 Degradación de Alprazolam por Oxidación.....	181
8.7 Degradación de Alprazolam por Fotólisis.....	181
8.8 Cromatografía en Placa Preparativa.....	186
8.9 Irradiación de Soluciones Metanólicas de Alprazolam.....	186
8.10 Medidas de Fluorescencia.....	187
8.11 Medidas de Absorbancia.....	187
8.12 Irradiación de Alprazolam en Comprimidos.....	187
8.13 Estudios de Alprazolam y comprimidos con Alprazolam en ambiente húmedo.....	188
8.14 Medidas de fluorescencia comprimidos.....	189
REFERENCIAS.....	190
Resumen.....	194

CAPITULO 1

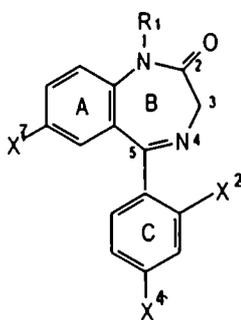
***ESTABILIDAD DE
BENZODIAZEPINAS.***

1.1 Introducción

Benzodiazepinas son conocidas como tranquilizantes menores, cuya introducción a la práctica clínica facilitó el tratamiento de desórdenes del pánico, ansiedad, tensiones y depresión con un alto grado de separación entre sus efectos ansiolíticos de utilidad y la sedación excesiva, además de su baja proclividad de producir efectos de dependencia física y/o intoxicación aguda grave tras la sobredosis. Con estas características las benzodiazepinas dejaron atrás a los tranquilizantes anteriormente conocidos y se abrió el camino para la síntesis de más de 3000 benzodiazepinas, de las cuales más de 50 están actualmente en aplicación clínica. Los sedantes de esta clase han dominado el mercado y el ejercicio médico; en los últimos años el alprazolam, lorazepam y sus congéneres se encuentran al frente de la lista en cuanto a número de prescripciones emitidas para todos los fármacos utilizados en el ejercicio médico.¹

1.2 Relación entre estructura y actividad

Sternbach, quien sintetizó la primera benzodiazepina: el clordiazepóxido, estudió también las relaciones entre estructura y actividad de las benzodiazepinas.²



Las sustituciones juegan un papel importante como es de esperarse, siendo muy importante la sustitución en la posición 7 del anillo A: La actividad incrementa con grupos atradores de electrones como halógenos, NO₂ y CF₃, y es disminuida por grupos no atradores como CH₃ y OCH₃. El grupo atrador en la posición 7 interacciona electrostáticamente con un sitio específico del receptor.³ La actividad es disminuida por la presencia de sustituyentes en posiciones distintas a la posición 7.

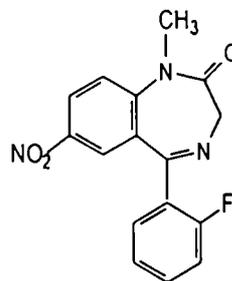
En el anillo B: La actividad es incrementada por un grupo metilo en la posición 1; y es disminuida por sustituyentes grandes como el terbutilo.

El 1-terbutil homólogo del diazepam es casi completamente inactivo.⁴ Mientras que otros grupos alquilo son fácilmente removidos por microsomas del hígado, el grupo terbutilo no es atacado.

Respecto al anillo C: La actividad se incrementa con halógenos en la posición 2' (Cl, F) y es muy fuertemente disminuida por sustituyentes en 4'.

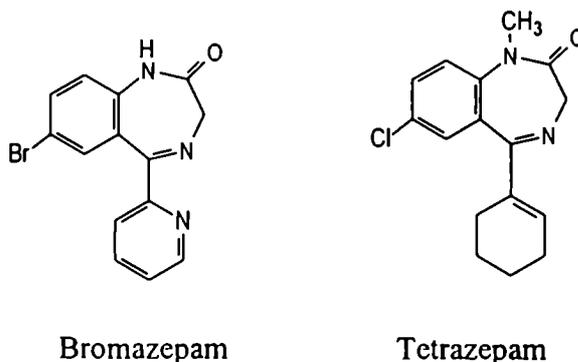
Estas reglas probaron ser una guía importante en el desarrollo de los estudios posteriores que llevaron a sintetizar benzodiazepinas con distintos sustituyentes en la posición 7 y 1.

Basándose en todos los hechos encontrados, Sternbach y su grupo² sintetizaron un compuesto que combinaba todos los factores conocidos para impartir alta actividad: grupo metilo en 1, grupo nitro en 7, y F en la posición 2'. Resultó ser una de las benzodiazepinas farmacológicamente más potentes, ilustrando de esta manera la aditividad o potenciación de las propiedades de grupos farmacofóricos en las series de benzodiazepinas. Este producto se introdujo en Suiza en 1975 como un potente hipnótico, actuando en dosis de 1 mg, con el nombre de Flunitrazepam.



Flunitrazepam

Las benzodiazepinas con un fenilo en la posición 5 son los compuestos más activos y más fácilmente accesibles, sin embargo varios grupos incluyendo el de Sternbach sintetizaron y estudiaron muchas benzodiazepinas con otros sustituyentes en la posición 5. Pocos productos fueron de interés y algunos fueron difíciles de sintetizar, se encuentran en el mercado: α -piridil derivado, bromazepam,⁵ y un ciclohexenil derivado, el tetrazepam,⁶ que actúa como músculo relajante.⁷

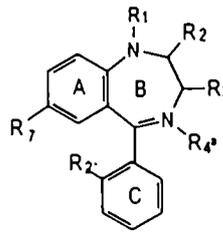


Los estudios de desarrollo más interesantes corresponden a la obtención de derivados con anillos adicionales unidos al núcleo benzodiazepínico en las posiciones 1 y 2. Entre ellos los compuestos más interesantes son las triazolobenzodiazepinas (alprazolam) e imidazolobenzodiazepinas (midazolam), provenientes de la adición de un anillo triazol e imidazol, respectivamente. Ambas son más potentes que las 1-metilbenzodiazepinas correspondientes. Las triazolobenzodiazepinas fueron sintetizadas e investigadas por los grupos de los laboratorios Takeda⁸ y Upjohn.⁹

En todos los casos las propiedades hipnóticas, miorelajantes, sedantes, ansiolíticas y anticonvulsivas están presentes en grados variables. Solo varía la preponderancia de una propiedad sobre las otras. En la Tabla 1.1 se ilustran las estructuras de las benzodiazepinas disponibles en el mercado.

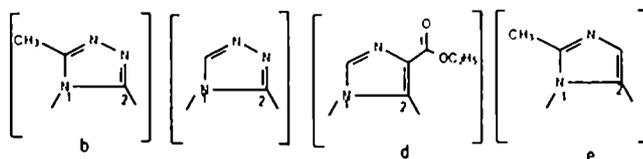
Nomenclatura: En la primera página se ha identificado la numeración correcta que se utiliza para nombrar todos los compuestos benzodiazepínicos que se han sintetizado. En la mayoría de los casos que siguen a continuación utilizamos la numeración mostrada en dicha página, excepto en aquellas situaciones en que, por razones prácticas y/o de simplicidad, resulte más conveniente utilizar una numeración "a" la cual se mostrará cuando corresponda.

Tabla 1.1 Benzodiazepinas disponibles en el mercado farmacéutico actual



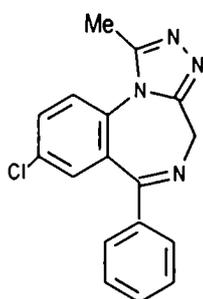
enzodiazepina	R1	R2	R3	R7	R2'
lprazolam	triazol fusionado ^b		H	Cl	H
lordiazepoxido ^a		NHCH3	H	Cl	H
lobazam ^a	CH ₃	=O	H	Cl	H
lonazepam	H	=O	H	NH ₂	Cl
lorazepato	H	=O	COO-	Cl	H
emoxepam ^a	H	=O	H	Cl	H
iazepam	CH ₃	=O	H	Cl	H
stazolam	triazol fusionado ^c		H	Cl	H
lumazenil ^a	triazol fusionado ^d		H	F	(=OenC5) ^f
lurazepam	CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	=O	H	Cl	F
alazepam	CH ₂ CF ₃	=O	H	Cl	H
orazepam	H	=O	OH	Cl	Cl
idazolam	imidazo fusionado ^e		H	Cl	F
itrazepam	H	=O	H	NO ₂	H
ordazepam	H	=O	H	Cl	H
xazepam	H	=O	OH	Cl	
uazepam	CH ₂ CF ₃	=S	H	Cl	F
emazepam	CH ₃	=O	OH	Cl	H
riazolam	triazol fusionado ^b		H	Cl	Cl

^a No hay sustituto en la posición 4, salvo en los casos de: clordiazepoxido y demoxepam, que son N-óxidos; R₄ es CH₃ en el flumazenil, en el cual no hay doble enlace entre las posiciones 4 y 5; R₄ es =O en clobazam, en el cual la posición 4 es C y la posición 5 es N. ^f No hay anillo C.

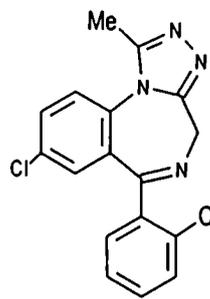


1.3 Principales características del Alprazolam

El agregado de un anillo nitrogenado a las 1-4 benzodiazepinas dio origen a las triazolobenzodiazepinas. Y con esto se lograron cambios muy importantes en el perfil farmacocinético y clínico. Los datos experimentales indican una vida media de 12-15 horas y efecto antipánico para el alprazolam, y una vida media de 1.5-5 horas con efecto hipnoinductor rápido para el triazolam.



Alprazolam



Triazolam

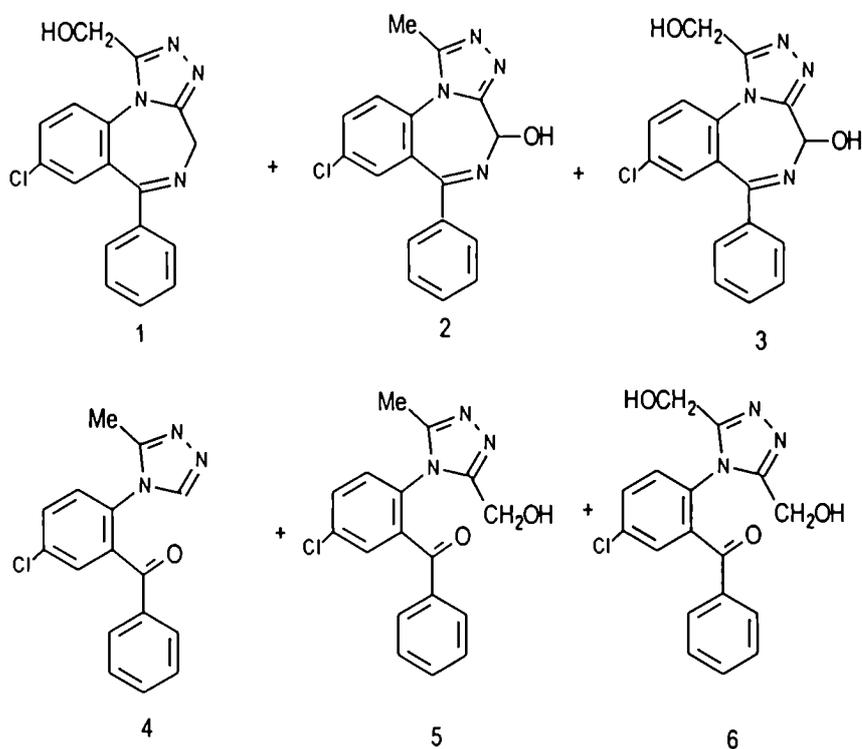
El alprazolam ha sido introducido en la terapia clínica como una de las drogas más promisorias y efectivas para el tratamiento de desórdenes de ansiedad, debido a que se diferencia de las anteriores benzodiazepinas por su mayor afinidad con los receptores benzodiazepínicos (mayor efectividad). En dosis equivalentes es de 5 a 15 veces más potente que el diazepam. Por su rápido metabolismo y excreción (posee un comienzo de acción más rápido y una acción más reducida que diazepam, con efectos sedantes poco prolongados), por lo cual ha sido llamada benzodiazepina de tiempo de vida media intermedio. La absorción de la droga es rápida y compleja, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan entre la primera y segunda hora.^{10,11,12}

Debido a sus características farmacológicas presenta pocos efectos adversos y por eso ha llegado a ser la benzodiazepina más frecuentemente prescrita en la actualidad.^{13,14}

Las triazolobenzodiazepinas se metabolizan principalmente por hidroxilación inicial del metilo sobre el anillo triazol fusionado, dando lugar al α -hidroxialprazolam, 1; la ausencia de cloro en el anillo C del alprazolam vuelve considerablemente lenta esta reacción (tiempo de vida de 12 ± 2.0 horas), mientras que en el triazolam esta reacción ocurre rápidamente lo cual explica el tiempo de vida de 2.9 ± 1.0 horas de este compuesto.

La segunda vía del metabolismo es la hidroxilación en la posición 3 que da lugar al 4-hidroxiaprazolam, 2 y al α ,4-dihidroxiaprazolam, 3. Estos compuestos hidroxilados presentan afinidad por el receptor, principalmente el α -hidroxiaprazolam, 1, cuya actividad es comparable a la de la droga inicial; pero los compuestos hidroxilados son rápidamente eliminados por conjugación con el ácido glucurónico.

El 4-hidroxiaprazolam se oxida a las benzofenonas 4, 5 y 6 inactivas, antes de ser eliminado.¹⁵



Esquema 1.1 Metabolitos del alprazolam

1.4 Mecanismo de Acción de Benzodiazepinas

El sitio de acción de las benzodiazepinas ha sido sujeto a una extensiva investigación; las benzodiazepinas presentan alta afinidad con el sitio de acción por lo cual se han usado como ligandos para conocer la características de éste.

Los blancos moleculares principales de las benzodiazepinas son los receptores de los neurotransmisores inhibidores. El aminoácido llamado ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio, el más extendido en el sistema nervioso central, aproximadamente un tercio de las sinapsis son gabaérgicas. El receptor

del GABA, es un canal de cloruro integral de la membrana citoplasmática. La función del GABA es aumentar la conductancia al cloruro, este ion al entrar en la célula produce una hiperpolarización de la membrana, que determina la disminución de su excitabilidad y por lo tanto su inhibición.

Los agonistas típicos de estos agentes incrementan la magnitud de la corriente de cloruro generada por la actividad del receptor GABA, con lo que potencian los efectos del GABA por todo el sistema nervioso.

Se ha identificado tres tipos de receptores: GABA_A, GABA_B y GABA_C. El receptor GABA_A es el receptor donde actúan las benzodiazepinas de acuerdo a experimentos con benzodiazepinas radiomarcadas¹⁶ y por experimentos con otros agentes agonistas y antagonistas a este receptor.

El receptor GABA_A tiene una estructura que le permite, según el sitio donde interactúe con las diferentes sustancias, lograr modificar su estructura. Se intuye entonces que las benzodiazepinas modulan de manera alostérica la actividad del receptor.

Las benzodiazepinas son agonistas completos de este receptor, es decir que, en presencia de la droga y según su potencia, el sistema responde con el máximo de su capacidad. Estudios electrofisiológicos in vivo han mostrado que la intensificación de las corrientes de cloruro causada por las benzodiazepinas es resultado primario del incremento en la frecuencias de apertura de los canales de cloruro, producida por un estímulo GABA dado, con lo cual se produce un incremento en la inhibición postsináptica.¹⁷ Es decir que las benzodiazepinas no tienen efecto en la conductancia del cloruro en ausencia de GABA.

Otras drogas que han sido usadas como ligandos del receptor GABA_A para dar evidencia de que este es el receptor responsable de la ansiedad y el sitio de acción de las benzodiazepinas son: los llamados controvertidamente agonistas inversos como algunas β -carbolinas (contienen un grupo indol fusionado con una piridina, zolpidem, zopiclona) que actúan sobre el receptor desencadenando una respuesta contraria al disminuir la afinidad del GABA por su sitio de unión. Estos aumentan la ansiedad.

También existen los antagonistas competitivos y no competitivos. El flumanezil es un antagonista competitivo de las benzodiazepinas, es decir que las desaloja de su

sitio de unión al receptor, lo que resulta de utilidad en los casos de intoxicación aguda por benzodiazepinas.

La bicuculina y picrotoxina son también antagonistas competitivos, pero por diferentes mecanismos: la primera por inhibición competitiva del GABA y la segunda por su acción directa sobre el ionóforo de cloro. La conducta y los efectos electrofisiológicos de las benzodiazepinas suelen reducirse o prevenirse mediante tratamiento previo con antagonistas del receptor a nivel del $GABA_A$, como bicuculina

La prueba más firme de que las benzodiazepinas actúan directamente en los receptores $GABA_A$ deriva de la clonación molecular de subunidades codificadoras de cDNA del complejo del receptor $GABA_A$.¹⁸ Cuando se expresan las subunidades apropiadas en células heterólogas se producen sitios de fijación de benzodiazepinas de alta afinidad con receptores que median las conductancias de cloruro activadas por el GABA, las benzodiazepinas potencian las corrientes medidas en estas células; las propiedades de los receptores expresados son bastante semejantes a las de los receptores $GABA_A$ que se encuentran en la mayor parte de las neuronas centrales.

En conclusión las benzodiazepinas incrementan la inhibición mediada por el GABA sobre el receptor, y así producen ansiólisis, sedación y miorreajación.

1.5 Métodos de valoración:

Como resultado del amplio uso de las benzodiazepinas varios métodos de cuantificación en muestras biológicas han sido publicados, estos métodos buscan ser más sensible debido a la alta potencia que poseen las benzodiazepinas más recientes que por lo tanto se encuentran en bajas concentraciones en las formas farmacéuticas y también se encontraran en muy bajas concentraciones en las muestras biológicas.

Los métodos de valoración de benzodiazepinas han cambiado notablemente, antes se recomendaba una hidrólisis ácida previa al ensayo, de esta manera las benzofenonas formadas resultaban ser más fáciles de analizar, debido a sus propiedades hidrofóbicas que las hace más fáciles de separar de las matrices usadas, sin embargo con el advenimiento de nuevos métodos esto se dejó de practicar, sin olvidar que el pH es un factor clave en la valoración de benzodiazepinas.

Se han publicado varios métodos para la cuantificación de benzodiazepinas por cromatografía gaseosa, entre lo más recientes se encuentran: cromatografía gaseosa con desorción térmica ha sido aplicada al análisis de diferentes benzodiazepinas en comprimidos con bajo contenido de principio activo (menores de 1%).¹⁹ Microextracción en fase sólida y cromatografía gaseosa se aplicó al análisis de oxazepam, diazepam, nordiazepam, flunitrazepam, y alprazolam en sangre y orina.²⁰ Microextracción con cromatografía gaseosa con captura de electrones para la detección de benzofenonas provenientes de benzodiazepinas en orina.²¹

Alprazolam también ha sido analizado por cromatografía gaseosa en muestras biológicas²² y en especial cromatografía gaseosa con detector captura de electrones se aplicó al análisis de triazolobenzodiazepinas.²³

La descomposición que sufren las benzodiazepinas durante la cromatografía gaseosa es bien conocida. Las benzodiazepinas que se han encontrado que sufren descomposición durante los análisis de cromatografía gaseosas son:

N-4 óxidos: clordiazepóxido y medazepam, pierden un radical oxígeno, ketazolam se transforma en diazepam.

7-Nitro: Nitrazepam y clonazepam, son reducidas al correspondiente amino.

α -Hidroxi cetonas: lorazepam y oxazepam, se descomponen con la pérdida de agua, mediante rcarreglos térmicos, como se muestra en el esquema 2.2.

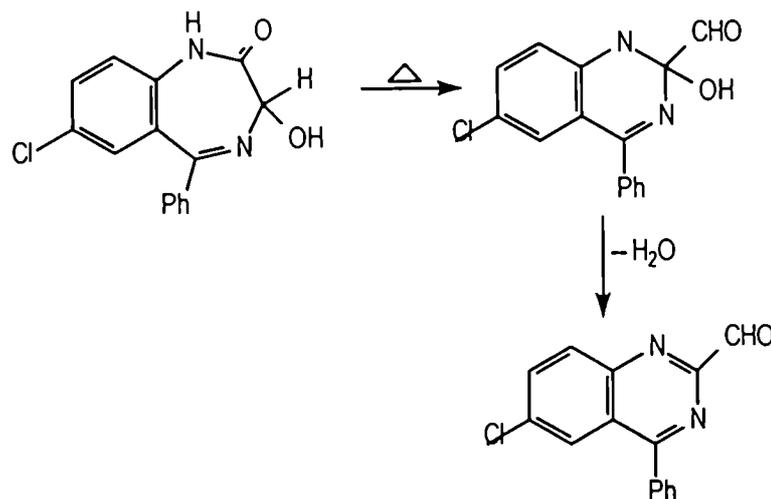
N-metil α -Hidroxi cetonas: lormetazepam y temazepam que se descomponen con la pérdida de un hidrógeno para producir la correspondiente α,β -dicetona.^{24,25}

HPLC es la técnica más ampliamente usada para el análisis de benzodiazepinas, se han publicado varios métodos de HPLC para el análisis de alprazolam en muestras de plasma tras extracción en fase sólida.^{18, 26,27}

En otro se publica un método de HPLC para determinar alprazolam y metabolitos, donde se reporta inestabilidad del metabolito del alprazolam: el 4-hidroxi alprazolam.²⁸ Y otros métodos también se han publicado para el análisis de triazolam en plasma²⁹ y adinazolam.³⁰

Recientemente se está usando métodos de LC/MS/MS, se aplicó esta técnica al análisis de una mezcla de bromazepam, estazolam, alprazolam y triazolam, en orina, mostrando que

este método es apropiado y rápido en el análisis de estos compuestos.³¹



Esquema 2.2. Rearreglo térmico de Oxazepam.

También se ha aplicado para la cuantificación de alprazolam y α -hidroxialprazolam en plasma humano usando LC/MS/MS.³²

Una combinación de extracción por inmunoafinidad y LC/MS/MS se usó para el análisis de nuevas benzodiazepinas con el fin de crear una biblioteca en síntesis combinatoria.³³

En un estudio muy reciente de alprazolam y sus metabolitos en plasma humano se diseñó un método de espectrometría de masa con ionización química negativa.³⁴ Espectrometría de masa por ionización química también ha sido usada para la detección de alprazolam en cabello, diseñándose un método sensible con fines forenses.³⁵

1.6 Degradación de Medicamentos

Estabilidad Farmacéutica Se define como la habilidad de un producto farmacéutico para mantener sus propiedades dentro de los límites especificados a través del tiempo de vida útil.

Estudios de estabilidad: son una serie de ensayos para obtener información sobre la estabilidad de una droga pura o un producto farmacéutico, en orden a definir

su período de re-test, tiempo de vida útil y período de utilización bajo condiciones de almacenamiento y empaque específicas.

“El propósito de un estudio de estabilidad es dar evidencia de cómo la calidad de una droga pura o en una preparación farmacéutica varía con el tiempo, bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad, luz y factores internos como concentración de la droga, luz, pH, fuerza iónica y oxidación.”³⁶

1.6.1 Tendencias en los ensayos de estabilidad

Las tendencias contemporáneas en los ensayos de estabilidad de productos farmacéuticos, consideran en particular los problemas que subyacen con el advenimiento de la globalización. Durante los últimos años numerosos laboratorios farmacéuticos se han fusionado incrementando el número de laboratorios que operan en diferentes áreas del mundo. Estos laboratorios transnacionales tienden a usar las mismas materias primas, equipos, métodos de producción y métodos de control de calidad en todas las plantas a través del mundo. Por lo tanto estos laboratorios tienen un gran interés en promover la compatibilidad de políticas de regulación tales como las de control de los ensayos de estabilidad.³⁷

Un factor importante en el mejoramiento de los estudios de estabilidad ha sido el desarrollo de nuevos métodos analíticos que son apropiados para usar como ensayos indicadores de estabilidad, en particular la cromatografía líquida, HPLC. La definición de un ensayo indicador de estabilidad ha evolucionado desde un método que permite la cuantificación del principio activo en la presencia de los productos de degradación y los excipientes a un método que permite la cuantificación de no solamente el principio activo sino también de los productos de degradación principales.³⁸

En la década del 60 aparecieron diversos artículos que sentaron las bases cinéticas para los estudios de estabilidad. En los años 70 comenzó a emerger la estandarización de metodologías para la cuantificación confiable de la estabilidad de productos farmacéuticos

En esta última década se avanzó considerablemente en la estandarización y reglamentación de los ensayos de estabilidad de medicamentos requeridos a la

industria farmacéutica. La FDA emitió por primera vez en 1987 la *Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologicals*³⁹ constituyéndose en las guías que sentaran las bases para el proceso de estandarización de estos ensayos. De igual modo, en la Comunidad Europea, la CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) emitió sus respectivas guías en 1989.

“Con el objetivo de usar económicamente los recursos humanos, animales y materiales y la eliminación de retrasos innecesarios en el desarrollo y disponibilidad de medicamentos nuevos mientras se mantiene la calidad, seguridad y eficacia como también obligaciones reglamentarias para proteger la salud pública,”⁴⁰ se reunieron en la *International Conference on Harmonization (ICH)* representantes de las autoridades reguladoras y productores farmacéuticos de la Comunidad Europea, Japón y USA. Cuyo resultado fue la guía dada a conocer como *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, que abarca un número de tópicos concernientes a la investigación, desarrollo y control de calidad de medicamentos. En cuanto a estabilidad se emitieron los siguientes documentos, *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, *Photostability Testing of New Drug Substances and Products*, *Stability Testing of New Dosage Forms*, *Validation of Analytical Methods*, *Impurities in New Drug Substances*, *Quality of Biotechnology Products* *Stability of products*.

La guía ICH Tripartita comenzó a ser vigente a partir de enero de 1998 en la Comunidad Europea reemplazando las otras guías emitidas por la CPMP. En Junio de 1998 la FDA propuso un borrador “*Draft Guidance: Stability Testing of Drug Substances and Drug Product*” basado en las guías de la ICH, sin embargo aún no se ha emitido el documento oficial.

La estandarización de los estudios de estabilidad es posible gracias a la división de las condiciones climáticas del mundo en cuatro áreas,⁴¹ a saber:

Tabla 1. Zonas climáticas

Zona Climática	Definición	Condiciones de Almacenamiento
Zona I N. Europa	Templado	21 °C/45% RH
Zona II. Europa, USA, Japón, Argentina, Chile.	Subtropical y mediterráneo	25 °C /60 % RH
Zona III Angola, Etiopía	Caliente y seco	30 °C /35 % RH
Zona IV África Central, Indonesia , Centroamerica	Caliente y Húmedo	30 °C /70 % RH

La división se hizo mediante la introducción del concepto de Temperatura Media Cinética, T_{km} ⁴² la cual se define como una temperatura virtual que se calcula a partir de datos meteorológicos y considerando también factores cinéticos (Ea y z). La determinación de T_{km} permite hacer estudios de estabilidad isotérmicos asegurando que los resultados representan el avance de las reacciones de degradación bajo las variaciones climáticas a que está sometido el medicamento en condiciones reales.

Primero se calculó la T_{km} para Japón, Comunidad Europea y USA, con la cual se estandarizó las condiciones de almacenamiento.⁴³ Tomando como base estos estudios actualmente se esta extendiendo esta estandarización a otras zonas climáticas^{44, 45}

1.6.2 Desarrollo de estudios de estabilidad

En términos generales, éstos se llevan a cabo siguiendo las siguientes etapas:

Ensayos de estrés: son aplicados sobre la droga pura. Se llevan a cabo para elucidar las características de estabilidad intrínseca. Tienen como objetivo determinar productos de degradación forzada y mecanismos de descomposición para la droga pura y proponer métodos apropiados de análisis. (75% HR y 60 °C) Se reconoce que algunas rutas de degradación pueden ser complejas y que bajo condiciones de

degradación forzada algunos productos pueden ser observados que son improbables que se formen bajo condiciones de degradación aceleradas y a largo término, sin embargo esta información es siempre útil en el desarrollo y validación de métodos analíticos apropiados.

Las nuevas guías de estabilidad hacen especial énfasis en la estabilidad de la droga pura, señalan que la droga pura debe ser sometida a estudios de estabilidad acelerado y a largo término, los últimos deben tener una duración de 13 meses. También señalan que durante estos estudios se debe monitorear las características físicas tales como polimorfismo.

Estudios de estabilidad acelerada son diseñados para incrementar la velocidad de la degradación química o cambios físicos de una sustancia activa o producto farmacéutico usando condiciones de almacenamiento exageradas. Se usan condiciones menos severas que las usadas en estudios de estrés.

Estudios de largo término o tiempo real: definido como la evaluación de las características físicas, químicas, microbiológicas y biofarmacéuticas de una droga durante y más allá del tiempo de vida útil, de muestras almacenadas en las condiciones esperadas en el mercado objetivo. En esta etapa se determina el tiempo de vida útil o fecha de expiración de un producto farmacéutico. Las guías de la FDA requieren que al mínimo 3 lotes de cada producto sea testeado en un programa de estabilidad de largo término por varios años. Los intervalos de testeo son cada 3 meses el primer año, cada 6 meses el segundo y después anualmente.

Un estudio de estabilidad definirá las condiciones de almacenamiento propias tanto para la droga pura como para los productos que la contengan y además definirá los siguientes tiempos si se almacenan en las condiciones recomendadas:

Período de retest: Término introducido para definir la estabilidad de la droga pura. Es el período durante el cual la sustancia pura se mantiene dentro de las especificaciones y por eso aceptable para su uso en la manufactura de un producto dado. La longitud de este período debe ser suficiente para cubrir el tiempo de almacenamiento, venta y subsiguiente uso.

Tiempo de vida útil: Es el intervalo de tiempo durante el cual un producto farmacéutico se mantiene dentro de las especificaciones aprobadas, bajo las condiciones de almacenamiento definidas y bajo el empaque propuesto y cerrado.

Periodo de utilización: Período durante el cual una preparación reconstituida o una forma farmacéutica (en un envase multidosis) abierta puede ser usada.

1.6.3 Métodos fisicoquímicos

La estimación del periodo de expiración por estudios de estabilidad acelerado y por la ecuación de Arrhenius mantiene su utilidad .

Recientemente se están dando a conocer publicaciones con miras al diseño de los tratamientos fisicoquímicos,⁴⁶ Se hace especial énfasis en la concepción de estos estudios, cuyo tratamiento está lejos de ser netamente estadístico y cuyas implicancias recaen sobre la salud pública .

Las nuevas guías son flexibles en el diseño factorial para tratar los datos obtenidos de las muestras retenidas en el programa de estabilidad. En general el diseño factorial es probablemente mas aceptado para productos con buena estabilidad y baja variabilidad que aquellos con pobre estabilidad y gran variabilidad

En la clásica metodología isotérmica la predicción del tiempo de vida útil se obtiene por estimación de la constante de velocidad aparente (k) a diferentes temperaturas y los parámetros de Arrhenius por una regresión de cuadrados mínimos. Esta metodología se emplea usualmente en la literatura farmacéutica para medir la estabilidad de una droga en un solvente específico o en formas farmacéuticas líquidas. Sin embargo para sustancias sólidas o formas farmacéuticas sólidas se emplean otras metodologías estadísticas. De hecho es difícil obtener predicciones fiables de un sistema heterogéneo como un comprimido. Esto puede ser debido a diferentes razones: uno es que la ecuación empírica de Arrhenius no siempre es válida en todo el rango de temperatura estudiado, y otra razón es que la presencia de alteraciones anómalas que pueden alterar o encubrir el perfil de degradación verdadero. Estos datos anómalos derivados de condiciones experimentales críticas son típicas de un estudio de estabilidad. Un cuidadoso proceso de limpieza debe ser llevado a cabo antes de

usar los datos para cuadrados mínimos. Este proceso de limpieza podría conducir a resultados de acuerdo a las expectativas del experimentador. Por esta razón se han diseñado técnicas de regresión que no son afectadas fácilmente por los puntos que claramente caen fuera de la regresión. Estos son llamados regresiones robustas RR⁴⁷

Oficialmente se recomiendan los intervalos de ensayo de 4 veces el primer año, 2 veces el segundo y anualmente los siguientes años. Se ha sugerido que para simplificar el número de muestras se puede aplicar un diseño de matrices.⁴⁸

En los ensayos de estabilidad por matrices donde estadísticamente las muestras ensayadas son consideradas representantes de las muestras en estudio y de las que se encuentran en el mercado. Se ejemplifica mediante la comparación de los resultados obtenidos de un test de estabilidad matriciado y un test de estabilidad completo. La matriz reduce en un 37% las muestras para los tres lotes.

La matriz consiste en muestrear los 3 lotes conjuntamente de manera que cada muestra represente los 3 lotes, así se reduce el número de muestras.

El trabajo citado presenta un estudio de un medicamento bajo dos presentaciones, y lo estudian de las dos maneras: test completo y mediante matrices, y se analiza el tiempo de expiración estimado por los dos métodos. Se concluye que los resultados entre ellos no son diferentes, lo que habilita al método por matrices.

¹ Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9ª ed. México, McGraw-Hill Inter. 1996, pp447

² Sternbach, L. H., Randall, L.O., Banziger, R., Lehr H., Medicinal Research Series, vol 2, A. Burger, Ed. Marcel Dekker, New York, 1968, pp 237.

³ Loew, G.H., Nicnow, J.R., Poulsen, M., *Mol. Pharmacol.*, 1984, 26, 19.

⁴ Gilman, N.W., Sternbach, L., *J. Heterocyclic. Chem.*, 1971, 8, 297.

⁵ Freyer, R.I., Schmidt, R.A., Sternbach L. H., *J. Pharm. Sci.*, 1964, 53, 264.

⁶ Schmidt, J., Comoy, P., Suquet, M., Boitard, J., LeMeur, J., Basselier J.J., *Chim. Ther.*, 1967, 2, 254

⁷ Wong M. G. Delfina. J.A., *J. Med Chem*, 1986, 29, 562.

-
- ⁸ Meguro K., Kuwada, Y., *Tetrahedron Lett.*, 1970, 4039.
- ⁹ Hester, J. B., Jr., Duchamp, D.J., Chidester, C.G., *Tetrahedron Lett.*, 1971, 1609.
- ¹⁰ USP DI, 16th ed. 1996, p. 529.
- ¹¹ Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9^a ed. México, McGraw-Hill Inter. 1996, vol. I, p.394.
- ¹² Wright, C.E.; Sissin, T.L.; Fleishaker, J. C.; Antal, E. J. *J. Clin. Pharmacol.*, 1997, 37, 321,
- ¹³ Bourin, M. et. al. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1998, 18, 364..
- ¹⁴ Noyes, R. Jr. et. al. *J.Clin. Psychiatry*, 1996, 57, 349.
- ¹⁵ Sethy V. H., Douglas, W., Harris, W., *J. Pharm. Pharmacol*, 1982, 34, 117-118
- ¹⁶ Pritchett, D.B., Somthimer, H., Shivers, B.D., Ymer, S., Kettenmann, H., Shofield, P.R. , Seeburg, P.H. , *Nature*, 1989, 338, 582-585.
- ¹⁷ Twymn, R. E., Rogers, C. J., McDonal, R.L., *Ann, Neurol.*, 1989, 25, 213-220
- ¹⁸ Schofield, P.R., Darlison, M.G., Fugita, N., Burt, D.R., Stephenson, F.A., Rodriguez, H., Rhee, L.M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencourse, T.A., *Nature*, 1987, 328, 221-227
- ¹⁹ Hida, M., Mitsui T., OTAN, H., Tsuge, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20, 419-426
- ²⁰ Reubsæet J.K., Norli, H>R., Hemmersbarch p., Rasmuseen, K.E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, 18, 667-680.
- ²¹ Guan, F., Seno, H., Ishii, A., Watanabe, K., Kumazawa T., Hattori, H., Suzuki., o., *J. Anal. Toxicol.*, 1999, 23, 54-61.
- ²² Greenblatt, D. J., Javaid, J. I., Locniskar A., Harmatz, J., Shader I.S. *J. Chrom. Biomed. App.*, 1990, 534, 202-207
- ²³ Greenblatt D. J., Divoll, M., Moschitto, L.J., Shader I.R., *J. Chrom. Biomed. App.*, 1981, 225, 202-207
- ²⁴ Joyce J.R., Arrdery, R.E., Bal, T.S., Stevens, H>M., Moffat, A.C., *Biomed. Mass Spectrometry*, 1984, 11, 284-289.
- ²⁵ Sadee, W., Kleijn, V.D., *J. Pharm. Sci.*, 1971, 60, 135-137
- ²⁶ Rogers W. O., Hall M.A., Brissie, R. M., Robinsson, C. A. *J. Forensic Sci.*, 1997, 42, 155-156
- ²⁷ Hall M.A., Brissie, R. M., Robinsson, C.A., *J. Anal. Toxicol.*, 1995, 19, 511-513

-
- ²⁸ Schmith, V. D., Cox, S.R., Zemaitis, M.A., Kroboth P.D.J. *Chrom. Biomed. App*, 1991, 568,253-260
- ²⁹ Inoue T. , Suzuki S.I., *J. Chrom. Biomed. App.*, 1987, 422, 197-204
- ³⁰ Peng, G.W., *J. Pharm. Sci*, 1984, 73, 1173
- ³¹ Zweigenbaum, J., Heinig, K., Steinborner, S., Wachs T., Henion, J., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2294-2300
- ³² D.J. Crouch, D.E. Rollins, D.E. Canfield, D.M. Andrcnyak, J.E. Schulties, *J. Anal. Toxicol*, 1999, 23. 479-485.
- ³³ Nedved, M.L., Habibi-Goudarzi, S., Ganen, B., Henion J. D., *Anal Chem*, 1996, 68, 4228-4236
- ³⁴ K.M. Hold, D.E. Rollins, D.J. Crouch, D.G. Wilkins, D.E. Canfield, R.A. Maes, *J. Mass Spectrometry*
- ³⁵ K.M. Hold, D.J. Crouch, D.E. Rollins, D.G. Wilkins, R.A. Maes, *Forensic Science International.*, 1997, 84, 201-209.
- ³⁶ Stability Testing of New Drug Substance and Products, ICH, 27 octubre de 1993
- ³⁷ B. Kommanaboyina, C. T. Rhodes, *Drug Dev. Ind. Pharm*, 1999, 25(7), 857-868.
- ³⁸ Quanyun A.X., Lawrence A. T., Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis, American Pharmaceutical Association, Washington,2000, 391pp
- ³⁹ *Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics*; Center for Drugs and Biologics, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services: Washintong , DC, February 1987
- ⁴⁰ Rodees C. T. en:Carstensen J.T., Rhodes C.T., *Drug Stability, Principles and Practices*, 3^o ed. Revised and Expanded, Marcel Decker, New York, 2000, pp 622
- ⁴¹ Gimm W, Thomae K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995, 41,194-196
- ⁴² Haynes, J., *J. Pharm. Sci.*, 1971, 60, 927
- ⁴³ Grim, W., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1993, 20, 2795-2830
- ⁴⁴ Grim, W., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998, 24, 313-325
- ⁴⁵ Carstensen, J. T., Bedawi, A. E., Hamid, M.E., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1995, 21, 731-738.
- ⁴⁶ Pranker R., *Australian J. Hospital Pharmacy* ,1995, 25, 405
- Golden M. H. , Cooper D. C. *J. Pharm. Sci.* 1996 ,85, 240.
- Cartensen J. T. , Danjo K. , *J. Pharm. Sci.* 1987 ,76, 548.

Cartensen J. T. , Franchini M. , *J. Pharm. Sci.* 1992 ,81, 303.

Fairweather W.R. , Daphne Tsae - Yun, *J. Pharm. Sci.* 1995 ,84, 1322.

Gimm W, Thomae K., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995, 41,194

⁴⁷ G. Caviglioli, G. Drava, S. Cafaggi, B. Parodi, G. Bignardi, *J Pharm Sci.*, 1996, 85 (10), 1096-1104

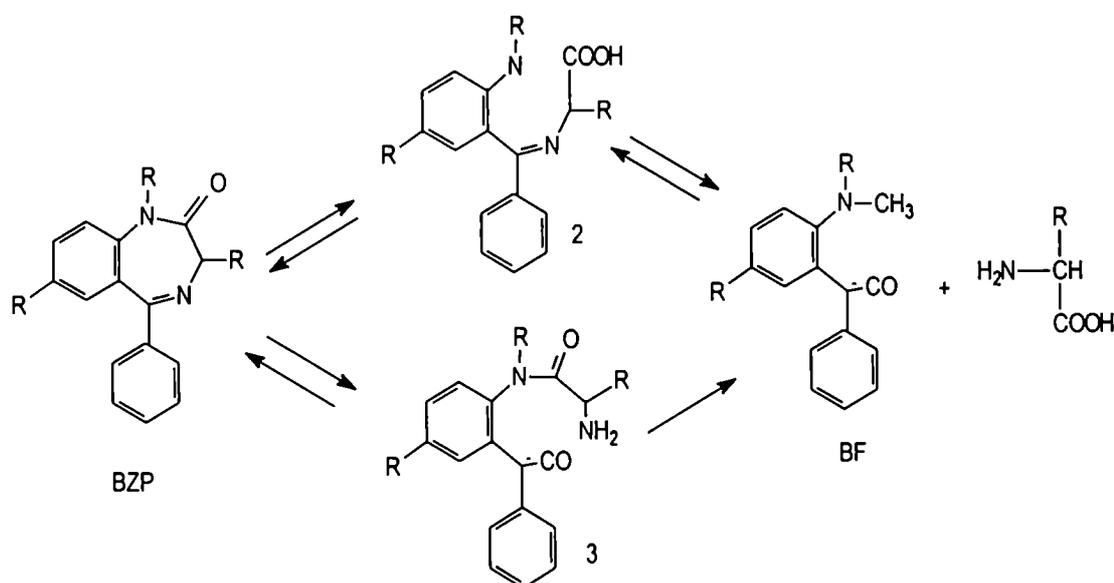
⁴⁸ Golden M. H.;Cooper D. A., *J. Pharm. Sci.*,1996,58,240

CAPITULO 2

DEGRADACION HIDROLITICA Y TERMICA DE ALPRAZOLAM.

2.1 Antecedentes

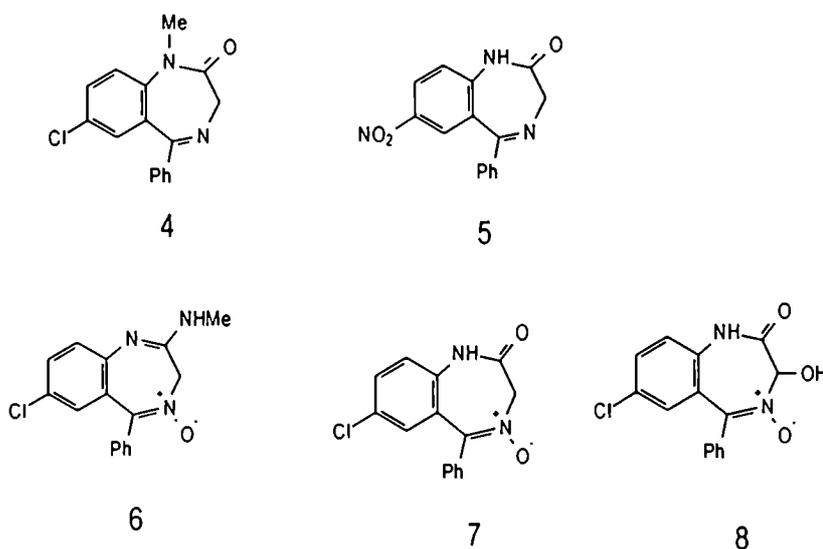
Desde el punto de vista mecanístico, la hidrólisis de las benzodiazepinas, **BZP**, es interesante debido a que el ataque nucleofílico puede ocurrir en el carbono 2, produciéndose la hidrólisis inicial de la amida con formación del intermediario **2**, o en el carbono 5 dando la hidrólisis inicial de la unión azometino con formación del intermediario **3**. Subsiguientemente, la hidrólisis de ambos intermediarios **2** y **3** conduce a la producción de las 2-aminobenzofenonas sustituidas, **BF**, y glicina.



Esquema 2.1

Las primeras mediciones de esta reacción de hidrólisis se llevaron a cabo usando mediciones de absorción, en metanol acuoso y en medio ácido.^{1,2}

Se han realizado investigaciones cinéticas y mecanísticas de la hidrólisis de diferentes benzodiazepinas: diazepam, **4**, nitrazepam, **5**, clordiazepóxido, **6**, demoxepam, **7** y oxazepam, **8**, con el fin de delinear los efectos estructurales en la importancia relativa de las dos rutas mecanísticas que conllevan a los productos finales.



Los resultados mostraron que el ataque del nucleófilo ocurre en el carbono 5, en la hidrólisis del nitrazepam, **5**, produciéndose la hidrólisis del enlace azometino 4-5 y la formación del intermediario, **3**. La reciclación del intermediario ocurre a pHs superiores al pKa del intermediario, en la región de pH donde el grupo amino del intermediario no está protonado. El hecho que esta ruta prevalezca sobre la otra es atribuido a una activación preferencial por hidrólisis del enlace azometino por el grupo nitro.³

La constante de velocidad de hidrólisis del enlace azometino 4,5 del nitrazepam es mayor que la del diazepam, lo cual podría ser explicado por el mayor efecto atractor del grupo nitro frente al cloro del diazepam.⁴

En la hidrólisis de clordiazepóxido, **6**, se observa la pérdida del grupo metil amina para dar lugar al demoxepam, **7**. El demoxepam se degrada por reacciones paralelas y consecutivas a 2-amino-5-clorobenzofenona y un derivado de glicina. Se observaron dos intermediarios para la hidrólisis de demoxepam por TLC, uno se debe a la estructura de anillo abierto proveniente de la hidrólisis de la amida, **2** y cinéticamente parece ser la ruta principal que conlleva a la formación de la benzofenona. El otro intermediario representa una ruta alternativa pero menor, que resulta presumiblemente de la escisión del enlace azometino, el intermediario **3**. La protonación del N-óxido altera ligeramente la importancia de estas dos rutas. La reciclación del intermediario carboxílico es a valores de pH inferiores al pKa de este intermediario.⁵ Iguales resultados se encuentran en el compuesto **8**.⁶

Los estudios cinéticos de la hidrólisis de estos compuestos se realizaron a través de dos métodos: un estudio espectrofotométrico acoplado a un proceso extractivo, donde la fase orgánica se descartó y la fase acuosa se leyó a 244 o 305 nm para el clordiazepóxido, y graficaron $\log \text{Abs vs } t$ y obtuvieron k_{obs} .

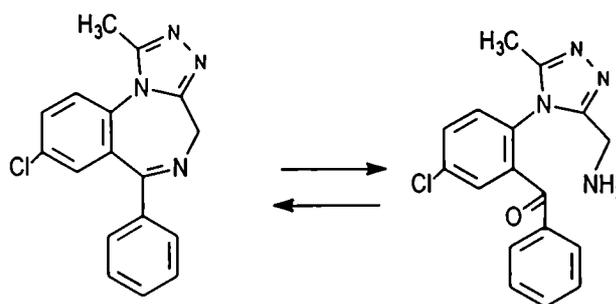
También emplearon TLC cuantitativa, con el fin de delinear el perfil cinético de la reacción y comparar ambas técnicas y también por TLC se aislaron los intermediarios que luego se caracterizaron por espectroscopia.

También se ha estudiado mediante espectrofotometría UV la hidrólisis del medazepam⁷ y del midazolam.⁸ Las cinéticas se han hecho a la temperatura de 37 °C, pensando en la hidrólisis que podría ocurrir en el tracto gastrointestinal.

En el laboratorio existe una abundante experiencia en estudios de estabilidad de benzodiazepinas;^{9,10,11} recientemente se ha publicado el aislamiento de novedosos productos de degradación del diazepam que no habían sido publicados en estudios previos realizados por otros autores.¹² Paralelamente se estudió la velocidad de decaimiento del primer producto de degradación y la cinética de formación de cada uno de los otros productos.¹³ Los resultados son relevantes por cuanto indican que los estudios del fármaco y de sus productos de degradación realizados con los métodos de valoración oficiales pueden conducir a errores considerables. Siguen a continuación los estudios que hemos realizado sobre alprazolam.

2.2 Hidrólisis de Alprazolam

El alprazolam se diferencia de las otras benzodiazepinas como diazepam y nitrazepam que han sido estudiadas anteriormente en este laboratorio,⁹⁻¹³ y en la presente tesis y de otras estudiadas por otros autores¹⁻⁸ que se hidrolizan a una benzofenona sustituida y glicina. El alprazolam y el triazolam podrían sufrir un mecanismo hidrolítico que implica la ruptura reversible de la unión imina dando una benzofenona, que en el caso del triazolam, es la 2'',5-dicloro-2-(3'-aminometil-5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-yl)benzofenona, como se muestra en el esquema 2.3.



Esquema 2.3

Varios intentos se han hecho para aislar esta benzofenona de la mezcla, la cristalización exhaustiva solamente dio como resultado alprazolam,¹⁴ es posible separar las especies de este equilibrio hidrolítico a través de TLC, usando cloroformo-metanol, 9-1, pero la benzofenona no puede ser separada del soporte de absorción.¹⁵

Solo por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono pudimos detectar la benzofenona formada en este equilibrio hidrolítico.(Fig 2.1 y 2.2). En RMN de ¹H se puede observar la hidrólisis del anillo diazepínico a través de las variaciones en la señal de los H-4: cuando el anillo diazepínico está cerrado los hidrógenos geminales del carbono 4 forman un sistema AX, y aparecen como dos d a 5.5 ppm y 4.3 ppm con J= 12 Hz, mientras que en la benzofenona los H-4 aparecen como un singulete a 4.1ppm y aparece la señal debida a NH,¹ a 8.3 ppm, como es observado en la figuras 2.1 y 2.2.

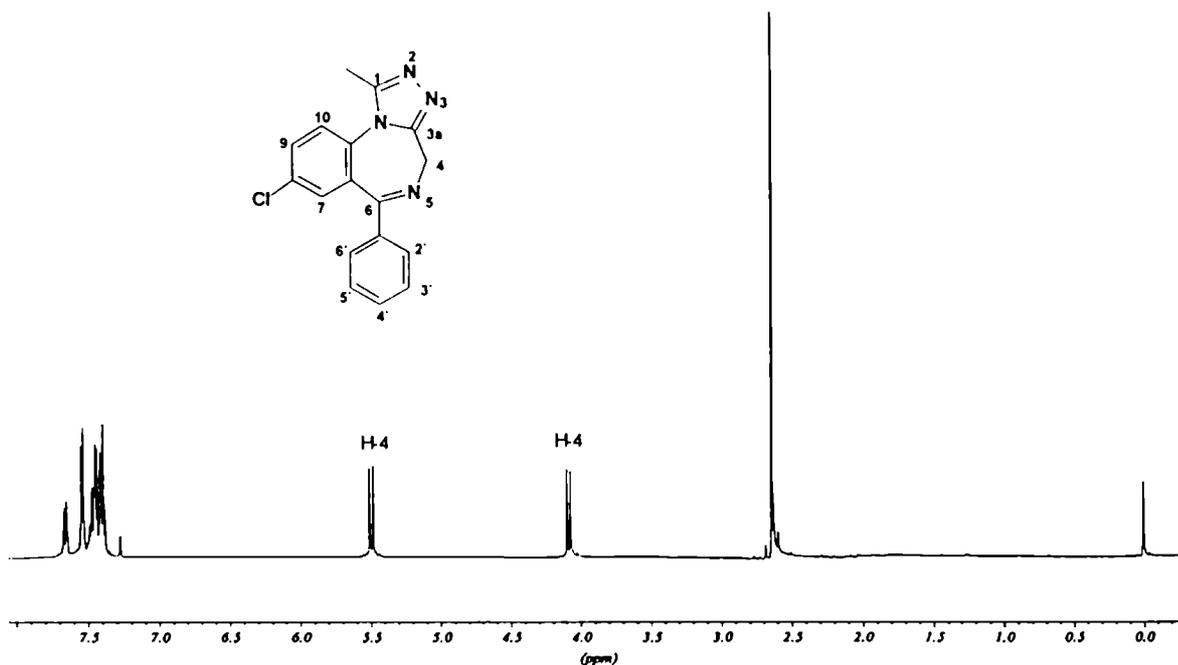


Figura 2.1. Espectro de ¹H RMN de Alprazolam

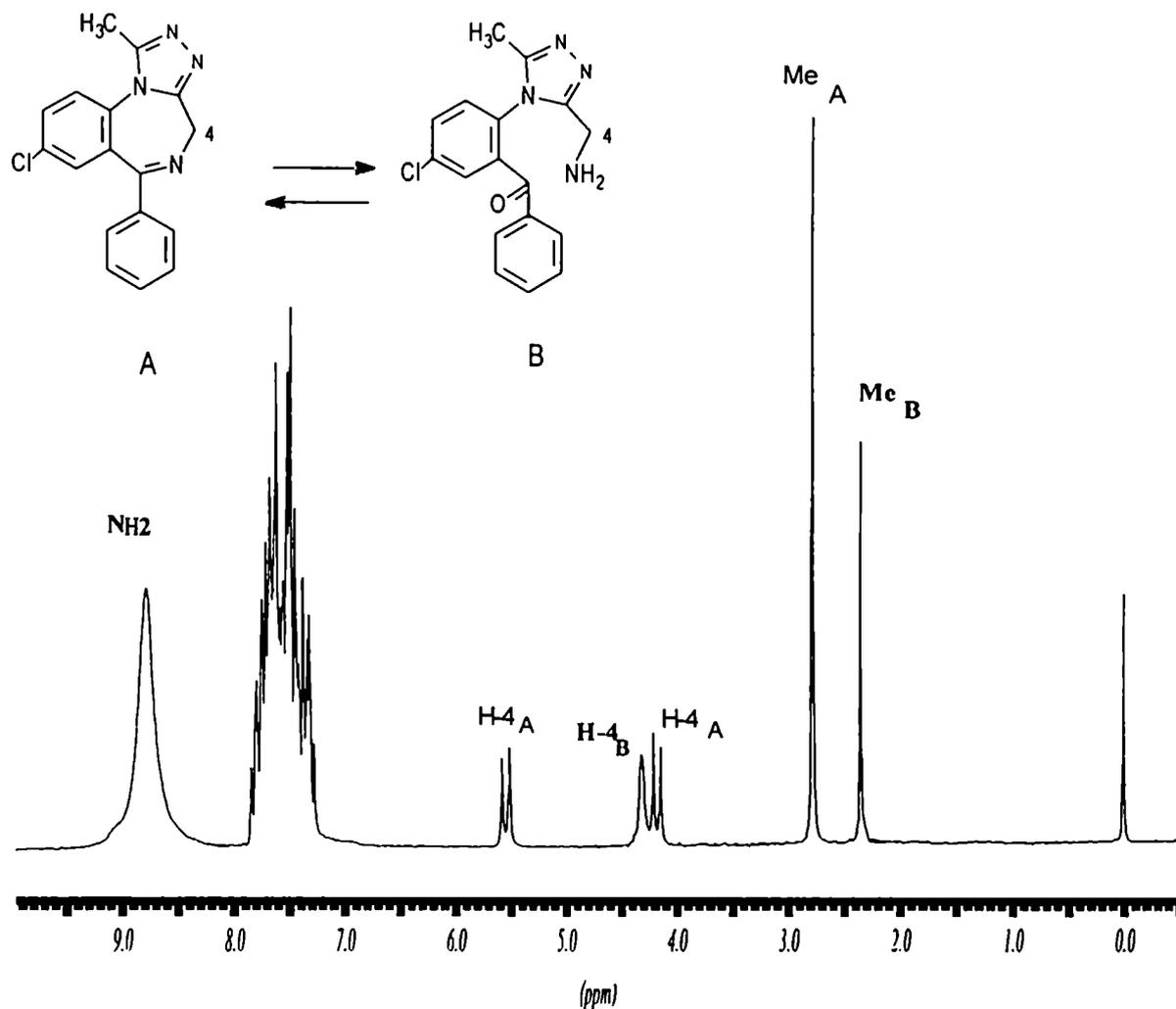


Figura 2.2. Espectro de ^1H RMN de Alprazolam y su benzofenona.

En el espectro de ^{13}C RMN también se observa la hidrólisis a través de la señal característica correspondiente al C carbonílico de la benzofenona. En la tabla 2.1 se resumen las señales para alprazolam y su benzofenona.

Tabla 2.1 Datos de ^{13}C -RMN para Alprazolam y su benzofenona

Compuesto	CH ₃	CH ₂	C-3a	C-1	C=N	C=O
Alprazolam	11.42	45.59	150.82	154.11	166.96	
Benzofenona	10.17	33.11	149.59	152.95		191.99

El mecanismo de la reacción de hidrólisis para alprazolam y triazolam ha sido estudiado por Cho M. J.¹³ y Konishi M.,¹⁶ respectivamente. En ambos casos la hidrólisis del alprazolam se estudió mediante espectrometría UV. Dado que cuando una solución de alprazolam es acidificada, el espectro UV cambia rápidamente presentando dos puntos isobésticos a 246 nm y 274nm. A pH cercano a 1.0, el espectro UV muestra una λ_{\max} de 263 nm y λ_{\min} de 238nm. Similarmente cuando una solución ácida de alprazolam es neutralizada a pH >6, el espectro UV cambia lentamente al espectro inicial: una λ_{\max} de 222 nm y λ_{\min} de 245nm.

Esto es, cuando una solución neutra es acidificada a pH < 5, los cambios en el espectro UV reflejan la velocidad de las reacciones de hidrólisis y anelación; y cuando una solución ácida es neutralizada a pH > 6.0, los cambios en el espectro UV reflejan la reacción de anelación exclusivamente.

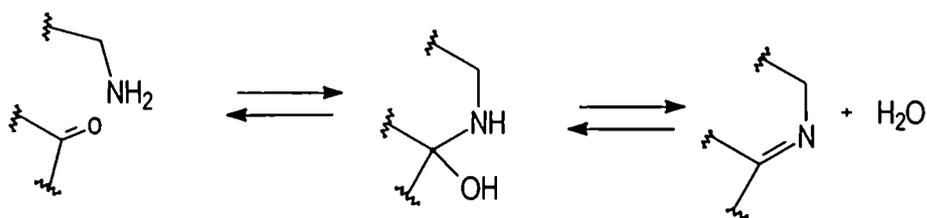
Las constantes de velocidad (k_{obs}) se determinaron midiendo el incremento en la absorbancia a 260 nm vs tiempo, aplicando una ecuación cinética de primer orden:

$$\log A_{\infty} - A_t = k_{\text{obs}} t.$$

k_{obs} se calculó para diferentes valores de pH (pH 1.0 - 8.0).

Con el fin de medir por separado la velocidad de la reacción de hidrólisis y la de anelación en pH < 5.0, se aprovechó la diferencia en las constantes de partición del alprazolam y de su benzofenona en solventes orgánicos. Se adaptó un sistema para que removiera el alprazolam (que se está formando mediante la reacción de ciclación) de la fase acuosa (soluciones buffer pH 2.41, 2.75 y 3.35). La velocidad de la reacción de anelación se calculó a partir de las mediciones de la disminución de la absorción a 260 nm.¹³ En otro estudio se midió estudiaba la reacción de anelación con cromatografía gaseosa después de derivatizar la benzofenona a un derivado de quinolina, en condiciones apropiadas para no perturbar el equilibrio.¹⁶

En ambos casos, el perfil de pH da como resultado una curva en forma de campana para la reacción de anelación, con un máximo a pH 5.5. La curva es similar a la resultante de la formación de una base de Schiff cuyo mecanismo se explica en el esquema 2.4, reacción que ha sido ampliamente estudiada.¹⁷

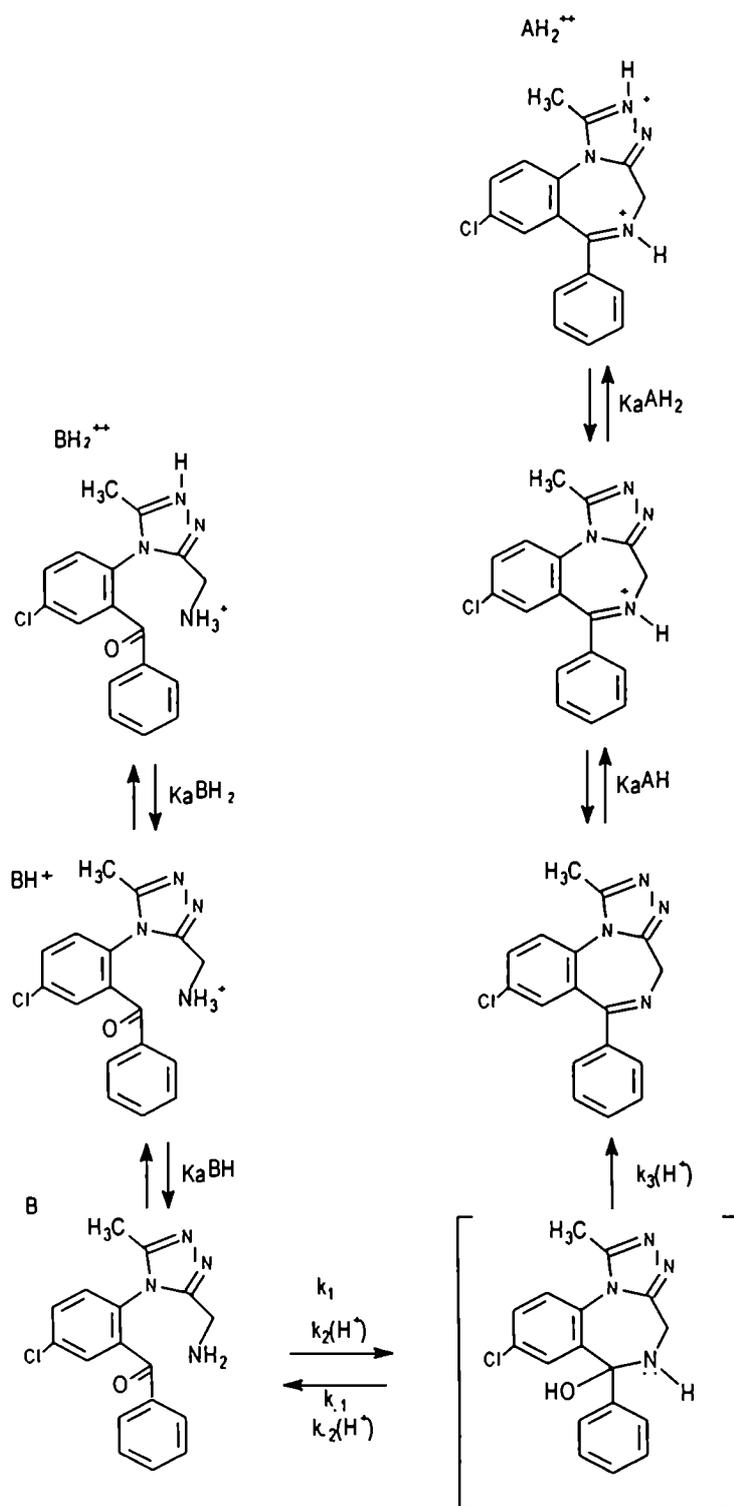


Esquema 2.4

La curva en forma de campana se debe al cambio en la etapa determinante de la velocidad de reacción con el cambio del pH:

En medio ácido la velocidad de anelación está gobernada por la formación del intermediario carbinolamina I, (esquema 2.5), debido a que la concentración de la amina B es extremadamente baja, y la deshidratación de la carbinolamina, I, es facilitada por la protonación del grupo OH. Sin embargo cuando el pH incrementa, aproximándose al pKa del grupo amina primario, el ataque nucleofílico del grupo amino en el carbonil de la benzofenona es más rápido que la deshidratación del intermediario I.

En las últimas páginas y en las tres siguientes, se describen sucintamente los resultados de estudios realizados hace casi veinte años. Vamos a ver en los capítulos subsiguientes que la espectroscopia UV utilizada en estos dos estudios, es ineficiente para diferenciar los productos de degradación con la precisión necesaria para realizar estudios de estabilidad. De tal manera, los estudios descriptos merecen mencionarse como antecedentes pero sus conclusiones con respecto a las estructuras no son totalmente válidas. A la luz de nuestros resultados que se detallan más adelante, es claro que puede haber otros productos de degradación además de los mencionadas, cuyas estructuras no han sido caracterizadas espectroscópicamente.



Esquema 2.5

En el esquema 2.5, k_1 y k_{-1} representan la velocidad de reacción sin catalizar, mientras que k_2 y k_{-2} representan las constantes de velocidad catalizada por ácido. Konishi calculó las constantes microscópicas mediante una aproximación al estado estacionario aplicada al intermediario carbinolamina, las ecuaciones de velocidad para la reacción de ciclación e hidrólisis, se formularon las ecuaciones 3 y 4.

$$k_{\text{ciclacion (obs)}} = \frac{(k_2[\text{H}^+] + k_3)(k_1 + k_2[\text{H}^+])}{k_{-1} + k_3[\text{H}^+] + k_4} \times \frac{K_a^{\text{BH}}}{K_a^{\text{BH}} + [\text{H}^+]} \quad (3)$$

$$k_{\text{hidrolisis (obs)}} = \frac{k_{-1}[\text{H}^+](k_4 + k_3[\text{H}^+])}{k_{-1} + k_3[\text{H}^+] + k_4} \times \frac{1}{K_a^{\text{BH}} + [\text{H}^+]} \quad (4)$$

Después, aplicando simplificaciones en estas ecuaciones para cada rango de pH, se llegó a ecuaciones más simples que permitieron hallar los valores de estas constantes microscópicas de manera experimental:

En medio alcalino, la etapa determinante es la deshidratación del intermediario carbinolamina, esto implica que $k_1 \gg (k_3[\text{H}^+] + k_4)$.

Si se asume que $k_1 \gg k_2[\text{H}^+]$, $k_3[\text{H}^+] \gg k_4$ y $K_a^{\text{BH}} \gg [\text{H}^+]$ se obtiene la ecuación 5

$$k_{\text{ciclacion (obs)}} = \frac{k_1 + k_2[\text{H}^+]}{k_{-1}} \times \frac{K_a^{\text{BH}}[\text{H}^+]}{K_a^{\text{BH}} + [\text{H}^+]} \quad (5)$$

reorganizándola se obtiene una ecuación donde k_1 y K_a^{BH} pueden ser calculados a partir del gráfico $[\text{H}^+]/k_{\text{ciclacion (obs)}}$ vs $[\text{H}^+]$. Los valores encontrados son $k_1 = 1.39 \times 10^{-5}/\text{min}$ y $k_3 = 3.13 \times 10^{-7}$ ($\text{p}K_a^{\text{BH}} = 6.50$).

Para pH superiores a 9.0, donde $K_a^{\text{BH}} \gg [\text{H}^+]$ $k_4 \gg k_3$, se obtiene la ecuación (6)

$$k_{\text{ciclacion (obs)}} = \frac{k_1 k_4}{k_{-1}} \quad (6)$$

Es decir, que a pH altos la velocidad llega a ser una constante, el valor observado es $0.4 \times 10^{-2}/\text{min}$.

En medio ácido la etapa determinante de la velocidad de reacción es el ataque de la amina, lo que equivale a $(k_3[\text{H}^+] + k_4) \gg k_1$ y en esta región de pH se cumple que $[\text{H}^+] \gg K_a^{\text{BH}}$ la ecuación 3 se simplifica a:

$$k_{\text{ciclacion (obs)}} = k_2 \frac{K_a^{\text{BH}} + k_1 K_a^{\text{BH}}/[\text{H}^+]}{K_a^{\text{BH}} + [\text{H}^+]} \quad (7)$$

De una gráfica k_{obs} vs $1/[H^+]$ se obtiene $k_1K_a^{\text{III}}$ y $k_2K_a^{\text{III}}$. Los valores obtenidos son $7.38 \times 10^{-4}/\text{min}$ y $7.32 \times 10^{-4}/\text{min}$ para k_1 y k_2 , respectivamente.

$$k_{\text{hidrólisis (obs)}} = \frac{k_1 k_2 [H^+]}{k_3 (K_a^{\text{III}} + [H^+])} \quad (8)$$

A partir de un reordenamiento de esta ecuación se puede calcular $k_1 k_2 / k_3$ y K_a^{III} se puede obtener de una gráfica $1/k_{\text{hidrólisis (obs)}}$ vs $1/[H^+]$. Los datos obtenidos son 6.32 min para $k_1 k_2 / k_3$ y 3.02×10^{-2} ($\text{p}K_a^{\text{III}} = 1.52$). M.O.Cho calculó las constantes microscópicas descritas en el esquema 2.5, aplicando el programa SIMPLEX a partir de los valores de k_{obs} y K_a^{III} determinados experimentalmente.

Los resultados de los estudios de hidrólisis de alprazolam y triazolam llevan a concluir que la reacción de hidrólisis de las triazolobenzodiazepinas es diferente a la de las anteriores benzodiazepinas, debido a la presencia del anillo triazólico que estabiliza el producto del primer paso reversible de la hidrólisis, y no permite la hidrólisis total del compuesto.

Un comportamiento similar se encontró para el midazolam, una benzodiazepina que contiene un núcleo imidazol en su estructura.

Patriarche, menciona que las reacciones de hidrólisis reversible del triazolam y del alprazolam, así como la del midazolam, pueden ser evaluadas con seguridad por polarografía pulsada diferencial.¹⁸

Por otra parte, el alprazolam es la única benzodiazepina donde la etapa de anelación de la reacción de hidrólisis reversible es cuantitativa y relativamente rápida a pH fisiológico; esta propiedad podría ser usada en el desarrollo de prodrogas hidrosolubles para uso parenteral.¹⁹

2.3 Hidrólisis de Alprazolam en condiciones severas

Se programó la hidrólisis de alprazolam en condiciones severas, con el objetivo de identificar otros productos de degradación, ya que en la literatura se menciona que, realizando la reacción de hidrólisis a 25°C , a pH menor que 0.5, y llevándola a cabo en la celda del espectrofotómetro, se habrían encontrado que había reacciones laterales, pero no se habrían identificado los productos.¹⁵ Se trabajó en las condiciones en las que se habían estudiado previamente otras benzodiazepinas,¹² se refluyó una solución de alprazolam en

condiciones de hidrólisis ácida, (HCl 6N y 0.1 N). Luego se procedió a extraer las mezclas de las dos reacciones con cloruro de metileno en medio básico y neutro, agregando NaOH 15%. A continuación se procedió a analizarlas por TLC usando distintas mezclas de eluentes. Se analizaron también por HPLC, ya que no es posible la determinación cualitativa del alprazolam por CG.

Los resultados según análisis por HPLC y TLC indican la formación de un solo compuesto. El análisis posterior de una solución ácida recientemente preparada indicó que ese producto es de una especie protonada del alprazolam..

Los resultados de las TLC indican que los productos de la reacción solución metanólica con HCl son reversibles.

También se observó que el estándar de alprazolam disuelto en cloruro de metileno y conservado en condiciones de temperatura ambiente y protección de la luz, presenta un producto que no es reversible. En vista de esto se procedió a dejar otra solución en iguales condiciones y otra protegida de la luz, observando que las muestras que sufren degradación son la que permanecieron más tiempo en el solvente, sin importar el factor luz.

2.4 Termólisis

Muestras de alprazolam en estado sólido se sometieron al influjo de la temperatura en una estufa de calor seco a 80 °C durante 5 meses. El análisis cuantitativo por HPLC mediante estándar externo, de una solución preparada y con esta muestra, indicó que esta droga no sufre descomposición en estas condiciones, la respuesta área-concentración es aproximada a la del estándar y no se observan nuevos picos. De otra manera, los análisis con TLC con diferentes eluentes no mostraron formación de otros productos.

También se prepararon soluciones de alprazolam en buffer pH 3.5, envasadas en ampollas y llevadas mediante un termostato a 80 °C durante 88 días, después de los cuales se analizaron por HPLC, no se observó disminución de la concentración, ni aparición de otros productos.

2.5 Oxidación

La degradación por oxidación se efectuó diluyendo 100 mg de alprazolam en cloruro de metileno destilado y agregando 1 ml de agua oxigenada 200 volúmenes; se dejó este

sistema bifásico agitando por 5 días a temperatura ambiente, haciendo monitoreo permanente de la reacción. Al cabo de este tiempo la solución se tornó de un color amarillo.

La mezcla de reacción se lavó con suficiente agua destilada para eliminar el agua oxigenada y luego se secó con sulfato de magnesio y se filtró.

Se desarrollaron diferentes TLC en placas de sílica gel con indicador, con la finalidad de encontrar el sistema más apropiado para separar los productos de la reacción. En las distintas TLC realizadas se encontró que el porcentaje de degradación es mínimo y no aparece ninguna mancha importante.

Oxidación y temperatura Dado que con el sistema precedente no hay avance en la reacción, se trató de acelerarla con más calentamiento, para ello se cambió de solvente, seleccionándose cloroformo para aumentar la temperatura.

Una solución de alprazolam en cloroformo se preparó de igual forma que la anterior y se dispuso a reflujo por 5 días.

La mezcla de reacción resultante es una mezcla bifásica donde ambas fases orgánica y acuosa toman color amarillo. Se trató de igual forma que a la reacción sin calentamiento. Debido a que los solventes de desarrollo de TLC usados para separar los productos del caso anterior no resultaron útiles, para ésta reacción se ensayaron otros. Los resultados muestran que en estas condiciones el porcentaje de degradación sigue siendo bajo y se observó la separación de varias manchas tenues.

2.6 Estudios de degradación de comprimidos de Alprazolam en ambiente húmedo

Con el objetivo de estudiar el efecto de la humedad y la temperatura en comprimidos de alprazolam, se analizaron por HPLC y TLC muestras sometidas a altas condiciones de estrés: 80 °C y 80 % HR, las cuales se dispusieron como se describe en detalle en la Sección Experimental.

La descomposición se monitorizó por veinte días y las muestras retiradas se analizaron por el método B de HPLC previamente validado (capítulo 7) descrito en la Sección Experimental.

Se realizaron ensayos preliminares donde se observó una degradación importante del alprazolam, y se observó la formación de un producto de degradación mayoritario, el cual se

identificó a través de la comparación de los t_R y R_f con los productos de degradación ya aislados e identificados y descritos en el Capítulo 5 de la presente.

Los resultados muestran que la triazolaminoquinolina es el principal producto de la degradación de alprazolam en estas condiciones, en la figura 2.3 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de estas muestras.

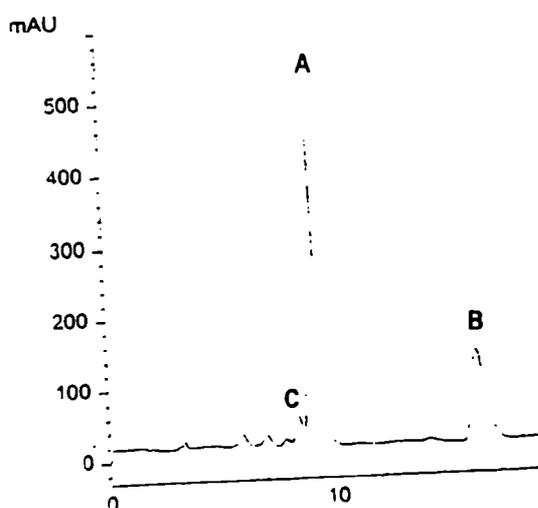


Figura 2.3 Cromatograma obtenido del análisis de comprimidos de alprazolam sometidos a 80 °C y 80 % HR durante 6 días.
(A) Alprazolam, (B) Triazolaminobenzofenona, (C) triazolbenzofenona

Se realizó un estudio cinético de la reacción de descomposición en estas condiciones. La degradación de los comprimidos se monitoreó durante 15 días, retirando periódicamente las muestras y analizándolas por el método de HPLC. La curva de decaimiento de alprazolam y formación de triazolaminoquinolina se muestran en la figura 2.4

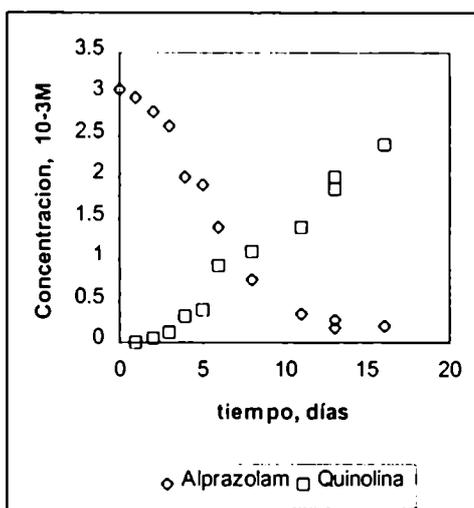


Figura 2.4. Reacción de degradación de Alprazolam en comprimidos a 80 °C y 80 % HR

Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de degradación en las condiciones arriba mencionadas para alprazolam como droga pura y también se evaluó el efecto de la temperatura sobre las tabletas, los resultados se muestran en la tabla 2.2:

Tabla 2.2. Degradación de alprazolam en comprimidos y como droga pura.

	t, días	% Alprazolam	% Quinolina
80 °C, 80 %RH ^a			
Comprimidos A	16	15.6	65.6
Comprimidos C	16	5.9	75.0
Comprimidos D	8	24.1	34.4
Alprazolam puro	28	86.8	<1
80 °C ^a			
Comprimidos	23	72.5	1.18
Alprazolam puro	88	98.0	No se observó

^a Muestras protegidas del efecto de la luz

En la tabla 1 se observa una diferencia en la estabilidad de alprazolam como droga pura y cuando está bajo una formulación, se evaluaron independientemente 3 presentaciones

comerciales observándose degradación significativa en todas ellas, bajo estas condiciones aceleradas de estrés.

2.7 Conclusiones

En la primera fase del estudio de estabilidad de alprazolam se observó que éste es una molécula altamente estable. No es sensible a hidrólisis a distintos pH por las reacciones reversibles que presenta, ni sufre termólisis en estado sólido, así como tampoco en soluciones; respecto a la oxidación sólo es levemente sensible en condiciones muy severas. Sin embargo, es las formulaciones farmacéuticas estudiadas, el alprazolam bajo condiciones de estrés muy severas se degrada por reacciones de reordenamiento para dar triazoloaminoquinolina. Probablemente, los excipientes utilizadas están involucrados en promover estas reacciones, que, de todos modos serían extremadamente lentas.

Otro factor importante que puede explicar la mayor degradación en los comprimidos es el efecto catalizador de los excipientes solamente por efecto de superficie. Efectivamente, se ha observado que la dispersión del sustrato sobre superficies inertes tiene también un efecto denominado "catálisis por superficie"^{20,21}

¹ Barret J., Franklin S., Davidson I.E., *J. Pharm., Pharmac.*, 1973, 25, 387-393

² Mauldin, H.V., Nazareno, J.P., Pearson, J.E., Michaelis, A.F., *J. Pharm. Sci.*, 1975, 64, 277

³ Han W.W., Yakatan, G. J., maness D.D., *J. Pharm Sci*, 1977, 66, 795-798

⁴ Inotsume N, Nakano M., *J Phar, Sci*, 1980, 69, 1331-1334

⁵ Han W.W., Yakatan, G. J., maness D.D., *J. Pharm Sci*, 1977, 66, 573-577

⁶ Han W.W., Yakatan, G. J., maness D.D., *J. Pharm Sci*, 1976, 65, 1199-1204

⁷ Petit, G. F. *J. Pharm Sci.*, 1976, 65, 1094-1095

⁸ Andersin, R.; Ovaskainen, J.; Kaltia, S. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 1994, 12, 165-172.

⁹ Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *Il Farmaco*, 1975, 30, 478.

¹⁰ Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *Org. Mass Spec.*, 1978, 13, 61.

¹¹ Nudelman, N. S., Socolovsky, S. E., Waisbaum, R. G. *Anales Real Soc. Esp. de Fis. y Quim.*, 1982, 78, 145

-
- ¹² Nudelman, N. E. and Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 998.
- ¹³ Nudelman N. S. and Waisbaum, R. G.. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 208.
- ¹⁴ Cho, M. J., Scahill, T. A., Hester, J. B. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 356
- ¹⁵ Jiménez, R. M., Domínguez, E., Baía, D. Alonso, R. M., Vicente, F., *J. Heteroc. Chem.*, **1987**, *24*, 421.
- ¹⁶ Konishi, M., Hirai, K., Mori, Y. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 1328
- ¹⁷ Jencks W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475
- ¹⁸ Patriarche, G. J., Vire, J. C. *Analytica Chim. Acta*, **1987**, *196*, 193
- ¹⁹ Cho, M. J.; Sethy, V. H.; Haynes, L. C. *J. Med. Chem.*, **29**, 1346, **1986**.
- ²⁰ Somorjov J. "urface Catalysis" , Mc Graw Hill, 1994
- ²¹ Nudelman N.S., Rios J.M, *Anales AQA*, **2001**, en prensa

CAPITULO 3

***SOLVOLISIS DE
O-AMINOBENZOFENONAS.***

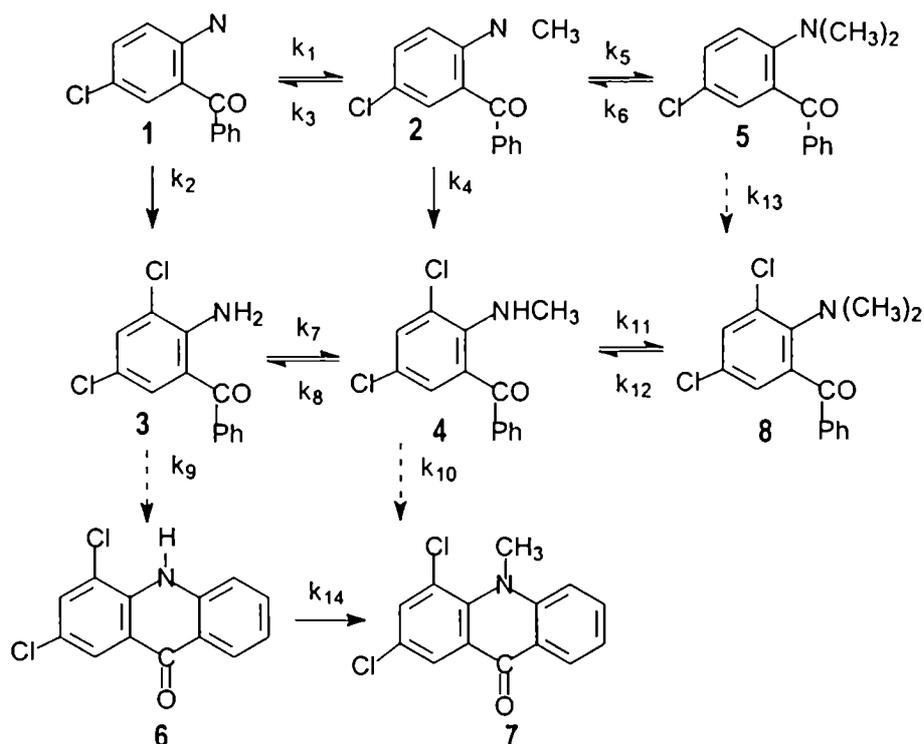
3.1 Antecedentes

Uno de los medicamentos más ampliamente estudiados en nuestro laboratorio es el diazepam, en cuyo estudio se encontró un sistema de reacciones interesantes dada la novedad y la complejidad de éstas.

En publicaciones previas a los estudios efectuados en el laboratorio se encontró como productos finales de hidrólisis del diazepam en medio ácido: la 2-(N-metilamino)-5-cloro benzofenona **2** y glicina, donde la velocidad de la reacción se determinó por espectroscopia UV.^{1, 2,3,4} Sin embargo para la misma reacción, en nuestro laboratorio, se encontraron, además, los siguientes productos: 2-Amino-5-Cloro-benzofenona, **1**; 2-Amino-3,5- dicloro-benzofenona, **3**; 2-N- Metil-amino- 3,5- dicloro-benzofenona, **4**; 2-N,N- Dimetil-amino- 5-Cloro- Benzofenona, **5**; 2,4- dicloro-acridin-9-(10H)-ona, **6**; 2,4- Dicloro-acridin- 10-Metil-9-(10H)-ona, **7**; y 2-N,N- Dimetil-amino- 3,5- dicloro- benzofenona, **8**. Los productos mencionados fueron caracterizados por espectroscopia RMN y EM y además las estructuras se confirmaron por síntesis independiente.⁵

Teniendo en cuenta las abundantes investigaciones existentes sobre esta droga frecuentemente prescrita, y el hallazgo de reacciones inesperadas que este compuesto sufre bajo condiciones levemente ácidas, nos interesó estudiar el mecanismo total de la reacción

En base a la suposición de que algunos de estos productos provengan de una posterior degradación de 2-(N-metilamino)-5-clorobenzofenona, de **2** se estudió la reacción de este compuesto en HCl 0.5 – 2.0 M en metanol-agua (1:1) a 60 °C y 80 °C ⁶ y también recientemente la cinética de las reacciones de **1**⁷ con HCl en metanol-agua (1:1) a 60 °C y 80 °C, en las cuales se observaron los productos **3-8**, derivados formalmente de reacciones de transferencia de metilos, cloración y ciclización, como se muestra en el esquema 1.



Esquema 1

Objetivos

No se esperaba que esas reacciones ocurriesen bajo estas condiciones y por tanto, el estudio presente se hizo con el objetivo de contribuir al conocimiento del mecanismo que da estos productos inesperados.

En este capítulo se describen los resultados de determinaciones cinéticas de las reacciones complejas de la 2-Amino-3,5-Cloro-benzofenona, **1**, de la 2-N-Metil-amino-5-Cloro-benzofenona, **2**, con HCl en varias concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 N) y en mezclas binarias de metanol-agua 84-16, y se compara con estudios previos en mezclas binarias metanol-agua, 1-1, resultados obtenidos en previamente en nuestro laboratorio de las reacciones de estos compuestos. También se estudia la reacción de 2-N-Metil-amino-3,5-dicloro-benzofenona, **4**, con HCl en varias concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 N) y en mezclas binarias de metanol-agua 84-16 y 1-1.

Por otra parte se describen otros experimentos adicionales, que pretenden dar evidencia adicional de los mecanismos propuestos.

En todos los casos se determinaron la velocidad de desaparición del sustrato (1, 2, 3 o 4) y las velocidades de formación de los diversos productos de reacción, se identificaron los gases desprendidos y se determinó las acridinonas sustituidas se habían formado. Se utilizó un complejo sistema de ecuaciones diferenciales para calcular los coeficientes de velocidad de las diversas etapas, y se ensayaron experimentos diferentes para verificar el mecanismo propuesto. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que se hace de este esquema de reacciones inesperado, que las sustancias dadas sufren bajo las condiciones de reacción presentes.

3.2 Análisis cinético

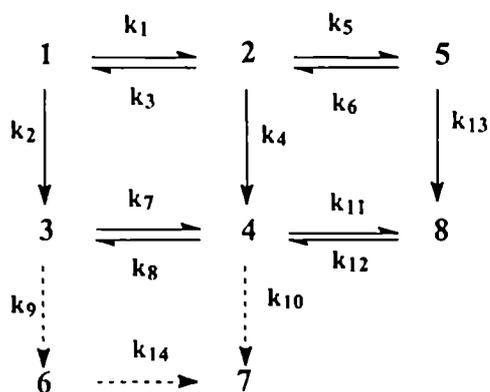
La técnica espectrofotométrica no es apropiada para seguir la cinética, porque los espectros UV de los compuestos 1-8 y sus derivados de primer y segundo orden son muy similares.

El sistema de cromatografía gaseosa descrito en "Sección Experimental" permitió la determinación de las concentraciones actuales de los productos 1-5 y 8. En las condiciones de análisis fue posible cuantificar por separado las benzofenonas dicloradas.

Las acridinonas 6 y 7 no pueden ser determinadas por GC y se han determinado en forma semi-cuantitativa por TLC. Por cuanto la exactitud en la determinación de la concentración de cada compuesto era esencial para el objetivo de este trabajo, se realizaron por lo menos tres veces los ensayos.

3.3 Modelo cinético. Como en líneas generales este modelo se usará también para el tratamiento de la cinética realizada con alprazolam se describirá en detalle en este capítulo el modelo cinético utilizado para ambos estudios. En un principio, la reacción obedece a una ecuación cinética simple, un decaimiento de primer orden del sustrato S, las porciones iniciales de las gráficas [concentración molar] vs tiempo, se comportan como si representaran reacciones paralelas bajo ciertas condiciones de reacción, en las cuales unas variaciones lineales de $\ln([S]_0/[S])$ vs tiempo indican que la degradación de S sigue una cinética de primer orden, las pendientes de estas gráficas se llaman k_{obs} . En estos casos, se consideró un esquema simplificado de las reacciones, y los coeficientes de velocidad de formación específica de los productos se calcularon a partir de gráficas de las concentraciones molares de ellos, como función de $\{1 - \exp(-k_{obs} \cdot t)\}$ ⁸ Esto es lo se llama método A, en las tablas 5 y 6.

Transcurrido este tiempo tienen lugar otras reacciones y los puntos experimentales caen muy fuera de la recta " $\ln ([S]_0/[S])$ vs. t " y " $[S]$ vs. $\{1-\exp(-K_{obs} t)\}$ ". En la mayoría de los casos, se obtuvo el mejor ajuste con un conjunto de ecuaciones diferenciales correspondientes, en cada caso, a las diversas reacciones paralelas y/o consecutivas que representan formalmente como sigue :



Esquema 3.2

Las ecuaciones diferenciales planteadas para la reacción de 1 están dadas por las ecuaciones 1-7 :

$$\frac{d[1]}{dt} = -k_1 [1] + k_3 [2] - k_2 [1] \quad (1)$$

$$\frac{d[2]}{dt} = k_1 [1] - (k_3 + k_5 + k_4) [2] + k_6 [5] \quad (2)$$

$$\frac{d[3]}{dt} = k_2 [1] - (k_7 + k_9) [3] + k_8 [4] \quad (3)$$

$$\frac{d[4]}{dt} = k_7 [3] + k_{12} [8] - k_4 [2] - (k_8 + k_{10} + k_{11}) [4] \quad (4)$$

$$\frac{d[5]}{dt} = k_5 [2] - (k_6 + k_{13}) [5] \quad (5)$$

$$\frac{d[6]}{dt} = k_9 [3] \quad (6)$$

$$\frac{d[7]}{dt} = k_{10} [4] \quad (7)$$

Para resolver el sistema, se consideró como una primera aproximación el conjunto de los coeficientes de velocidad específica hallados por el método A, y se tuvieron en cuenta las observaciones adicionales :

1) Se observó formación del compuesto 8 solamente en la reacción de 4 en metanol-agua (84:16), a todas las concentraciones de HCl, mientras no se observó en la reacción de 2 con 1.5 M HCl, en la cual a su vez es muy importante la formación de 5; esto sugiere que k_{13} es despreciable. El lento decaimiento de [5] en las reacciones estudiadas sugiere que k_6 también es muy pequeño, mientras k_{11} debería ser importante. Como no se observó una degradación de 8, se asumió que k_{12} es despreciable.

2) En la reacción de 3 con 0.5M HCl en metanol-agua (1:1), luego de 120 días [3] era el 85% de su valor inicial y solo se observó trazas de los compuestos 4, 6 y 7. Esto indicaría que k_7 y k_9 son pequeños también. Como se observó 4 en los primeros días de la reacción, esto indicaría que $k_7 \ll k_{10}$ (así, 4 desaparecería inmediatamente para dar 7 y/o que lo más importante es la vía $3 \rightarrow 6 \rightarrow 7$, y se puede asumir que esta ocurriendo una metilación de 6, donde el "k" involucrado es el k_{14} .

3) Para la simulación, se tomaron las constantes de velocidad más fiables en base a los siguientes criterios: a) Los valores de k_1 y k_2 de la reacción de 1 (véase la tabla 2) se consideran los más fiables porque la formación de 2 o 3 no involucra reacciones consecutivas (la formación de 4 y 5). b) Por la misma razón se consideran más acertados, los valores de k_3 , k_4 y k_5 obtenidos en la reacción de 2 (véase tabla 1).

c) De las reacciones de 3 conjeturamos fácilmente que k_7 es más pequeño que las otras constantes de velocidad.

El ajuste de los valores de estos parámetros k se hizo por un procedimiento iterativo, buscando aquellos que minimizasen la suma de los cuadrados de las diferencias entre los datos experimentales, y los valores calculados a partir de las curvas correspondientes a los parámetros propuestos. Se obtuvo, en cada caso, un buen ajuste de las gráficas simuladas a partir de los valores hallados, al conjunto de datos experimentales, y se muestra esto para algunas pruebas típicas en las figs. 1-4, donde se observó una coincidencia muy satisfactoria..

En algunos casos se resolvió el sistema por integración numérica, usando el algoritmo de Runge-Kutta hasta el 4o. orden.⁹ Todas las determinaciones cinéticas se realizaron a 80°C.

3.4 Reacción de la 2-(N-metil)amino-5-clorobenzofenona. 2

La Tabla 1 muestra las concentraciones molares de 1-5, determinadas en las reacciones de 2 con 0.5 M HCl en metanol-agua, 84-16 a 80°C, a diferentes intervalos durante los primeros 7 días.

Se puede ver en la tabla 1 el continuo decrecimiento de [2] y el incremento de [1], [3], [4] y [5].

Tabla 1. Reacción de 2-(N-Metilamino)-5-clorobenzofenona, 2, con HCl 0.5 M en metanol-H₂O (84:16), a 80°C.^a

tiempo días	10 ³ M				
	[2]	[4]	[1]	[5]	[3]
0.0	3.26	-	-	-	-
0.2	3.09	0.12	0.04	0.01	
0.9	2.68	0.35	0.18	0.04	
1.2 ^b	2.49	0.43	0.27	0.08	
1.9	1.95	0.60	0.60	0.11	-
2.2	1.86	0.85	0.45	0.09	0.02
2.9	1.58	0.90	0.65	0.10	0.04
3.1	1.20	1.33	0.61	0.07	0.04
4.0	1.19	1.30	0.62	0.06	0.09
4.2 ^c	0.76	1.29	0.70	0.06	0.18
6.9	0.41	1.60	0.79	0.12	0.33

^a [2]₀ = 3.26 × 10⁻³ M. ^b De este tiempo en adelante acridinona 6 se detectó por TLC. ^c De este tiempo en adelante acridinona 7 se detectó por TLC.

Los compuestos 4 y 1 son los productos que prevalecen en la reacción; 3 y 5 fueron detectados en cantidades menores. La Fig. 1 muestra que mientras [4] crece continuamente, [1] alcanza un máximo tras aproximadamente 2 días y luego permanece casi constante.

El gráfico lineal de $\ln([2]_0/[2])$ vs. tiempo, indica que la degradación de 2 sigue una cinética de primer orden. La evaluación de los datos de hasta 7 días de reacción confirma cuatro reacciones paralelas, correspondientes a la formación de 1, 3, 4 y 5. Los coeficientes de velocidad específica para la formación de los productos, se calcularon a partir de las gráficas de la concentración molar para cada uno de ellos, en función de $\{1-\exp(-kt)\}$. Los resultados, que son promedio de por lo menos dos ensayos, se muestran en Tabla 2 para esta y otras reacciones a diferente [HCl] (Metodo A). La simulación de esta compleja cinética de reacción para cada [HCl] dio los coeficientes de velocidad por una aproximación pseudo-primer orden, que también mostramos en la Tabla 2 (Métodos B y C). Donde también se han consignado las velocidades de reacción observadas en metanol-agua, 1-1 a fin de evaluar los

efectos del solvente. Los datos para metanol-agua, 1-1 fueron obtenidos previamente, se citan aquí a fin de establecer un paralelo entre las reacciones estudiadas con metanol-agua, 84-16 y 1-1 y obtener observaciones mecanísticas.⁵

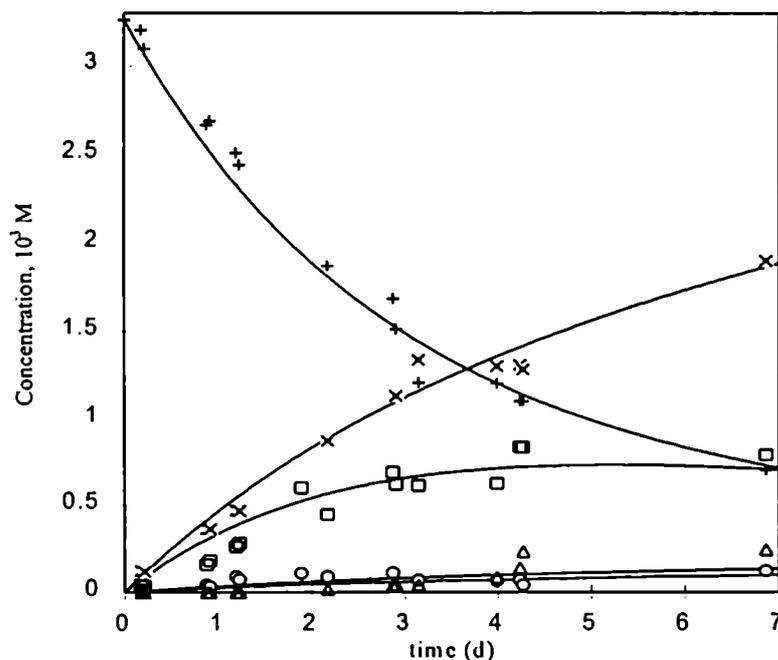


Figura 1. Datos representativos para la pérdida de 2, (+) y formación de: 4, (x); 1, (o); 5, (O); y 3, (Δ), como función del tiempo, usando HCl 0.5 M en metanol:agua, 84:16 a 80 °C.

Se observa una concordancia razonablemente buena con las velocidades determinadas por el método A, cada vez que la comparación es posible.

Cuando la reacción se produjo con HCl 1.0, la degradación total de 2 fue más lenta y prevaleció la formación de 5. Los valores finales fueron:

$[4]_{7.3d} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[1]_{7.3d} = 0.68 \times 10^{-3} \text{ M}$ habiéndose partido de un valor inicial $[2]_0 = 3.73 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Las acridinonas 6 y 7 se detectaron desde los 1.9 y los 5 días, respectivamente.

La Fig. 2 muestra los resultados de la reacción con HCl 1.5 M a 80°C, y la comparación con la Fig. 1 revela el efecto de [HCl] sobre la producción relativa de cada compuesto.

Tabla 2. Reacción de 2-(N-Metilamino)-5-clorobenzofenona, 2, con HCl en metanol-H₂O a 80 °C. Coeficientes de velocidad de pseudo-primer orden.

[HCl], 10 ⁷ (s ⁻¹)		10 ⁷ constantes de velocidad de pseudo-primer orden,(s ⁻¹)					
M	k _{obs}	Método	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅
Solvente:			MeOH-H ₂ O, 84:16				
0.5	42	A	^b	1.5	12	23	1.2
		B	4.0	4.2	15	18	1.0
		C	4.2	4.5	15	18	1.3
1.0	25	A	^b	0.8	7.4	16	3.9
		B	6.1	1.5	10	14	2.9
		C	5.8	1.0	6.1	12	2.6
1.5	18	A	^b	0.35	3.9	8.2	4.2
		B	13	0.5	5.0	12	4.2
Solvente:			MeOH:H ₂ O, 1:1				
0.5	78	A	^b	2.2	42	40	0
		B	0.3	1.6	42	32	0
1.0	44	A	^b	0.70	19	14	1.6
		B	4.0	0.6	19	11	2.3
1.5	21	A	^b	0.25	5.8	2.3	4.6
		B	9.1	0.1	5.0	2.1	10

^a Métodos A: Calculados considerando reacciones paralelas. B: Calculados con el método descrito en sección experimental (ver medidas cinéticas). C: Calculados usando el método de Runge Kuta. ^b k₁ no puede ser calculada por el método A.

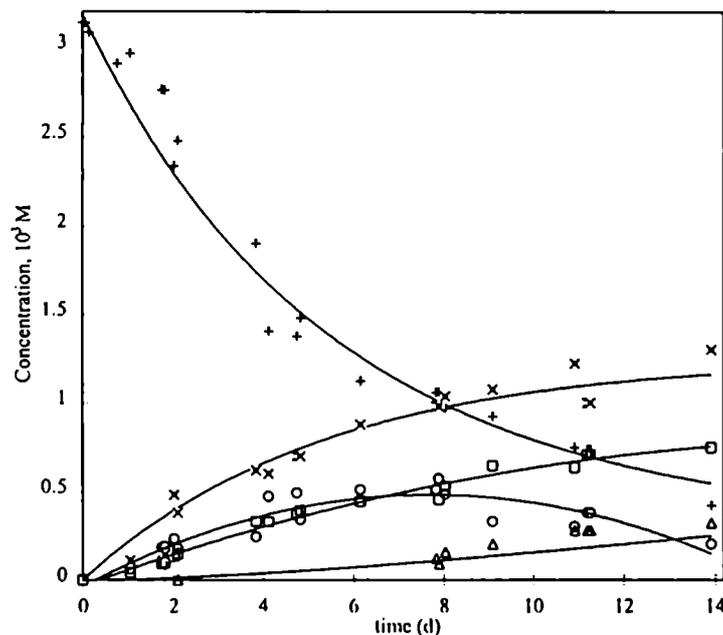


Figure 2. Datos representativos para la pérdida de **2**, (+) y formación de: **4**, (x); **1**, (); **5**, (O); y **3**, (Δ), como función del tiempo, usando HCl 1.5 M en metanol:agua, 84:16 a 80 °C.

En esta reacción, se ha hecho más lenta la degradación total de **2**, prevalece la cantidad del producto **5** y se observa una disminución de este último al cabo de 6 días. Se detectó las acridinonas **6** y **7** a partir de los 1 y los 5 días, respectivamente. La evaluación de los datos dio los coeficientes de velocidad para pseudo-primer orden que se muestra en la Tabla 2.

- Las observaciones generales son :
- 2** desaparece más lentamente a [HCl] más baja.
 - La formación del producto clorado **4** es más importante con HCl 0.5 M.
 - A menor [HCl], es más importante la desmetilación de **2**.
 - A mayor [HCl], es más importante la metilación de **2**.

- La acridinona **6** aparece ya casi al principio de la reacción, mientras la formación de **7** demora más.
- Las k_{obs} global de pseudo primer orden es mayor en MeOH-H₂O, 1-1 que en 84-16
- El efecto del solvente sobre las velocidades parciales k_1 a k_5 es muy dependiente de la [HCl] observándose, coherentemente, que las velocidades de metilación k_1 y k_5 son mayores a mayor [MeOH] en el solvente.

3.5 Reacción de la 2-Amino- 5-clorobenzofenona, (1) .

Se observó un comportamiento diferente al de la reacción de **2**. La vida media de la reacción no depende de [HCl] (ver Tabla 4), y es más larga que la de **2**. La Tabla 3 muestra los resultados para la reacción con HCl 0.5M en metanol-agua (84:16), a 80°C .

Tabla 2. Reacción de 2-(N-Metilamino)-3,5-diclorobenzofenona, 4, con HCl 0.5 M en metanol-H₂O (1:1), a 80 °C. ^a

tiempo días	10 ³ M		tiempo días	10 ³ M	
	[4]	[3]		[4]	[3]
0.0	2.63	-	9.2	2.20	0.40
0.8 ^b	2.63	-	11	2.25	0.35
3.2	2.52	0.11	13	2.01	0.62
4.9	2.42	0.17	14 ^{c,d}	1.91	0.60
7.0	2.26	0.24	17	2.05	0.50
7.1	2.23	0.27	19	1.60	1.00
7.9	2.33	0.26			

^a [4]₀ = 2.63 x 10⁻³ M. ^b De este tiempo en adelante acridinona **7** se detectó por TLC. Acridinona **6** no se observó. ^c De este tiempo en adelante trazas de **8** se detectaron. ^d [7]_{15 d} = 1.22 % de [4]₀.

Los productos principales son **3** y **4** (prevalece **3**); es evidente que [**1**] disminuye por cloración y metilación. Durante los primeros días de la reacción aumenta [**2**] , luego a partir de los 5 días disminuye mientras [**3**] crece sostenidamente. La formación de **4** parece ser consecuencia inmediata de la desaparición de **2**. Solo se encontró vestigios de **5**, y se detectó las acridinonas **6** y **7** a partir de los 5 y los 13 días, respectivamente. El comportamiento del sistema concuerda con el de reacciones consecutivas, y en la Tabla 4 se muestra los coeficientes de velocidad específicos para pseudo-primer orden, para todos las

[HCl] estudiadas. Los resultados encontrados para la reacción de 1 en metano-agua, 1-1 provienen de un estudio desarrollado anteriormente en el laboratorio.⁶

Tabla 4. Reacción de 2-amino-5-clorobenzofenona, 1, con HCl en metanol-H₂O a 80 °C. Coeficientes de velocidad de pseudo-primer orden

[HCl]	$10^7 (s^{-1})$ k_{obs}	Método	10^7 constantes de velocidad de pseudo-primer orden, (s ⁻¹)				
M			k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	k ₅
Solvente:			MeOH-H ₂ O, 84:16				
0.5	13	A	0.39	8.0	^b	2.0	0
		B	3.0	4.0	14	20	0.58
		C	3.1	8.2	2.3	21	1.2
1.0	13	A	1.7	3.3	^b	6.6	0.34
		B	5.1	1.2	12	16	2.4
1.5	13	A	8.1	1.7	^b	3.4	1.3
		B	13	0.5	5.6	14	3.8
Solvente:			MeOH-H ₂ O, 1:1				
0.5	3.4	A	0.13	0.15	^b	2.6	0
		B	0.26	0.5	38	25	0
1.0	3.9	A	3.5	0.10	^b	1.8	1.3
		B	4.0	0.2	14	10	0.13
1.5	10	A	9.5	0	^b	0	11
		B	9.2	0	6.2	0	5.0

^a Métodos A: Calculados considerando reacciones paralelas. B: Calculados con el método descrito en sección experimental (ver medidas cinéticas). C: Calculados usando el método de Runge Kutta. ^b k₃ no puede ser calculada por el método, debido a que solamente reacciones paralelas son consideradas.

La reacción de 1 con HCl 1.0M, se muestra en la Fig. 3, sigue un comportamiento similar a reacciones consecutivas, aunque difiere de aquella con HCl 0.5M.

En las etapas iniciales de la reacción, 2 es el producto principal, alcanzando la máxima concentración al cabo de 4 días para luego disminuir ligeramente hasta los 28 días.

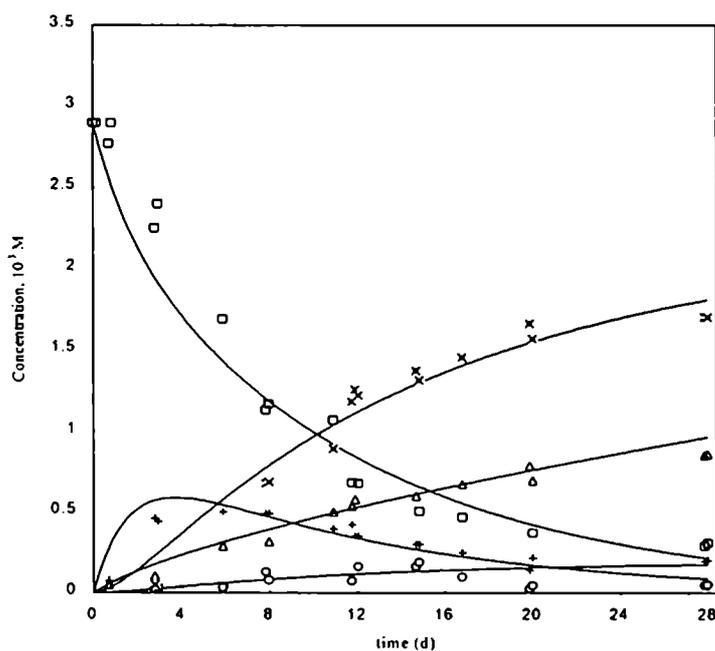


Figure 3 Datos representativos para la pérdida de 1, (□) y formación de: 2, (+); 4, (x); 5, (O); y 3, (Δ), como función del tiempo, usando HCl 1.0M en metanol:agua, 84:16 a 80 °C.

La causa de esto parece ser su conversión en 4, por cuanto 4 es el producto principal de la reacción: [4] crece sostenidamente hasta los 28 días. El segundo producto principal es 3, que alcanza una concentración final de 0.00086 M al cabo del mismo tiempo. Bajo estas condiciones, se encontró concentraciones detectables de 5. Tras 6 días se detectó la acridinona 6 y al cabo de 13 días, la acridinona 7.

En la Fig.4 se muestra los resultados de la reacción con HCl 1.5M, a 80°C. Hasta los 12 días, el sistema se comporta como reacciones consecutivas. Al cabo del tiempo de vida media, 6.3 días, [2], [4] y [3] valen 0.0008, 0.00054 y 0.00011 M, respectivamente (El valor inicial [1] fue 0.00302 M). En los primeros días, el producto principal de la reacción es 2, que alcanza su concentración máxima en 6 días para luego disminuir continuamente, probablemente por convertirse en 4 y 5.

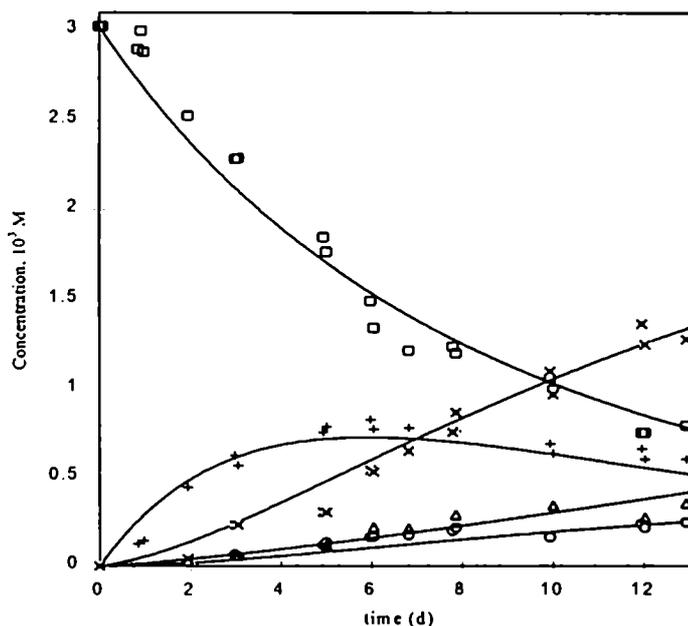


Figure 4 Datos representativos para la pérdida de 1, (□) y formación de: 2, (+); 4, (x); 5, (O); y 3, (Δ), como función del tiempo, usando HCl 1.5 M en metanol:agua, 84:16 a 80 °C.

5 se forma en mayores concentraciones que en las reacciones con HCl 0.5 M o 1.0 M.

Al final de la reacción, se observan los compuestos 1-5 en cantidades significativas. 6 aparece tras 7 días, y 7 luego de 11 días.

Los tiempos de vida media de la reacción total y el tiempo de la máxima [2] son aproximadamente los mismos a diferentes [HCl]. A diferencia de la reacción en metanol-agua, 1-1, la cloración sigue siendo importante aún con HCl 1.5M en metanol-agua, 84-16.

3.6 Reacción de la 2-(N-metil)amino-3,5-diclorobenzofenona (4).

Las reacciones de 4 se llevaron a cabo con el fin de:

- Conocer la influencia de la [HCl], metanol en las reacciones de cloración, metilación y anelación
- Confirmar los productos de la reacción
- Determinar los valores de las constantes de velocidad implicados en las reacciones

La Tabla 5 muestra las concentraciones de **3** y **4** en la reacción de **4** con HCl 0.5M en metanol-agua, 1-1, a 80°C, durante los primeros 19 días. Se puede ver que **4** disminuye mientras **3** crece continuamente. Luego de 14 días de reacción, también se detectó trazas de **8**.

El desarrollo de TLC analítica permitió detectar la acridinona **7**, $[7]_{15d} = 1.22\%$ de $[4]_0$, mientras en esta ocasión no se detectó **6**.

Tabla 5. Reacción de 2-(N-Metilamino)-3,5-diclorobenzofenona, **4, con HCl 0.5 M en metanol-H₂O (1:1), a 80 °C. ^a**

tiempo días	10 ³ M		tiempo días	10 ³ M	
	[4]	[3]		[4]	[3]
0.0	2.63	-	9.2	2.20	0.40
0.8 ^b	2.63	-	11	2.25	0.35
3.2	2.52	0.11	13	2.01	0.62
4.9	2.42	0.17	14 ^{c,d}	1.91	0.60
7.0	2.26	0.24	17	2.05	0.50
7.1	2.23	0.27	19	1.60	1.00
7.9	2.33	0.26			

^a $[4]_0 = 2.63 \times 10^{-3}$ M. ^b De este tiempo en adelante acridinona **7** se detectó por TLC. Acridinona **6** no se observó. ^c De este tiempo en adelante trazas de **8** se detectaron. ^d $[7]_{15d} = 1.22\%$ de $[4]_0$.

El gráfico lineal de $\ln([4]_0/[4])$ vs. tiempo, mostró que la degradación sigue una cinética de primer orden, y la evaluación de los datos de hasta 19 días confirma que hay dos reacciones paralelas correspondientes a la formación de **3** y **8**, respectivamente. Los coeficientes de velocidad específica, calculados de las gráficas de las concentraciones molares para cada producto como función de $\{1-\exp(-kt)\}$, se muestran en la Tabla 7.

Con HCl 1.0M, la degradación total de **4** es más lenta. La reacción predominante es la demetilación, y también ocurre algo de metilación. Al final de la reacción se detectó **4**, **8**, **3** y vestigios de **7**. La reacción con HCl 1.5M muestra que la degradación total de **4** es más lenta, y presenta los mismos productos que la reacción con HCl 0.5M y 1.0M.

La reacción de **4** con HCl 0.5 M en metanol-agua (84:16) a 80°C muestra un comportamiento diferente a aquel en la mezcla 1:1. El producto principal es **8**; se forma **3** en cantidades menores (Tabla 6). Sobresale en estas reacciones la aparición de **8**, es la primera vez que se produce en cantidades apreciables.

Tabla 6. Reacción de 2-(N-Metilamino)-3,5-diclorobenzofenona, 4, con HCl 0.5 M en metanol-H₂O (84:16), a 80 °C. ^a

tiempo días	10 ³ M			tiempo días	10 ³ M		
	[4]	[8]	[3]		[4]	[8]	[3]
0.0	2.89	-	-	8.0	2.60	0.25	0.05
1.0	2.86	0.02	0.01	11 ^b	2.48	0.34	0.06
2.1	2.81	0.06	0.02	13	2.44	0.37	0.08
3.9	2.76	0.11	0.02	18	2.34	0.44	0.12
6.0	2.72	0.16	0.01	20	2.12	0.55	0.13
7.0	2.63	0.23	0.02				

^a [4]₀ = 2.89 x 10⁻³ M. ^b De este tiempo en adelante acridinona 7 se detectó. Acridinona 6 no se observó.

Se detectó la acridinona 7 por TLC a partir de los 11 días ([7]_{20d} = 1.18% de [4]₀) mientras no se observó la acridinona 6. Hasta los 20 días de reacción, el sistema se comporta como reacciones paralelas. En soluciones con mayor concentración de HCl, la velocidad de reacción total aumenta (Tabla 7), y hay un incremento notable en la velocidad de metilación. Se detectó la formación de la acridinona 7 al cabo de 6 y de 7 días para el HCl 1M y 1.5M, respectivamente. No se detectó la acridinona 6.

Tabla 7. Reacción de 2-(N-Metilamino)-3,5-diclorobenzofenona, 4, con HCl en metanol-H₂O a 80 °C. Coeficientes de velocidad de pseudo-primer orden. ^a

MeOH-H ₂ O (v/v)	[HCl], M	10 ⁷ k _p , (s ⁻¹)		
		k _{obs}	k ₈	k ₁₁
1 : 1	0.5 ^b	2.1	2.3	0.03
	1.0	1.6	1.5	0.09
	1.5	1.4	1.3	0.05
84 : 16	0.5 ^c	1.4	0.27	1.2
	1.0	3.9	0.29	3.6
	1.5	5.0	0.27	4.7

^a Calculado considerando reacciones paralelas. ^b [7]_{15d} = 4.76 % de [4]₀. 6 no se detectó. ^c [7]_{20d} = 1.18 % de [4]₀. 6 no se detectó.

3.7 Reacción de la 2-(N-metil) Amino- 5- clorobenzofenona (2) con HCl 0.5M, en metanol-agua (84:16) y bajo condiciones de reacción especiales.

Los resultados condensados se muestran en la tabla 9, observándose los siguientes resultados:

a) Cuando se realiza la reacción en una atmósfera de nitrógeno, no se observó la formación de 4, y no se observó la demetilación.

Por otra parte, no se observó diferencias esenciales con el procedimiento habitual, cuando no se purgaban las ampollas con nitrógeno antes de sellarlas.

b) Cuando se realizó la reacción en presencia de m-dinitrobenceno (que es conocido como una "trampa de radicales", no observamos cambio alguno. Por otra parte, en presencia de hidroquinona el único producto de la reacción fue 5. El coeficiente de velocidad específica a pseudo-primer orden, calculado a partir del gráfico de regresión de $\ln([2]_0/[2])$ fue de 1.7×10^{-7} /s, correspondiendo a una vida media de 46 días. No se observó demetilación.

c) En las reacciones de 2 con HCl 0.5M en metanol-agua (84:16), a 80°C, se analizó los gases desprendidos; se determinó claramente la presencia de hidrógeno molecular, mientras no se observó cloro.

d) Cuando se hizo reaccionar 2 con HCl 0.5M y con HCl 1.5M en metanol-agua (84:16), a 45°C y bajo irradiación UV, se observó un notable incremento de la velocidad de reacción total, y de la formación de las acridinonas 6 y 7, respecto de aquello que daría la reacción a oscuras (ver los datos en Tabla 9). Para esta reacción bajo irradiación UV, solo se presenta los datos de los primeros 4 días porque luego aparecieron varios productos no identificados y además se hizo $[2] = 0$ al cabo de 7 días.

La formación de los diferentes productos de reacción siguen un pattern complejo el cual es altamente sensible a las condiciones de reacción, tales como: sustrato, concentración de HCl, composición de solvente.

Como se describe en la sección experimental, las coeficientes de velocidad dados por el método (A) se obtuvieron directamente de la medición de las concentraciones actual considerando un esquema de reacción simple. El ajuste satisfactorio entre las velocidades parciales (en Tablas 2 y 4) obtenidas por tres métodos cuando la comparación es posible dan confianza a los diferentes métodos de calculo de datos cinéticos. De otra manera, un ajuste

satisfactorio es también observado cuando se compara cada constante de velocidad parcial en la Tabla 2 con la equivalente en la Tabla 4. A pesar de la complejidad de las reacciones, los valores obtenidos de sets de datos completamente independientes son similares, lo cual da confianza en el tratamiento de todos los resultados cinéticos.

Las reacciones más simples observadas en el sistema de reacción estudiado son: metilación, medida por k_1 , k_5 , k_7 y k_{11} , (k_7 es una ruta de metilación despreciable) y demetilación medida por k_3 , k_6 , k_8 y k_{12} (k_6 y k_{12} son rutas de metilación despreciables); en adelante solamente los coeficientes de velocidad significantes serán considerados en la discusión.

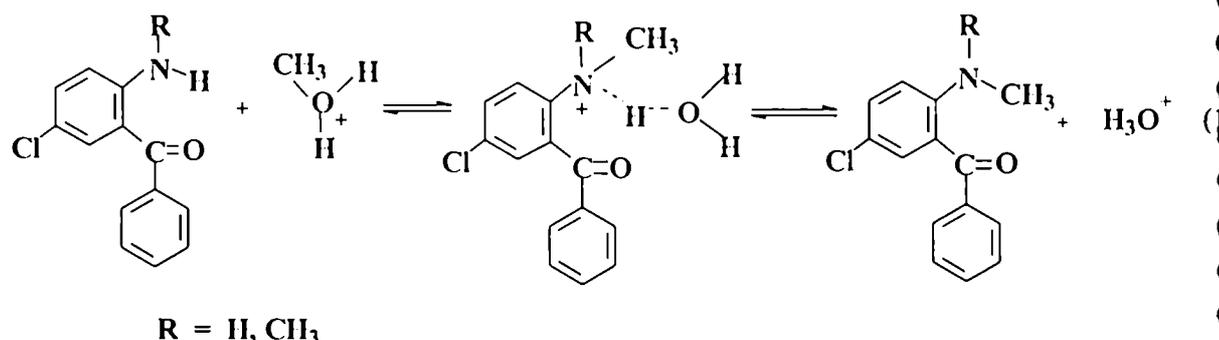
3.8 Consideraciones mecánicas

Puede ser observado en la Tabla 2 y 4 que k_1 , k_5 , y k_{11} (esta última también en Tabla 7), incrementa con la $[HCl]$, mientras las constantes de velocidad específicas la demetilación, k_3 y k_8 , disminuyen con el incremento de $[HCl]$. Resultados similares pueden ser observados para la reacción de 4 en Tabla 7. La tabla 8 muestra los tiempos de vida media observados en las tres $[HCl]$ para las reacciones de 1, 2 y 4 en metanol agua 1-1 y 84-16.

Tabla 8. Reacciones de aminobenzofenonas sustituidas con HCl en metanol:H₂O, a 80 °C. Tiempo de vida media, $\tau_{1/2}$, días.

MeOH:H ₂ O	Substrato	[HCl], M		
		0.5	1.0	1.5
1:1	1	24	17	7.8
84:16	1	6.4	6.2	6.3
1:1	2	1.0	1.9	4.5
84:16	2	2.2	3.2	5.0
1:1	4	37	51	57
84:16	4	55	21	16

Debido a que en las reacciones de alquilación se esperan que ocurran en aminas no protonadas, los resultados observados sugieren que el metanol protonado podría ser el agente de metilación (ver abajo para un mecanismo paralela o alternativo). Respecto a las reacciones de demetilación, un mecanismo reversible podría estar operando y agua protonada podría ser el agente que ataca el nitrógeno amino (ecuación 1)



Una demetilación oxidativa de algunas N,N-dimetilanilinas sustituidas en metanol han sido recientemente publicadas.¹⁰

La demetilación se observó también en las reacciones de **4** con HCl 0.5M en MeOH-H₂O 1:1, mientras que cuando la reacción era llevada a cabo con alto contenido de MeOH en el solvente, la metilación de **4** para dar **8** fue la reacción principal. k_{11} , es más alto a altas [MeOH] consistente con que el metanol protonado como el agente metilante. Los resultados indican la reversibilidad de las reacciones con los productos diclorados también. (similar a ecuación 1)

Las reacciones de cloración y anelación son más difíciles de entender bajo las condiciones de reacción presentes. Las velocidades de ambas reacciones son más altas cuando la [HCl] es baja, indicando que estas podrían ocurrir en aminas desprotonadas.

La posición del segundo átomo de cloro *orto*- al grupo amino, (no se encontraron compuestos clorados en otras posiciones), el hecho que la cloración de **2** es más rápida que la de **1** ($k_4 > k_2$), sugiere un mecanismo de sustitución aromática electrofílica, sin embargo una ruta S_NAr no es esperada bajo las condiciones de reacción presentes. Debido al gran número de determinaciones necesarias, la reacción en el presente trabajo se determinó solamente a una temperatura, estudios previos de la degradación de **2**, en MeOH:H₂O 1:1, dan una energía de activación de 83.6 kJ mol⁻¹ calculada de las constantes de velocidad globales en el rango de 35-80°C. La cloración es la reacción más importante en la reacción de **2** a bajas [HCl] y los valores altos de la energía de activación observada, también como la sensibilidad a los efectos del solvente observada en todas las reacciones estudiadas (Tabla 8) son típicas de un mecanismo polar, el cual es consistente con la insensibilidad en la presencia de m-dinitrobenceno.

Desde que la ciclación parece una reacción lenta, el hecho que no se hayan encontrado trazas de productos clorados en la posición 2 podría excluir la posibilidad que la anelación ocurre como una sustitución nucleofílica de un cloruro localizado en esa posición. Además, solamente acridinonas doblemente cloradas se encontraron (3-cloro y 3-cloro-10-metil acridinona se buscaron cuidadosamente pero no se detectaron). Esto sugiere que el segundo átomo de cloro *orto* al grupo amino es necesario para que la anelación ocurra. De otra manera, muy pequeñas cantidades observadas de 7 y no aparece de 6 en las reacciones de 4, sugieren fuertemente a 4 como un intermediario claro de las acridinonas.

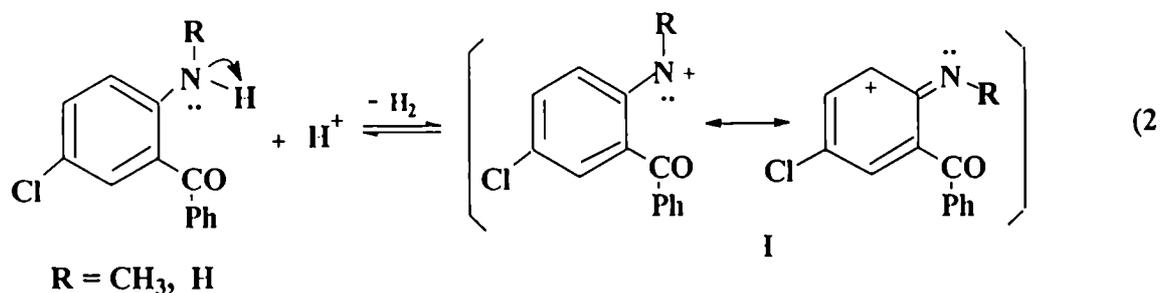
No es fácil de establecer cuál es el agente electrófilo de cloración bajo las condiciones de reacción presentes. La posibilidad que cloro podría ser formado de reacciones con trazas de oxígeno remanente en las ampollas de nitrógeno selladas con atmósfera de nitrógeno se chequeó determinando la naturaleza de los gases formados durante la reacción, pero cloro no se detectó en ningún caso. Al contrario se detectó la presencia de hidrógeno molecular.

Además no se observaron diferencias en la proporción de productos de cloración cuándo las ampollas se sellaron bajo atmósfera de nitrógeno. La posibilidad que trazas de sales metálicas pondrían actuar como un catalizante siendo disueltas en el reactivo se chequeó también usando HCl de diferentes marcas, y se descartó debido a que se obtuvieron resultados similares en todos los casos. El hecho que la reacción es más rápida a bajas [HCl] también hace altamente improbable que la reacción sea debida a impurezas.

Cloración es la principal reacción de 2 en 0.5M HCl, pero para 1 la metilación es la más importante. (el grupo metilamino favorece la formación de intermediarios nitrenium, ver abajo). Puede ser observado en la Figura 4 que la cantidad de producto metilado 2, incrementa rápidamente at the onset de la reacción y luego decrece, mientras lo contrario es observado para el producto clorado, sugiriendo que 4 es formado principalmente de 2. La ausencia de algún compuesto monoclorado en las reacciones de 4 con HCl (Tablas 3 y 4) indica la irreversibilidad de las reacciones de cloración (k_2 y k_4). El grupo metil en la 2-amino también favorece el producto de ciclación: 6 y 7 aparece después de un tiempo corto de reacción en la reacción de 2 (Tabla 1). Las acridinonas 6 y 7 son estables en soluciones metanólicas acuosas HCl a 80°C, indicando la irreversibilidad de las reacciones medidas para k_9 y k_{10} . De otra manera, presiones positivas significativas se observaron en al abrir las ampollas después de aproximadamente 50% de reacción, especialmente con las reacciones llevadas a cabo en 0.5 M HCl e hidrógeno se identificó claramente en los gases involucrados. Finalmente, cuando la reacción de 5 se estudió bajo las mismas condiciones, solamente 2 se

observó como producto de reacción, **8** se encontró como trazas, después una significativa proporción de **2** ha sido formado (14 días de reacción). Esto podría indicar que al menos un átomo de hidrógeno en el grupo amino es requerido para que la reacción de cloración ocurra. Teniendo en cuenta todos los factores anteriores un mecanismo tentativo involucrando un intermediario para las reacciones de cloración y anelación se propone.

Debido a que la formación de especies tales como Cl^+ no es posible bajo las condiciones de reacción presentes, y la presencia del *o*-amino es requerido para que la reacción ocurra (benzofenona insustituidas se encontraron ser estables bajo las condiciones de reacción presente), el mecanismo propuesto debería incluir una primera etapa que lleve a la formación de una carga positiva en C3, susceptible al ataque por Cl^- , la única especie de cloración presente en el medio de reacción. La formación de un intermediario nitrenio, **I**, por pérdida de un hidruro del grupo amino, es sugerida como la primera etapa lenta en el mecanismo (ecuación 2).

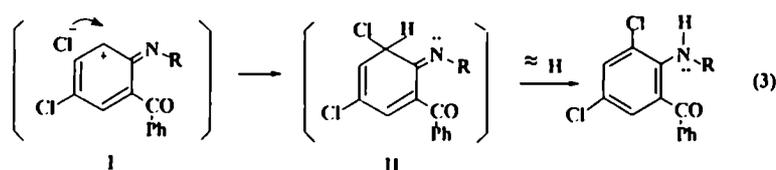


3.9 Propuesta de un intermediario “nitrenio”

Los iones Nitrenio son intermediarios reactivos que contienen un divalente átomo de nitrógeno cargado positivamente¹¹ y estos son propuestos en reacciones de aminas aromáticas activadas.¹² Hay avances significativos en la caracterización de los tiempos de vida de aril nitrenios en soluciones acuosas,¹³ su reactividad y selectividad hacia nucleófilos,^{14,15} el efecto de par iónico,^{16,17} y el mecanismo de sus reacciones con DNA y nucleófilos relacionados.¹⁸ Investigaciones experimentales demostraron que la sustitución aril estabiliza el estado singulete,²⁴ el cual se comporta como una especie electrófila.^{24,19} Las

benzofenonas son fácilmente excitadas y la formación de intermediario I en el presente caso podría ser favorecida por la irradiación UV, como ha sido observado

Adición nucleofílica rápida en la posición *orto* del intermediario I produciría el intermediario II el cual por estabilización transfiere un protón dando los productos de cloración 3 o 4. Un ion fenil nitrenio (PhMeN^+) intermediario ha sido recientemente probado ser formado en las reacciones de N-(metilfenil)amino-2,4,6-trimetilpiridinium tetrafluoroborato (MPAP), y la adición de un nucleófilo Cl^- al intermediario ion nitrenio propuesto ocurre tanto en la posición *orto* y *para* del anillo.³³ En el presente caso la posición *para* esta ocupada y la adición ocurre exclusivamente en la posición *orto*, dando el intermediario II (ecuación 3).

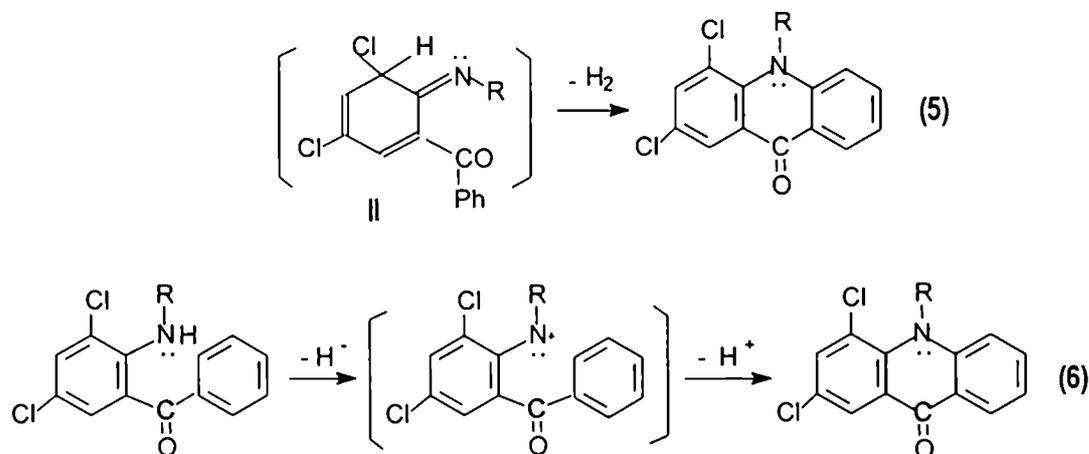


Los autores³³ también encontraron la N-metilnilina y anilina como productos colaterales, la formación de anilina es explicada por un corrimiento 1,2 -hidruro del grupo N-metil *orto* al nitrógeno seguido por hidrólisis del ion iminium resultante.²⁴ Los hallazgos de la N-metilamino y amino benzofenonas sustituidas en el presente caso, podrían explicarse por mecanismos similares de reacciones del ion nitrenium, (ec. 4) adicionados a su formación más simple por la metilación y demetilación previamente mostradas en la ec. 1. El hecho que la demetilación decrece en la presencia de 2 bajo condiciones que se muestran la formación de 4, esta de acuerdo con una ruta paralela

3.10 Evidencias experimentales

El intermediario II puede también desplazar el hidrógeno *orto* del grupo carbonil en los anillos insaturados dando los productos de ciclación, acridinonas 6 o 7. (ec. 5).

Esto es consistente con el hecho que el átomo de cloro es requerido para que la reacción ocurra. Un mecanismo similar incluye un intermediario nitrenio es propuesto para la formación de 7 a partir de 4 como se muestra en la ecuación 6.



La formación de arilnitrenios y sus reacciones inter e intra moleculares podrían generar hidrógeno, el gas determinado después de algún tiempo de reacción. El grupo metilo en el amino podría favorecer la formación del ion arilnitrenium como es observado, y el hecho que las acridininas no son formadas de aminobenzofenonas monocloradas, y que al menos un hidrógeno es requerido para que las reacciones de cloración y anelación ocurran dan soporte adicional al intermediario ion arilnitrenium propuesto. Formación de amino- y metilaminobenzofenonas observadas en el presente estudio son también consistentes con las reacciones usuales de estas especies. (cc. 4).

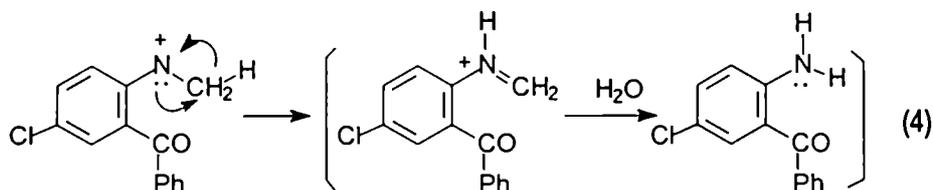


Tabla 9. Reacción de 2-(N-Metilamino)-5-clorobenzofenona, 2, con HCl 0.5 M en metanol-H₂O (84:16), a 80°C.^a

tiempo días	10 ³ M				
	[2]	[4]	[1]	[5]	[3]
<i>Reacción bajo condiciones normales</i>					
0	3.26	-	-	-	
1.2 ^b	2.49	0.43	0.27	0.08	
1.9	1.95	0.60	0.60	0.11	-
4.0 ^c	1.19	1.30	0.62	0.06	0.09
6.9	0.41	1.60	0.79	0.12	0.33
<i>Reacción en presencia de Hidroquinona^d</i>					
0	3.4	-	-	-	
1.0	3.4			0.03	
3.8	3.2			0.18	
6.8	3.1	-	-	0.34	
<i>Reacción bajo presión positiva de Nitrógeno</i>					
0	2.9	-	-	-	-
1.0	2.8			0.02	0.03
3.8	2.6			0.10	0.17
6.8	2.5	-	-	0.22	0.12

^a [2]₀ = 3.26 x 10⁻³ M. ^b De este tiempo en adelante acridinona 6 se detectó por TLC. ^c De este tiempo en adelante acridinona 7 se detectó por TLC. ^d [Hidroquinona] = 3 x 10⁻³ M.

La reacción de 2 se llevó a cabo también bajo condiciones especiales buscando una evidencia adicional para el mecanismo propuesto. Es bien conocido que la formación de nitrenium puede ser promovida fotoquímicamente. La observación de los productos de cloración y anelación después de un corto tiempo aún a bajas temperaturas (tabla 10), y la comparación con los resultados encontrados para reacciones en la oscuridad son consistentes con el intermediario nitrenio propuesto. De otra manera, m-dinitrobenceno no reacciona pero la p-hidroquinona (un agente reductor bien conocido) inhibe fuertemente la oxidación de nitrenium, la cual es la etapa lenta del mecanismo propuesto. Un decrecimiento en las velocidades también se observó bajo atmósfera de nitrógeno positiva.

Tabla 10. Reacción de 2 N-metilamino-5-clorobenzofenona, 2, con 0.5 M HCl en metanol-H₂O (1:1) a 45°C.^a

Tiempo, días	10 ³ M		
	[2]	[4]	[1]
<i>Bajo irradiación UV</i>			
0.9	3.12	0.16	0.09
1.1	2.95	0.23	0.16
4 ^b	1.60	1.80	0.26
<i>En la oscuridad</i>			
1.1	3.31	0.01	0.01
4 ^c	3.23	0.06	0.04
7.1	2.83	0.35	0.16
7.8	2.82	0.36	0.16

^a [2]₀ = 3.33 x 10⁻³ M. ^b [6]_{4d} = 1.2 x 10⁻⁴ M, [7]_{4d} = 0.5 x 10⁻⁴ M.

^c [6]_{4d} = 0.7 x 10⁻⁴ M, 7 no se detectó.

Reacciones inesperadas se encontraron con esas aminobenzofenonas, que se estudiaron bajo varias condiciones de reacción y desde diferentes aspectos con el objetivo de contribuir a la elucidación del mecanismo complejo de reacción. El esquema de la reacción general descrito en las ecuaciones 1-6 da cuenta de todos los resultados observados, es consistente con las velocidades relativas determinadas y con las evidencias adicionales.

¹ Chafetz, L. J. *J. Pharm. Sci.* **1967**, 26, 1681.

² Inotsume, N.; Nakano, M. *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69, 1331

³ Maulding, H. V. ;Nazareno J. P.; Pearson, J. E. *J. Pharm. Sci.* **1975**, 64, 277

⁴ Bronxton, J. T.; Wright, S. J. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2965

⁵ Nudelman, N.S.; Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, 84, 208.

-
- ⁶ Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 998.
- ⁷ Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 97
- ⁸ Moore, J. W.; Pearson, R. G. *Kinetics and Mechanism*. Wiley & Sons. New York, 3rd Edition, 1981, p. 285.
- ⁹ Kinkaid, D.; Cheney, W. *Numerical Analysis Mathematics of Scientific Computing*. Brooks/Cole Publishing Company, 1991 E.U.A. Addison- Wesley, Iberoamericana, S. A. 1994. Wilmington, Delaware, U. S. A.
- ⁹ Acosta, K.; Cessac, J. W.; Narasimha, R. and Kim, H. K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994** 1985.
- ¹⁰ Acosta, K.; Cessac, J. W.; Narasimha, R. and Kim, H. K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994** 1985.
- ¹¹ Srivastava, S.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10186.
- ¹² a) Kadlubar, F. F. In *DNA Adducts Identification and Significance*: Hemminki, K., Dipple, A., Shuker, D. E. G., Kadlubar, F. F., Segerbäck, D., Bartsch, H., Eds.; University Press: Oxford, U. K. , 1994; pp 199.
- ¹³ a) Novak, M.; Kennedy, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 574. b) Davidse, P. A.; Kahley, M. J.; McClelland, R. A.; Novak, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4513; c) Novak, M.; Kahley, M. J.; Eiger, E.; Helmick, J. S.; Peters, , H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9453. d) Fishbein, J. C.; McClelland, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2824-2835.
- ¹⁴ Robbins, R. J.; Yang, L. L.-N.; Anderson, G. B.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6544.
- ¹⁵ a) Novak, M.; Kahley, M. J. Lin, J.; Kennedy, s. A.; Swanegan, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11626. b) Anderson, G. B.; Falvey, D. E.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9870.
- ¹⁶ a) Fishbein, J. C.; McClelland, R. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1995**, 663. b) Fishbein, J. C.; McClelland, R. A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.2* **1995**, 653.
- ¹⁷ Panda, M.; Novak, M.; Magonski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4524.
- ¹⁸ a) Cardnelli, L.; Carloni, P.; Damiani, E.; Greci, L.; Stipa, P.; Rizzoli, C.; Sgarabotto, P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 1589. b) Helmick, J. S.; Martin, K. A.; Heinrich, J. L.; Novak, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3459. c) Novak, M.; Martin, K. A.; Heinrich, J. L. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 5430. d) Famulok, M.; Bosold, F.;

Boche, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 337. e) Famulok, M.; Boche, G. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 468.

¹⁹ a) Moran, R. J.; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8965. b) Anderson, G. B.; Yang, L. L. -N; Falvey, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7254.

³³ Chiappcrino, D.; Falvey, D. E. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, *10*, 917.

CAPITULO 4

FOTOESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS.

4.1 Importancia de los estudios de fotoestabilidad

Los estudios de la degradación de drogas bajo la acción de la luz UV y visible son importantes debido a que la fotodescomposición de un medicamento no solamente lleva a la pérdida en la potencia de la droga sino también puede resultar que los productos de degradación formados sean tóxicos y pueden aparecer en la formulación, como resultado de una exposición inapropiada a la luz de la droga (materia prima) o del producto final,¹ tal es el caso de los diuréticos hidroclorotiazida y clorotiazida² y los antihipertensivos nifedipina y derivados³ que se descomponen rápidamente.

Otro aspecto por lo cual son importantes los estudios de fotodegradación de drogas es el hecho que la exposición a la luz solar de un paciente a quien se le administró una droga fotosensible puede causar efectos adversos inducidos por la luz debido a la interacción de la droga, productos de degradación o metabolitos con sustancias endógenas.^{4,5} Entre los casos más estudiados son los que presenta la furosemida,⁶ promazine y clorpromazine.⁷

4.2 Objetivos y utilidades de estos estudios

El conocimiento de la fotoestabilidad de drogas es importante en orden a evaluar:

El período de vida útil

Manipulación, empaque y rótulo.

Caracterización de Productos de Fotodegradación

Efectos adversos

Aspectos terapéuticos y nuevos sistema de comercialización de droga

Condiciones de Almacenamiento y Expendio de medicamento

4.3 Antecedentes

Mucho se ha estudiado sobre la degradación de drogas promovida por la temperatura, humedad y factores internos como el pH, de manera que ha sido posible estandarizar las condiciones para que estos estudios se lleven a cabo y que los resultados obtenidos sean confiables.

Sin embargo la degradación de medicamentos debido a procesos de fotodescomposición aún no ha sido suficientemente documentada en comparación a los otros

factores citados y en el sentido de que los farmacéuticos recientemente han comenzado a lograr estandarizar las metodologías adecuadas a seguir en estos estudios.

A finales de la década del 80 y a principios de la década del 90 aparecieron publicaciones de estudios colaborativos entre diferentes laboratorios donde se compararon resultados de estos estudios con miras a estandarizar el diseño de los ensayos de fotoestabilidad de drogas.^{8,9,10,11,12}

Estos resultados se discutieron en 1989 en la International Conference on Harmonization ICH, que emitió una primera guía publicada por la TPMA (Tokio Pharmaceutical Manufacturers Association). Después se emitió la "*Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products*,"¹³ que fue adoptada por la CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) en diciembre de 1996 y comenzó a ser vigente en enero de 1998 en la Comunidad Europea.

Finalmente, en Junio de 1998 esta guía fue incluida dentro del último documento emitido por la FDA para la regulación de los ensayos de estabilidad "*Draft Guidance: Stability Testing of Drug Substances and Drug Product*."¹⁴ Un capítulo general de fotoestabilidad será incorporado dentro de la United States Pharmacopeia (USP).¹⁵

La no estandarización de las condiciones en que se degradaban las drogas en los laboratorios farmacéuticos no permitía comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios ya que existían variaciones en el diseño del experimento en cuanto a la selección de la fuente de luz, distancia entre la lámpara y la muestra, duración de la irradiación, envase donde se irradia la muestra, temperatura que alcanza el equipo de radiación, etc.¹⁶

Se hacía urgente la estandarización principalmente en cuanto a las fuentes de radiación a utilizar. Inicialmente se pensó en la irradiación con luz UV, sin embargo el uso de luz más energética no es muy bueno para tales intentos de aceleración, porque puede llevar a reacciones que nunca se llevarían a cabo bajo la luz a la que están expuestos los medicamentos, (la cual es más pobre en luz UV).

Lo que se sugiere es seleccionar una lámpara que presente un espectro semejante a la radiación a que estarán sometidas las drogas en el mercado farmacéutico e incrementar la intensidad total de radiación.¹⁷ No obstante, aquí se encuentra una dificultad ya que es difícil determinar las características espectrales de la iluminación a que están sometidas los medicamentos, considerando que se trata de un irradiación solar indirecta combinada con

irradiación artificial a la que están expuestas las drogas durante el tiempo de almacenamiento en la farmacia y/o durante la fabricación,¹⁸ añadido el hecho que de hay variadas zonas climáticas con variación de los días de radiación solar intensa por año.

La ICH presenta dos opciones para el tipo de lámparas a usar, mostrándose flexible en cuanto al uso de otros tipos de lámparas si están convenientemente justificadas, las lámparas recomendadas son:

Opción 1. Lámparas diseñadas para producir un rendimiento de salida similar al estándar de emisión de ID65/D65 como lámparas fluorescentes de luz diurna artificial que combinen salidas visible y UV, lámparas de Xenón o lámparas de Haluro de metal. D65 es el estándar internacionalmente reconocido para luz diurna al aire libre, y ID65 es el estándar equivalente para luz diurna indirecta interior.

Opción 2. Irradiación simultánea por una lámpara fluorescente blanca y a una lámpara fluorescente de UV cercano que concuerde con los criterios especificados.^{11, 19}

4.4 Reglamentación de los estudios de fotoestabilidad

Muy recientemente han comenzado a diseñarse algunas recomendaciones con respecto a los estudios de Fotoestabilidad. Las guías de la ICH presentan metodologías diferentes para el estudio de la fotoestabilidad para la droga pura y para la droga preparada en un producto farmacéutico.

4.4.1 Estudios de fotoestabilidad para la droga pura

El acercamiento a la determinación de la fotoestabilidad se lleva a cabo en dos etapas, a saber:

a. Estudios de estrés forzados:

Esta primera etapa consiste en la degradación de la droga pura deliberadamente, irradiando la droga sola y/o en soluciones o suspensiones.²⁰

Estos estudios tienen la finalidad de evaluar la fotosensibilidad general de la molécula activa, identificar los productos de degradación y elucidar el mecanismo de fotodescomposición. Por otro lado en esta etapa se desarrolla y valida el método analítico para monitorear el proceso de fotodegradación en los productos farmacéuticos que contienen la droga.

En estos estudios de degradación forzada puede usarse una variedad de condiciones de exposición dependiendo de la fotosensibilidad de la droga y la intensidad de las fuentes de luz que se usan. Para propósitos de desarrollo y validación es adecuado limitar la exposición y terminar los estudios si ocurre una descomposición extensa.

Para materiales fotoestables los estudios pueden terminarse luego de haber usado un nivel de exposición adecuado, se deja a la discreción del interesado el diseño de esos experimentos, si bien los niveles de exposición deberían justificarse. Bajo condiciones forzadas se pueden observar productos de descomposición que difícilmente se formarían bajo las condiciones empleadas en los estudios de confirmación esta información puede ser útil para evaluar los distintos métodos analíticos. Si en la práctica se ha demostrado que ellos no se forman en los estudios de confirmación estos productos de degradación no necesitan examinarse más.

b. Estudios confirmatorios

Se llevan a cabo para establecer características de fotostabilidad en condiciones estandarizadas. Tienen como propósito identificar medidas de precaución necesarias en la formulación y manufactura, como también tienen el objetivo de obtener información útil para la elección del empaque apropiado para el producto.²¹

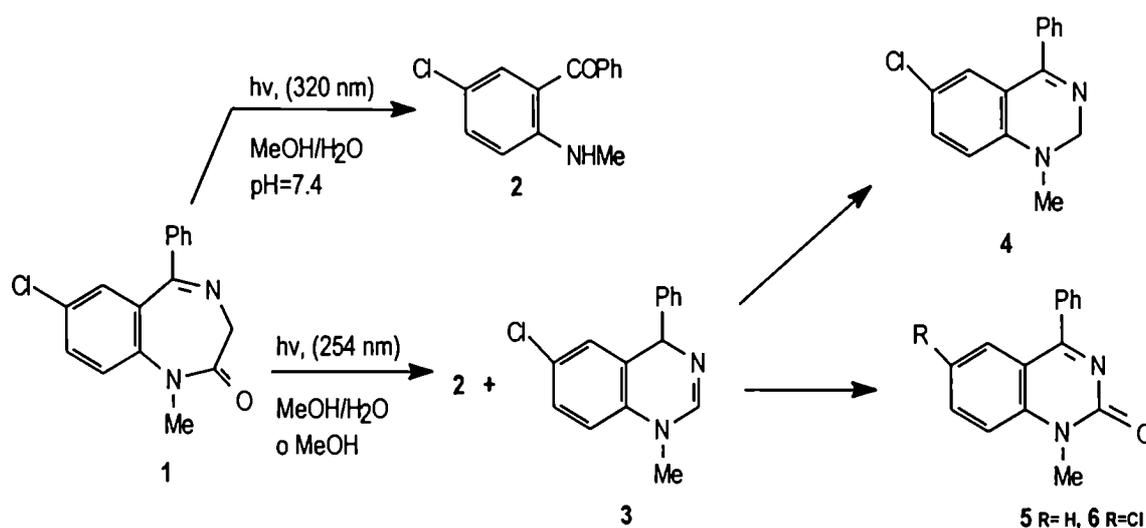
Para esta última etapa la guía sugiere la iluminación de las muestras a una luz proveniente de una iluminación general de no menos 1.2 millones de lux hora y una energía integral de UV cercana de no menos que 200 Wh/m².

4.4.2 Estudios de fotoestabilidad para el producto farmacéutico

Las guías recomiendan que el estudio sea conducido de una manera secuencial comenzando con la exposición del producto en el empaque inmediato y después en el empaque de venta. Los ensayos deberían continuar hasta que los resultados demuestren que el producto farmacéutico está adecuadamente protegido de la luz, la guía describe el desarrollo de estos estudios en un Diagrama de flujo de decisiones.²²

4.5 Fotoestabilidad de benzodiazepinas

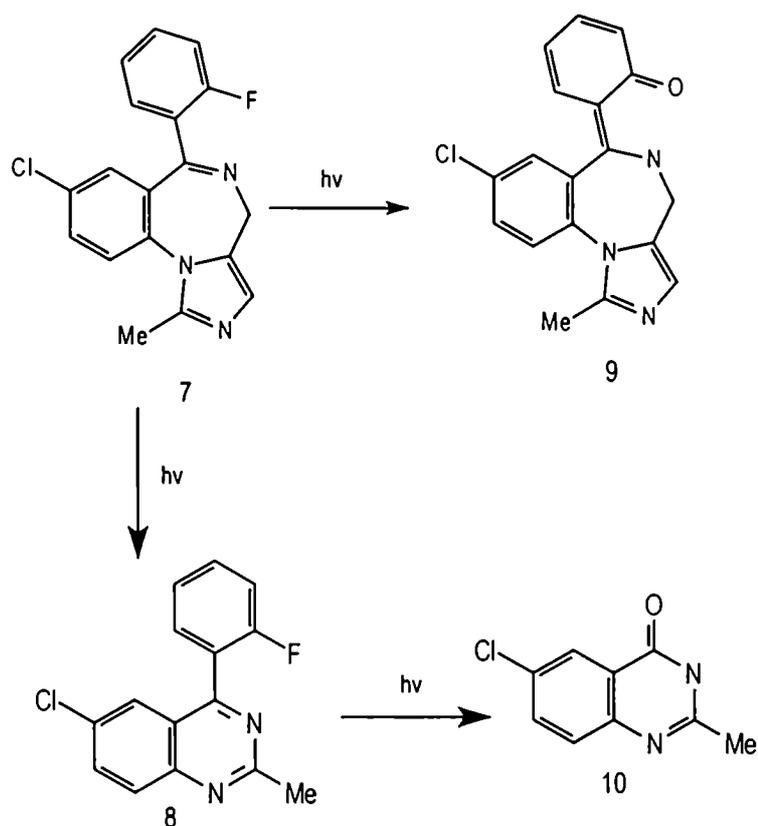
Las benzodiazepinas pueden ser fotolábiles, pero la ruta de degradación seguida depende de la estructura de cada derivado y de las condiciones. Una de las primeras benzodiazepinas estudiadas fue el diazepam, **1**. Este estudio es muy preliminar y no se han tomado recaudos para evitar las posibles reacciones “oscuras”. Según los autores, por acción de la luz el diazepam, **1**, sufre ruptura del anillo heterociclo, siendo los principales productos de reacción la benzofenona, **2**, por irradiación a 320 nm en MeOH-H₂O, y la hidroquinazolina, **3**, por irradiación a 254 nm en MeOH. El compuesto después sufre isomerización a **4**, también como dechloración y oxidación a **5** y **6**.⁵ (esquema 4.1)



Esquema 4.1

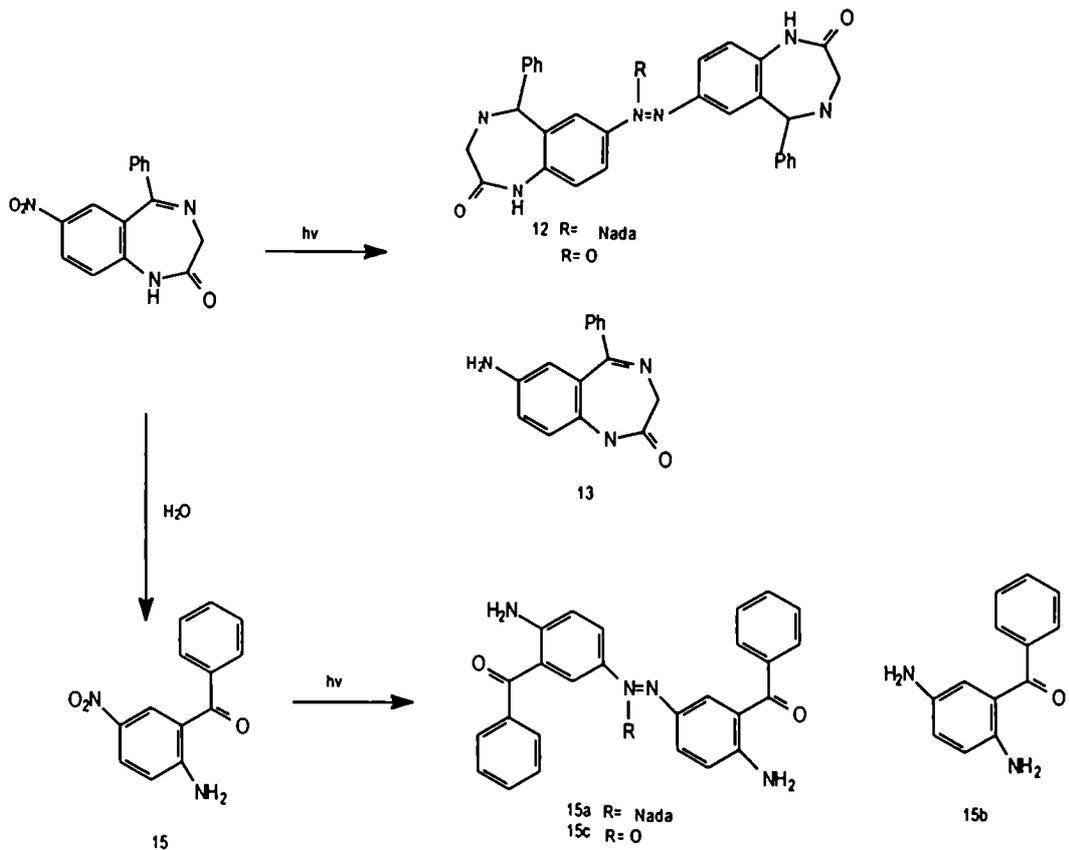
Sin embargo recientemente hemos demostrado en nuestro laboratorio, con abundante evidencia que la ruptura del anillo y la dechloración ocurre también en reacciones “oscuras”
23,24,25

Un estudio fotoquímico más reciente ha sido realizado con midazolam, **7**. Se demostró que midazolam, **7**, (anestésico) en solución sufre reordenamiento del anillo a una quinazolina, **8**, (principal ruta con radiación solar), también como oxidación del grupo 5-fluorfenil para dar **9**, y luego **10** (principal ruta con luz artificial) (esquema 4.2).^{26, 27}



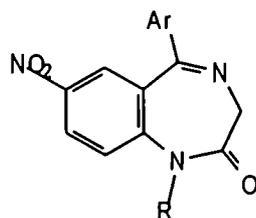
Esquema 4.2

La inserción de un sustituyente nitro en el núcleo benzodiazepínico, como en el nitrazepam, **11** (anticonvulsivante), cambia la fotoquímica; ésta es ahora dominada por la reacción en ese grupo. Un antiguo estudio fotoquímico con nitrazepam describe que el nitrazepam es fotoreducido en la presencia de hidrógeno transferible (irradiación de solventes orgánicos bajo nitrógeno) a una mezcla de derivado amino **13**, azo **12** y azoxy **14** dímeros. El compuesto azoxy dímérico **14** sufre separadamente, reducción a **12**. La hidrólisis de nitrazepam da la 2-amino-5-nitrobenzofenona **15** la cual sufre una serie similar de fotoreducciones.²⁴ (esquema 4.3) De todos modos estos estudios son muy precarios y sus resultados deben considerarse como muy preliminares, Como el nitrazepam ya no se comercializa en gran mayoría de países no se ha justificado estudios ulteriores.



Esquema 4.3

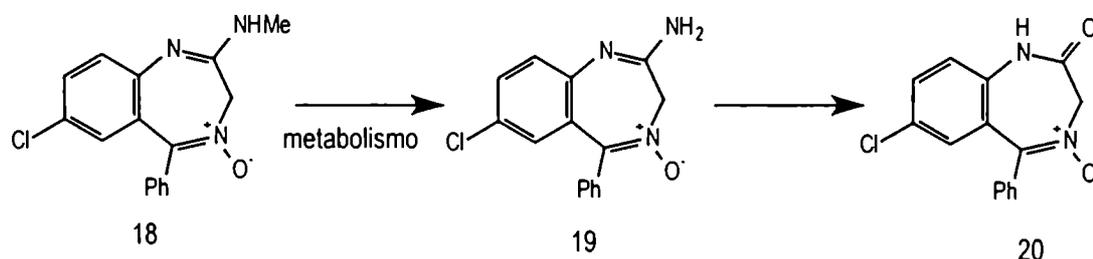
Un poco más reciente son los estudios fotoquímicos con flunitrazepam. El hipnótico flunitrazepam, **16**, sufre una reducción en múltiples etapas llevando finalmente al derivado 7-amino bajo condiciones anaeróbicas,^{29,30} mientras que es N-demetilado para dar **17** en la presencia de oxígeno.²⁴ (esquema 4.4)



16 Ar= 2-F-C₆H₄, R=Me Flunitrazepam
17 Ar= 2-F-C₆H₄, R=H

Esquema 4.4

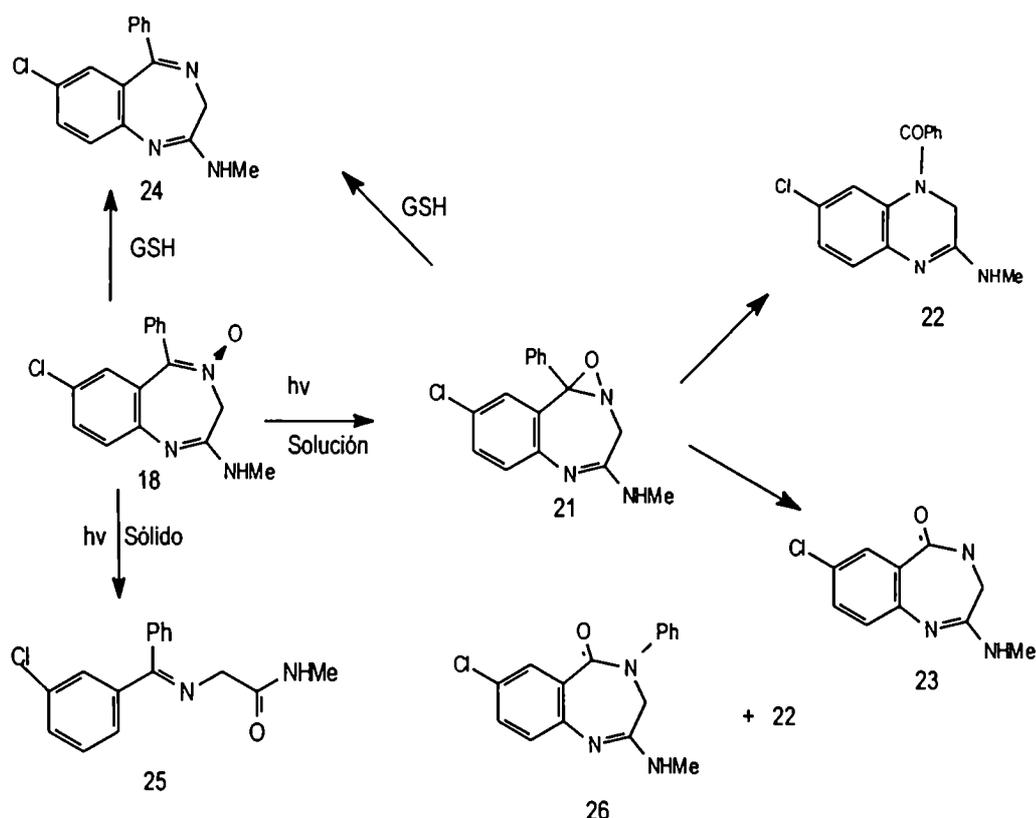
Cuando está presente una función N-óxido, como en el clordiazepóxido, **18**, (sedante), éste es el grupo activo fotoquímicamente, lo mismo ocurre con sus dos metabolitos, demetilclordiazepóxido **19** y demoxepam **20**.(esquema 4.5)



Esquema 4.5

Como es usual con nitronas pueden tener lugar reordenamientos a la oxaziridina **21**. La oxaziridina tiene una baja absorción a 350 nm y es lentamente degradada a sus productos secundarios. Estudios antiguos con soluciones de clordiazepóxido en metanol y metanol/agua irradiadas a 254 y 350 nm por 50 min parecen dar principalmente los compuestos **22** y **23** a través de contracción y expansión de anillos respectivamente. (esquema 4.6).³¹ En la presencia de un agente reductor tal como glutatión (GSH) el principal proceso es la N-deoxigenación para dar **24**, ocurriendo en parte a partir de la oxaziridina y en parte directamente del estado excitado del N-óxido.³² La irradiación en el estado sólido lleva otra vez a la quinazolina **22**, pero se obtiene también una imida **25** y una diazepinona **26**, independientemente de si es irradiada la base libre o el clorhidrato.³³

El clordiazepóxido parece ser fototóxico, razón que ha motivado el estudio de la fotoestabilidad de este compuesto en medios biológicos.³⁴



Esquema 4.6

De otra manera en algunos estudios se reporta fotosensibilidad inducida por varias benzodiazepinas y un caso con alprazolam.³⁵

Como se citó anteriormente una de la benzodiazepinas que presenta fototoxicidad elevada es el clordiazepóxido, 18 algunos estudios preliminares han sido conducidos con el objetivo de correlacionar la fototoxicidad con la fotoquímica. Se observó que la toxicidad se debe a los productos formados durante y después de la radiación, principalmente la 6-cloro-4-amino-fenilquinazolina-2-carboxaldehído, 22.³⁶

Respecto al alprazolam no se han publicado estudios sobre su fotoquímica, como tampoco de ninguna otra triazolobenzodiazepina. Sin embargo, desde el punto de vista clínico, recientemente, han aparecido tres publicaciones^{37,38,39} donde se reporta

fotosensibilidad inducida por este medicamento en pacientes a quienes se les administró alprazolam (terapias de 0.25 mg día durante 2 años y en otro caso de 0.4 mg /3veces día durante 1 mes). La fotosensibilidad se manifestó con prurito eritomatoso. Estos casos hacen aún más interesante el estudio de la fotoestabilidad de alprazolam.

¹ Moore, D. E. *J. Pharm Biomed. Sci.*, 1987, 5, 441-453

² Revelle, L. K., Musser, S.M., Rowe, B.J., Feldman I.C., *J. Pharm Sci.*, 1996, 86, 631-634

³ Marinkovic, M., Agbaba D., Karlijkovic-Rajic K., Comor, J. *Il Farmaco*, 2000, 55, 128-133

⁴ Beijerbergen van Heneouwen, G.M.J., *Photostability of Drugs*, 2º Congreso Internacional, Septiembre 14-15, 1997, Pavia-Italia.

⁵ Moore D.E., *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1282-1288

⁶ Vargas, F., Martinez, I, Sequera J., Mendez, H., Rojas, J., Fraile, G., Velásquez., Medina, R., *J Photochem Photobiol.*, 1998, 42, 219-225

⁷ Garcia. C., Smith G., McGimpsey W.G., Kochevar, I., Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 10871-10878.

⁸ Anderson, N. H., Johnston, D., McLellandm.A., Munden P., *J. Pharm. Biomed Anal.*, 1991, 9, 443-449

⁹ Yoshioka S., Ishihara Y., Terazono, T., Tsunakama N., *Drugs Dev. Ind. Pharm*, 1994, 20, 2049-2062

¹⁰ Drew H. D., en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 227-242

¹¹ Tonessen H.H., *Pharmazie*, 1991, 46, 263-265

¹² Tonessen H.H., , *Moore D.E. Pharm. Technol. Int.*, 1993, 5, 27-33

¹³ International Conference on Harmonization, "Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products", Federal Register, 4th Rev. 1996, pp 2

¹⁴ *Draft Guidance: Stability Testing of Drug Substances and Drug Product*, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Junio de 1998.

¹⁵ Idem 10, p228.

¹⁶ Thorma K., en: H.H. Tonnesen (Ed.), *Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor&Francis, London, 1996, pp. 136.

-
- ¹⁷ Carstensen J. T. , en Carstensen J.T., Rhodes C.T., Drug Stability, Principles and Practices, 3° ed. Revised and Expanded, Marcel Decker, New York, 2000, pp 322
- ¹⁸ Piechocki, J.T. en: Albini, A., Fasani, E., (Eds.), Drugs: Photochemistry and Photostability, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 253.
- ¹⁹ Valvani, S. C., en Carstensen J.T., Rhodes C.T., Drug Stability, Principles and Practices, 3° ed. Revised and Expanded, Marcel Decker, New York, 2000, pp 535
- ²⁰ Albini, A., Fasani, E., en: Albini, A., Fasani, E., (Eds.), Drugs: Photochemistry and Photostability, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 73.
- ²¹ Matthews B. R., en Carstensen J.T., Rhodes C.T., Drug Stability, Principles and Practices, 3° ed. Revised and Expanded, Marcel Decker, New York, 2000, pp 609
- ²² Mathews B. R., *Drug Devel. Ind. Pharm.*,1999, 25,831-856
- ²³ Nudelman SN, Waisbaum RG *J Phys Org Chem* 1997, 10: 97-106.
- ²⁴ Nudelman NS, Waisbaum RG. *J Pharm Sci.*, 1995, 84:208-211
- ²⁵ Nudelman NS, Waisbaum RG. *J Pharm Sci*, 1995, 84: 998-1004
- ²⁶ Andersin, R., Ovaskainen, J., Kaltia, S. *J. Pharm. Biomed. Anal*, 1994, 12, 165.
- ²⁷ Andersin R., Mesilaako M., *J. Pharm. Biomed. Anal*, 1995, 13, 667.
- ²⁸ Roth, H.J., Adomeit, M., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1973, 306, 889
- ²⁹ Busker, R. W., Beijersbergen Van Henegouwen G.M., Kwee B.M., Winkens J.H., *Int. J. Pharm.*, 1987, 36,113
- ³⁰ Givens, R.S., Gingrich, J., Mecklemburg, S., *Int J. Pharm.*, 1986, 29, 67
- ³¹ Cornelissen, P. J.G., Beijersbergen van Henegouwen, G.M., Gerritsma, K.M., *Int J. Pharm.*, 1979, 3, 205
- ³² Cornelissen, P. J.G., Beijersbergen van Henegouwen, G.M., Mohn G. R., *Photochem. Photobiol.* 1980, 32, 653-659.
- ³³ Reisch J., Ekiz-Guecer N., Tewes G., *Liebigs Ann. Chem.*, 1992, 69
- ³⁴ Bakri, A., Sedee A.G. *Photochem. Photobiol.* 1986, 2, 205- 212.
- ³⁵ Shader, R. I. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1992, 12, 146.
- ³⁶ De Vries, H.; Beijersbergen Van Henegouwen G.M.; Wouters P.J. *Pharm. Weekbl Sci.*, 1983 , 16, 302.
- ³⁷ Watanabe, Y.;Kawada, A.; Ohnishi , Y.; Tajima, S.; Ishibashi, A. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1999, 40, 832
- ³⁸ Pazzagli, L., Banfi, R., Borselli, G., Semmola M. V. *Pharm. World Sci.*,1998, 3, 136

³⁹ Kanwar, A. J., Rajeev Gupta, M.D., Swami Das Mehta. M.D. *Dermatologica*, 1990, 181,75

CAPITULO 5

PRODUCTOS DE FOTODEGRADACION DE ALPRAZOLAM. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION.

5.1 Aislamiento de Productos formados en medio acuoso

En primer lugar se desarrollaron estudios de fotodegradación de estrés de alprazolam a diversos pH a fin de determinar las condiciones óptimas para diseñar los estudios posteriores. En estos experimentos preliminares se observó que la velocidad de descomposición del alprazolam es mayor a pH ácido; por este motivo se realizó la fotodegradación usando una solución de alprazolam $3.2 \times 10^{-3} \text{M}$ en buffer fosfato-cítrico [$6.4 \times 10^{-4} \text{M}$], pH 2.0 con 13% de metanol para facilitar la disolución. La solución se irradió 10 días con la lampara descrita arriba. La solución tomó un color amarillo al cabo de 4 días de irradiación.

Para separar los productos provenientes de degradación de alprazolam la solución se alcalinizó a pH 8.0 con NaOH, se enfrió, y así se formó un precipitado amarillo que fue removido mediante filtración. (*Sólido 1*).

El sobrenadante se extrajo con diclorometano, (*Extracto 1*), lavándose repetidas veces con agua para eliminar sales provenientes del buffer. En primer lugar, se estudiaron los compuestos presentes en este extracto.

5.1.1 Resolución del *Extracto 1*

Con el objeto de separar los productos formados se ensayaron diferentes sistemas de cromatografía de capa fina, estos resultados muestran que el extracto es una mezcla compleja de compuestos que resultaba imposible de resolver. Diversos intentos de aplicación de cromatografía en columna, para separar los múltiples productos de degradación resultaron infructuosos, probablemente debido a la similitud de las estructuras entre sí, y, posiblemente, a la labilidad de algunas de ellas en las condiciones de manipulación. Entonces la mezcla se resolvió mediante la aplicación de sucesivas placas de cromatografía en capa preparativa, de esta manera se lograron separar tres productos de degradación.

La primera resolución se realizó usando placas de sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) preparativas y como eluente EtOAc:MeOH:TEA, 70:30:0.4. Se revelaron con luz UV 254 y 366 nm cuatro manchas las cuales fueron removidas de la placa y extraídas con metanol. La suspensión se filtró y luego evaporó a sequedad. El residuo obtenido se redisolvió en cloroformo, nuevamente se filtró y evaporó. Las fracciones obtenidas se continuaron purificando por TLC y HPLC como se indica abajo para obtener los siguientes productos de degradación:

Compuesto 1:

Las mejores condiciones para el aislamiento del compuesto 1 fueron las siguientes. Este compuesto se purificó trabajando con cromatografía preparativa con sílica gel (Merck TLC Sílica 60 F₂₅₄), e isopropanol 100% como solvente (R_f alprazolam 0.20 y R_f compuesto 1 0.27). En seguida se aplicó cromatografía preparativa usando celulosa y como eluyente NaOH 0.2N (R_f alprazolam 0.35 y R_f compuesto 1 0.49). En ambos casos se visualizaron los compuestos con lámpara UV 254nm.

Las fracciones obtenidas se terminaron de purificar por HPLC, columna C-8, fase móvil: agua-acetonitrilo, 60-40, detector UV 220 nm, (t_R alprazolam 14.3 y t_R compuesto 1 12.0). Las fracciones se llevaron a sequedad a presión reducida, después se redisolviéron en cloroformo por sonicación, finalmente se filtraron y se llevaron a sequedad.

Se realizaron también experiencias de irradiación de una solución de alprazolam en metanol, en las cuales también se formó este compuesto. En este caso, la separación se logró mediante cromatografía preparativa con sílica gel con AcOEt-MeOH-TEA, 50-50-0.5 para las primeras placas y luego con AcOEt-CH₂Cl₂-TEA 30-70-0.5.

Es importante destacar que este compuesto también se aisló de comprimidos de alprazolam sometidas a degradación usando la lámpara descrita, y se separó como se indica arriba.

Compuesto 2:

Este compuesto se purificó desarrollando placas de sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) en cloroformo-metanol, 100-5, (R_f alprazolam 0.56 y R_f compuesto 2 0.52). Las manchas se visualizaron con luz UV, 254 nm, y se extrajeron de la sílica con metanol. El residuo así obtenido se redisolvió en cloroformo y se sometió a una segunda separación por cromatografía preparativa, esta vez usando celulosa (Aldrich) y NaOH 0.2N (100%), como solvente. (R_f compuesto 2 0.65). Las manchas se removieron con metanol, se secó y después de redisolviéron con cloroformo, se filtró para remover restos de celulosa y se llevó a sequedad.

El residuo se redisolvió en una mezcla de buffer acetato 0.025M (pH 4.5): acetonitrilo (40:60 v/v) y se procedió a una última purificación con HPLC usando el método de gradiente con las mezclas: A: buffer acetato 0.025M –acetonitrilo 80-20 y B: buffer acetato 0.025M –acetonitrilo 20-80. Aplicando el siguiente gradiente: 5 min B (50%), 7 min B (100%). (t_R alprazolam 10.7 min y t_R compuesto 2 8.1 min)

Compuesto 3:

Este compuesto se purificó aplicando los siguientes sistemas de cromatografía de capa preparativa: sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) con acetato de etilo-cloruro de metileno-trietilamina 70:30:0.4 (R_f *alprazolam* 0.05 y R_f *quinolina* 0.15). Como revelador se usó luz UV 254 nm y 366nm. Finalmente se extrajo de la sílica con metanol como se indica arriba.

Para confirmar la estructura propuesta de acuerdo a las características espectroscópicas del producto separado se procedió a sintetizarlo.

Síntesis de triazoloaminoquinolina

Se disolvió 186 mg de Alprazolam en 2 mL de MeOH, luego se agregó 4 mL de HCl 0.33 N, para generar la benzofenona respectiva. Inmediatamente después que el pH de esta solución se ajustara rápidamente a pH 9.0 con el agregado de KOH 2.0 N, se adicionó 2.0 mL de anhídrido acético disuelto en 4 mL de THF con constante agitación. Después de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se llevó a sequedad a presión reducida.

El residuo se disolvió en metanol y luego se agregó 10 mL de KOH 2N y la solución se calentó a 90 °C durante 6 horas. Después de que la solución se enfrió se procedió a extraerla con 5 mL de benceno y después se secó a presión reducida..

La purificación se hizo mediante cromatografía de capa fina usando placas de sílica gel y como solvente metanol-isopropanol-cloroformo 5-15-80, (R_f *quinolina* 0.77 y R_f *alprazolam* 0.62, R_f *benzofenona* 0.49). Se obtuvo un porcentaje de 83%

5.1.2 Resolución del Sólido 1

Después de 10 días de irradiación de una solución de alprazolam en buffer citrato pH 2.0, se observó un precipitado amarillo en la solución irradiada. Este precipitado se separó por filtración, lavó y secó; el sólido así obtenido solamente fue posible solubilizarlo en metanol. En los primeros análisis que se hicieron por TLC usando sílica gel, no se encontró un eluyente apropiado; con metanol se logró eluirlo pero de manera muy difusa, la adición de ácidos o bases no mejoró la separación.

Después de muchas manipulaciones se observó que un sólido amarillo también precipita al alcalinizar la solución. Este sólido es soluble en solventes menos polares, haciendo más fácil separarlo de las sales del buffer mediante la solubilización del sólido en acetato de etilo, seguido de varios lavados y extracción, después se secó con sulfato de magnesio y se evaporó.

Los ensayos por TLC mostraron que se trata de una mezcla de compuestos de diferentes polaridades, por lo tanto se emprendió a hacer la primera separación en una columna que permitiera separar los compuestos más polares de los menos polares.

Esta se hizo usando sílica gel y como solventes:

AcOEt-MeOH, 7-3 para recoger la fracción 1

MeOH-TEA, 50-0.1 para recoger la fracción 2

El análisis de la fracción 1 mediante TLC y estándares revela que ésta es una mezcla de los productos separados en el extracto 1.

La fracción 2, no fue posible analizarla con TLC usando sílica gel como soporte, ya que no se encontró una fase móvil adecuada, nuevamente se obtuvo una mancha difusa que solamente eluye al frente del solvente con metanol y TEA.

Por este motivo se buscaron otros soportes para la separación, se ensayó primero en fase reversa. Usando metanol y ácido fórmico se separa la mezcla en varias manchas difusas, las cuales se procedieron a separar mediante columna, usando como solventes:

MeOH -buffer fórmico pH 2.8, 50-50 y 70-30 para eluir manchas no definidas

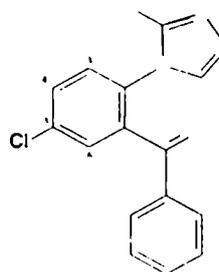
MeOH-ácido fórmico 50%, 10-0.8 para eluir la mancha más definida. *Compuesto 4*.

Por otra parte, el análisis por TLC usando alúmina como soporte indicó que en esta fase el sólido obtenido se separa en tres manchas. Se realizó una columna usando mezclas progresivas de acetato de etilo-metanol-TEA, 50-5-0.5, 50-10-0.5 para separar el *compuesto 5* y 30-70-0.5 para separar el *compuesto 6* y *compuesto 4*.

5.2 Caracterización de productos de degradación.

5.2.1 5-Cloro-[5''-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzofenona

Uno de los productos que se forma mayoritariamente en las soluciones y tabletas irradiadas artificial y naturalmente es la 5-Cloro-[5''-metil-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzofenona.



Compuesto 1

Este compuesto presenta un ion molecular intenso m/z 297, acompañado por el satélite propio del cloro, además el espectro de masa por impacto electrónico presenta el ion característico benzoilo m/z 105 que indica que este producto de degradación proviene de la hidrólisis del enlace imino del anillo diazepínico que da lugar a una benzofenona, el carbono carbonílico además se confirma con la señal a 192.59 ppm en el espectro de ^{13}C -RMN.

En el espectro de masa se observa que una de las principales fragmentaciones se debe a la pérdida de 29 uma, que corresponde a la eliminación de HNN la cual es característica de los 1,2,4 triazoles, para formar el ion m/z 268. También se observa el ion m/z 192 $[M+105]$ complementario del ion m/z 105; el ion m/z 77 (pico base) y su complementario m/z 220 $[M+77]$, como también otros iones de intensidad menor que se forman por la pérdida sucesiva de HCN y CN.

El espectro ^1H -RMN (figura 5.1) muestra tres tipos de señales: un singulete a campos bajos que integra a 3 H correspondiendo a un metilo, diferentes señales en la zona aromática y un singulete a campos bajos que integra a un H.

La primera señal indica que el metilo del anillo triazólico se encuentra presente en este compuesto de degradación.

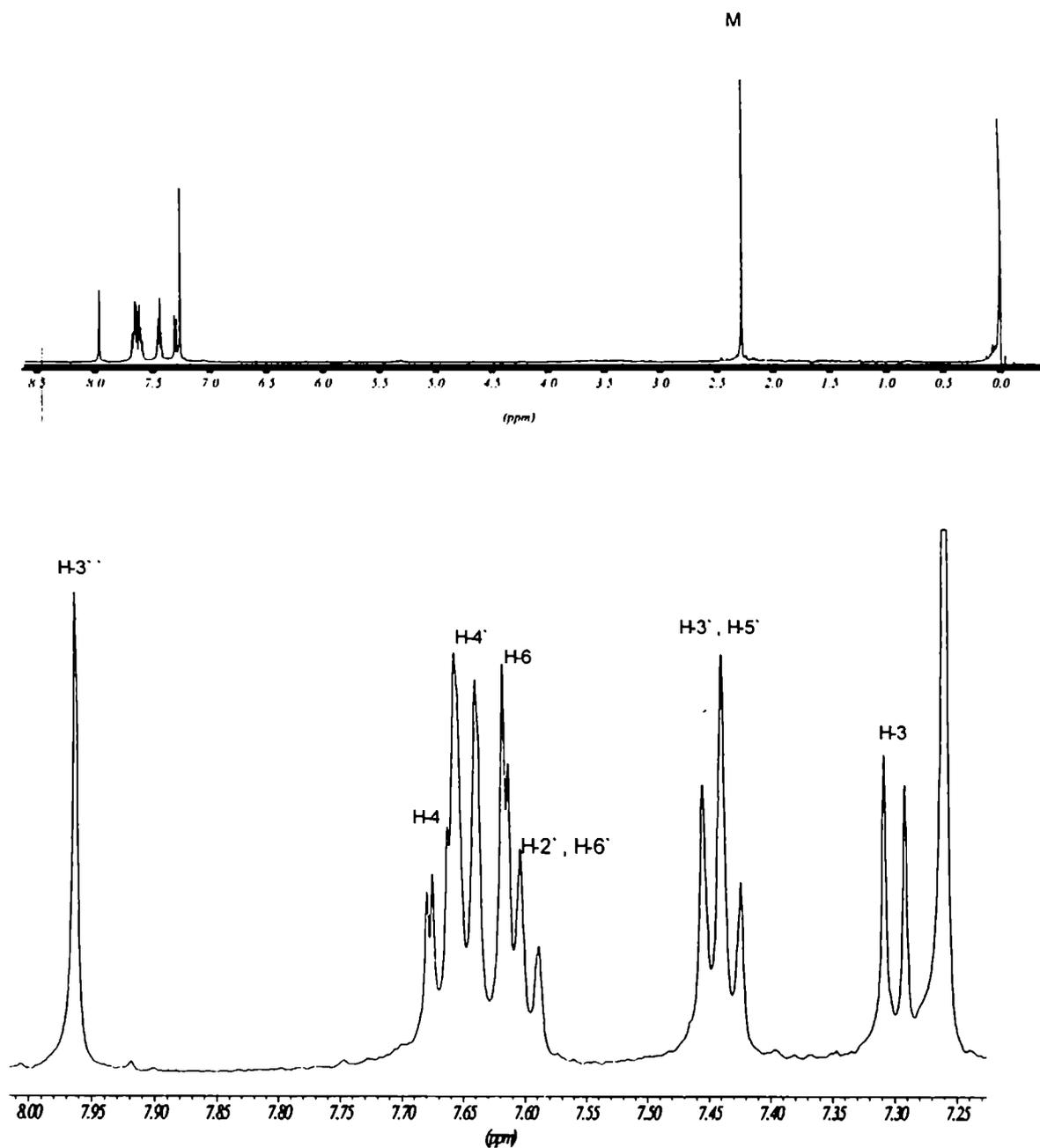


Figura 5.1 Espectro de ^1H -RMN de triazolbenzofenona

Un análisis detallado en la zona aromática indica que las señales aromáticas conforman dos sistemas: un sistema AMX para el anillo trisustituido y un sistema AA'BCC', no obstante no es posible seguir un análisis de primer orden para las primeras debido a la superposición de las señales con el otro anillo

El H-3 se identifica claramente por el único acoplamiento orto que presenta, se trata del doblete a 7.29 ppm con J 8.41 Hz.

El valor de este J permite identificar la señal correspondiente al H-4, el cual está desprotegido al encontrarse en posición orto respecto al cloro, por lo tanto el doble doblete

J 8.41 y 2.31 Hz corresponde al H-4, el segundo doblete de esta señal está superpuesto con la siguiente señal, el segundo acoplamiento equivale al acoplamiento meta con el H-6.

Nuevamente el acoplamiento meta permite identificar la señal del tercer H (H-6) del anillo trisustituido, el doblete a 7.61 ppm presenta el acoplamiento meta 2.31 buscado.

Las señales restantes corresponden a los hidrógenos del anillo monosustituido, así el triplete a 7.43 ppm se deben a la resonancia de los dos H equivalentes químicos que presentan dos acoplamientos orto 7.94 y 7.78 Hz, por lo tanto este triplete corresponde a los H 3' y H5'.

Las señales que faltan por asignar son un dd a 7.64 ppm con J 8.5 y 1.3 Hz y un dt a 7.60 ppm con J 7.51, lamentablemente no es posible integrarlas independientemente debido a la superposición de señales. Los H que faltan por asignar son los H- 2' y H-6' que son equivalentes químicos y el H 4', la señal de los H-2' y H-6' debería presentar un J orto, meta y se esperaría poderse observar el J para, en cambio la señal del H 4' deberían presentar J orto y meta. Es decir que el dd se debe al H 4' y el dt se debe a los H 2' y 6' donde el tercer J es un J *para* que también puede verse sutilmente en el t correspondiente a los H 3' y 5'.

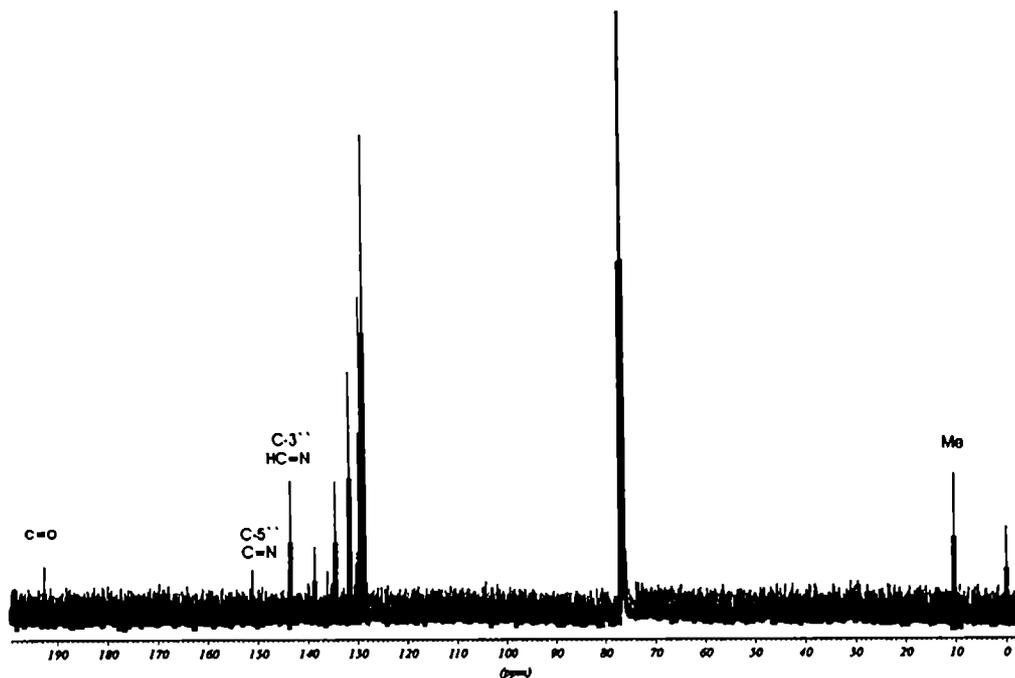


Figura 5.2 Espectro de ^{13}C -RMN de Triazolbenzofenona

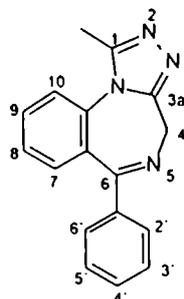
El espectro de ^{13}C -RMN (Fig5.2) muestra la señal debida al metilo sustituyente del anillo triazólico a 10.44 ppm, como se mencionó anteriormente también se observa la señal de carbonilo de la benzofenona. Se observan 10 carbonos aromáticos donde las señales correspondientes a los C equivalente 2' - 6' y 3' - 5' presentan mayor altura. Los espectros muestran dos señales a campos bajos a 143.65 ppm y 151.22 ppm que corresponden a dos carbonos iminos, por la altura de la señal se puede concluir que el carbono a 143.65 ppm es un carbono protonado.

Esto confirma el hecho que la señal observada a campos bajos y que integra a un hidrógeno se debe al H-3'' del anillo triazólico.

La estructura de este compuesto fue confirmada por otra benzofenona sintetizada en nuestro laboratorio

5.2.2 8-H Alprazolam: 1-[metil]-6-fenil-4H-s-triazolo[4,3a][1-4]benzodiazepina.

Este compuesto se forma minoritariamente en la fotodegradación de soluciones acuosas con buffer citrato.



Compuesto 2

El espectro de masa por impacto electrónico presenta un ion molecular intenso de 274 uma, sobresale la ausencia del ion $[M+2]$. Con esta masa se puede concluir que este compuesto se trata de un producto de fotodegradación formado por la pérdida del átomo de cloro.

El espectro de masa, como era de esperarse, presenta iones comunes con el espectro del alprazolam y las mismas fragmentaciones que ocurren con la molécula de alprazolam. Siendo los iones más intensos m/z 245, 204, 103, 89 y 77.

En el espectro de ^1H -RMN (figura 5.3) se observan los dobletes a 4.08 ppm y 5.48 ppm con $J=12.9$ Hz (acoplamiento geminal), estas señales corresponden a los H-4 del

metileno, su presencia es indicio de la integridad del anillo diazepínico, se observa también un singulete a 2.66 ppm que integra a tres hidrógenos correspondiente al metilo del anillo triazólico.

Las dos señales anteriores son idénticas a las presentadas por el alprazolam, estos dos espectros son diferentes en la zona aromática.

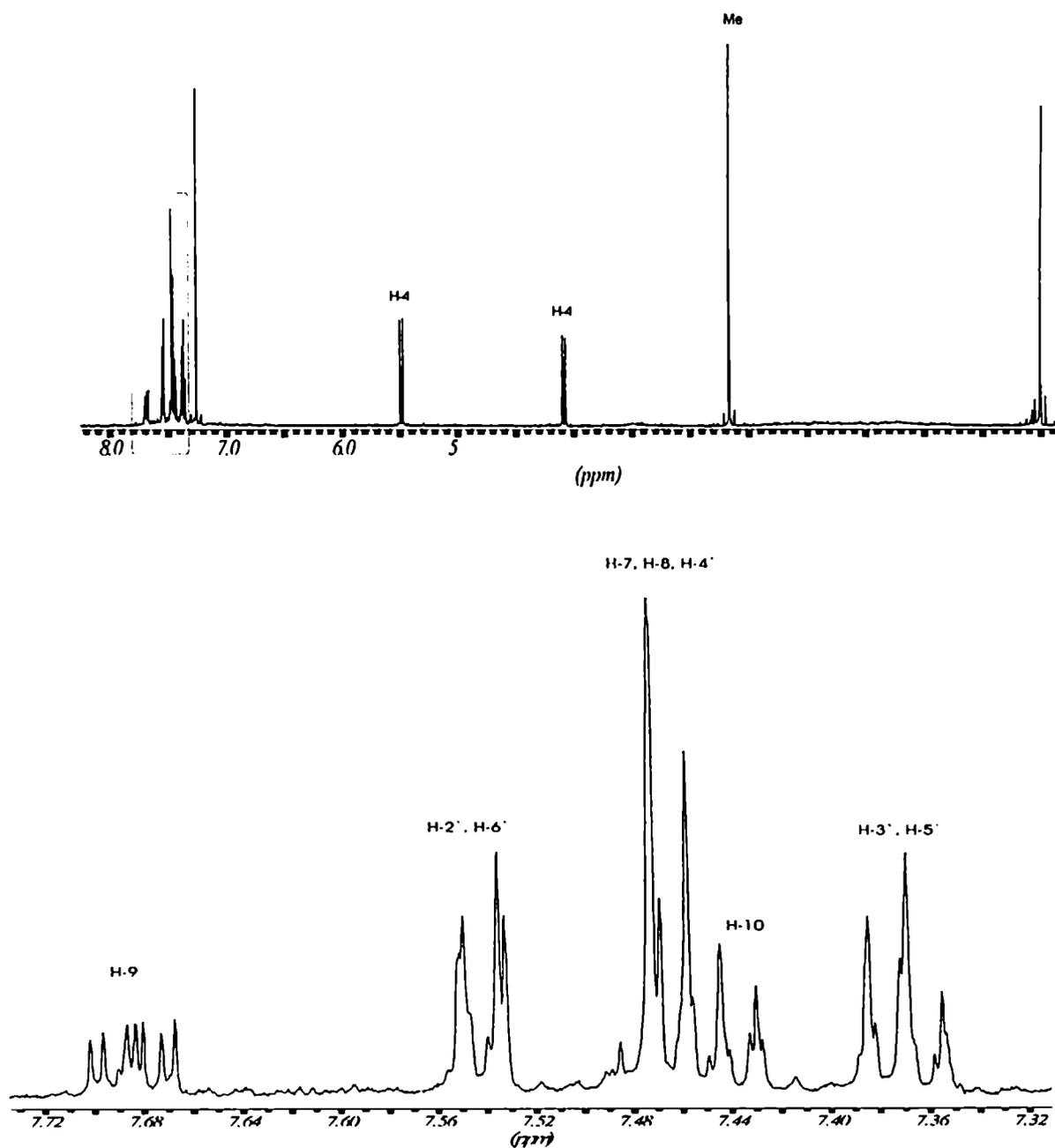


Figura 5.3 Espectro de ¹H-RMN de 8-Halprazolam

Se observa de manera clara un dq a campos bajos (7.68 ppm) que integra a un hidrógeno con acoplamientos 7.45, 6.35, 2.55 Hz; los hidrógenos más desprotegidos de acuerdo al efecto del sustituyente son los H-7 y H-9, considerando que el H-7 no presenta dos acoplamientos orto según la estructura propuesta, el dq se debe al H-9, que se encuentra desprotegido debido a que se encuentra en posición *para* respecto a la imina y *meta* respecto a la amina.

El dt a 7.43 ppm presenta un acoplamiento de 7.45 Hz que indica que corresponde al H-10 o H-8, debido a la multiplicidad que presenta se determinó que esta señal corresponde al H-10 ya que esta presenta acoplamientos orto, meta y para, mientras que el H-8 presenta dos J orto y un J meta. Podría pensarse también que el J del dt corresponda al $J_{8,7}$, sin embargo al tener en cuenta el corrimiento químico se observa que el H-10 está más protegido que el H-7 por efecto de los sustituyentes imina y amina.

Las señales que integran a 2H: dt a 7.54 ppm con J 7.15 y tt a 7.37 ppm con J 7.15 y 7.8 Hz se deben a los dos pares de hidrógenos equivalentes químicos presentes en el anillo monosustituido, H-2', H-6' y H 3' - H-5' respectivamente.

Siguiendo este análisis en la señal a 7.46 ppm que muestra una apariencia de un simple dd se encuentran las resonancias de los H-8, H-7, y H-4', lo cual está confirmado con los resultados de la integración.

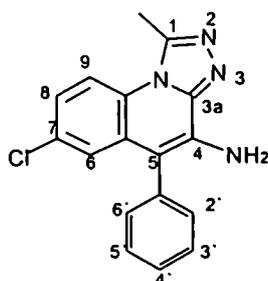
En el espectro de ^{13}C -RMN no se observan diferencias apreciables respecto al espectro del alprazolam.

Tabla 5.1 Señales de ^{13}C -RMN de 8-H alprazolam y alprazolam

	8-H alprazolam (ppm)	Alprazolam (ppm)
Me	12.36	11.85
C-4	46.36	46.75
Ar	123.27	126.90
	127.23	129.5
	128.28	130.58
	129.32	132.07
	130.63	132.20
	131.50	132.77
	132.16	133.37
	133.83	133.47
C=N	139.22	134.63
		140.05
	155.39	152.90
C=N	164.61	156.45
	169.27	170.96

5.2.3 Triazoloaminoquinolina

Es el compuesto minoritario que se forma en la fotodegradación de tabletas, también se aisló de soluciones buffer pH 2.0. Y es el principal producto de degradación de alprazolam en comprimidos a 80 °C y 80 % de humedad relativa al abrigo de la luz.



Compuesto 3

El primer acercamiento a la estructura de este compuesto se hizo mediante el análisis del espectro de masa de impacto electrónico (IE-EM). Este se caracteriza por presentar un pico

intenso $[M-1]$ que es justamente el pico base, y es típico para aminas primarias. También se encuentran los iones $[M-1+2]$, $[M]$ y $[M+2]$, (pattern de cloro) después de realizar la síntesis independiente de este producto se determinó con precisión el peso molecular de este compuesto (308 uma). Contrario a lo que se esperara para un producto de degradación, este no difiere del peso molecular del alprazolam (308 uma); además de esta coincidencia hay varios iones comunes en el espectro de masa de estos dos compuestos.

Los picos más importantes según intensidad son m/z 307, $[M+1]$, 102 y 89, los dos últimos son comunes con el alprazolam. Los otros iones son fragmentaciones debidas a la pérdida de ácido cianhídrico y CN.

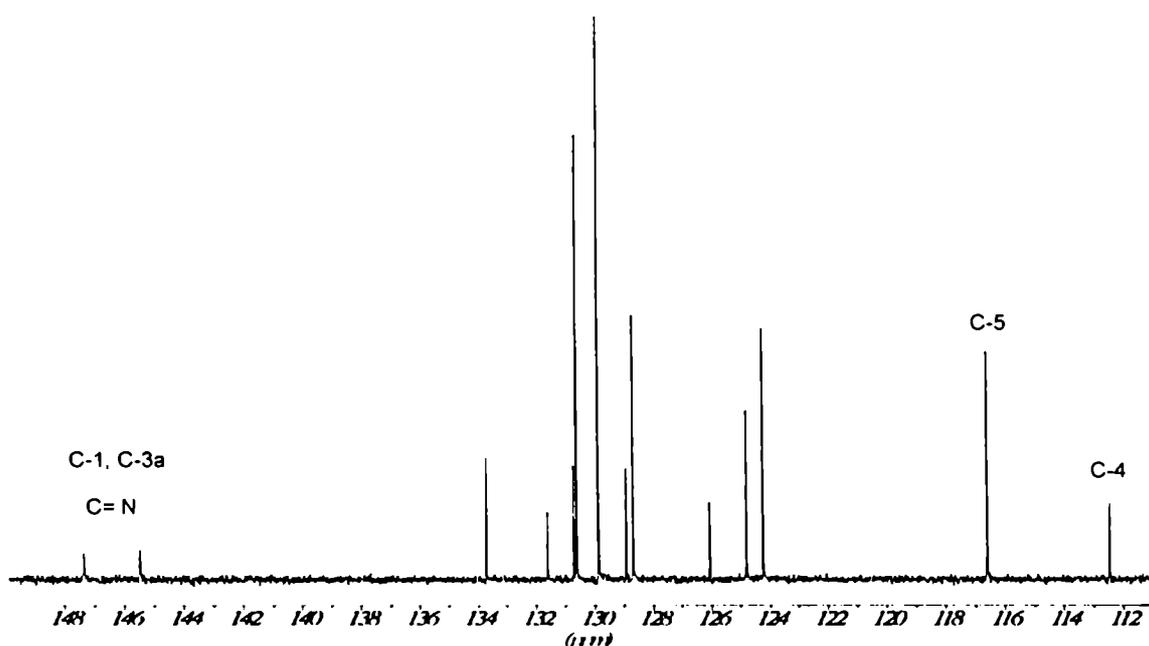


Figura 5.4 Espectro de ^{13}C -RMN de Triazolaminoquinolina

No obstante el espectro de ^{13}C RMN (figura 5.4) da cuenta de varias diferencias estructurales respecto al alprazolam que ayudaron a establecer su estructura:

- I. No se encuentran las señales particulares del metileno (C-4) que hace parte del anillo diazepínico.
- II. Resuenan dos carbonos en la zona de los alquenos a 112.44 ppm y 116.59 ppm.
- III. Desaparece un carbono con carácter imino, se observa solamente dos carbonos imino a 147.35 ppm y 145.46 ppm.

De estas observaciones, y de la masa molecular, se puede concluir que este compuesto es producto de reacciones de reordenamiento de la molécula de alprazolam.

En la figura 5.5 se muestra el espectro de ^1H -RMN, se observa en la zona alifática solamente dos señales un singuletes a 3.15 ppm que integra a 3 H y una señal ancha a 4.69 ppm que integra a 2 H, (los cuales resultaron ser hidrógenos intercambiables), mientras que el espectro de ^{13}C -RMN se observa solamente un carbono alifático (CH_3), indicando que los dos hidrógenos a 4.69 ppm forman parte de una amina primaria.

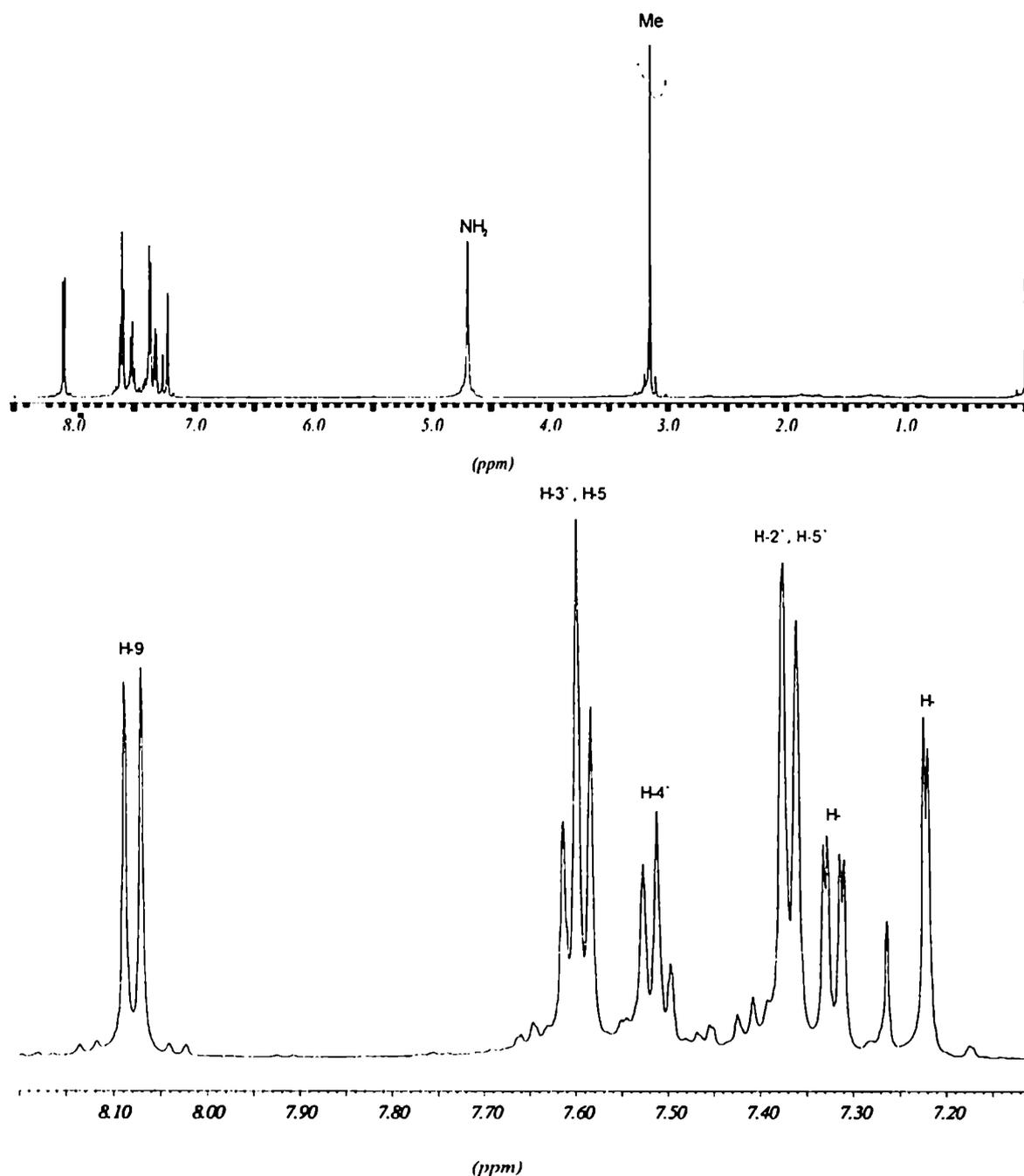


Figura 5.5 Espectro de ^1H -RMN de triazolaminoquinolina

También en el espectro de ^1H -RMN sobresale la ausencia de los dos dobletes con acoplamiento geminal característicos de los hidrógenos en el C-4 del anillo diazepínico del alprazolam.

Las señales en la zona aromática están bien resultas para cada uno de los anillos, sin embargo hay superposición entre las señales de los dos anillos que modifican el valor de los acoplamientos medidos. Las señales del anillo monosustituido se identifican por la

integración, las dos señales que integran a dos hidrógenos se atribuyen a los hidrógenos equivalentes químicos, por la multiplicidad se deduce que el t a 7.60 ppm se debe a los H-3' - H5' con J 7.3 y 7.7 Hz y el d a 7.36 corresponde a los H-2' y H6' con J 7.4 Hz. En este orden de ideas, el H-4' debe ser un d con dos acoplamientos orto y meta, por lo tanto la señal a 7.51 ppm con J 7.7 Hz se debe al H-4'

Las tres señales restantes presentan la multiplicidad clásica de un anillo trisustituido AMX: un hidrógeno que resuena como d a 8.07 ppm con J orto (J 8.7 Hz), H-9, un hidrógeno que resuena como dd a 7.32 ppm con J orto y meta (J 8.7 Hz y 2.35 Hz), H-8, y finalmente un hidrógeno que resuena como d a 7.22 ppm con J meta (J 2.35 Hz), H-6. El corrimiento a campos bajos del H-9 se debe a los efectos de anisotropia que reciben los H en posición ipso.

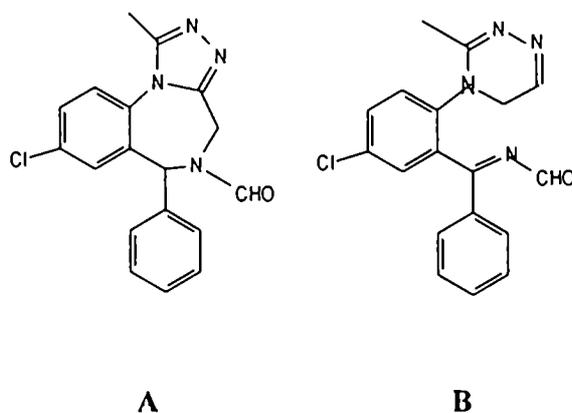
De acuerdo a este análisis el compuesto no presenta hidrógenos con carácter alqueno, es decir los carbonos insaturados están completamente sustituidos.

Se propusieron varias estructuras de reordenamiento, y finalmente el compuesto se confirmó al tener el espectro de la triazolaminoquinolina que se sintetizó de forma independiente.

En la quinolina se presenta un gran sistema conjugado que explica el aumento en el corrimiento químico del metilo sustituyente en el triazol, como también del corrimiento a campos altos de los carbonos iminos 1 y 3a. Su estructura es también responsable de la observación de fluorescencia

Los productos aislados en estas condiciones son completamente diferentes a los encontrados en la degradación de otras benzodiazepinas.^{1, 2, 3, 4, 5, 6,7,8,9,10}

5.2.4 Compuestos 4



El espectro de masa muestra un ion molecular de 338 uma, con el pattern de cloro usual, este peso molecular indica la adición de 30 uma al alprazolam; considerando que la fotodegradación se realizó en soluciones de alprazolam en buffer con 13 % de metanol para ayudar a solubilizar la droga, lo que podría adicionarse es entonces: $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CO}- + 2\text{H}$, $-\text{CHOH}-$, $-\text{CHO} + \text{H}$.

En el espectro de masa se observan los iones 77, 89 y 102, que también están en el EM del alprazolam; esto está indicando que las 30 uma adicionales no se encuentran en ninguno de los anillos aromáticos en A y en B. La primera fragmentación en el EM corresponde a la pérdida de 29 uma que sumando a otros datos espectroscópicos sugiere la separación de un grupo $-\text{CHO}$.

Por otra parte, el espectro de ^1H RMN presenta 2 singuletes en la zona donde se ha observado el metilo del alprazolam, cuatro dobletes que están acoplados entre sí, con $J=15.2$ para los dos dobletes de 4.00 y 5.49 ppm y $J=14.8$ para los dobletes de 4.31 y 5.34 ppm. Esta duplicidad de señales sugiere la presencia de dos compuestos en la muestra. De igual forma, en el espectro de ^{13}C RMN también se observa la duplicidad de señales.

Se realizaron nuevamente varias y cuidadosas tentativas de separación de dichos compuestos pero resultaron infructuosas. Dado que, posiblemente, se trata de un artefacto resultante de la presencia de metanol en la mezcla de reacción se procedió al análisis conjunto de ambos productos.

En la figura 5.6 se muestra el espectro de ^1H RMN, donde se indican con B las señales correspondientes al compuesto B, el resto de las señales corresponde a A.

Las señales de los metilos conservan la multiplicidad y el corrimiento químico muy similares al alprazolam lo cual quiere decir que los sustituyentes a los que está unido el grupo metilo en estos compuestos serían los mismos que en el alprazolam. El corrimiento químico

del compuesto A es exactamente igual al del alprazolam por lo que se le asigna la estructura triazólica en anillo de 5 miembros del alprazolam no se modifican.

También se observa en el espectro de ^1H RMN (figura 5.6) dos singuletes a 8.3 y 8.5 ppm, integrando a un hidrógeno cada uno, no se puede pensar en que se trate del carbono ipso u otro de la señal aromática por que no presentan multiplicidad, y además con los sustituyentes que se conoce es improbable que un H aromático tenga este desplazamiento. Esta señal es bien explicada por el hidrógeno de una función formamida, lo cual explica también la primera pérdida de 29 uma en el EM.

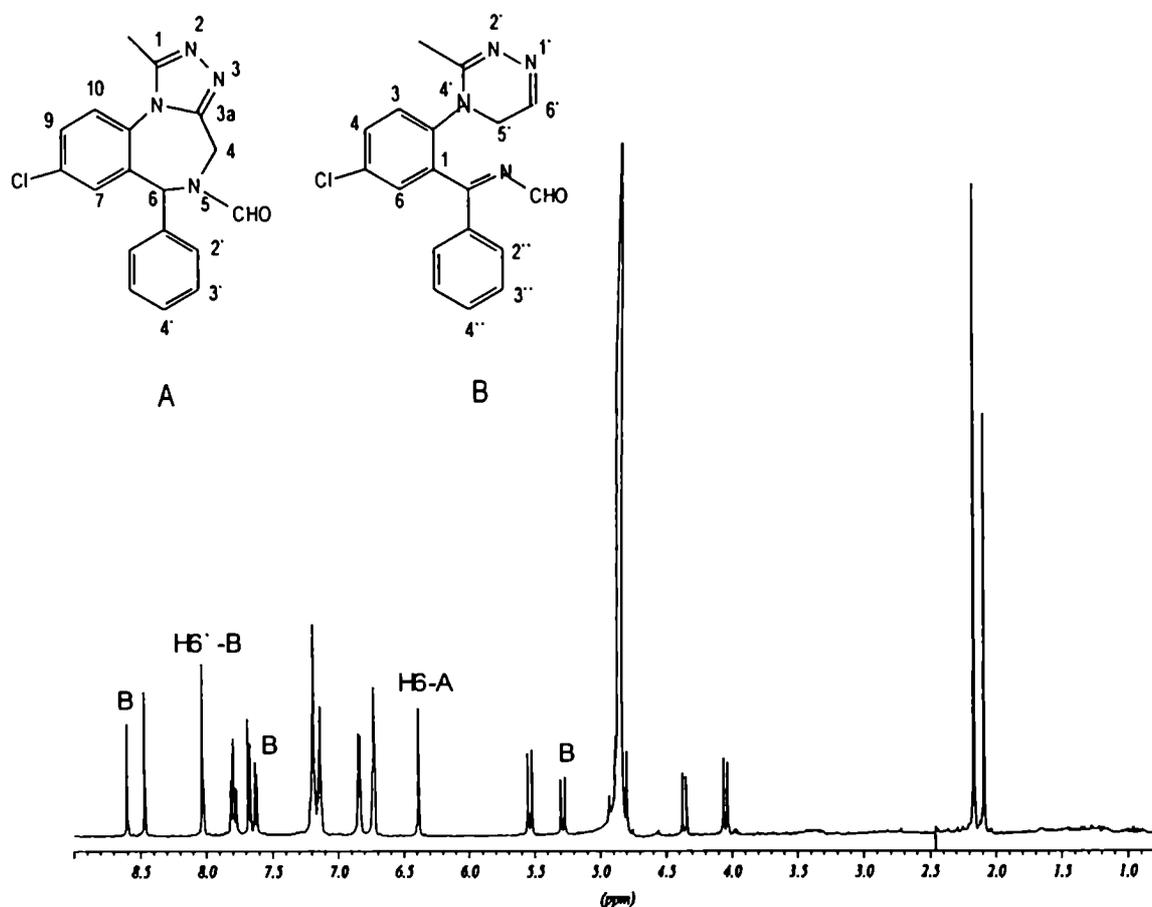


Figura 5.6 Espectro de ^1H -RMN de compuestos 4A y 4B

Si bien el espectro es complejo, de acuerdo a la integración es posible asignar tentativamente estructuras a uno y otro compuesto, tomando como base las señales de los hidrógenos diferentes, esto es el H-6 para la estructura A el H-6' para B.

Las señales del espectro ^1H RMN para 4A: 2.13 (s, metilo); 4.00 y 5.49 ppm (2d, $J=15.2$ hz, H-4); 6.39ppm (s, H-6); 8.43 ppm (s, formamida); si bien es arriesgado intentar una

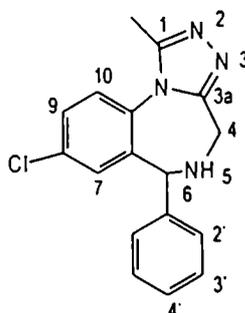
diferenciación precisa de los hidrógenos aromáticos de A y de B, en base a las multiplicidades e integración puede tentativamente asignarse las señales para : 7.63 ppm (d, $J= 8.35$ hz, H-10); 7.77 ppm (dd, $J= 8.35$ y 2.2 Hz, H-9), sin embargo los otros hidrógenos aromáticos es difícil distinguirlos: 7.14,6.8, 6.68 ppm (m, H-7, H-2'-H4', H-3')

Con respecto al compuesto 4B se realizaron diversas estructuras tratando de compatibilizar todos los datos de ^1H y ^{13}C RMN y las posibilidades lógicas dentro de la reactividad posible del alprazolam en esas condiciones.

Dadas las dificultades inherentes al tratarse de una mezcla, la estructura más coherente con los datos que siguen es la que se muestra como 4B. Así el compuesto 4B presenta las siguientes señales: 2.05 ppm, (s, metilo); 4.31 y 5.34 ppm, (2d, $J=14.8$ hz, H-5'); 7.99 ppm (s, H-6'); 8.65 ppm (s, formamida); con las mismas consideraciones dadas para el compuesto A, pueden asignarse: 7.58 ppm (d, $J= 8.4$ hz, H-3); 7.74 ppm, (dd, $J= 8.4$ y 2.45 Hz, H-4), 7.14,6.8, 6.68 ppm (m, H-7, H-2'-H4', H-3')

En el ^{13}C RMN aparecen dos señales a 8.28 y 8.26 (Me), 38.7 y 35.0 (C-4A-C-5'B), 126-132.4 (aromáticos). Se observan dos señales a 162.6 y 162.0 que podrían deberse a los carbonos imino o al carbono carboxílico de la amida.

5.2.5 Compuesto 5



Presenta un pico molecular de 310 uma, con el satélite del cloro, indicando que el alprazolam a sufrido una reducción en uno de los tres enlaces imino que presenta. Considerando que el metilo se presenta en el ^1H RMN como un singulete a 2.26 ppm, se descarta que el enlace imino 1-2, haya sido reducido; de lo contrario el metilo aparecería como un doblete.

El EM tiene un perfil muy semejante al del alprazolam, con dos diferencias importantes: la primera es la presencia de un pico base de 233, que corresponde a la pérdida de 77 uma, y la segunda es el hecho de que el espectro de este compuesto presenta numerosas

pérdidas de 28 uma, no siendo así en el del alprazolam donde se observan varias pérdidas de 26 y 27 uma. Esta observación corrobora el hecho de que se trata de un compuesto que ha sufrido reducción. Un análisis detallado de estas pérdidas se esperaría que dé información de donde están las dos unidades de masa adicionales que presenta este compuesto.

La pérdida de 28 uma se encuentra entre los iones 117 - 89, 165 - 137, 179 - 151 y 233 - 205, sólo en las dos últimas se puede pensar que se deba a la pérdida de NN, en las dos anteriores no es posible por la masa del ion. Lastimosamente ninguno de estos fragmentaciones aseguran cual imino se redujo si el del anillo diazepínico o el del anillo triazol.

El pico base del espectro es 233, que corresponde a la pérdida de 77 uma, esta es una diferencia notable respecto al espectro del alprazolam, donde esta pérdida es apenas importante; este hecho constituye una evidencia de que el enlace que ha sido reducido es el imino que forma parte del anillo diazepínico.

En estas condiciones se podría pensar en una estructura correspondiente al alprazolam reducido, o una formada por reordenamiento y reducción. El espectro de ^1H RMN (figura 5.7) no presenta el H imino que debería existir para la segunda posibilidad, pero sí presenta un H a 5.48 ppm que correspondería a la señal del H-6 de la primera posibilidad. El CH_2 del anillo diazepínico aparece como dos dobletes a 4.01 y 3.93 ppm, con J 14.45 y 12.9; el hidrógeno de la amina secundaria se identificó a través de experimentos para ver hidrógenos intercambiables, siendo la señal correspondiente a 3.65 ppm.

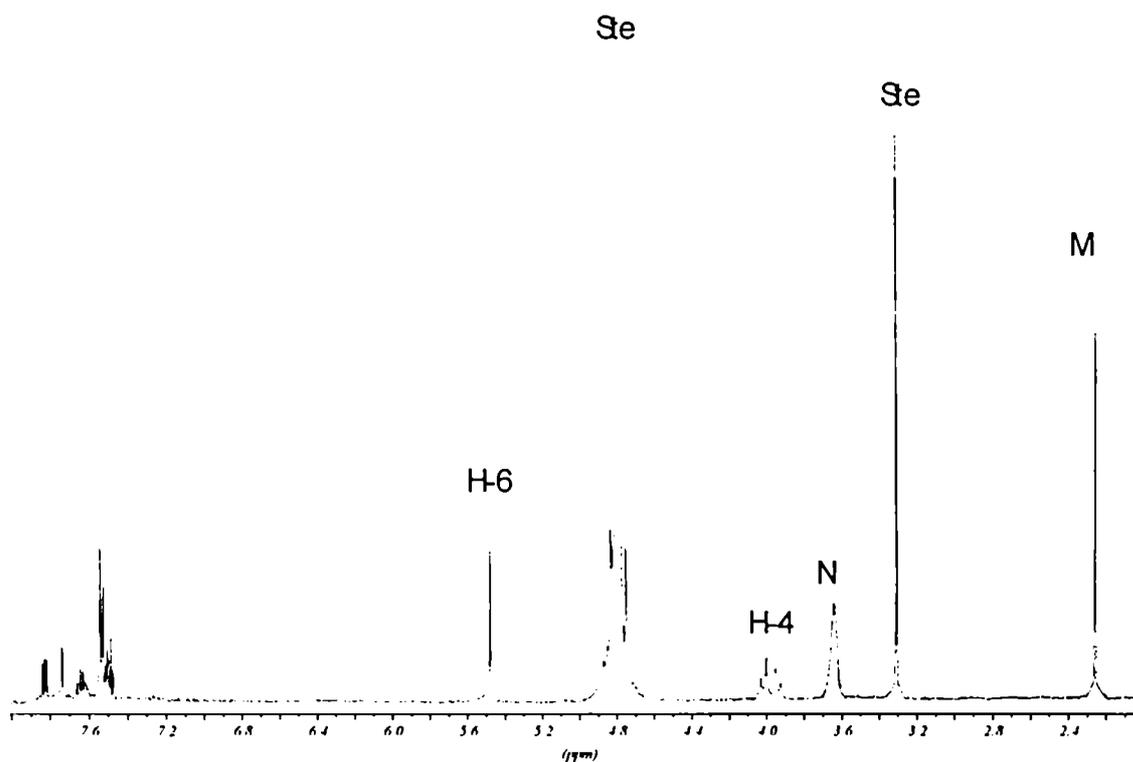
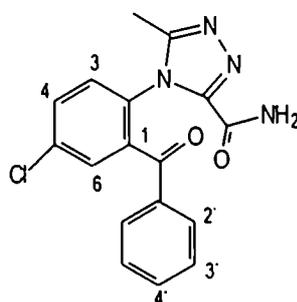


Figura 5.7 Espectro de ^1H -RMN de compuesto 5

Las señales aromáticas se observan a 7.8ppm (dd, $J= 8.35$ y 2.3 hz, H-9), 7.53 ppm(m, $J=6.9$ hz, H-10', H2'-5'-), 7.79ppm (d, $J= 2.35$ hz, H-7), 7.64 ppm (tt. $J= 7.7$ hz, H4), 7.49(tt, $J= 6.7, 8.8$ hz, H3'-6')

El ^{13}C RMN muestra las señales correspondientes a 10.8 (CH_3), 30.8(C-4), 55(C-6), 126.9-136.1(aromáticas), C imino no se alcanzan a observar.

5.2.6 Compuesto 6



El espectro de masa presenta un ion molecular de 340, con el satélite de cloro. Sobresale en este espectro el ion a 105 con su complementario 235, $[M+105]$, siendo estos los fragmentos más importantes después del ion 77 que es el pico base. También se observa la pérdida de 44 uma que corresponde a la pérdida de CONH_2 y da lugar al ion 296.

El espectro de masa tiene un perfil semejante al observado en el espectro del compuesto I (triazolbenzofenona, PM 297).

El espectro de ^1H RMN (figura 5.8) es simple, muestra el singulete del metilo a 2.36 ppm y la señal ancha de la amina a 3.5 ppm.

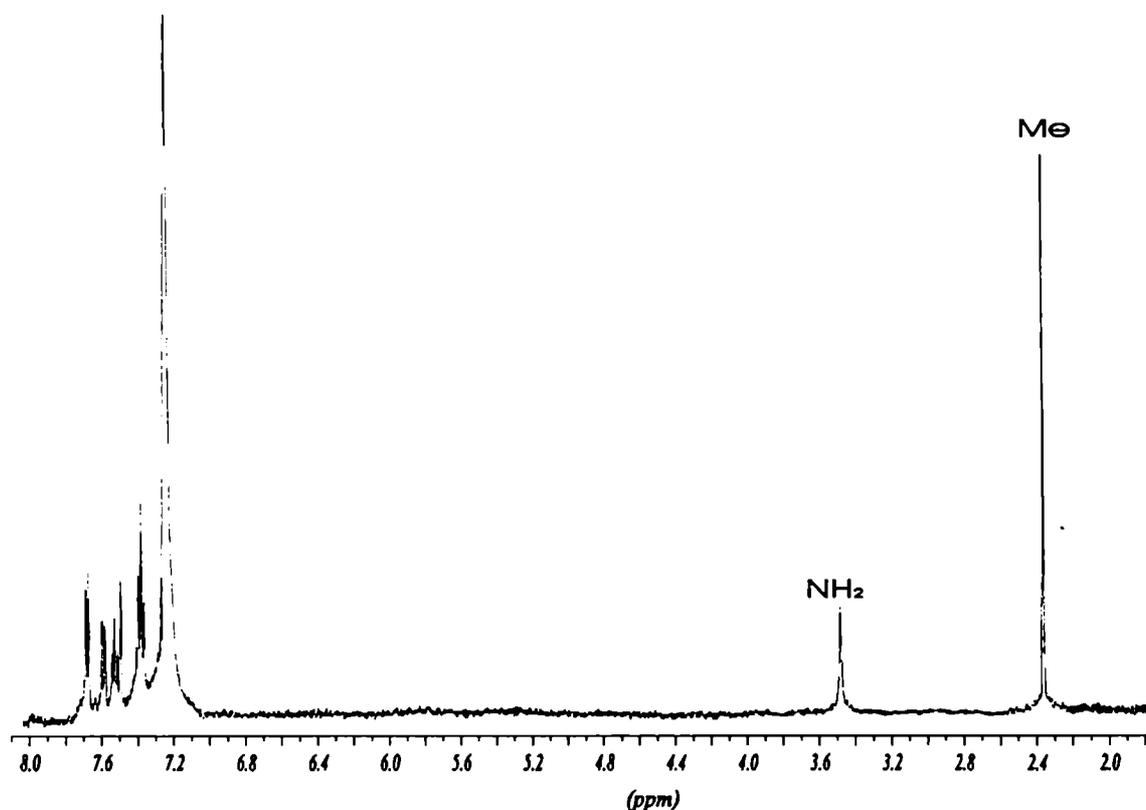


Figura 5.8 Espectro de ^1H -RMN de compuesto 6

Las señales aromáticas son las típicamente observadas para un anillo trisustituido y monosustituido:: 7.64 (dd, $J=8.25, 2.4$, H-4); 7.55 (d, $J=2.4$, H-6); 7.73, 2 (d, $J=8.25, 8.3$ H-3, H-2'-6'); 7.59 (tt, $J=7.40, 7.45$, H-4'); 7.44 (tt, $J=7.4-8.3$, H-2'-5').

5.3 Aislamiento y Elucidación de estructuras de productos de fotodegradación de alprazolam en metanol

El aislamiento de los productos de reacción de la irradiación de soluciones bufferadas se intentó con mucha dificultad, debido a que las velocidades de formación son pequeñas y al bajo porcentaje de recuperación de los productos formados durante la extracción. Teniendo en mente que el alprazolam es lábil a la fotodegradación se buscó la manera de mejorar y facilitar el aislamiento y así la caracterización de los productos de degradación, para ello se ensayó la irradiación de alprazolam en solución metanólica. A continuación se describen también los resultados obtenidos del análisis de la fotodegradación de alprazolam en estas condiciones, el aislamiento y caracterización de los productos de degradación formados.

En solución metanólica se observó la formación de tres principales compuestos, uno de éstos es el triazolaminobenzofenona que también se encontró en medios acuosos. También se encontraran trazas del compuesto 4A.

Las señales de los espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN y IE-EM de los otros dos compuestos se describen a continuación:

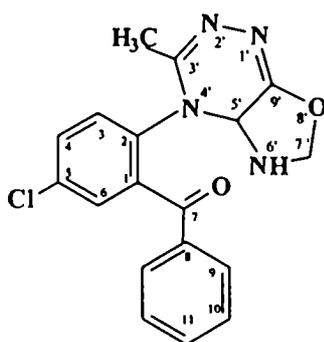
Compuesto 7: ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.35 [m, 1H, (NH)], 2.15 [s, 3H, (CH_3)], 3.10 [d, J = 7.5 Hz, 1H, (H-5')], 4.15 [dd, J = 15.0, 7.5 Hz, 1H, (H-7a')], 4.55 [dd, J = 15.0, 5.0 Hz, 1H, (H-7b')], 7.68 [m, 8H, (H-Ar)]. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 10.9 (CH_3), 32.9 (C-5'), 46.0 (C-7'), 132 (C-Ar), 150 (C-3'), 165 (C-9'), 195.0 (C-7). MS m/z [ion] 356 [$\text{M} + 2$] $^+$, 355 [$\text{M} + 2 - 1$] $^+$, 354 [M] $^+$, 325 [$\text{M} - \text{CHO}$] $^+$, 308 [$\text{M} - \text{OCH}_2\text{NH}_2$] $^+$, 307 [$\text{M} - \text{CHO} - \text{H}_2\text{O}$] $^+$, 298 [$\text{M} - \text{CHO} - \text{HCN}$] $^+$, 281 [$\text{M} - \text{CHO} - \text{HCN} - \text{HCN}$] $^+$, 249 [$\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$] $^+$, 220 [$\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{NNH}$] $^+$, 204 [$\text{M} - \text{CHO} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{NH}_2$] $^+$, 105 [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$] $^+$, 77 [C_6H_5] $^+$.

Compuesto 8: ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.18 [s, 3H, (CH_3)], 3.21 [s, 3H, (CH_3N)], 4.35 [d, J = 15.5 Hz, 1H, (H-9a')], 4.63 [d, J = 15.5 Hz, 1H, (H-9b')], 4.65 [d, J = 10.5 Hz, 1H, (H-5')], 4.74 [d, J = 10.5 Hz, 1H, (H-6')], 5.60 [s, 1H, (OH)], 7.60 [m, 8H, (H-Ar)]. ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 10.94 (CH_3), 35.5 (CH_3N), 55.5 (C-5'), 79.5 (C-9'), 107.6 (C-6'), 132 (C-Ar), 155.0, (C-3'), 162.6 (C-10'), 195.0 (C-7). MS m/z [ion] 400 [$\text{M} + 2$] $^+$, 299 [$\text{M} + 2 - 1$] $^+$, 398 [M] $^+$, 383 [$\text{M} - \text{CH}_3$] $^+$, 366 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{OH}$] $^+$, 355 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN}$] $^+$, 339 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{OCO}$] $^+$, 311 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{NN}$] $^+$, 282 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO}$] $^+$, 268 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO} - \text{CH}_2$] $^+$, 263 [$\text{M} - \text{CH}_3 - \text{NN} - \text{CHO} - \text{Cl}$] $^+$, 206 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{NN} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$] $^+$, 171 [$\text{M} - \text{CH}_3\text{N} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CO} - \text{Cl}$] $^+$, 152 [$\text{ClC}_6\text{H}_4\text{NCHCH}_3$] $^+$, 105 [$\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$] $^+$, 77 [C_6H_5] $^+$.

Los dos compuestos presentan un singlete correspondiente a 3 protones a campos altos en el espectro de ^1H RMN y presentan además en el ión molecular el típico satélite debido a la presencia de un átomo de cloro, $[M+2]$, estos hallazgos indican que el anillo benceno sustituido por un átomo de cloro y el grupo metilo presente en el anillo triazol del alprazolam están intactos en los productos de descomposición.

De otra manera, las resonancias a δ 195.5 en el espectro de ^{13}C RMN, también como el ión m/z 105 de los espectros de EM revelan la presencia de un grupo fenilcetona indicando que los productos de degradación son formados por apertura del anillo benzodiazepínico, donde una cetona es producida por hidrólisis del enlace imina.

Compuesto 7 exhibe un ión molecular de m/z 354, el espectro de ^1H RMN (CDCl_3) muestra una señal en la región aromática a (δ 7.68, m, 8H), siendo similar al multiplete mostrado por el compuesto 1.

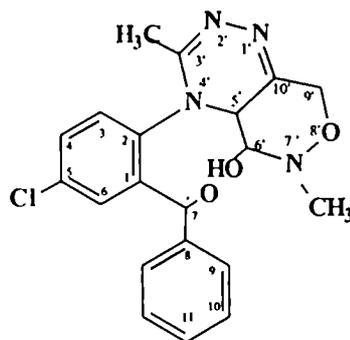


Compuesto 7

Los experimentos DEPT son consistentes con la presencia de ocho carbonos metinos aromáticos. La estructura del sistema biciclo se definió por la presencia de un carbono metileno (C-7') con dos protones no equivalentes, éstos aparecen como dos dobletes en el espectro de protones (CDCl_3) a δ 4.15, dd, $J = 15.0, 7.5$ Hz y δ 4.55, dd, $J = 15.0, 5.0$ Hz, también como en el espectro de carbono y experimentos DEPT a δ 46.0. Además se observa una señal amplia a δ 1.35, m, que se puede asignar a NH. Esta señal y sus respectivos acoplamientos desaparecen en experimentos de ^1H RMN con intercambio de hidrógeno, sugiriendo que el protón del amino NH tiene un acoplamiento con los protones del metileno adyacente 2H-7' anteriormente descritos, y un segundo acoplamiento con el protón H-5' (δ 3.1, d, $J = 7.5$ Hz). Los dos carbonos del enlace imina pueden ser identificados por la señal del espectro de ^{13}C RMN a δ 165.0 y 150.0, también como por dos picos

significativos a m/z 298 y 281 formados por pérdida de HCN (27 mmu) de los iones m/z 325 y 3 m/z 38, respectivamente, en el espectro de masa.

El espectro de ^1H RMN del compuesto **8**, muestra dos singuletes que integran a 3 protones cada uno a δ 2.18 y 3.21 correspondiendo a dos grupos metilos, según el espectro de ^{13}C RMN en el cual dos carbonos metilos aparecen a δ 10.94 y 35.5. La última señal corresponde a un grupo metilo unido a una amina terciaria. Las señales aromáticas se observan en el espectro de ^1H RMN a δ 7.60 (8H) como un multiplete y en el espectro de ^{13}C RMN a δ 132. También hay una señal a δ 195.0 de un carbono carbonílico y dos señales a δ 162.6, 155.0 que están de acuerdo con el desplazamiento químico correspondiente a carbonos imino.



Compuesto **8**

De estas señales se concluye que una benzofenona y un anillo 1,2,4-triazina están presente en el compuesto **8**. El sistema biciclo en **8** fue establecido por análisis de las constantes de acoplamiento. Los dos protones H-9' aparecen como dos dobletes a δ 4.35 y a 4.63 con un acoplamiento geminal $J = 15.5$ Hz, mientras H-6' aparece a (δ 4.74, d) exhibiendo una constante de acoplamiento $J = 10.5$ Hz con H-5', el cual aparece a δ 4.65, d. El espectro de ^{13}C RMN y el espectro DEPT confirma la presencia de estos carbonos metilenos (δ 79.5) y dos carbonos metinos (δ 107.6, 55.5). Además la señal amplia del OH es observada a δ 5.60, esta señal desaparece por intercambio con deuterio. En base a estos datos la estructura **8** se propuso para este compuesto, considerando también el ión molecular que muestra el espectro de masa m/z 398, la pérdida de agua y las demás fragmentaciones que son consistentes con la estructura propuesta.

El peróxido de hidrógeno en metanol incrementa la formación del compuesto **7**.

-
- ¹ Mathews B. R., *Drug Devel. Ind. Pharm.*, 1999, 25, 831-856
 - ² Andersin, R., Ovaskainen, J., Kallia, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, 12, 165
 - ³ Andersin R., Mesilaako M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13, 667
 - ⁴ Roth, H.J., Adomeit, M., *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1973, 306, 889
 - ⁵ Cornelissen, P. J.G., Beijsbergen van Henegouwen, G.M., *Photochem. Photobiol.*, 1979, 30, 337
 - ⁶ Bakri, A., Sedee A.G. *Photochem. Photobiol.* 1986, 2, 205- 212.
 - ⁷ Busker, R. W., Beijersbergen Van Henegouwen G.M., Kwee B.M., Winkens J.H., *Int. J. Pharm.*, 1987, 36, 113
 - ⁸ Givens, R.S., Gingrich, J., Mecklemburg, S., *Int J. Pharm.*, 1986, 29, 67
 - ⁹ Cornelissen, P. J.G., Beijsbergen van Henegouwen, G.M., Gerritsma, K.M., *Int J. Pharm.*, 1979, 3, 205
 - ¹⁰ Cornelissen, P. J.G., Beijsbergen van Henegouwen, G.M., Mohn G. R., *Photochem. Photobiol.* 1980, 32, 653-659

CAPITULO 6

ESTUDIOS CINETICOS DE ALPRAZOLAM EN SOLUCION.

6.1 Fotodegradación de Alprazolam: Seguimiento del decaimiento

La primera aproximación que se realizó a la cinética de fotólisis de alprazolam en solución es la medición del decaimiento de éste a través de un método por HPLC publicado para el análisis de la fotodegradación de midazolam.¹ Las condiciones del método son: C-18, fase móvil: acetonitrilo-buffer pH 3.5, 65-35, flujo de 1 mL/min., 225 nm. El buffer está compuesto por ácido fosfórico 5×10^{-2} M con trietilamina 1.44×10^{-2} M, ajustado a pH 3.5 con NaOH.

El método se aplicó al seguimiento de la cinética de alprazolam en medio acuoso y también en soluciones metanólicas, bajo irradiación con lámpara Metal Haluro, HPA.

Una solución de alprazolam en concentración de 3.0×10^{-3} M en metanol y otra en buffer citrato, pH 3.6, se envasaron en frascos erlenmeyer y se irradiaron con una lámpara a una distancia de 5 cm. Periódicamente se sacaron alícuotas de 5 ml que luego se extrajeron con CH_2Cl_2 y se evaporaron. Se redisolviaron en la fase móvil del sistema cromatográfico y se inyectaron.

La reacción se monitoreó durante 25 horas para el alprazolam en medio acuosa y durante 4 días para el alprazolam en medio metanólico.

Antes de analizar las muestras se hizo un ensayo para determinar el porcentaje de recuperación de alprazolam, se realizó el mismo procedimiento de extracción a soluciones estándar de alprazolam en buffer pH 3.6 sin irradiar y finalmente se analizaron con el método de HPLC mencionado. El porcentaje de recuperación obtenido es de 99%.

Los resultados de las cinéticas están representados en las gráficas de decaimiento que se muestran en la figuras 6.1 y 6.2, respectivamente.

Los perfiles de estas gráficas muestran que los mecanismos de fotodescomposición de alprazolam varían de acuerdo al solvente usado, lo cual también se observó en el capítulo anterior al identificar diferentes productos de fotodescomposición en cada solvente.

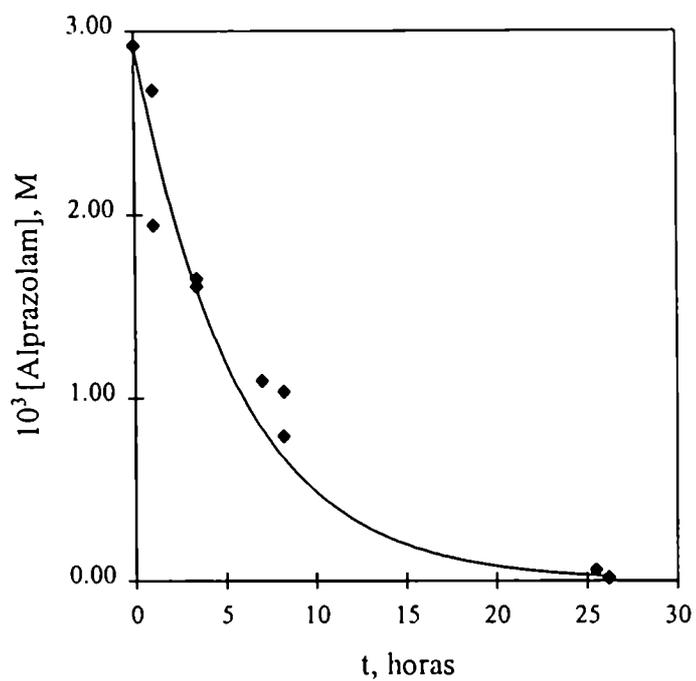


Figura 6.1. Fotodegradación de Alprazolam en buffer pH 3.6

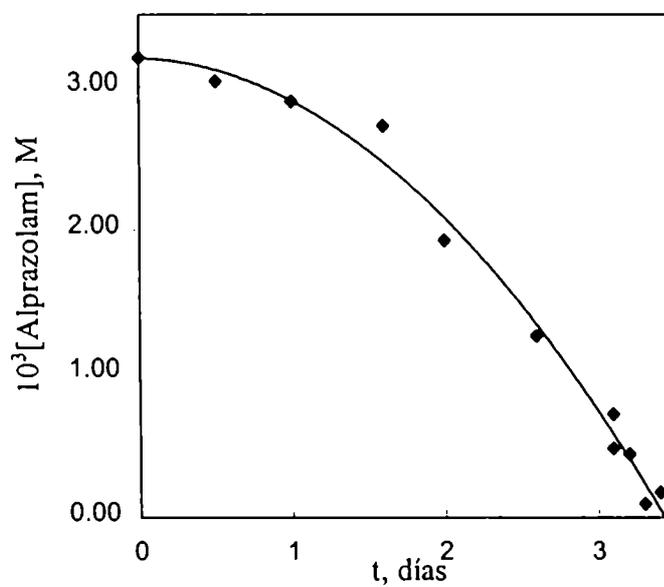


Figura 6.2. Fotodegradación de alprazolam en metanol

Las estructuras de los compuestos aislados de la solución acuosa sugieren que la fotodegradación incluye reacciones de reducción, dechloración, hidrólisis, solvólisis,

contracción del anillo diazepínico y expansión del anillo triazol para transformarse en un anillos más estables de seis miembros. Mientras que en la fotodegradación en metanol parecería que la primera etapa de reacción es probablemente la hidrólisis del enlace imina seguido por reacciones de solvólisis.

También se observa que la fotodegradación es mucho más rápida en la solución acuosa que en metanol. El segundo paso que se dio, es la medición de la descomposición en soluciones acuosas con diferentes pH y con luz natural para conocer si la degradación observada se debía a la alta radiación UV que posee la lámpara usada. Las soluciones se irradiaron con luz natural, al cabo de 88 días se evaluó por HPLC la concentración de alprazolam.

Tabla 6.1. Fotodegradación natural de alprazolam en soluciones buffer^a

pH de irradiación	% alprazolam residual ^b
1.8	55
3.5	74
10.0	97

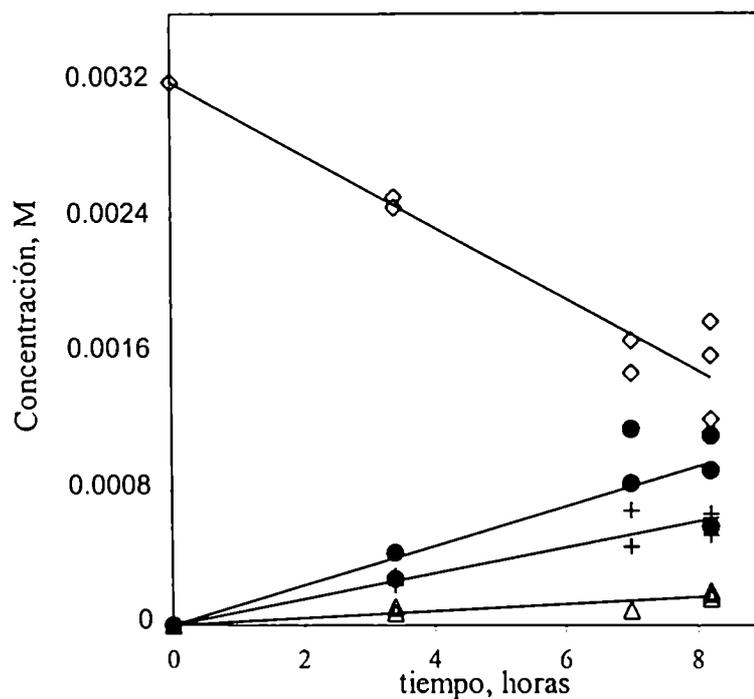
^a[Alprazolam]= 3×10^{-3} M

^b88 días de irradiación con luz solar

De acuerdo a la tabla 6.1 la incidencia de la luz solar causa fotodegradación en alprazolam en solución. También muestra que la fotolabilidad del alprazolam depende del pH de la solución, siendo más importante a pH ácidos. En medio alcalino el alprazolam es prácticamente fotoestable.

Después de haber aislado algunos de los productos que se forman durante la fotólisis en estos medios, se desarrolló un método de HPLC que permitiera cuantificarlos, en orden a monitorear la formación de éstos en soluciones y en las formas farmacéuticas que se analizarán más adelante.

Aplicando el método desarrollado se siguió la cinética de fotodescomposición de alprazolam en solución acuosa a pH 3.6 irradiada con la lámpara. Periódicamente se retiraron muestras de 5 ml, las cuales se extrajeron con diclorometano. Los resultados se muestran en la Figura 6.3



[◇] Alprazolam; [+]8-Halprazolam; [Δ] Triazolbenzofenona; [•] “fluorescentes”

Figura 6.3. Fotodegradación de alprazolam en buffer pH 3.6, irradiado artificialmente

La figura 6.3 muestra el decrecimiento de alprazolam y la formación de los productos de degradación extraídos con diclorometano de la solución buffer estudiada. Se observa que la degradación transcurre con reacciones de declorinación que conducen a la formación de 8-H alprazolam y también se observa la formación de triazolobenzofenona.

Mediante balance de masa se calculó la concentración máxima global de los productos no extraídos, los cuales se observan por TLC y fluorescencia, la concentración total de estos productos se muestra en la figura 6.3 como “fluorescentes.”

El estudio de la fotodegradación de alprazolam en soluciones en buffer citrato por HPLC presentó dificultades debido a que aparentemente hay interferencia entre los productos de degradación formados y el buffer, impidiendo la separación de los productos al hacer inyección sin extracción previa. Y al hacer extracciones no se consiguió extraer todos los productos de degradación formados, ya que como se observó en el capítulo 5 son varios los productos que se forman al irradiar alprazolam en las condiciones de estudio.

6.2 Mediciones de absorbancia

Se observó que durante el tiempo de exposición las soluciones bufferadas expuestas a la luz, pH 3.6, desarrollan un color amarillo que se va incrementado con el tiempo de exposición.

Por este motivo se estudiaron los cambios en el espectro UV de la solución irradiada, la figura 6.4 muestra los espectros UV tomados a diferentes tiempos de irradiación. Se observa una disminución en la absorbancia a 260 nm y un aumento en la absorbancia a 240 nm. No aparecieron nuevos máximos de absorbancia.

Simultáneamente se registró un espectro UV de una solución preparada de igual forma pero conservada en la oscuridad, no se observaron cambios en el espectro de esta muestra, este hecho que indica que los cambios en el espectro UV no están asociados con la hidrólisis en medio ácido como se ha descrito en la literatura para alprazolam^{2,3} y otras triazolobenzodiazepinas.^{4,5,6,7} Se esperó a que ambas soluciones irradiada y no irradiada, respectivamente, alcanzaran el equilibrio de hidrólisis, antes de hacer las mediciones.

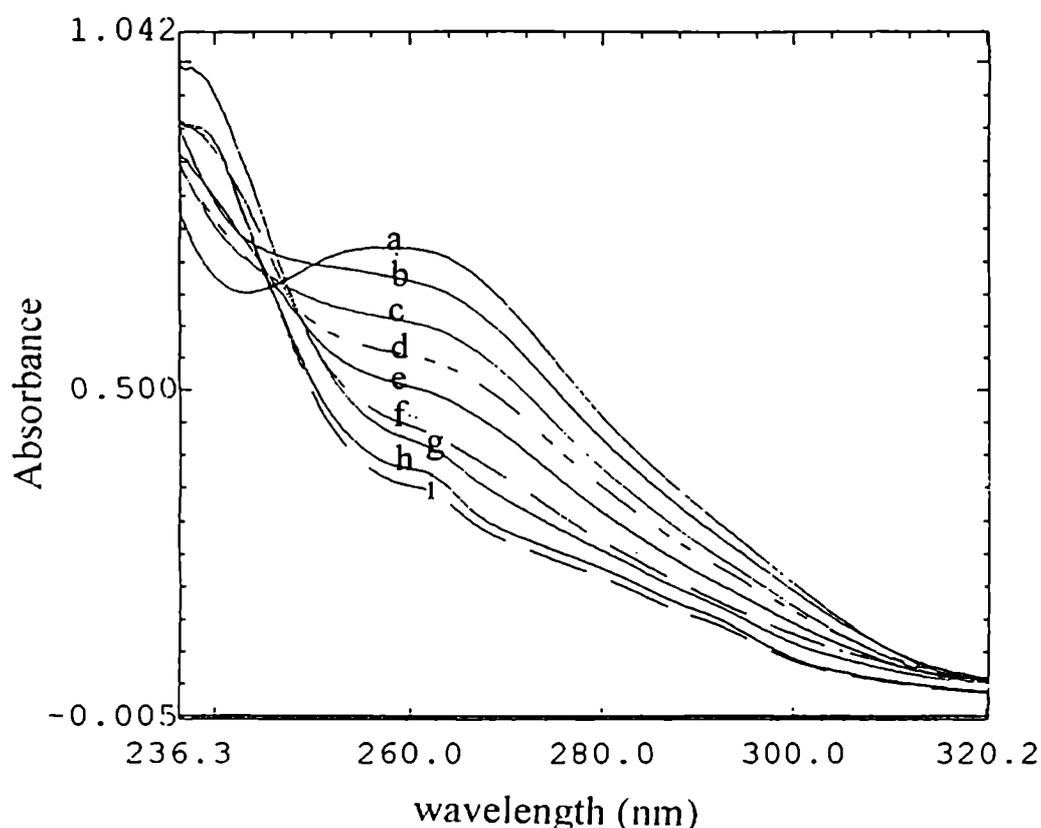


Figura 6.4 Espectro UV de Alprazolam (en solución buffer pH 3.6), después de la irradiación bajo con lámpara Metal Haluro por diferentes tiempos. t = 0 (a), 1 h (b), 2 h (c), 3 h (d), 4 h (e), 5 h (f), 6 (g), 7 h (h), 9 h (i).

6.3 Seguimiento por Fluorescencia

Debido a las observaciones anteriores se estudió los cambios en las propiedades fluorescentes de soluciones acuosas de alprazolam durante el tiempo de exposición a la luz UV y se evaluó la posibilidad de usar un método espectrofluorométrico para monitorear el proceso de degradación de alprazolam en soluciones acuosas.

Se ha observado que la degradación de alprazolam está acompañada por cambios en las propiedades fluorescentes: la solución no irradiada no es fluorescente, mientras que en la solución irradiada incrementa la señal de fluorescencia a 430 nm con el tiempo de exposición (λ_{exc} 260 nm) este comportamiento se observa tanto para las soluciones irradiadas con luz natural directa y soluciones irradiadas con lámpara, como se muestra en las figuras 6.5 y 6.6

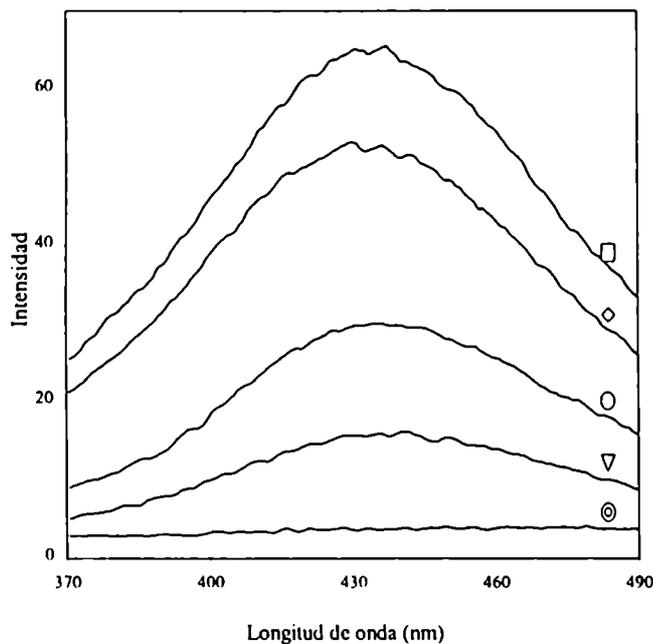


Figura 6.5. Espectro de Fluorescencia (λ_{exc} 260 nm) de Alprazolam (en solución buffer pH 3.6), después de la exposición a la luz natural para diferentes tiempos. t = 0 (⊗), 8 d (▽), 14d (O), 17 d (◇), 19 d (□).

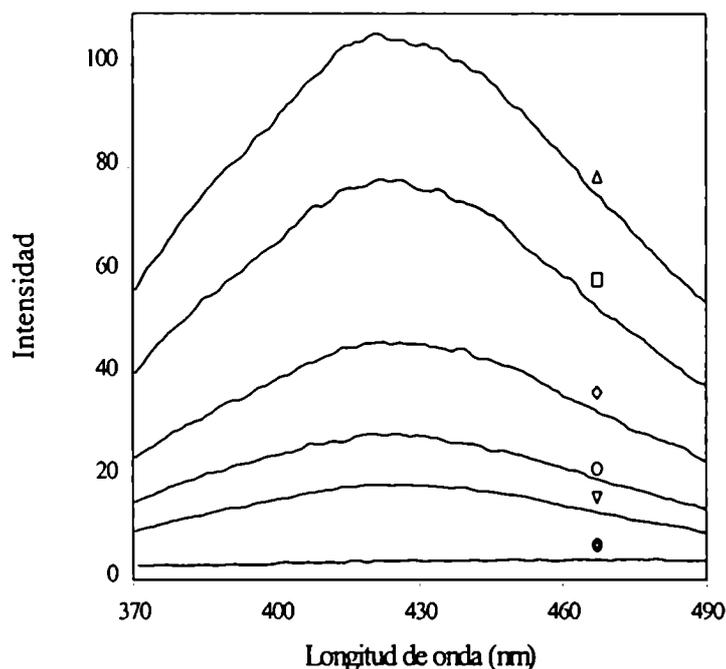


Figura 6.6 Espectro de Fluorescencia (λ_{exc} 260 nm) de Alprazolam (en solución buffer pH 3.6), después de la irradiación bajo lámpara metal haluro por diferentes tiempos. t = 0 (●), 9 h (▽), 12 h (○), 27 h (◇), 35 h (□), 47 h (△).

Se realizaron los estudios de alprazolam en solución buffer de pH 3.6 y se observó un incremento mayor al 60% en la fluorescencia a los 19 días de exposición a la luz natural; y mayor al 100% luego a las 47 h de irradiación con lámpara metal haluro.

El incremento en la señal de fluorescencia después de irradiación a diferentes pH se estudió cinéticamente. Se prepararon soluciones de alprazolam en concentración de 2.75×10^{-3} M en soluciones buffer fosfato-citrato, pH 2.0, 3.6 y 5.0

Las soluciones así preparadas se envasaron en un erlemeyer y se irradiaron con una lámpara metal haluro, HPA. Alicuotas de 5 ml se extrajeron en intervalos de tiempo adecuado e inmediatamente se analizaron usando un espectrofluorímetro: se midió la señal de emisión a 435 nm después de excitar con una longitud de onda de 260 nm. Se realizaron alrededor de 15 determinaciones para cada condición. En todos los casos, se controló con un blanco de solución de alprazolam en iguales condiciones pero sin irradiar. La línea de base inicial de fluorescencia (F_0) se mantuvo en todos ellos.

En las medidas de soluciones irradiadas se obtuvo un gráfico lineal de $\ln (F/F_0)$ como función del tiempo, indicando que la degradación sigue una cinética de primer orden (ecuación. 1). Las constantes de velocidad se calcularon mediante la ecuación 1.

$$\ln (F/F_0) = kt \quad (1)$$

Donde F es la señal de fluorescencia a tiempo t y F_0 es la señal de fluorescencia medida al comienzo del estudio ($t = 0$). La figura 4 muestra el aumento en la fluorescencia a 435 nm versus tiempo de exposición a la luz artificial en las soluciones bufferadas a pH 2.0, 3.6 y 5.0. Las cinéticas se siguieron por 4 tiempos de vida media, la concentración de alprazolam residual se determinó por el método de HPLC en las condiciones descriptas en la parte experimental. Las constantes de velocidad correspondientes a la evolución de la fluorescencia, calculadas asumiendo un comportamiento de primer orden, se resumen en la Tabla 6.2

Tabla 6.2. Constantes de velocidad de Reacciones de Fotodegradación de Alprazolam en medio acuoso^{a, b}

pH	k_{obs} $10^{-5} (s^{-1})$	$t_{1/2}$ (horas)
2.0	3.61	5.3
3.6	1.67	11.5
5.0	0.55	34.7

^a [Alprazolam] = 2.75×10^{-3} M, en buffer fosfato-citrato

^b medida como el incremento en la señal de fluorescencia

(λ_{exc} 260nm, $\lambda_{emisión}$ 435 nm)

La magnitud de las constantes de velocidad demuestran la fotosensibilidad que presentan las soluciones de Alprazolam bajo irradiación UV y muestran además que la

fotodegradación de alprazolam es dependiente del pH: La velocidad de descomposición es más rápida a pH ácidos y más lenta a pH básicos como ya se había observado.

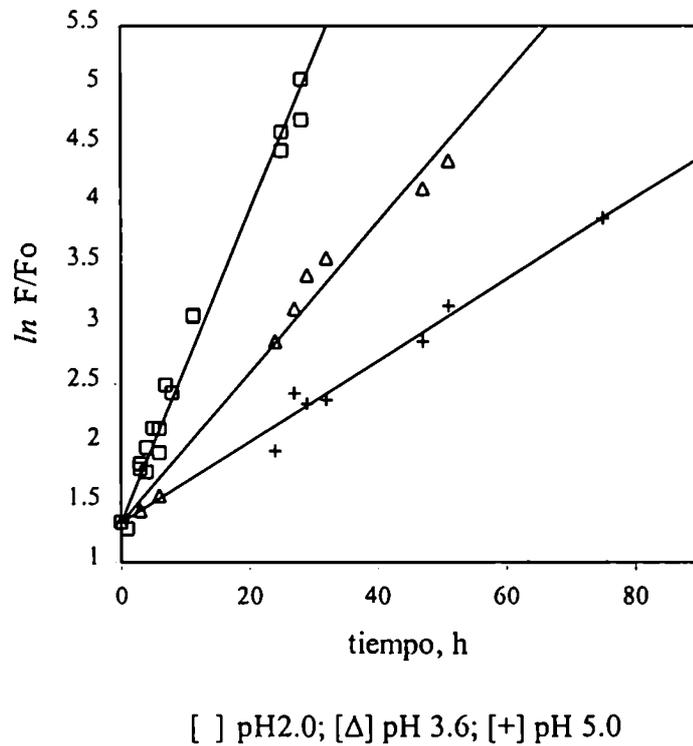


Figura 6.7 $\ln F/F_0$ vs t de solución de Alprazolam (buffer pH 2.0, 3.6 y 5.0), después de la irradiación con lámpara de metal haluro de media presión.

El aumento de la señal de fluorescencia con el tiempo de radiación se debe de acuerdo a los productos aislados y caracterizados a la formación fundamentalmente de triazolaminoquinolina y a compuestos que se encuentran en proporción. Las estructuras propuestas para estos productos de degradación formados están de acuerdo con el aumento de las propiedades fluorescentes debido a que estos compuestos presentan más enlaces C=C y C=N con posibilidades de mayor resonancia que el alprazolam.

6.4 Elección de lámpara para estudios cinéticos de drogas

Las guías de la ICH dan una considerable flexibilidad en diseño experimental (lámparas, artefactos de monitoreo, etc) y en cada decisión se requiere una extensiva validación. Se hicieron diversas evaluaciones y ensayos preliminares de estrés fotoquímico para decidir las condiciones óptimas para los ensayos.

6.4.1 Generalidades sobre actinómetros

Existen varios tipos de actinómetros tanto físicos como químicos que se usan para medir la intensidad de la radiación. A los efectos de los estudios de fotoestabilidad, los actinómetros físicos como radiómetros o fotómetros frecuentemente rinden resultados discordes dependiendo de las características espectrales; sin embargo estos requieren una calibración periódica y no tienen en cuenta las fluctuaciones en la intensidad de luz en el tiempo. Los actinómetros químicos basados en la medición de un cambio químico que le ocurre a un estándar fotosensible, son considerados más exactos, reproducibles, estables con el tiempo y miden exactamente la cantidad total de radiación recibida.

El actinómetro de ferrioxalato es quizás el sistema más usado para medir la intensidad de la luz: éste absorbe en un rango ancho del espectro 250-500 nm; es barato, y requiere solo el uso de un espectrofotómetro. La principal desventaja que limita su uso en estudios de fotostabilidad de drogas basados en la exposición a radiación que simula la radiación solar, es que la fotoreacción del ferrioxalato es rápida (en relación a la mayoría de la fotodescomposición de drogas), cuando se usa con un rango amplio de longitudes de onda.⁸

La quinina presenta una reactividad más baja que el ferrioxalato y absorbe solamente en el UV. El rendimiento cuántico para la fotodescomposición de quinina y el mecanismo de la fotodegradación no ha sido aún claramente determinado.⁸ Las gráficas absorbancia vs tiempo de exposición demuestran que el aumento de absorbancia es proporcional a la energía integrada emitida, (UV). La pendiente de estas gráficas varía por la diferencia espectral que presentan.

6.4.2 Método de Validación Propuesto

Con el objetivo de establecer un protocolo estándar para los ensayos de fotoestabilidad de drogas, muy recientemente se propuso un actinómetro químico: se trata de quinina monoclóridato dihidrato (2% solución en agua)⁹ para calibrar la radiación UV de

simuladores solares y para monitorear la intensidad integrada de irradiación incidente en las muestras.¹⁰

Se usa en cada experimento un actinómetro químico para medir la irradiación incidente en la muestra de manera que los experimentos llevados a cabo en diferentes días puedan compararse y también que los experimentos realizados en el simulador solar puedan ser normalizados a la irradiación solar.¹¹

En líneas generales metodología es la siguiente: Se expone la muestra y el control de la solución de quinina (envasado en ampollas o celdas de cuarzo) a la lámpara por un número apropiado de horas. Después de la exposición se mide la absorbancia de la muestra A_T y la del control A_0 a 400 nm. Se calcula el cambio de absorbancia, $\Delta Abs = A_T - A_0$. La duración de la exposición debe ser suficiente para asegurar un cambio de absorbancia de al menos 0.9 y 0.5, respectivamente.¹²

Se propone que la intensidad integrada de radiación se exprese como la diferencia en la absorbancia ΔAbs a 400 nm de la solución irradiada de quinina, (unidades de quinina).

Para otros sistemas lámpara/actinómetro se puede usar la misma aproximación, pero cada sistema actinómetro debería ser calibrado para la lámpara usada .

La ICH propuso como mínimo un nivel de exposición de 200 Wh/m² aproximadamente y una ΔAbs de 0.9 para estudios de fotoestabilidad confirmatorios.

6.4.3 Calibración de la lámpara

Se calibró la lámpara Metal Haluro usada en nuestra experiencia, mediante el actinómetro de quinina arriba descrito. La gráfica Absorbancia vs tiempo de irradiación da una línea recta que se muestra en la figura 6.8:

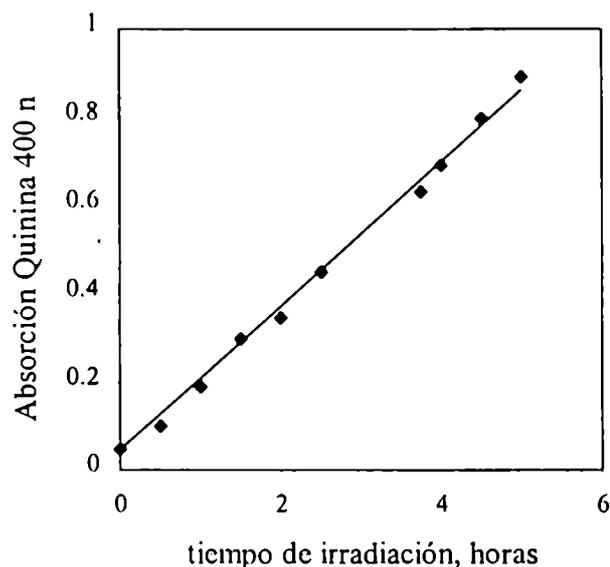


Fig 6.8 Gráfica Absorción de Quinina (400 nm) vs tiempo de exposición a la lámpara de metal haluro

Las muestras se colocaron después de dos horas de encendida la lámpara, ya que la lámpara necesita este período para estabilizarse. La pendiente de la gráfica para la lámpara usada HPA 400W es semejante a la pendiente que se obtiene con una lámpara luz blanca fría recomendada por FDA¹³ ($m= 0.0025$), iguales valores de pendiente significa que las lámparas tienen la misma distribución espectral.

La intensidad de la lámpara usada para los estudios de estrés forzados de acuerdo a la terminología usada por la guía ICH, fue monitoreada con esta calibración cada vez que se comenzó un estudio; cuando la pendiente disminuyó se reemplazó la lámpara por una nueva.

Con la exposición a 0.9 unidades de quinina (5 horas de exposición en nuestra lámpara), un 30 % de alprazolam en solución acuosa pH 3.6 es fotodegradado de acuerdo a la cinética de decaimiento de alprazolam seguido por HPLC.

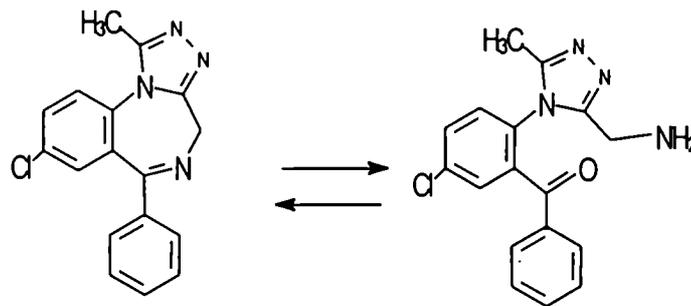
6.5 Mecanismos de formación de los productos de degradación de alprazolam

En base a todos los resultados descritos en este y capítulos anteriores sobre estudios cinéticos de reacciones hidrolíticas de derivados de diazepam (capítulo 3) y de estudios de hidrólisis, termólisis y fotoquímica (capítulo 5 y 6) se proponen mecanismos para la formación de los diversos productos de degradación con las evidencias experimentales en cada caso.

6.5.1 Hidrólisis

Como ya se describió en el capítulo 2, AL es muy estable en condiciones en que otras benzodiazepinonas experimentan apertura del anillo benzodiazepínico. Aparentemente, la resonancia adicional que procura el anillo triazólico confiere al alprazolam una destacada estabilidad frente a la hidrólisis.

Mediante espectroscopía UV-visible a diferentes pH pudieron caracterizarse señales que permiten confirmar la presencia de un equilibrio dinámico de apertura y cierre de anillo. En medio fuertemente ácidos (pH 0.5) se observan evidencias de la existencia parcial de la benzofenona 5-cloro-2-(3'-aminometil-5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-il) benzofenona, que permiten postular el esquema de apertura y cierre de anillo que se muestra en el esquema 6.1.



Esquema 6.1

No obstante, todos los intentos de separar 5-cloro-2-(3'-aminometil-5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-il) benzofenona de la mezcla de reacción, aún a este pH, fracasaron por su rápida ciclización a AL. A pH neutro o básico, solo existe alprazolam, i.e. la forma cíclica.

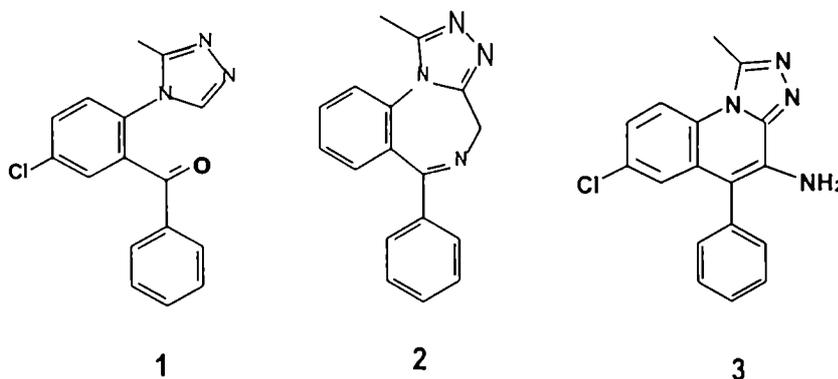
6.5.2 Fotoquímica

En estas reacciones hay que diferenciar:

- a) las reacciones llevadas a cabo en solución de buffer fosfato-citrato
- b) las reacciones llevadas a cabo en presencia de metanol y
- c) las reacciones llevadas a cabo en fase sólida con los medicamentos

6.5.2.1 Reacciones llevadas a cabo en solución de buffer fosfato-citrato:

En estas condiciones se aislaron e identificaron tres productos de degradación principales, a saber:: 5-Cloro-2-[5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-il]benzofenona (1), 8H alprazolam:1-metil-6-fenil-4*H*-s-triazo-[4,3- α][1,4]benzodiazepina(2), Triazolaminoquinolina (3); cuyas estructuras se muestran debajo.



8-II Alprazolam (2)

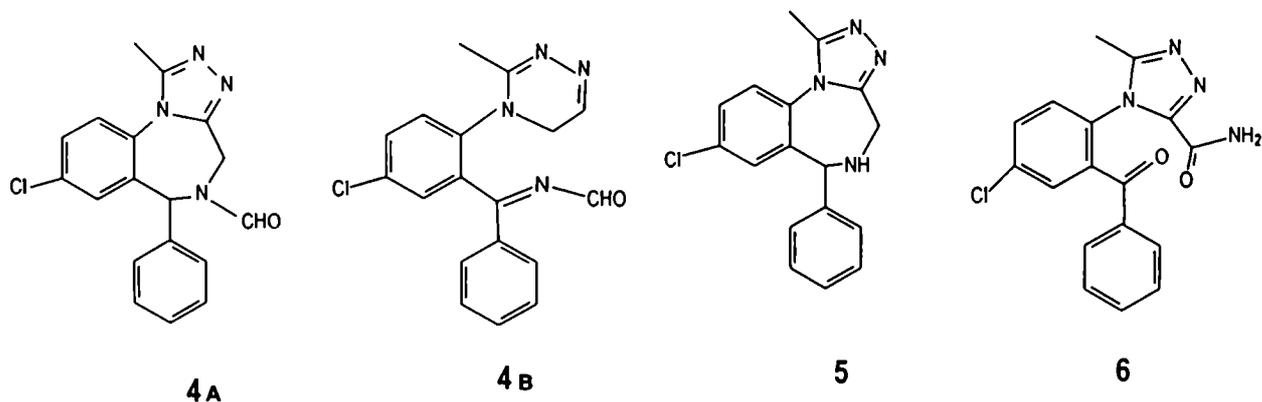
Este compuesto puede concebirse, formalmente, como el producto de una reacción de dechlorinación. La separación de halógeno, fundamentalmente en forma de haluro, es una conocida reacción en la fotoquímica de compuestos aromáticos halogenados, se produce a través de un mecanismo de transferencia electrónica entre un donador y el aceptor (el haluro de arilo). Esta reacción puede ser intermolecular ó intramolecular cuando el donador y el aceptor están en la misma molécula ^{14,15}

En el caso de medicamentos existen muy pocos antecedentes de estudios previos de dehalogenación. Así, pueden mencionarse: i) una publicación referida al diclofenac (una droga anti-inflamatoria) que presenta productos formalmente derivados de una dechlorinación y ciclización, seguida de una fotoreducción. ¹⁶

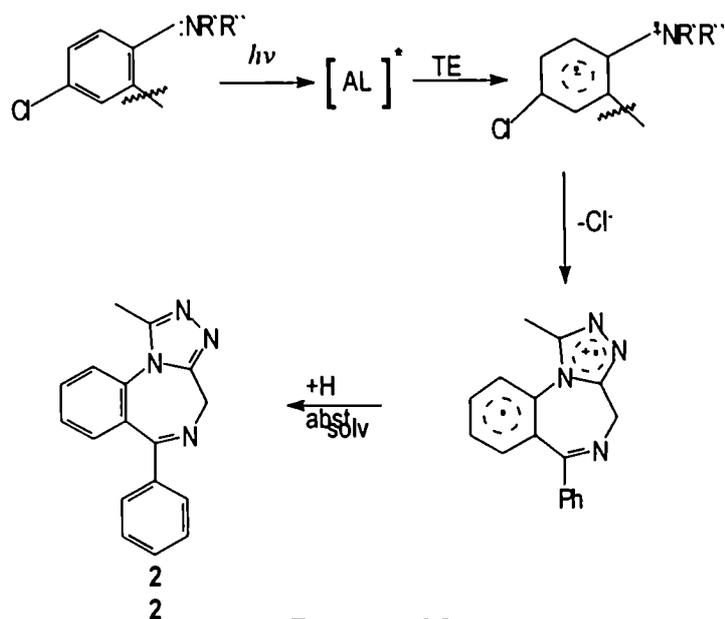
ii) la fotodescomposición del midazolam que es también una triazolobenzodiazepina con un sustituyente flúor en el segundo anillo aromático, colocado en posición *orto* al C que une a ambos anillos. En este caso, uno de los caminos de fotodegradación parece ser la separación oxidativa de flúor, con formación de una “dienona.” ¹⁷

Teniendo en cuenta otros productos de degradación encontrados en forma de trazas, (ver estructuras 4-6: 8-Cloro-1-metil-6-fenil-4,6-dihidro-5-carbaldehido-triazo-[4,3- α][1,4]benzodiazepina (4A), 8-Cloro-1-metil-6-fenil-4,6-dihidro-5*H*-triazo-[4,3- α][1,4]benzodiazepina (5), 5-Cloro-2-[3'-formilamida-5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-

il]benzofenona (6)) pueden postularse dos mecanismos de transferencia electrónica para la formación de 2, en ambos casos el anillo aromático que porta el sustituyente cloro es el aceptor, ya que el mismo es el que presenta mayor deficiencia electrónica.



1) *Mecanismo Intramolecular.* Cualquiera de los átomos de nitrógeno existentes en la molécula de alprazolam puede ser un excelente donador de electrones. En principio, podría postularse que la resonancia adicional que provee el anillo triazólico, haría a los nitrógenos de dicho anillo, particularmente aptos para la transferencia por la estabilización que encontraría en el seno del mismo, el radical catión producido. En forma genérica se simboliza en el esquema 6.2 como $:NR^1R^2$



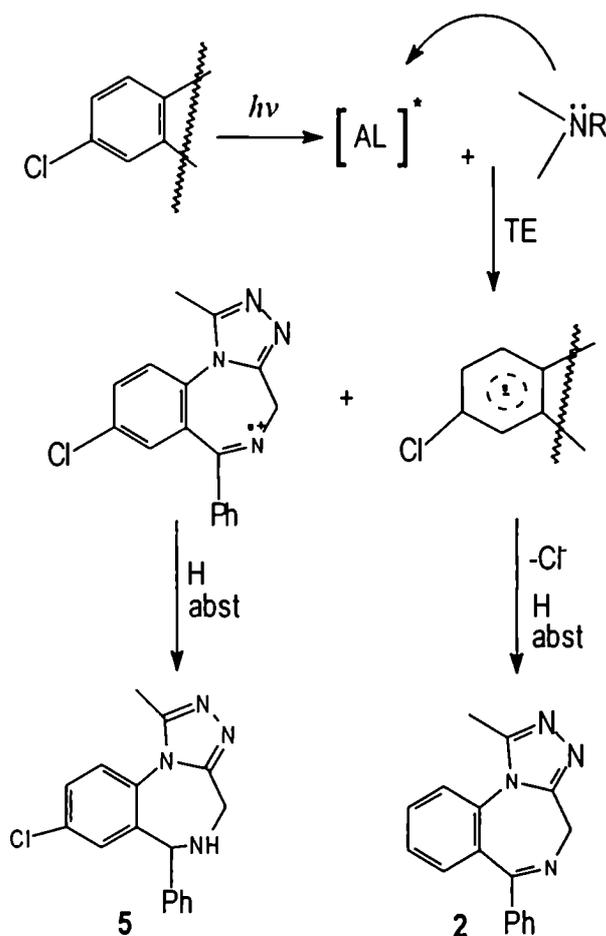
Esquema 6.2

La acción fotoquímica ($h\nu$) primeramente transforma al alprazolam [AL] en el primer estado electrónicamente excitado, [AL]* desde el cual se produce más fácilmente la transferencia electrónica *intramolecular*, provocada por la presencia simultánea en la molécula de donador y aceptor. Es conocido que el estado electrónicamente excitado (D*) de una molécula actúa como un donador o aceptor de electrones más poderoso que el estado fundamental: es posible calcular (i.e. mediante la ecuación de Marcus¹⁸ o la teoría de electrones frontera de Fukui¹⁹) la contribución del estado excitado a bajar la energía de activación necesaria para que ocurra la reacción.

La transferencia electrónica transforma a la molécula neutra de alprazolam, en una molécula de alprazolam que tiene una dispersión de cargas en el radical catión y el radical anión, (esquema 6.2). De la misma puede, fácilmente, separarse el átomo de cloro en forma de ión cloruro, dejando un radical libre en ese anillo aromático. Abstracción de hidrógeno del solvente es una reacción que requiere muy baja energía en estas condiciones y conduce a la formación de 2, (esquema 6.2).

2) *Mecanismo Intermolecular*. Es igualmente válido postular un mecanismo intermolecular: en el cual una molécula de alprazolam actúa como aceptor, de la misma manera que en el esquema anterior. Simultáneamente, una segunda molécula de alprazolam juega el rol de donador, transfiriendo un electrón de cualquiera de sus 4 átomos de nitrógeno.

Cuando la molécula está en un estado electrónicamente excitado muy frecuentemente puede formar un complejo con otra especie que suele designarse como Q (*quencher*), y el complejo D*Q se denomina exciplex, las aminas suelen ser muy efectivas en la formación de exciplex. La transferencia electrónica es un caso especial y está favorecida en solventes fuertemente polares como el agua.²⁰ Podemos considerar que en el presente caso, una molécula no excitada de alprazolam actuaría como Q, formando el exciplex a partir del cual se produciría la transferencia electrónica.



Esquema 6.3

En la segunda línea del esquema 6.3 se ha dibujado la transferencia involucrando al átomo de nitrógeno del anillo benzodiazepínico, por cuanto este camino de reacción explicaría, al mismo tiempo, la producción de 5. Puede, además, argumentarse que ese nitrógeno está más expuesto favoreciéndose así el ataque intermolecular.

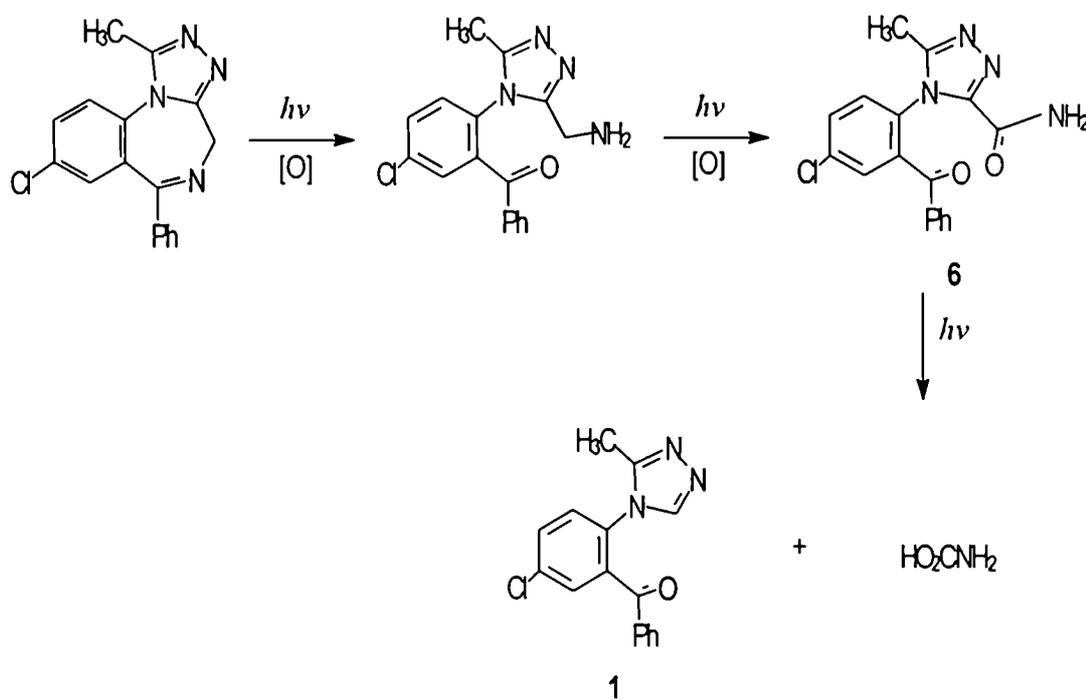
La acción fotoquímica produciría, en primer lugar, un estado excitado de alprazolam que está activado para la transferencia electrónica. Por acción de la misma, en forma *intermolecular*, se produce un par iónico radical, en la cual una molécula de alprazolam está como anión-radical y la otra como catión-radical. La primera pierde fácilmente ión cloruro, dando un radical libre que, finalmente, por abstracción de hidrógeno del solvente producirá 2, como en el mecanismo intramolecular. (esquema 6.3).

El catión radical remanente, sufrirá la química común a este tipo de especies radicalarias, i.e. abstracción de hidrógeno por el solvente, llevando así a la producción del

compuesto 5, que, formalmente, puede considerarse un producto de reducción fotoquímica, reacción también conocida en fotoquímica básica.²¹

Triazolbenzofenona (1)

La formación de este compuesto es, en principio, inesperada por cuanto la apertura del anillo benzodiazepínico es un fenómeno muy común en las reacciones de hidrólisis de las benzodiazepinas clásicas, pero ya hemos visto que no se produce en la hidrólisis forzada de alprazolam.

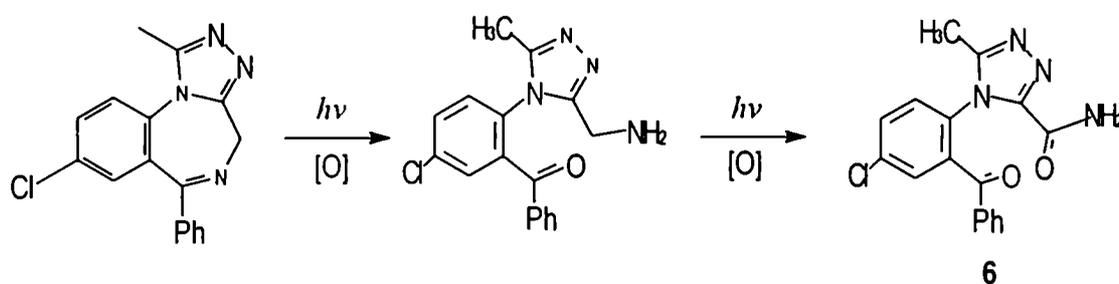


Esquema 6.4

El mecanismo de formación de este compuesto involucra una apertura foto-oxidativa del anillo probablemente a partir de [AL]* seguida de pérdida de la cadena lateral que se produce. Este fenómeno nunca había sido observado antes en los estudios publicados sobre degradación de benzodiazepinas. Es muy probable que la estabilización adicional que procura el anillo triazólico sea un factor importante en determinar la producción de este compuesto. (Esquema 6.4).

Para la postulación del mecanismo de formación de 1 también se han tenido en cuenta las estructuras de compuestos de degradación encontrados en cantidades menores, en este caso particular el compuesto 6. La fotodescomposición oxidativa de la unión imina del anillo

diazepínico produce, en primer lugar, la benzofenona con cadena lateral de metilénamina, que rápidamente resulta oxidada conduciendo al compuesto 6 que tiene la función amida como cadena lateral. Esta reacción puede ser en pasos, como se ha postulado a través primero de una hidrólisis de la función imina, o directamente, por fotodescomposición oxidativa producirse, en una apertura oxidativa. (Esquema 6.5)

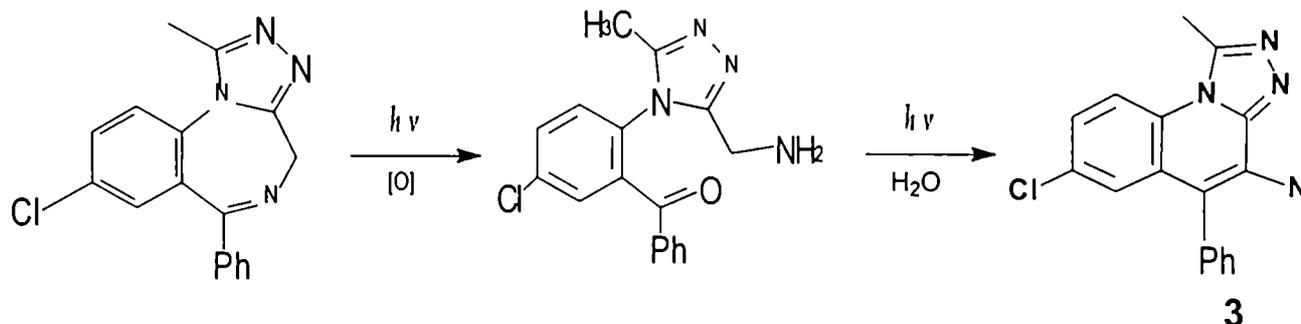


Esquema 6.5

Mecanismos de fotooxigenación se han encontrado en la fotoquímica de derivados de benzoquinolonas, en los cuales la función amida involucrada en un anillo, se abre para dar lugar a una benzocetona, quedando el nitrógeno formando parte del otro anillo.²² La pérdida posterior de la cadena amida es también un proceso de fotodescomposición oxidativa, en la que posiblemente se forme glicina y el compuesto 1, (esquema 6.5). Dado que las reacciones no se han realizado en atmósfera inerte, sino en presencia de la cámara de aire propia del recipiente a fin de trabajar en condiciones naturales, la reacción se produce pues, en presencia de oxígeno. No se descarta la posible formación de oxígeno singlete, que se ha observado en la fotoquímica de compuestos heterocíclicos nitrogenados. Cuando se irradió un derivado benzoquinolínico en solución metanólica con luz visible en condiciones aeróbicas se detectó formación eficiente de oxígeno singlete.²³

Triazolaminoquinolina (3)

Para la formación de este compuesto puede proponerse, un camino semejante al mostrado en el esquema 6.4. La reacción entre el metileno activado y el carbonilo, conduce a la pérdida de agua con formación de un anillo de seis miembros altamente estabilizado.



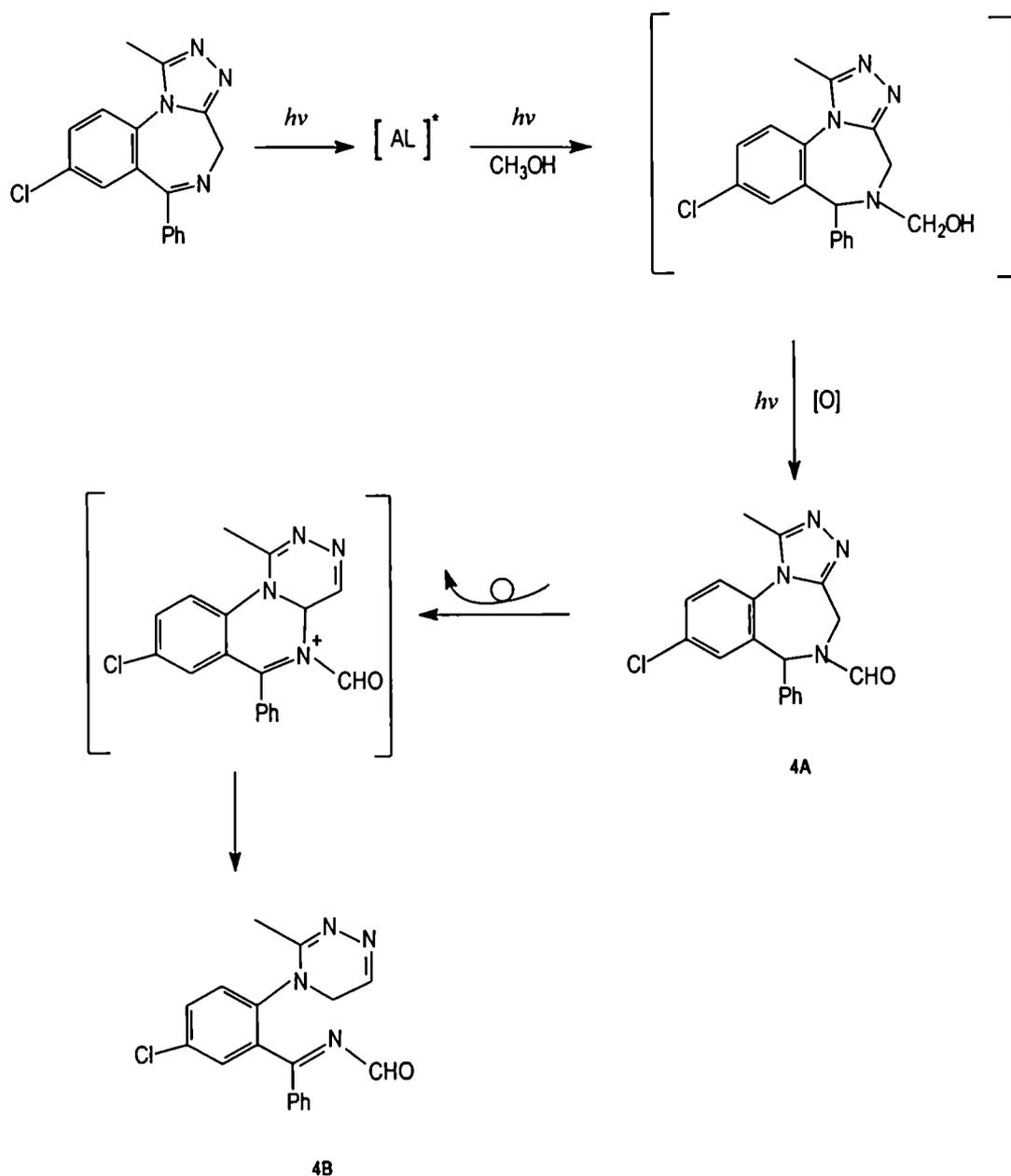
Esquema 6.6

6.2.2 Reacciones llevadas a cabo en presencia de metanol

Cuando las reacciones de fotodegradación de alprazolam se realizan en presencia de metanol, ya sea como solvente de reacción, o como co-solvente coadyuvante para la disolución de alprazolam, se producen, mayoritariamente los productos 1 a 3 ya descritos, cuyos esquemas de reacción también se aplicarían en el presente caso. Pero, además, se producen otros dos productos que tienen una unidad de carbono adicional que sólo puede provenir del metanol, única fuente accesible de carbono presente en el medio de reacción. Estos productos pueden, en consecuencia, considerarse artefactos propios de las condiciones de reacción.

Productos 4A y 4B

La formación de los mismos involucra acción fotoquímica del alprazolam dando su estado excitado y, bajo esas condiciones, hidroximetilación del nitrógeno del anillo benzodiazepínico. (esquema 6.7). Incorporación de $-\text{CH}_2\text{OH}$ se observó previamente en la radiación UV de ibuprofeno en solución metanólica.²⁴ En las condiciones foto-oxidativas de reacción, es energéticamente fácil la transformación en aldehído, generando así una función amida en el compuesto 4A. (esquema 6.7) Se ha descrito la formación de aldehído, en la fotólisis de una amina terciaria con restos aromáticos que fue desarrollada por Oppenlander²⁵ como un potencial agente termogénico, el aldehído se produce en un 27%, por ruptura foto-oxidativa del resto bencílico unido al nitrógeno terciario.



Esquema 6.7

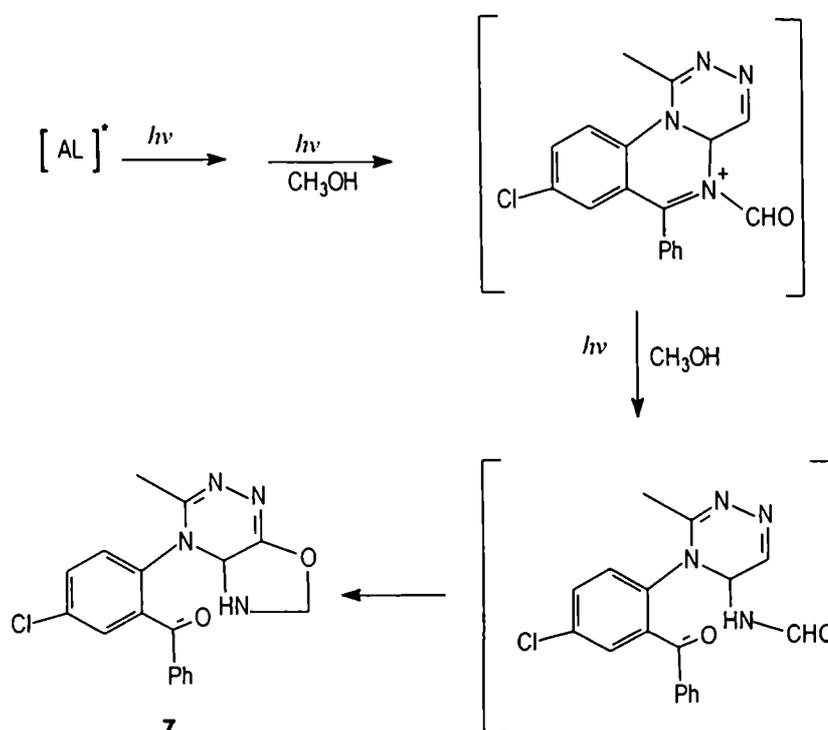
La contracción del anillo diazepínico a un anillo de 6 miembros y simultánea transformación del anillo triazólico de 5 a 6 miembros, por la fuerza directriz que procura el cambio de anillos de 5 y 7 a dos anillos de 6 miembros, conduce al compuesto precursor del compuesto **4B** por apertura del amonio cuaternario. (esquema 6.7).

Existen antecedentes similares en la reacción fotoquímica de unos derivados isoquinolínicos que, en presencia de etanol, incorporan unidades OC_2H_5 y se producen rupturas oxidativas.¹¹

Compuestos 7 y 8

Los resultados observados refuerzan los mecanismos propuestos anteriormente ya que existen intermediarios comunes. En estos casos, se produce también incorporación de las funcionalidades de la molécula de CH_3OH , reacción conocida en fotoquímica.¹¹ Para la formación del compuesto 7 puede postularse el mismo camino de reacción que conduce al compuesto 4B (Esquema 6.7).

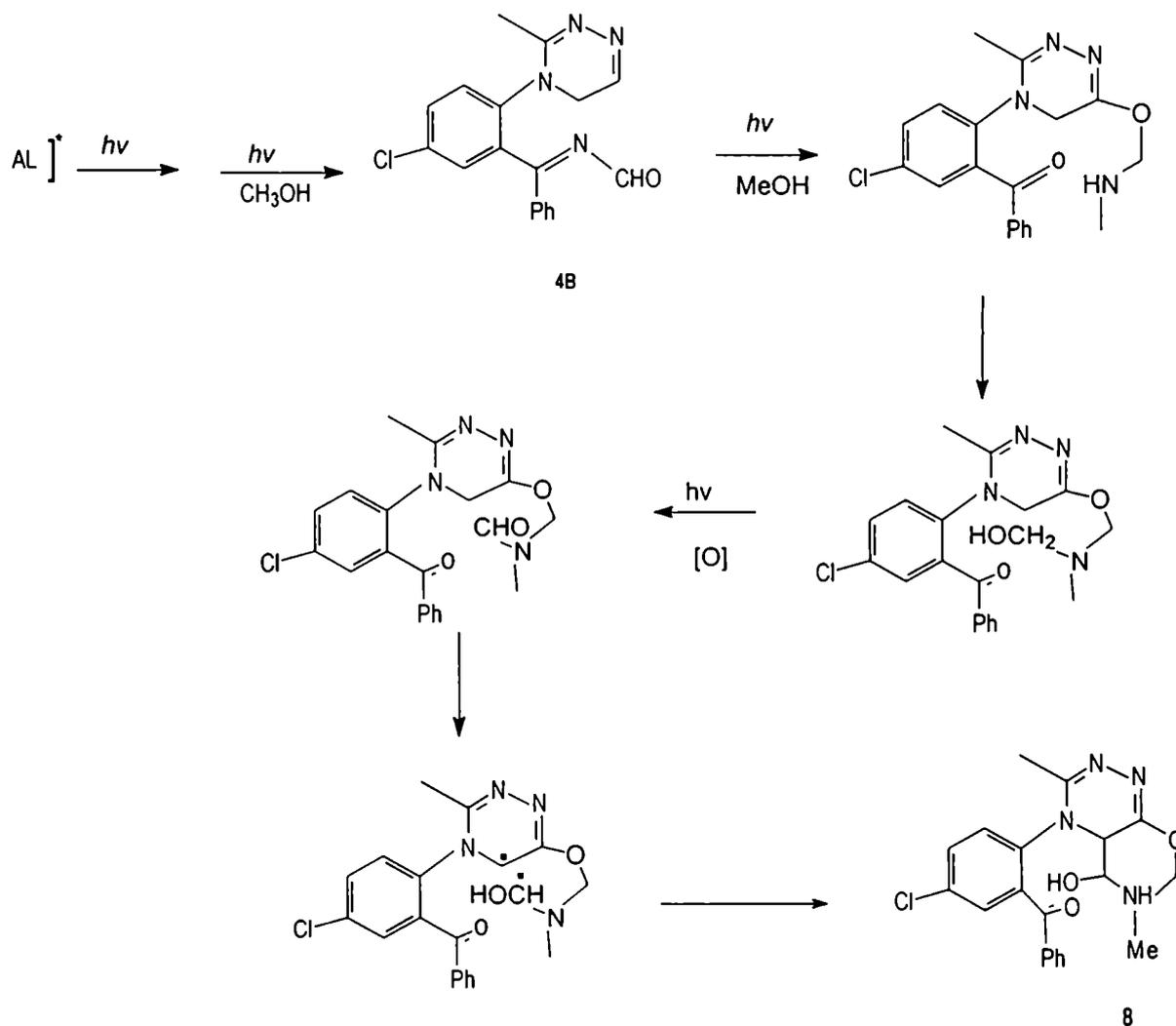
En el intermediario propuesto como precursor puede también producirse la solvólisis de la función imida conduciendo a la benzofenona derivada con una cadena lateral de formamida que fácilmente se cicla dando el compuesto 7, (esquema 6.8). El mecanismo propuesto para esta ciclación sería semejante al propuesto en la fotoquímica de dienamidas: adición radicalaria del oxígeno a la función $-\text{C}=\text{N}$ y posterior reorganización del diradical formado.²⁶



Esquema 6.8

Para la formación del compuesto **8** se puede proponer un camino semejante al que conduce al compuesto **4B** (esquema 6.7). En la fotólisis en metanol este compuesto sigue reaccionando adicionando molecular del solvente, reacción conocida en fotoquímica de aminas e iminas²⁷ en metanol o etanol.

A partir de **4B** puede producirse la adición de oxígeno de la función amida a la unión $-C=N$ cíclica y la solvólisis de la unión $-C=N$ exocíclica dando un derivado de benzofenona. Este intermediario en las condiciones de reacción sufrirá hidroximetilación y posterior oxidación a amida que se adicionara al metileno activado del anillo 1,2,4 triazólico también por un mecanismo radicalario, produciendo el compuesto **8**. El orden en que tienen lugar las reacciones de adición del oxígeno amídico, la solvólisis, la hidroximetilación oxidativa y adición para formar el anillo oxazólico puede invertirse sin menoscabo del esquema general propuesto. (esquema 6.9). La metilación del nitrógeno es común en fotoquímica de aminas en metanol¹³ y lo hemos observado en nuestro laboratorio es en otras reacciones de aminobenzofenonas similares.^{28,29} También el cierre radicalario de anillos dando lugar a un metileno hidroxilado ha sido informado previamente en fotoquímica de amidas y de imidas³⁰.



Esquema 6.9

Alternativamente al mecanismo propuesto, podría postularse como primera etapa una fotoadición oxidativa de una molécula de metanol a la imina en 4B generando una imida que luego daría las reacciones de cicloadición mencionadas terminando con metilación ulterior de la amina secundaria formada.

6.5.2.3 Reacciones en fase sólida.

La fotoquímica de alprazolam en fase sólida produce solamente los compuestos 1 y 3. Estos resultados refuerzan las propuestas mecanísticas anteriores.

En efecto, la transferencia electrónica intra o intermolecular mostrada en los esquemas 6.2 y 6.3, facilitada por los solventes polares para estabilizar los iones radicales que se formarían, no se produce de manera apreciable cuando la irradiación se realiza en fase sólida.

En estas condiciones existe íntimo contacto con el aire, lo que facilita la fotooxidación y ruptura de la cadena lateral que conduce al compuesto 1 (esquema 6.4 y 6.5). La ausencia de solvente también favorece la deshidratación del primer intermediario dando lugar al compuesto 3, (esquema 6.6).

La diversidad de productos de degradación que se producen bajo distintas condiciones; la alta sensibilidad de varios de ellos a la luz, el medio ácido y/o el aire; la similitud de las estructuras y por ende su reactividad química y comportamiento físico-químico; la extraordinaria lentitud de muchas reacciones y las cantidades mínimas de producción y en muchos casos agravadas por la dificultad de separación de los productos, han hecho muy arduo y laborioso el presente estudio.

No obstante, esa misma intrincada complejidad, ahora elucidada de manera adecuadamente amplía da una consistencia muy satisfactoria a los mecanismos propuestos de los cuales algunos productos son precursores de otros; o poseen intermediarios comunes, etc, lo que confiere una alta confiabilidad a los complejos sistemas de reacción propuestos.

6.6 CONCLUSIONES

Si bien se observó que el espectro de UV/Vis se modifica durante el proceso de degradación, el método espectrofotométrico descrito en la literatura no es un método adecuado para seguir la formación de los productos de degradación debido a su falta de sensibilidad.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la fotodegradación de alprazolam en solución puede ser monitoreada usando un rápido y simple método espectrofluorimétrico. La degradación de alprazolam medida por el incremento en la señal de fluorescencia y el decaimiento de alprazolam seguido por HPLC siguen una cinética de primer orden, dentro del rango de concentraciones estudiadas. Las constantes de velocidad determinadas muestran que el alprazolam es más fotolábil en soluciones ácidas.

Con respecto a los mecanismos de formación de los diferentes productos de degradación se ha mostrado que en solución tiene lugar fundamentalmente la reacción de transferencia electrónica, con abstracción de hidrogeno del solvente produciendo el compuesto 8-H alprazolam, rcondenamientos que dan lugar a la triazolaminoquinolina y en menor proporción una fotooxidación que produce la triazolbenzofenona. Confirman estas conclusiones los resultados de fotoquímica en fase sólida que producen fundamentalmente la triazolbenzofenona.

Los productos minoritarios encontrados en algunos casos son una evidencia adicional de los mecanismos propuestos pues son intermediarios en los caminos de formación de otros productos de degradación.

-
- ¹ Andersin R., Mesilaako M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, *13*, 667
 - ² Cho, M. J.; Scahill, T. A.; Hester, J. B. *J. Pharm. Sci.*, **1983**, *72*, 356.
 - ³ Jiménez, R. M.; Domínguez, E.; Baía, D.; Alonso, R. M.; Vicente, F. *J. Heteroc. Chem.*, **1987**, *24*, 421.
 - ⁴ Konishi, M., Hirai, K., Mori, Y. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 1328
 - ⁵ Patriarche, G. J., Vire, J. C. *Analytica Chim. Acta*, **1987**, *196*, 193
 - ⁶ Ogata, M.; Tahara, T.; Nishimura, T., *J. Pharm. Sci.*, **1995**, *84*, 786
 - ⁷ Cho, M. J.; Sethy, V. H.; Haynes, L. C. *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 1346,
 - ⁸ Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 72
 - ⁹ S. Yoshioka, Y. Ishihara, T. Terazone, N. Tsunakawa, M. Murai, T. Yasuda, Y. Kitamura, *Drug develop. Ind. Pharm.* **20** (1994) 2049-2062
 - ¹⁰ Bovina, E., De Filippis, P., Cavrini, V., Ballardini, R. en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 306
 - ¹¹ Allen., J.M., Allen S.K., Ling B., en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 174
 - ¹² International Conference on Harmonization, "Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products", Federal Register, 4th Rev.1996
 - ¹³ Drew H. D. en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 232
 - ¹⁴ Pac, C.; Ishitani, O., *Photochem. Photobiol.*, **1988**, *48*, 767.
 - ¹⁵ Fox, M. A., *Photochem. Photobiol.*, **1990**, *52*, 617.
 - ¹⁶ Moore, D.E., Roberts-Thomson, S., Zhen, D., Duke, C.C., *Photochem. Photobiol.*, **1990**, *52*, 685.
 - ¹⁷ Andersin R., Mesilaako M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1995**, *13*, 667.
 - ¹⁸ Fox, M.A., Chanon M., *Photoinduced Electron Transfer*; vol 1 Elsevier, 1988.
 - ¹⁹ Fukui K., *Reactivity and Structure, Concepts in Organic Chemistry 2*, Springer-Verlag, Berlin, 1975

-
- ²⁰ Tonnesen, H.H. en: H.H. Tonnesen (Ed.), *Photostability of Drugs and Drug Formulations*, Taylor&Francis, London, 1996, pp. 18.
- ²¹ Pandey, G., *Synlett*, **1992**, 546
- ²² Oppenlander, T., *Chimia*, **1988**, *42*, 331, Oppenlander, T., Henning T., *Chem Ing. Tech.*, **1995**, *67*, 594.
- ²³ Piette, J., *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, **1990**, *4*, 335.
- ²⁴ Castell, J.V., Gomez, L., M.J. Miranda, M.A. Morera, I.M. *Photochem., Photobiol*, **1987**, *46*, 991..
- ²⁵ Oppenlander, T., Henning T., *Chem Ing. Tech.*, **1995**, *67*, 594.
- ²⁶ Bochu, C., Couture, P., Grandclaoudon, P., Lablache-Combier A., *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 1959
- ²⁷ Ho, T.I., Chow, Y.L., 'Photocemistry of Amines and amino compounds" in "The Chemistry of amino, nitroso, nitro and related group" Patai, S, e Wiley, 1996, cap 15.
- ²⁸ Nudelman SN, Waisbaum RG *J Phys Org Chem* **1997**, *10*: 97-106.
- ²⁹ Nudelman NS, Waisbaum RG. *J Pharm Sci*, **1995**, *84*: 998-1004
- ³⁰ Coyle J.D., en *Synthetic Org. Photochem* (ed. W.M. Horspool) Plenum Press, New York, 1984
- ³¹ Shimada, K., Sako, M., Hisota K., Maki Y., *Tetrahedron Lett*, **1987**, *28*, 207.

CAPITULO 7

***FOTOESTABILIDAD DE ALPRAZOLAM
EN MEDICAMENTOS.***

7.1 Introducción

En el capítulo 5 se describió la sensibilidad a la fotodescomposición que presenta el Alprazolam como droga pura y principalmente cuando éste está en solución. La segunda etapa de este estudio de Fotoestabilidad de Medicamentos consiste en determinar la sensibilidad a la luz de la molécula cuando se encuentra formando parte de una preparación farmacéutica.^{1,2} Se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar si los mismos productos de fotodegradación identificados en condiciones de degradación forzada (soluciones irradiadas con lámpara) se forman al irradiar comprimidos de alprazolam.
- Determinar si los mismos productos de fotodegradación identificados en condiciones de degradación forzada (soluciones irradiadas con lámpara) se forman bajo irradiación natural cuando la droga está preparada en una forma farmacéutica.
- Determinar si los mismos productos de fotodegradación identificados en condiciones de degradación forzada (soluciones irradiadas con lámpara) se forman bajo irradiación natural cuando la droga está preparada en una forma farmacéutica.
- Desarrollar y validar un método de cuantificación que permita el seguimiento de los reacciones de fotodegradación.
- Medir la velocidad de decaimiento del principio activo en formas farmacéuticas irradiadas con luz natural.

7.2 Consideraciones sobre la fotoestabilidad en formas farmacéuticas sólidas

Muchas dificultades se encuentran cuando se trata de estudiar la fotoestabilidad de formas farmacéuticas, especialmente en las preparaciones sólidas. La estabilidad de la droga en formas farmacéuticas sólidas es la más importante, debido a que las formas farmacéuticas sólidas son más comunes que otros tipos, y porque los primeros ensayos clínicos en el desarrollo de una nueva droga son usualmente llevados a cabo con este tipo de forma farmacéutica. No obstante pocos estudios sistemáticos acerca de la fotólisis de sólidos han sido publicados.

En formas farmacéuticas sólidas no se espera que la droga sufra una fotólisis extensiva, dado que la fotólisis en este caso para algunos autores es un fenómeno de superficie,³ mientras que otros consideran que es la combinación de humedad y luz la que causa la fotodegradación.⁴ En base a nuestras propias experiencias en estudios de estabilidad de drogas puras y de medicamentos podemos establecer lo siguiente:

Las formas líquidas, y en especial las transparentes, son las más sensibles a la acción fotoquímica cuando la droga es fotostable. El envase de color ámbar es una protección parcial. El estuche opaco de cartulina y la inscripción “protéjase de la luz” son imprescindibles cuando el medicamento es fotosensible.

Siendo la forma sólida opaca al paso de luz, la mayor sensibilidad se encuentra en la superficie y va disminuyendo a medida que aumenta la columna de penetración.

Dependiendo de la estructura del principio activo y de los excipientes la fotodegradación superficial puede generar compuestos que catalicen posterior degradación de la droga fotoquímica o no.

Debe establecerse claramente la degradación producida por la humedad y la temperatura “a oscuras” a fin de poder evaluar el efecto conjunto de la humedad, temperatura y luz, y desarrollar los excipientes y métodos de empaque más adecuados para la protección específica de medicamentos en cada caso.

7.3 Análisis de comprimidos irradiados artificialmente.

Teniendo el conocimiento previo de los productos de fotodegradación en que se descompone el alprazolam, se analizó muestras de comprimidos irradiados durante 6 meses con la lámpara seleccionada para realizar estudios de estrés forzado^{5,6}. Los análisis por TLC mostraron que los productos en que se descomponen los comprimidos son aquellos aislados a partir de la extracción de la solución buffer irradiada, produciéndose de manera importante triazolbenzofenona y como segundo producto triazolaminoquinolina.

Con el objetivo de confirmar la estructura del principal producto de fotodescomposición, se procedió a separarlo mediante HPLC. Los espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN y espectros de masa coinciden con los espectros del compuesto caracterizado como triazolbenzofenona.

El análisis por estándar externo por HPLC indica que el alprazolam a decaído a un 54.1 %, mientras que un total de 30.3% de triazolbenzofenona se ha formado y un 15.6 % de triazolaminoquinolina, en un período de irradiación de 6 meses con el simulador solar usado, se obtuvo el cromatograma mostrado en la figura 7.1.

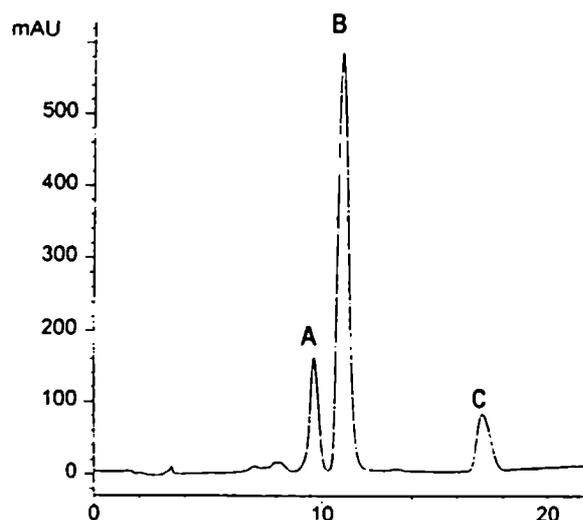


Figura 7.1 Cromatograma obtenidos del análisis de comprimidos de alprazolam (1.0 mg) irradiados con lámpara metal haluro (A) triazolbenzofenona, (B) alprazolam, (C) triazolaminoquinolina.

El porcentaje de degradación encontrado es importante al tratarse de una forma farmacéutica sólida .

Lo que sigue a continuación son los estudios orientados a determinar si esta fotodegradación observada en comprimidos irradiados con lámpara, se produce también bajo condiciones de irradiación natural.

7.4 Desarrollo y validación del método de cuantificación

7.4.1 Estandarización del método de cuantificación

Los siguientes experimentos tienen como objetivo encontrar las condiciones cromatográficas óptimas de resolución del alprazolam y de sus productos de degradación, método que luego será utilizado para el análisis cuantitativo en los estudios cinéticos de la fotodescomposición del alprazolam.

En la revisión bibliográfica sobre métodos de cuantificación de alprazolam se encontraron numerosas aplicaciones de HPLC para la cuantificación de alprazolam en matrices biológicas,^{7,8,9,10,11} en los métodos propuestos se usan diversas condiciones cromatográficas en cuanto a modificador orgánico, pH de la fase acuosa y en otros se usa

cromatografía de intercambio iónico, también se han publicado métodos con LC/MS/MS^{12,13,14} y otros mediante cromatografía gaseosa^{15,16,17} como se mencionó en el capítulo 1. Solamente se encontró una publicación de un método de HPLC usado para el estudio de estabilidad de alprazolam, donde se describe el estudio del efecto de la temperatura sobre la estabilidad de tres formulaciones extemporáneas de alprazolam no disponibles en el mercado, las muestras se almacenaron a 5 y 25 °C, protegidas de la luz y durante 60 días. El análisis por el método propuesto indicó que en la preparación más inestable, se retiene un 93.9 y 91% (5 y 25 °C, respectivamente) de la concentración inicial de alprazolam.¹⁸ Si bien se ha detectado un decaimiento, este es claramente, un estudio muy impreciso y defectuosamente diseñado tanto en las temperaturas estudiadas como en los lapsos del estudio y sólo se evalúa el alprazolam remanente sin realizarse determinaciones de productos de degradación, evaluación del balance de masas, etc.

Actualmente la HPLC es la técnica más extensivamente usada en los estudios de estabilidad de drogas,¹⁹ y dado lo poco confiable de la publicación anterior, se procedió a estandarizar un método de HPLC, apto para la detección cuantitativa de alprazolam y sus principales productos de fotodegradación formados en comprimidos, los cuales se identificaron en el estudio de estrés forzado descrito anteriormente. Se utilizó la siguiente mezcla de estándares: Alprazolam, 7.68×10^{-4} M; 8H-Alprazolam, 1.53×10^{-3} M; Triazolbenzofenona, 1.68×10^{-3} M y Triazolaminoquinolina, 3.25×10^{-3} M.

Como punto de partida se tomaron las siguientes condiciones: acetonitrilo-agua, columna RP-18, 220nm, 1 ml/min. En la figura 1 se ilustra la modificación del factor de capacidad k' correspondiente al alprazolam con el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil.

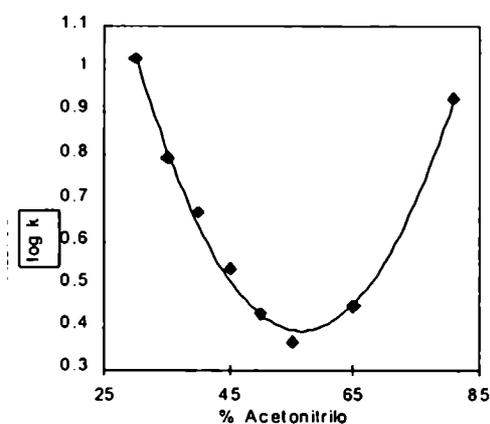


Fig. 7.2 Modificación del k' del alprazolam por el % de acetonitrilo.

Fase móvil: acetonitrilo-agua, columna RP-18, 220nm, 1 ml/min

La curva resultante es inusual, muestra que hay retención de alprazolam al aumentar y disminuir el porcentaje de acetonitrilo; con acetonitrilo 100% y agua 100% el alprazolam no eluye. Se observa que hay un máximo de elución con 50% de acetonitrilo.

También se analizó la influencia de la fuerza de elución en la resolución. En la Tabla 1 se describe la resolución calculada para cada uno de las distintas mezclas expresadas en porcentaje de acetonitrilo:

Tabla 7.1. Modificación de la Resolución por el % de acetonitrilo.^a

% acetonitrilo	Resolución
30	0.97
35	0.80
40	2.0
45	1.45
50	1.2
55	0.6
60	0.7

^aFase móvil: acetonitrilo-agua, columna RP-18, 220nm, 1 ml/min.
Muestra: Alprazolam, 8H-alprazolam, triazolbenzofenona y triazolaminoquinolina

Según la Tabla 1, la mejor resolución se logra con 40% de acetonitrilo, y de acuerdo a la Fig. 1 con este porcentaje el factor de capacidad está en un término medio. Después, se analizó el efecto de otros modificadores orgánicos de forma similar a la efectuada con acetonitrilo. En la Tabla 2 se resumen los mejores factores cromatográficos obtenidos con fases móviles compuestas con otros solventes, conservando la fuerza de elusión de la mezcla acetonitrilo-agua, 40-60.

Tabla 7. 2. Evaluación de otros modificadores orgánicos.^a

Solvente	$t_{R_{\text{alprazolam}}}$	k'	R
Acetonitrilo 40%	8.8	4.6	2
Metanol 55%	12.8	4.6	0.07
Tetrahidrofurano 29% ^b	72.7	14.5	1.05

^a Fase móvil: solvente-agua, columna RP-18, 220nm, 1 ml/min.

^b Se usó 29% de THF ya que no es posible usar el porcentaje requerido (35.7%) por impedimentos técnicos (aumento de la presión).

Se observa en esta tabla que el metanol afecta principalmente la resolución, disminuyéndola de manera apreciable, mientras que con THF el alprazolam presenta tiempo de retención muy alto, que no es muy apropiado para hacer análisis de rutina. Por estas dos razones, el acetonitrilo es el mejor modificador orgánico para resolver la muestra. El compuesto que presenta mayor tiempo de retención es la triazolaminoquinolina, (quinolina) en lo sucesivo se muestra este dato, ya que es éste el que determina el tiempo de análisis.

A continuación se analizó qué efecto tiene el pH de la fase acuosa y el tipo de buffer usado. En todos los casos, se usó una concentración de buffer de 0.025M y con igual fuerza iónica. Se determinó el t_R y la resolución para distintos sistemas de buffer conservando la concentración de acetonitrilo al 40% en la fase móvil. Se muestra algunos resultados en la Tabla 3.

Tabla 7.3. Efecto del pH en la fase móvil. ^a

Fase acuosa, (60%)	t _R alprazolam	t _R quinolina	R
Buffer fosfato pH 4.5	8.1	17.8	0.22
Buffer fosfato pH 7.5	8.1	17.8	0.15
Buffer acetato pH 4.5	16.0	>25	0.28
Buffer fórmico pH 4.5	4.9	6.6	0.10

^aFase móvil: acetonitrilo-buffer, columna RP-18, 220nm, 1 ml/min.

Se observa en primer lugar que el pH no afecta el t_R de alprazolam ni el de la quinolina, tampoco se observó que afectara el t_R de los otros compuestos. En segundo lugar, se observa que la naturaleza del buffer cambia los t_R de los compuestos a analizar, y la resolución del cromatograma. De acuerdo a esta tabla la mayor resolución la presenta el buffer de acetato, pero tiene el inconveniente de presentar altos tiempos de retención. También se observa que el t_R de la quinolina se diferencia notablemente de los t_R correspondientes a los otros compuestos en estudio, este hecho indica que un método de gradiente es el más apropiado para el análisis de esta muestra.

Se realizaron numerosos ensayos, al cabo de los cuales se llegó al siguiente sistema de gradiente como el óptimo para resolver la muestra, se empezó con una mezcla A compuesta por acetonitrilo-buffer acetato pH 4.5, 40-60 y se terminó con una mezcla B compuesta por acetonitrilo-buffer acetato pH 4.5, 80-20, y un programa de gradiente: 0-10 min (gradiente lineal fase móvil A: 100% a 50%), 10-14 min (isocrático, fase móvil A: 50%) y 14-20 min (gradiente lineal fase móvil A: 50% a 0%). Guardando las condiciones cromatográficas, flujo a 1ml/min y detección a 254 nm. En estas condiciones el alprazolam eluye a 8.7 min y quinolina 12.5 min.

En la figura 7.3 se muestra un cromatograma de la mezcla de estándares donde los productos de degradación del alprazolam están bien resueltos.

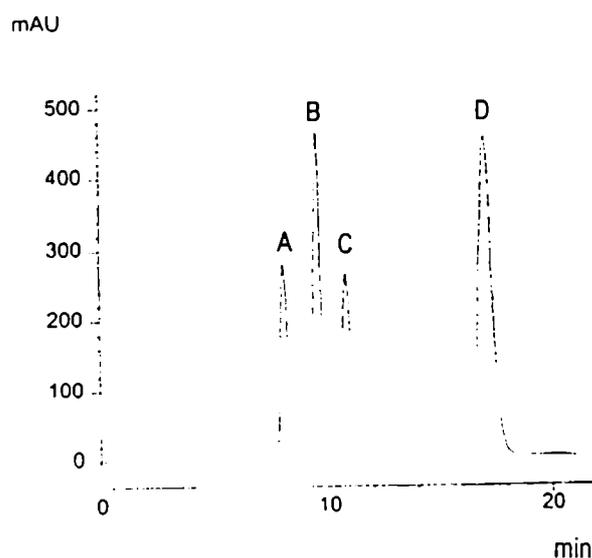


Figura 7.3. Cromatograma resultante de la inyección de solución estándar:
(A)8-HAlprazolam (B) Triazolbenzofenona; (C) Alprazolam;
(D)Triazolaminoquinolina.

7.4.2 Validación del método

La validación consiste en la evaluación de los parámetros del método que aseguren la eficacia para usar este método en mediciones cuantitativas,^{20,21} en este caso de los productos de degradación de alprazolam en el rango de las concentraciones de interés.

La determinación de la concentración de alprazolam remanente, como también la determinación de la concentración de los productos formados se hizo a través de estándar externo, se construyó una curva estándar de alprazolam en el rango de 480.5 a 1201 $\mu\text{g/ml}$, la respuesta área-concentración es lineal con un coeficiente de correlación de 0.99. De igual forma para los productos de degradación se elaboró una curva de calibración en el rango de 4.71 a 103.49 $\mu\text{g/ml}$, como se observa en la figura 3 la respuesta es lineal con coeficientes de correlación de 0.99. Las pendientes de las rectas se resumen en la tabla 4.

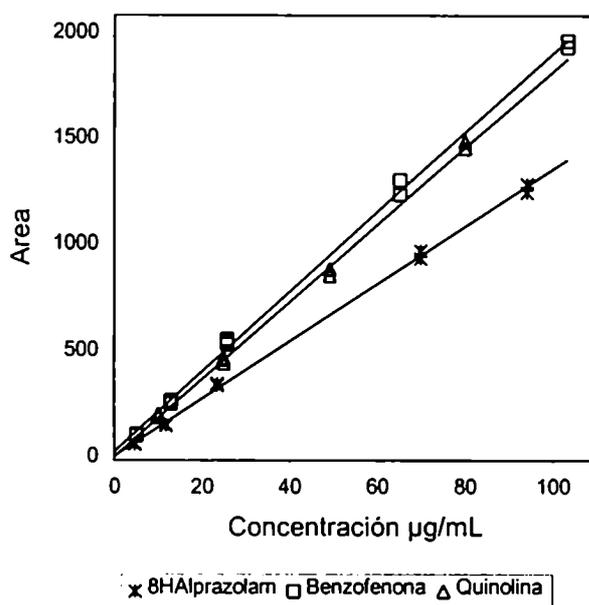


Figura 7.4. Linealidad de productos de Fotodegradación

Tabla 7.4. Respuesta Area vs concentración

Compuesto	Pendiente	Rango [] µg/ml
Alprazolam	35.428	480.5-1201.2
8-Halprazolam	13.504	4.71-94.25
Benzofenona	18.782	5.17-103.49
Quinolina	18.168	10.01-80.0

Se evaluó también la precisión del método para cada uno de los productos y en las concentraciones más bajas del rango de 4.71– 48.28 µg/ml para los productos de degradación.

La desviación relativa estándar (RSD) calculada para cada producto resultó ser menor del 3.0%, valor que se considera aceptable teniendo en cuenta las bajas concentraciones que se están midiendo. RSD son mayores para las concentraciones más bajas.

$$s = \sqrt{(\sum X_i - X)^2 / n - 1}$$

$$RSD = s * 100 / X$$

Tabla 7.5. Precisión del método

Compuesto	µg/ml	RSD
8H Alprazolam	4.71	2.39
	11.77	2.10
	23.56	1.20
Benzofenona	5.17	2.35
	12.94	2.89
	25.87	2.10
Quinolina	10.01	2.59
	25.01	2.77
	49.28	1.13
Alprazolam	480.48	1.56
	800.00	1.52
	1201.2	1.08

Otro factor importante que se calculó debido a la bajas concentraciones que se requieren medir es la sensibilidad.²² Para ello, se realizaron mediciones de estándares preparados en concentraciones del rango de 5.0 – 25.0 µg/ml, e inyectados por triplicado. Se calcularon los límites de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2:

$$\text{Limite de detección: } (Y_{bi} + 3 S_{bi}) / b * (1/\sqrt{n}) \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$\text{Limite de cuantificación: } (Y_{bi} + 10 S_{bi}) / b * (1/\sqrt{n})^{23} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde Y_{bi} es la respuesta a concentración cero de una curva concentración vs respuesta, usando los datos generados de los estándares de 5.0 – 25.0 µg/ml, S_{bi} es la desviación estándar a concentración cero de una curva concentración vs desviación, y n es el número de mediciones. b es la pendiente de la curva de calibración.

La sensibilidad calculada para el método propuesto se muestra en la tabla 6, los límites de detección y cuantificación demuestran que el método es apto para mediciones de bajas concentraciones de productos de degradación.

Tabla 7.6. Sensibilidad del método

	[] µg/ml	L . Detección (µg/ml)	L .Cuantificación (µg/ml)
8H Alprazolam	4.71-23.56	0.14	0.65
Benzofenona	5.17-25.87	0.32	0.97
Quinolina	5.01-25.01	1.53	3.04

7.5 Estudio de fotoestabilidad de formulaciones farmacéuticas de alprazolam

La forma farmacéutica en que se encuentra disponible el principio activo estudiado es sólida (comprimidos), no se han elaborado preparaciones líquidas con alprazolam debido a su baja hidrosolubilidad y a la hidrólisis y reciclización que sufre el alprazolam en medios acuosos como se mencionó en el capítulo 2. Debido a estas inconvenientes han aparecido propuestas para diseñar prodrugs de alprazolam que permitan desarrollar formulaciones parenterales.²⁴ Otra característica que tienen las formulaciones de alprazolam es que dada la alta potencia que caracteriza a esta benzodiazepina las concentraciones que se usa son bajas del orden de 2.0, 1.0, y 0.5 mg.

Lo primero implica que en esta preparación sólida el alprazolam es más estable que en las soluciones en que se ha estudiado previamente, y lo segundo exige que el método para estudiar la degradación sea lo suficientemente sensible a las bajas concentraciones de los productos de degradación que se forman y que sea preciso en la determinación de las variaciones en la concentración de principio activo remanente.

El estudio se desarrolló irradiando cuatro presentaciones comerciales de alprazolam (comprimidos de 2.0, 1.0 y 0.5 mg). La fuente de radiación elegida para este estudio es la luz natural. A pesar de que las guías de la ICH recomiendan irradiar con una lámpara, se eligió irradiar con luz solar directa por un período de aproximadamente 2 años, a fines de estar seguro o de confirmar que la degradación estudiada se lleva a cabo en condiciones naturales y no es producto de una degradación forzada con otro tipo de radiación diferente a la radiación solar.

Las tabletas se irradiaron de manera individual, se asignaron las letras A, B, C y D a las cuatro preparaciones comerciales diferentes que se presentan en forma de comprimidos, las muestras A y B (comprimidos de 2 mg y 1 mg respectivamente) obtenidas a granel se

sometieron a irradiación envasando cada una dentro de un frasco sellado herméticamente y las muestras C y D (comprimidos de 0.5 mg) se irradiaron dentro de su envase inmediato (blister).

Durante el período de ensayo no se observó deterioro del envase primario, pero sí se alteraron las propiedades físicas de las tabletas.

Las muestras se analizaron con el método propuesto de HPLC, este análisis indicó que el alprazolam en estas condiciones de irradiación es fotosensible y que se descompone dando lugar a dos productos de degradación: triazolbenzofenona y triazolaminoquinolina, los cuales se identificaron mediante la comparación de los t_R con estándares puros de productos de degradación aislados previamente de la fotodegradación de soluciones buffer. La triazolbenzofenona es el compuesto mayoritario, la concentración relativa en que se forma permitió que se pudiera aislar y purificar a partir de comprimidos degradados artificialmente con el fin de confirmar su estructura por espectroscopia RMN y EM. El cromatograma (Fig. 4) generado de una muestra sometida a irradiación natural por 408 días muestra las relativas intensidades de los productos de degradación formados y del principio activo

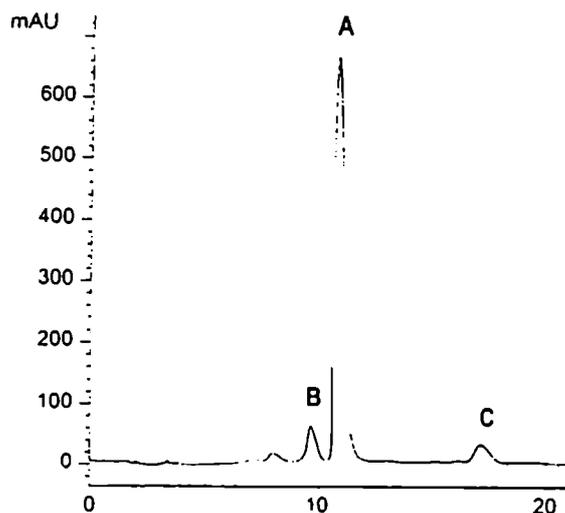


Fig. 7.5 Un típico cromatograma de HPLC para comprimidos fotodegradados de alprazolam (0.5mg): (B) Triazolbenzofenona; (A) Alprazolam; (C)Triazolaminoquinolina.

Aplicando el método de HPLC previamente validado se calculó la velocidad de desaparición del principio activo de las muestras analizadas. A pesar de las dificultades analíticas propias de estos comprimidos, las determinaciones efectuadas indican claramente que el decaimiento del principio activo sigue una cinética de orden cero como se observa en las figuras 5, 6, 7 y 8 para cada especialidad farmacéutica. En la Tabla 7 se resumen las constantes de velocidad para cada una de las muestras.

Figura 7.6. Fotodegradación de comprimidos de alprazolam 2 mg. Muestra A.

(□) Alprazolam, (+) Triazolbenzofenona, (Δ) Triazolaminoquinolina

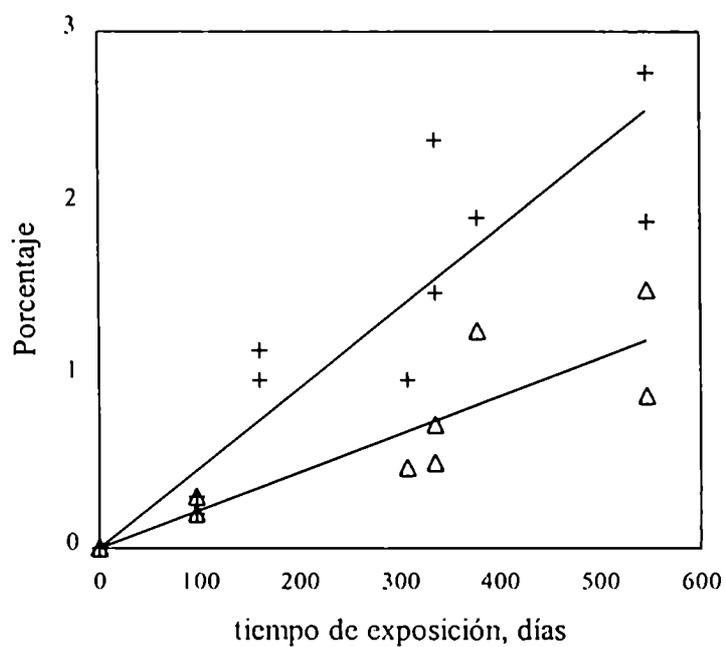
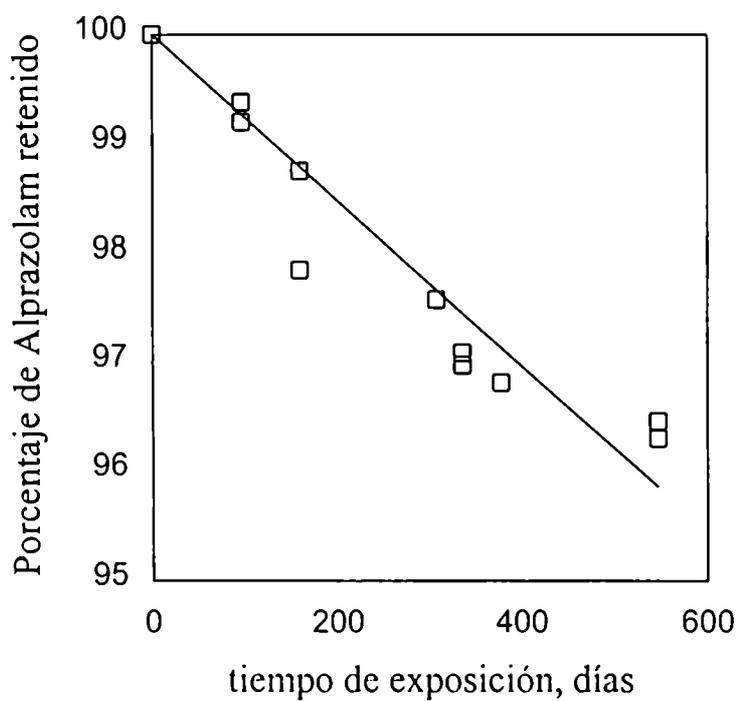


Figura 7.8. Fotodegradación de comprimidos de alprazolam 1 mg. Muestra B.

(□) Alprazolam, (+) Triazolbenzofenona, (Δ) Triazolaminoquinolina

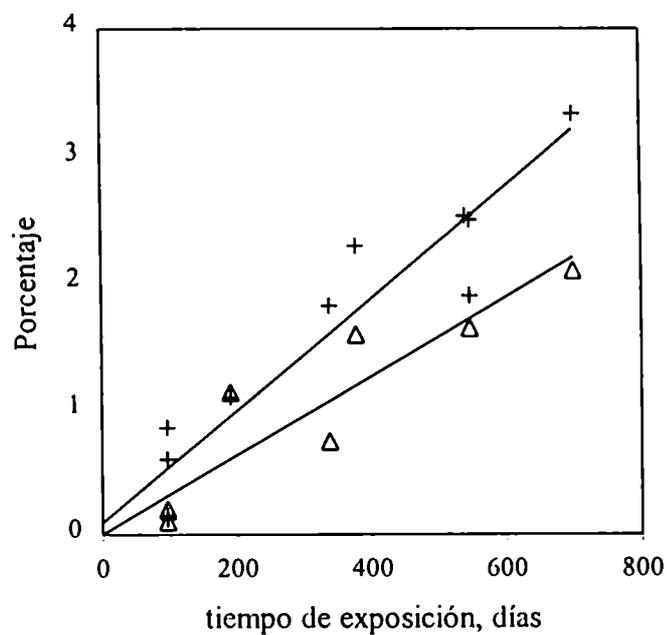
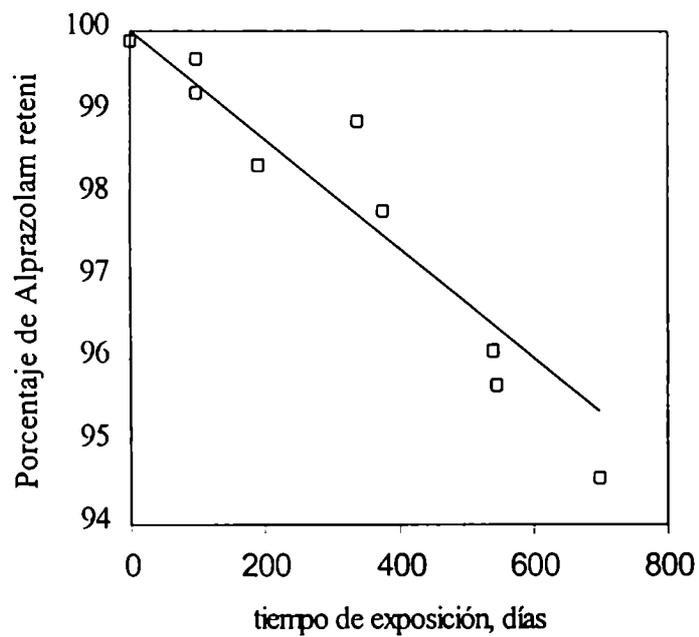


Figura 7.9. Fotodegradación de comprimidos de alprazolam 0.5 mg. Muestra C.

(□) Alprazolam, (+) Triazolbenzofenona, (Δ) Triazolaminoquinolina

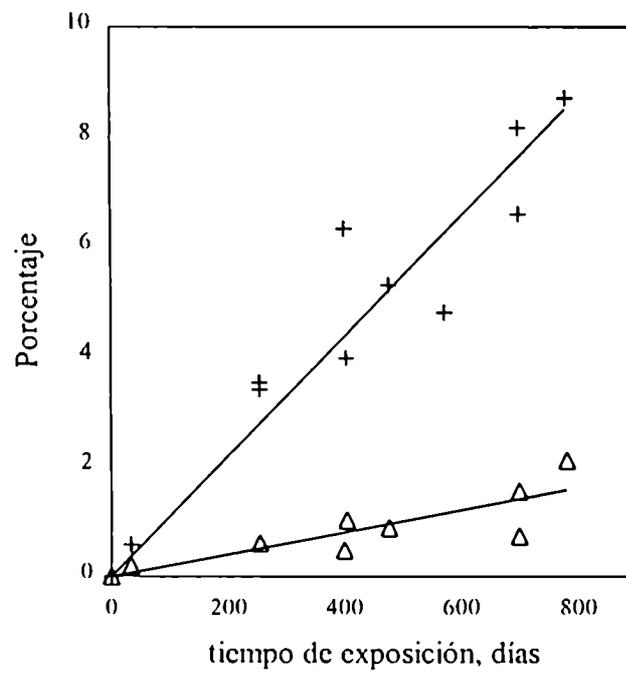
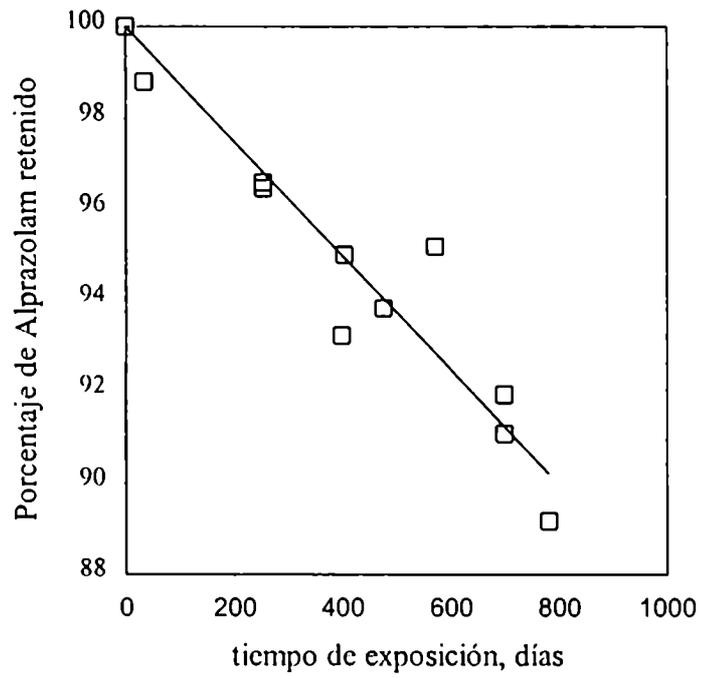
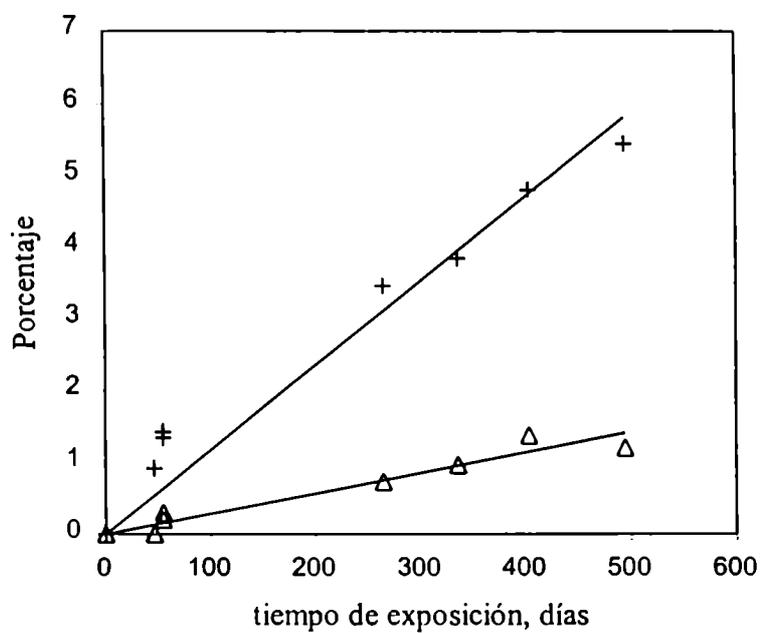
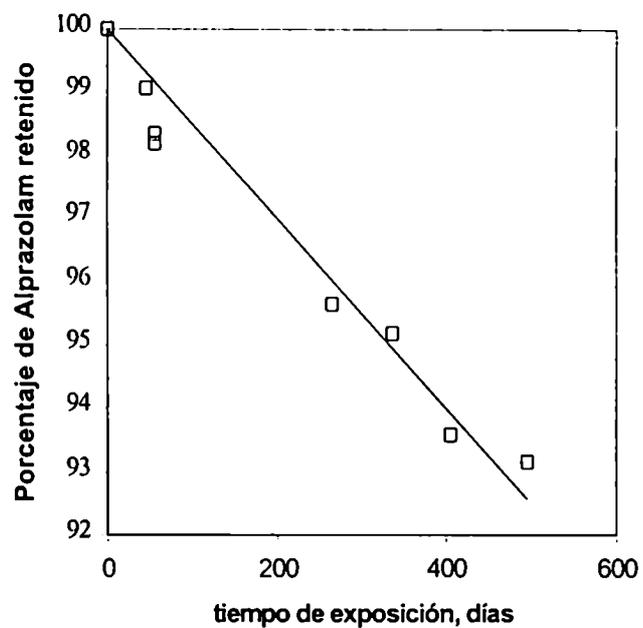


Figura 7.10. Fotodegradación de comprimidos de alprazolam 0.5 mg. Muestra D.

(□) Alprazolam, (+) Triazolbenzofenona, (Δ) Triazolaminoquinolina



Se observa que el envase afecta la velocidad de descomposición: en efecto las velocidades de reacción son semejantes para el mismo tipo de envase, las muestra irradiadas dentro de un blister (muestras C y D) se descomponen más rápidamente.

Tabla 7.7 Constantes de decaimiento de Alprazolam

Muestra	$k \text{ días}^{-1}$ (10^{-3})	r	t max (días)
A	7.6	0.88	547
B	6.6	0.85	700
C	12.5	0.89	781
D	15	0.95	495

La muestra que presenta el máximo decaimiento de la potencia es la muestra D, alcanza a un 10% de pérdida de la potencia, (valor que es considerado como una degradación significativa) después de una exposición de aproximadamente dos años. Estos resultados indican que las preparaciones farmacéuticas (comprimidos) de alprazolam son sensibles a degradación promovida por la luz.

Las constantes de velocidad calculadas en la tabla 7.7 no deben tomarse como herramientas predictivas del decaimiento de alprazolam para determinar el tiempo de vida útil de los comprimidos como es usual con la degradación de medicamentos promovida por la temperatura y la humedad. La diferencia se basa en que la fotodegradación puede ser eficientemente impedida mediante la selección de un empaque apropiado, mientras que la degradación de medicamentos debido a la temperatura y/o humedad no puede ser evitada, por esta razón los estudios de fotoestabilidad en el producto farmacéutico se orientan hacia la búsqueda de un material de empaque adecuado siguiendo el diagrama de flujo de decisiones mencionado en la introducción. Los ensayos de fotoestabilidad son un ensayo de estrés diseñado para determinar las características de la estabilidad intrínseca de una nueva droga, sus nuevos productos de degradación y su posible fototoxicidad. No se ha establecido correlación alguna que equipare el resultado con el período de expiración.²⁵

En cuanto a los productos formados se aprecia en las figuras 5, 6, 7 y 8 que la aparición de éstos sigue también una cinética de orden cero, sobresale en estas figuras la alta concentración de triazolbenzofenona que se observa en las muestras C y D.

Las velocidades de formación de los productos de degradación resumidas en la tabla 7.8 indican que la velocidad de formación de triazolbenzofenona es mayor que la velocidad

de formación de la triazolaminoquinolina para todas las preparaciones farmacéuticas estudiadas, principalmente en las muestras C y D, mientras que la velocidad de formación de la triazolaminoquinolina no varía de manera significativa en las cuatro muestras analizadas.

Tabla 7. 8. Constantes de formación de fotoproductos de degradación

Muestra	Triazolbenzofenona		Triazolaminoquinolina	
	$10^3 k,$ días ⁻¹	r	$10^3 k,$ días ⁻¹	r
A	4.6	0.80	2.2	0.75
B	4.7	0.89	3.1	0.82
C	11	0.89	2.0	0.73
D	12	0.94	2.8	0.94

Los bajos valores del factor de correlación en las cinéticas de decaimiento como en las de formación de compuestos se deben a la variación en la uniformidad de dosis y no al método. Como se demostró en la validación del método, éste tiene un límite de cuantificación apropiado para determinar las pequeñas concentraciones de los productos de degradación formados (0.97 µg/ml y 3.04 µg/ml para triazolbenzofenona y triazolaminoquinolina, respectivamente). También puede deberse parcialmente a las variaciones en la irradiación natural a que se sometieron las muestras.

La variación de la uniformidad de dosis en comprimidos con bajo contenido de principio activo es alta, en este caso se deberían analizar cada vez 10 unidades; en este ensayo no se hizo así a razón de disminuir la cantidad de muestras irradiadas ya que las muestras deben irradiarse de manera individual y guardando una geometría apropiada para asegurar que todas las muestras reciban la misma cantidad de irradiación.²⁶

7.6 Medidas de Fluorescencia en comprimidos

También se evaluó si hay cambios en las propiedades fluorescentes de los comprimidos al someterse a irradiación. Para este ensayo se comparó los espectros de fluorescencia de muestras blanco (provenientes de comprimidos sin irradiar) con las muestras provenientes de comprimidos irradiados con luz natural, en las mismas condiciones en que se irradiaron las muestras analizadas por HPLC. (ver detalle en la parte experimental)

En la figura 7.10 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos. El espectro de emisión (λ_{exc} 260nm) de una solución de triazolaminoquinolina ($3.2 \times 10^{-5}M$) se muestra en la figura 7.10 en línea gruesa, y en líneas delgadas los espectros obtenidos con comprimidos.

Se observa claramente que las muestras sin irradiar “blanco” (línea caracterizada con (O)) no presentan fluorescencia, mientras que los comprimidos irradiados (líneas delgadas) presentan fluorescencia. Los espectros corresponden a las muestras A, C y D con tiempos de exposición a la irradiación solar de 792 días, 605 días y 605 días, respectivamente.

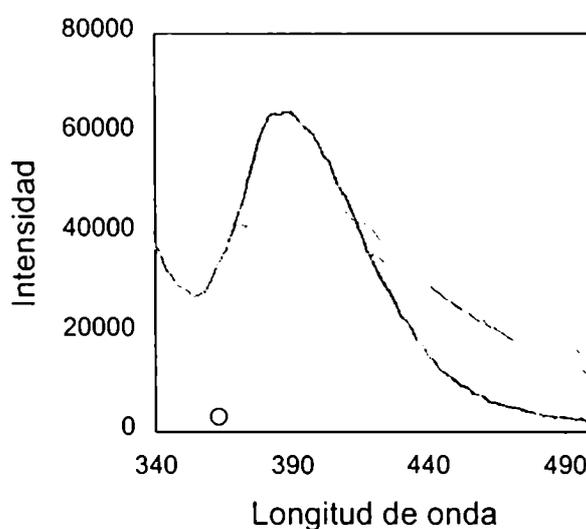


Figura 7.10. Medidas de fluorescencia en comprimidos.

De acuerdo a nuestro conocimiento de los productos de degradación formados, la señal de fluorescencia se debe fundamentalmente a la formación de quinolina. El corrimiento de los máximos y la dispersión observada en los comprimidos puede deberse a la turbidez por la presencia de restos de excipientes, como también puede deberse a la presencia de otros compuestos fluorescentes minoritarios no identificados.

Conclusiones

Los resultados muestran la fotosensibilidad del alprazolam bajo formas farmacéuticas sólidas (comprimidos) al ser irradiado con luz solar directa. A pesar de ser un proceso de

superficie se observa que la descomposición alcanza un valor máximo de 10% en la muestra D en un período de 2 años.

El método de análisis propuesto es adecuado para el seguimiento de muestras fotodegradadas.

La fotodegradación en estas condiciones da lugar a la formación de dos de los compuestos que se observaron en irradiación con lámpara y en solución: triazolbenzofenona y triazolaminobenzofenona, siendo mayoritario el primero.

Determinada la fotosensibilidad, es claro que los ensayos para evaluar la fotoestabilidad de las formas farmacéuticas de este medicamento deben conducirse dentro de su empaque final (blister +caja) para comprobar la eficacia del envase.

¹ International Conference on Harmonization, "Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products", Federal Register, 4th Rev.1996, pp 2

² *Draft Guidance: Stability Testing of Drug Substances and Drug Product*, Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Junio de 1998.

³ Drew H. D., en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), "Drugs: Photochemistry and Photostability", Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998 pag 240

⁴ Kaminski, E. E., Cohn, R.M., McGuire M., Carstensen, J.T., *J. Pharm Sci.*, 1979, 68, 368.

⁵ Albini, A., Fasani, E., en: Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 73.

⁶ Piechocki, J.T. en: Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 253.

⁷ Rogers W. O., Hall M.A., Brissie, R. M., Robinsson, C. A. *J. Forensic Sci.*, 1997, 42, 155-156

⁸ Hall M.A., Brissie, R. M., Robinsson, C.A., *J. Anal. Toxicol.*, 1995, 19, 511-513

⁹ Schmith, V. D., Cox, S.R., Zemaitis, M.A., Kroboth P.D. *J. Chrom. Biomed. App.*, 1991, 568, 253-260

¹⁰ Inoue T. , Suzuki S.I., *J. Chrom. Biomed. App.*, 1987, 422, 197-204

¹¹ Peng, G.W., *J. Pharm. Sci.*, 1984, 73, 1173

¹² Zweigenbaum, J., Heinig, K., Steinborner, S., Wachs T., Henion, J., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2294-2300

-
- ¹³ D.J. Crouch, D.E. Rollins, D.E. Canfield, D.M. Andrenyak, J.E. Schultics, *J. Anal. Toxicol.*, **1999**, *23*, 479-485
- ¹⁴ Reubsact J.K., Norli, H>R., Hemmersbarch p., Rasmuseen, K.E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1998**, *18*, 667-680.
- ¹⁵ Nedved, M.L., Habibi-Goudarzi, S., Ganen, B., Henion J. D., *Anal Chem*, **1996**, *68*, 4228-4236
- ¹⁶ Greenblatt, D. J., Javaid, J. I., Locniskar A., Harmatz, J., Shader I.S. *J. Chrom. Biomed. App.*, **1990**, *534*, 202-207
- ¹⁷ Greenblatt D. J., Divoll, M., Moschitto, L.J., Shader I.R., *J. Chrom. Biomed. App.*, **1981**, *225*, 202-207
- ¹⁸ Allen, L.V. *Am. J. Health Syst Pharm.*, *5* (18), 1915, **1998**.
- ¹⁹ Quanyun A.X., Lawrence A. T., Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis, American Pharmaceutical Association, Washington,2000, 391pp
- ²⁰ Jenke. D. R., *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* **1996**, *19*, 1873-1891
- ²¹ Prankerd R., *Australian J. Hospital Pharmacy* ,**1995**, *25*, 405
- ²² Vinod P. S., Kamal, K. M., Shrikant D., Iain, J. M., Jerome, P. S., *J. Pharm. Sci.*, **1992**, *81*, 309-312
- ²³ Quattrocchi, O.A., Andrizzi, S.I., Laba, R.F., *Introducción a la HPLC*, 1992, Buenos Aires, p301-328
- ²⁴ Cho, M. J.; Sethy, V. H.; Haynes, L. C. *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 1346.
- ²⁵ Valvani S. C en Carstensen J.T., Rhodes C.T., *Drug Stability, Principles and Practices*, 3^o ed. Revised and Expanded, Marcel Decker, New York, 2000, pp 535
- ²⁶ Mathews B. R., *Drug Devel. Ind. Pharm.*,**1999**, *25*,831-856

CAPITULO 8

SECCION EXPERIMENTAL.

8.1 Materiales y Métodos

8.1.1 Equipos

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AM 200 y otros en un espectrómetro Bruker AM 500, usando tetrametilsilano como estándar interno. Las mediciones se efectuaron usando tubos de 5 mm. Se usó cloroformo, CDCl_3 y Metanol, CD_3OD como solventes.

Los espectros de masa por impacto electrónico IE-EM se registraron usando un espectrómetro de masa BG Trio-2. Cuando se utilizó cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa se usó un cromatógrafo Hewlett Packard 5890, los espectros se realizaron a 70 eV.

Las determinaciones de CGL se hicieron en un equipo Hewlett Packard 5890 equipado con detector FID y Columna HP 5.

El Programa que ofreció mejor resolución es el siguiente: Primera rampa temperatura inicial 170 °C, a 2°C/ min hasta temperatura final de 180 °C. Segunda rampa de 180 °C a 0.5°C /min hasta temperatura final de 200 °C. Temperatura del detector 230 °C. Temperatura del inyector 280 °C. Gas portador: Nitrógeno.

Las determinaciones de HPLC se hicieron usando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 que consiste en una bomba Cuaternaria HP G1311A, detector UV HP 61315A. Las mejores condiciones se obtuvieron usando una columna de fase reversa Lichrosorb RP-18, (5 μm , 200 x 4.6 mm). Se usaron los siguientes métodos:

Método A: Como fase móvil se usó una mezcla de buffer pH 3.5:acetonitrilo, 35:65, con un flujo de 1 mL/min. El buffer está compuesto por ácido fosfórico 5×10^{-2} M con trietilamina (TEA) 1.44×10^{-2} M, y se ajustó a pH 3.5 con NaOH.

Método B: se usó un programa de gradiente: Fase móvil A: buffer acetato 0.025 M pH 4.5- acetonitrilo 60-40, y fase móvil B buffer acetato 0.025 M pH 4.5- acetonitrilo 20-80, se aplicó el siguiente gradiente: 0-10 min (gradiente lineal fase móvil A: 100% a 50%), 10-14 min (isocrático, fase móvil A: 50%) y 14-20 min (gradiente lineal fase móvil A: 50% a 0%), guardando las condiciones cromatográficas: flujo = 1ml/min y detección a 254 nm.

8.1.2 Purificación de Solventes

Ciclohexano

El producto comercial puro se dejó sobre cinta de sodio durante varios días y luego se destiló sobre este elemento. Se recogió la fracción de punto de ebullición 81-82 °C.

Benceno

El producto comercial previamente destilado o secado sobre sulfato de sodio anhidro se dejó sobre cinta de sodio durante varios días luego se destiló sobre este elemento. Se recogió la fracción de 80-81 °C.

Tetrahidrofurano

El producto comercial se dejó durante 24 horas sobre lentejas de hidróxido de sodio. Se filtró y se calentó a reflujo sobre sodio metálico y benzofenona, hasta que la solución presentó color azul. Luego se destiló recogiendo la fracción de punto de ebullición 66-67 °C y se guardó en un balón con tapa esmerilada y al abrigo de la luz. Previa a su utilización se pasó por una columna de alúmina básica para eliminar los peróxidos que pudieran haberse formado.

Cloruro de metileno

El producto comercial se destiló y se recogió la fracción de punto de ebullición de 39-40 °C.

Isopropanol

El producto comercial se destiló y se recogió la fracción de punto de ebullición de 82-83 °C.

Acetato de Etilo

El producto comercial se destiló y se recogió la fracción de punto de ebullición de 76-77 °C.

Metanol

El producto comercial se destiló y se recogió la fracción de punto de ebullición 64.5-65. Para las medidas de fluorescencia se usó metanol grado HPLC

Acetonitrilo

Se usó acetonitrilo grado HPLC, el cual se filtró por filtro de membrana 0.45µm

8.2 Síntesis de productos de degradación

8.2.1 Síntesis de 2-amino-5-clorobenzofenona.

Se preparó por condensación de cloruro de benzoilo con p-cloroanilina, siguiendo el método desarrollado en nuestro laboratorio.¹ Su pureza se confirmó por TLC.

Se calentó 81 g, (67.5 ml-67.6 mmol) de cloruro de benzoilo hasta 120 °C y se agregó, en porciones y agitando, 33 g (259 mmol) de p-cloroanilina. La mezcla se calentó hasta 180 °C, y se agregó 45 g (33mmol) de cloruro de zinc, la temperatura se elevó gradualmente hasta 220-230 °C y se dejó reaccionar a dicha temperatura hasta que cesó la eliminación de ácido clorhídrico (1-2 horas). La mezcla se enfrió a 120 °C, se agregó cuidadosamente 240 ml de ácido clorhídrico 3N, se agitó y se calentó a reflujo. Se decantó la capa ácida caliente. Este procedimiento se repitió varias veces para eliminar el cloruro de zinc y para eliminar el ácido benzoico producido por hidrólisis del cloruro de benzoilo en exceso.

El producto de condensación crudo, insoluble en agua, se disolvió en 50 ml de ácido sulfúrico 75% v/v y se sometió a reflujo durante 40 min para completar la hidrólisis, la solución caliente se vertió sobre 500g de hielo molido y se diluyó con 250 ml de agua.

El material orgánico se extrajo con cloruro de metileno, (4% 60 ml). El extracto se lavó con ácido clorhídrico 3N (4 porciones de 250 ml cada una) para eliminar los restos de p-cloroanilina, y con NaOH 5N, para eliminar los restos de ácido benzoico. El extracto se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó el solvente a presión reducida. Se recristalizó con metanol obteniéndose un producto de pf 77-78 °C, que luego se recristalizó con metanol. Se obtuvo un precipitado de pf 83-85 °C. Posteriormente se recristalizó con éter de petróleo: cloruro de metileno 3:1 y se obtuvo un precipitado de pf 96 °C (lit 95-97 °C).²

¹H RMN: 5.91(s, 2H, NH₂); 6.56 (d, 1H, H-3); 7.1(d, 1H, H-4); 7.3-7.8(m, 6H, H-6. H-9, H-10, H-11).

¹³C RMN: 119.8- 118.1 (C1, C3, C5); 128.9 (C10-13); 131.1-13.4 (C6,C9-C13, C10-C12, C11); 133.06 (C4); 133.9 (C8); 191.9 (C2); 197.0 (C7).

EM : m/c : (ion, ab.rel., %): 233 ([M+2]⁺, 29.5); 232 ([M+1]⁺ o [M-1+2]⁺, 47); 231 ([M]⁺,88); 230 ([M-H]⁺, 100); 216([M-OH+2]⁺, 2); 214 ([M-OH]⁺, 5.5); 195 ([M-ClH]⁺, 15.5);

151([M-Ph+2]⁺, 8.5); 149 ([M-Ph]⁺, 27.5); 128 ([M-PhCO+2]⁺, 5.5); 126 ([M-PhCO]⁺, 17.5), 105 (37.5); 77(57.5).

8.2.2 Síntesis de 2 - amino - 3, 5 - diclorobenzofenona.

Se sintetizó por cloración de la 2-amino-5-clorobenzofenona con cloruro de sulfurolo siguiendo el método desarrollado en nuestro laboratorio.¹

Se pesó 0.5 g de 2-amino-5-clorobenzofenona y se adicionó 12.7 ml de éter etílico anhidro y se disolvió. Después se enfrió en hielo y se agregó gota a gota 0.63 ml de cloruro de sulfurolo bajo agitación continua. Luego se colocó en reflujo y se calentó muy suavemente por 15 min.

Se lavó dos veces con agua, y luego con bicarbonato de sodio al 10% y nuevamente con agua, hasta que los lavados fueran de pH neutro. Se secó con sulfato de magnesio y se filtró.

Se eliminó el solvente por evaporación, obteniéndose un aceite de color marrón. Se disolvió el extracto en metanol y carbón activo y se cristalizó en frío. De esta manera se obtuvieron cristales amarillos en forma de aguja y punto de fusión 97---99 °C (lit 98-100 °C).²

Se identificó los cristales por medio de TLC, con eluyente tolueno-ciclohexano, 90-10 contra un patrón.

¹H RMN: 6.43 (s ancho, 2H, NH₂); 7.15 (d, J=2, 2H, H-4, H-6); 7.2-7.6 (m, 5H, H-9, H-10-H-11).

¹³C RMN: 128.2-129.0 (C1-C5, C6, C3, C9, C0, C12, C13); 131.7 (C4); 131.9 (C-11); 133.2 (C8); 222.4(C7).

EM: m/c: (ion, ab.rel. %): 269.8; 268.17; 267.0 ([M+2]⁺, 37); 266 ([M-1+2]⁺, 83); 265([M]⁺, 83); 264([M-1]⁺, 100); 249([M-OH+2]⁺, 3); 247([M-OH]⁺, 5.5); 230(7); 228([M-HCl]⁺, 28.5); 190([M-Ph+2]⁺, 12); 188([M-Ph]⁺, 18.5); 162([M-PhCO+2]⁺, 7.5); 160 ([M-PhCO]⁺, 11.5); 105 (68); 77(84).

8.2.3 Síntesis de 2-(N- metil) amino-5-clorobenzofenona

Este compuesto fue preparado por tosilación de la 2-amino-5-clorobenzofenona, seguido de metilación y subsecuente detosilación.

Tosilación : Se sometió a reflujo una solución de 6.5 g (28 mmol) de 2-amino-5-clorobenzofenona, y 6.3 g (33.3 mmol) de cloruro de p-toluculfonilo en 27.8 ml (27.3 g, 345 mmol) ($d=0.982$ g/ml) de piridina durante 90 minutos. Se destilaron 13.4 ml (13.15g, 166 mmol) de piridina, el residuo se vertió sobre 74.5 ml de agua y se agitó hasta solidificación del aceite.

El precipitado obtenido se filtró y se lavó consecutivamente con agua caliente y éter de petróleo 30-40. Se recrystalizó en etanol obteniéndose 9.3 g de 2-tosilamidobenzofenona que corresponde a un rendimiento del 99%. Pf 119-120 °C (lit 120-121 °C).²

Metilación: Se agregó una solución de 6.67 g (290 mmol) de sodio en 100 ml de metanol, a una solución de 9.3 g (24 mmol) de 2-tosilamidobenzofenona seca en 90 ml de tolueno. La mezcla se agitó y se sometió a reflujo durante 90 minutos. Se destiló el metanol y una pequeña parte del tolueno y se agregó 6.12 g (4.52 ml, 48.5 mmol) de sulfato de dimetilo al derivado sódico precipitado. La mezcla se agitó y se sometió a reflujo durante una hora.

Se agregó 60 ml de NaOH 6 N y se sometió a reflujo durante una hora con el objeto de destruir el exceso de dimetil-sulfato. La mezcla se enfrió, se separó la fase orgánica que se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el solvente por destilación del mismo a presión reducida. El residuo amarillo se purificó por recrystalización con metanol. Rendimiento 9.6 g, Pf 150-152 °C (lit 151-152 °C).²

Detosilación: Se adicionaron 96 g (24 mmol) de N-metil-2-tosilamidobenzofenona sobre 192 ml de ácido sulfúrico 70%, precalentado a 105 °C. La mezcla se agitó y calentó hasta 145 °C, hasta obtener una solución clara (aproximadamente 10 minutos), que luego se volcó sobre hielo granizado. El producto amarillo se filtró, lavó con agua y se recrystalizó con éter de petróleo. Se obtuvo un producto cristalino de Pf 95-97 °C (lit 94-95 °C).²

EM: m/e: (ion, ab. rel., %): 247([M+2]⁺, 33); 246 ([M-1+2]⁺, 39); 245([M]⁺, 100); 244([M-H]⁺, 78); 230([M-OH+2]⁺,14); 228([M-OH]⁺,39); 209([M-ClH]⁺,6); 193([M-OH-Cl]⁺,29); 170([M-Ph+2]⁺,5); 168([M-Ph]⁺,18); 133(8.5); 105 (22); 77 (47).

8.2.4 Síntesis de 2-(N metil) amino-3,5-diclorobenzofenona.

Se pesó 0.544 g (2.21 mmol) de 2-(N-metil)amino-5-clorobenzofenona en 12.7 ml ($\rho=0.713$ g/cm³, 9.06 g, 122 mmol) de éter etílico anhidro, previamente enfriado a 0 °C y se

agregó gota a gota bajo continua agitación 0.63 ml ($\rho=1.667$ g/ml, 1.050 g, 7.8 mmol) de cloruro de sulfurilo. Se formó un precipitado blanco amarillento que se disolvió lentamente. Todavía había cantidad apreciable de este precipitado a los 5 min. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 min al final de los cuales la solución se oscureció. La mezcla de reacción se lavó con 15 ml de agua, 5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua, como lo indica el método descriptivo en la literatura para la cloración del etil-o-arselinato.³ La solución se secó en sulfato de magnesio anhidro y se destiló el éter a presión reducida. El residuo aceitoso obtenido se analizó inmediatamente por TLC observándose por el producto formado es una mezcla de benzofenonas.

La separación de la mezcla de reacción se hizo por TLC preparativa ante la imposibilidad de cristalización. Para ello se evaluó la resolución de los siguientes sistemas de eluente:

1. Tolueno : ciclohexano (90 : 10)
2. Tolueno: acetona (20 : 0.2)
3. Tolueno : ácido acético (100 : 0.4)

Mostrando 1 y 3 mejor resolución. Se hicieron dos corridas de TLC preparativas consecutivas usando primero el eluente 1 y luego 3.

La banda correspondiente a la 2-(N metil) amino-3, 5-diclorobenzofenona se raspó y se extrajo de la sílica gel con benceno. La solución bencénica resultante se filtró, dos veces por placa filtrante se llevó a sequedad obteniéndose un producto aceitoso, rendimiento 2.397 mg (6.9%). Posteriormente en otra síntesis a fin de lograr mayor grado de pureza se utilizó benceno: acetona 20:0.2 como solvente de desarrollo de las placas.

¹H RMN: 2.8(d, J=5.3hz, colapsa a un singulete por intercambio con D₂O, CH₃NH); 5.6 (s, ancho, 1H, desaparece por intercambio con D₂O, CH₃NH); 7.15 (d, J=2.0, 1H, HA); 7.40 (d, J=2, 1H, H6); 7.5-7.9(m, 5H, H9,H10,H11)

¹³C RMN: 34.3(C14); 128.1 (C1); 129.5 (C4,C6); 131.2(C9-C13); 132,7(C8)

EM: m/e: (ion ab. rel. %): 281 ([M+2]⁺, 53); 279 ([M]⁺, 86); 264([M-OH+2]⁺, 52); 2629[M-OH]⁺, 74); 229([M-OH-Cl+2]⁺,25.5); 227([M-OH-Cl]⁺,70); 204([M-Ph+2]⁺, 19); 202([M-Ph]⁺, 31); 176([M-PhCO+2]⁺,6); 174([M-PhCO]⁺,12); 169([M-Ph-Cl+2]⁺,7), 167([M-Ph-Cl]⁺,19.5); 105(52); 77(100); 51(38).

8.2.5 Síntesis de 2-Cloro-9,10-acridinona.⁴

Se pesó 141 mg de HNa 40% por diferencia en éter de petróleo y se lavó dos veces con éter de petróleo sobre una placa filtrante.

Se disolvió 0.5 g de 2-amino-2',5-diclorobenzofenona en 20ml de DMSO. Se agregó el HNa con agitación. La solución se tornó naranja rojizo, y luego pasó al rojo. Se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y la mezcla resultante se volcó sobre 100 ml de agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). La fase orgánica se lavó con NaOH y agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el solvente a presión reducida. Se obtuvieron 0.547 g de un sólido amarillo pardo que no fundió hasta los 250 °C. Se recristalizó en metanol o acetona y se obtuvo un precipitado amarillo, soluble en DMF, que se calentó hasta 250°C y no fundió.

E.M.: m/e (ion, ab. rel.,%):231([M+2]⁺,30.2); 230([M+1]⁺, 15.7); 229([M]⁺, 100); 202([M-CN]⁺, 5); 201([M-CO]⁺,12); 200([M-CO-H]⁺, 5); 184([M-Cl]⁺, 8); 174([M-CO-Cl]⁺, 3); 173([M-CO-CN-H]⁺, 3); 156([M-CO-Cl]⁺, 28) 155 ([M-CO-Cl-H]⁺, 8); 154([M-CO-Cl-H-H]⁺, 8); 123([M-Cl-CO-CN]⁺,12).

8.2.6 Síntesis de 2-Cloro-10-metil-9,10-acridinona.

Se pesaron 0.024 g de sodio y se disolvieron en 50 ml de metanol. Esta solución se agregó a una solución de 0.02 moles de 143 suspendido en 75 ml de tolueno anhidro. Se calentó a reflujo durante 90 minutos. Se evaporó el metanol y una parte del tolueno y se añadieron 0.413 ml (d=1.33, 0.04 moles, 0.6 g) de sulfato de metilo y se sometió a reflujo durante una hora. Se agregó a 6 ml de NaOH 3 N para destruir el exceso de sulfato de alquilo. Se agregó agua y el producto se extrajo con 3 x 20 ml de cloruro de metileno. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro, y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio.

E.M.: m/e (ion, ab. rel., %): 245 ([M+2]⁺, 36.4); 244([M+1]⁺, 25.3); 243([M]⁺,100); 242 ([M-H]⁺, 29); 228 ([M-CH₃]⁺, 25); 215 ([M-CO]⁺,5); 214([M-CO-H]⁺, 15); 208([M-Cl]⁺, 4); 200([M-CH₃-CO]⁺, 32); 173([M-CH₃-CO-CN]⁺, 6); 165([M-CO-Cl-CH₃]⁺, 12); 164([M-Cl-CH₃-COH]⁺, 28); 163([M-Cl-CO-CN]⁺, 6); 162([M-Cl-CO-CN-H]⁺,27).

8.2.7 Síntesis de 2,4-Dicloro-10-metil-9,10-acridinona.

Se pesó 0.538 g (2.21 mmol) de 2-cloro-10-metil-9,10-acridinona, y se suspendió en 15 ml ($d=0.713 \text{ g/cm}^3$, 10.69 g, 44.5 mmol) de éter etílico anhidro enfriado a 0°C , y se agregó gota a gota, bajo continua agitación, 0.63 ml ($d=1.667 \text{ g/cm}^3$, 1.050 g, 7.8 mmol), de cloruro de sulfurilo. Se formó un precipitado que se disolvió lentamente. La mezcla se calentó a reflujo durante 15 minutos, según lo indica la técnica de la literatura¹ para otro compuesto. Se lavó sucesivamente con 5 ml de agua, 5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio y finalmente con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó el éter por destilación a presión reducida. El producto obtenido se analizó por TLC y se aisló el compuesto 2,4-dicloro-10-metil-9,10-acridinona, que se purificó por TLC.

$^1\text{H RMN (CL}_3\text{CD): 4.0, (s, 3H, CH}_3\text{); 6.9-7.6, (m, 6H, aromáticos).$

EM: m/e (ion, ab. rel.,%): 279 ($[\text{M}+2]^+$,43); 277($[\text{M}]^+$, 74); 264 ($[\text{M-CH}_3+2]^+$,40); 262($[\text{M-CH}_3]^+$,28); 241($[\text{M-ClH}]^+$,9); 236($[\text{M-CO-CH}_3+2]^+$,38); 234($[\text{M-CO-CH}_3]^+$,17); 105($[\text{PhCO}]^+$,5); 77($[\text{Ph}]^+$, 18); 57(100).

8.2.8 Síntesis de 2-4-Dicloro-9,10-acridinona

Se partió de la 2-cloro-9,10-acridinona, y se procedió de igual manera que en el caso anterior.

E.M. (m/e, frag.,%): 267(9); 266(7.5); 265($[\text{M}+2]^+$,63); 263($[\text{M}]^+$, 100); 237($[\text{M-CO}+2]^+$, 5); 235($[\text{M-CO}]^+$, 8.8); 230(1.1); 228($[\text{M-Cl}]^+$, 8.1); 202(7.2); 201 (4.3); 200 (23.7); 192 (5); 173(6.5); 164(59.4); 151(3.75); 132(8.7); 131(10); 118(10); 117(15); 101(8.8); 100 (20).

8.2.9 Síntesis de triazolaminoquinolina

Se disolvió 186 mg de Alprazolam en 2 mL de MeOH, luego se agregó 4 mL de HCl 0.33 N, para generar la benzofenona respectiva. Inmediatamente después que el pH de esta solución se ajustara rápidamente a pH 9.0 con el agregado de KOH 2.0 N, 2.0 mL de anhídrido acético disuelto en 4 mL de THF se adicionó con constante agitación. Después de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se llevó a sequedad por presión de vacío.

El residuo se disolvió en metanol y luego se agregó 10 mL de KOH 2N y la solución se calentó a 90 °C durante 6 horas. Después de que la solución se enfrió se procedió a extraerla con 5 mL de benceno y después se secó a presión de vacío.

La purificación se hizo mediante cromatografía de capa fina usando placas de sílica gel y como solvente metanol-isopropanol-cloroformo 5-15-80, (R_f quinolina 0.77 y R_f alprazolam 0.62, R_f benzofenona 0.49). El porcentaje obtenido fue de 83%. La caracterización espectroscópica se describe en el capítulo 5.

8.3 Método de valoración de aminobenzofenonas

La estandarización del método de cromatografía gaseosa se realizó usando los patrones de cada una de las benzofenonas sintetizadas. Aplicando el método descrito en 8.1.1 se obtuvieron los siguientes tiempos de retención:

Benzofenona (estándar interno), $4.00 \pm 0,03$ min; 2-(N,N-dimetilamino)-5- clorobenzofenona (5), $12.00 \pm 0,03$; 2- amino -5- clorobenzofenona (1), $3.00 \pm 0,03$; 2-(N-metilamino)-5- clorobenzofenona (2), $15.48 \pm 0,03$; 2-amino-3,5-diclorobenzofenona (3) $16.05 \pm 0,03$; 2-(N-metilamino)-3,5- diclorobenzofenona (4), $18.00 \pm 0,03$.

La cuantificación de las aminobenzofenonas se realizó usando como estándar interno benzofenona.

Determinación de acridinonas por TLC cualitativa, utilizando placas de sílica gel sin indicador, como solvente de desarrollo tolueno: ciclohexano 90:10 y como revelador: luz UV.

8.4 Estudios Cinéticos de aminobenzofenonas

8.4.1 Se prepararon soluciones de las benzofenonas a estudiar en concentraciones finales del orden 3×10^{-3} M, a las cuales se les agregó benzofenona como estándar interno. Las soluciones se prepararon con metanol destilado, adicionando agua destilada y HCl en las proporciones adecuadas para cada una de las condiciones de reacción a estudiar. Durante la preparación de las soluciones se trabajó a bajas temperaturas y lo más rápido posible para impedir el inicio de la reacción.

Luego se colocaron alícuotas de dichas soluciones en ampollas, que se sellaron a la llama y se colocaron simultáneamente en un termostato a 80 °C.

Se realizaron cinéticas preliminares con el propósito de conocer y de determinar aproximadamente parámetros de las reacciones a analizar como el tiempo de vida media, tiempo infinito, frecuencia de muestreo.

Las cinéticas preparadas y analizadas fueron las siguientes: Los números dados a los compuestos se refieren al capítulo 3)

- Cinéticas de **2** en concentraciones de HCl 0.5; 1.0 y 1.5 M. Se observó que estas reacciones son rápidas y por tanto para seguirlas se necesita una frecuencia de muestreo de dos veces por día.

- Cinéticas de **1** en concentraciones de HCl 0.5; 1.0 y 1.5 M. Estas reacciones son más lentas que las anteriores, necesitan una frecuencia de muestreo de una vez al día y un tiempo de monitoreo de 30 días.

- Cinéticas de **3** y **4** en concentraciones de HCl 0.5 M y metanol: agua 1:1 son reacciones bastante lentas, particularmente la reacción de **3** que aún continúa reaccionando después de 30 días de observación. La reacción de **4** tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 10 días. En ambas reacciones hay formación de acridinonas desde los primeros días de iniciada la reacción.

Las reacciones que se estudiaron finalmente son las reacciones de **1** y **2** en concentraciones de HCl de 0.5; 1.0 y 1.5 M en metanol con 16% de agua a 80 °C y reacciones de **3** y **4** en concentraciones de HCl de 0.5; 1.0 y 1.5 M en metanol con 16% y 50% de agua a 80 °C.

8.4.2 Cinéticas bajo atmósfera de nitrógeno. Se prepararon soluciones de 2-(N-metilamino)-5-clorobenzofenona en concentraciones de aproximadamente 3.00×10^{-3} M, de la manera como se ha descrito, la reacción bajo atmósfera de nitrógeno se realizó en ampollas donde después de envasada la solución, se saturaron las ampollas con gas nitrógeno e inmediatamente se sellaron a la llama.

8.4.3 *La reacción con inhibidores de radicales libres* se preparó agregando hidroquinona a la solución de reacción en cantidad suficiente para una concentración final de 3.00×10^{-3} M.

8.4.4 *Procesamiento de muestras.* A intervalos adecuados se retiraron muestras de los termostatos, y se enfriaron a fin de detener la reacción. La extracción de las benzofenonas de la mezcla de reacción se realizó con el siguiente procedimiento:

Se realizaron tres extracciones consecutivas con cloruro de metileno. El cloruro de metileno se usó dada la alta solubilidad que tienen las benzofenonas en este solvente.

Después se lavó la fase orgánica con agua destilada hasta neutralidad de los líquidos de lavado. Posteriormente se secó el extracto orgánico con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y finalmente se evaporó a sequedad. Previamente a la inyección en el cromatógrafo se disolvió nuevamente en 0.1 ml de cloruro de metileno y se inyectó 0,5 μ l de esta solución.

8.4.5 *Determinación de los gases involucrados en la reacción.* El análisis se llevó a cabo usando tubos Dräger (Drägerwerk. Aktiengesellschaft, Germany). Un extremo del tubo se conectó a una bomba de vacío. El otro extremo se conectó a la ampolla donde está contenida la mezcla de reacción por medio de una conexión de latex. El vacío se produjo por medio de una jeringa conectada a la bomba de vacío.

Se quebró la punta del tubo y la punta de la ampolla, y el color del tubo Dräger se comparó con una reacción blanco, conteniendo todos los reactivos iniciales en la mezcla de solvente correspondiente..

a) *Determinación de H₂:* Se usaron tubos Dräger, con un catalizador de la reacción $H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$, y un indicador de humedad. El color azul desarrollado por los gases presentes evidencia la formación de agua que indica la presencia de hidrógeno en los gases de las ampollas de reacción.

- b) *Determinación de cloro*: Se usaron tubos Dräger, que contienen un material absorbente sin reactivo, y una porción de material absorbente con o-tolidina que produce un color amarillo con cloro. No se observó desarrollo de color en las ampollas de reacción.

8.5 Degradación de Alprazolam por hidrólisis:

Los experimentos de ^1H RMN y ^{13}C RMN se realizaron para observar el producto de la hidrólisis reversible de alprazolam, se determinaron en una solución de 40 mg de alprazolam en cloroformo deuterado adicionando ácido trifluoroacético deuterado.

Los experimentos de hidrólisis en condiciones severas se llevaron a cabo preparando soluciones de alprazolam 3.00×10^{-3} M con HCl 0.1N y 6N en MeOH:H₂O, 1:1 y se refluxaron durante 3 horas. Después se evaporaron hasta sequedad a presión reducida. El residuo se redisolvió en cloruro de metileno, se lavó con NaOH 15% y finalmente se secó y evaporó. Este residuo final se analizó por TLC y HPLC usando el método A.

8.6 Degradación de Alprazolam por oxidación: Se preparó una solución de alprazolam 3.00×10^{-3} M en CH₂Cl₂ y CHCl₃, agregando H₂O₂ en exceso, se dejó este sistema bifásico agitando con y sin reflujo durante 5 días, analizando frecuentemente el avance de la reacción con TLC. Luego la mezcla de reacción se lavó con suficiente agua destilada para eliminar el peróxido de hidrógeno, se secó con sulfato de magnesio y se filtró. Finalmente se llevó a sequedad aplicando vacío.

Los ensayos de TLC se desarrollaron usando folios de Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck, como fase móvil: cloruro de metileno:acetona, 30:70 y revelando con luz UV 254 nm.

8.7 Degradación de Alprazolam por fotólisis

8.7.1 El fotoreactor usado para estudios fotoquímicos consta de una lámpara de Metal Haluro HPA de 400 W.

La calibración de la lámpara se hizo de acuerdo al siguiente ensayo:

Se preparó una solución de quinina monoclorhidrato dihidrato al 2% en agua milliQ y se envasó en ampollas de 10 ml que luego se sellaron a la llama.^{5,6} Estas muestras se exponieron a la lámpara después de que esta se había permanecido encendida como mínimo dos horas. Las ampollas se colocaron en un dispositivo giratorio para asegurar que reciban igual iluminación. Cada hora se retiraron dos ampollas y se midió la absorbancia a 400 nm.⁷

La fotodescomposición en medios acuosos se estudió preparando soluciones de alprazolam de concentración 3.2×10^{-3} M reguladas con buffer fosfato (6.4×10^{-4} M) - citrato (6.8×10^{-4} M), se adicionó H_3PO_4 para conseguir un pH 2.0, 3.6 y 5.0. Para pH 10.0 se usó un buffer de ácido bórico 0.025 M, KCl 2×10^{-4} M y NaOH 0.04 M. Las muestras se envasaron en frascos herméticos y se sometieron a la irradiación natural directa durante 88 días y otros se irradiaron artificialmente durante 10 días.

Idénticas muestras fueron sometidas a 80 ± 1 ° C en un termostato al abrigo de la luz.

Se extrajeron cada una de las muestras anteriores con diclorometano, se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se evaporó hasta sequedad, luego se disolvieron en la fase móvil y se analizaron por HPLC usando el método A.

Estudios cinéticos: se preparó una solución de alprazolam de 3.2×10^{-3} M en solución de buffer fosfato-citrato pH 3.6, la solución se envasó en un matraz y se sometió a irradiación artificial. Se sacaron alícuotas de 5 ml cada hora durante las primeras 8 horas de reacción, las cuales se procesaron como se indicó arriba y se analizaron por HPLC usando el método A y TLC.

Después de conocer los productos de degradación formados, el mismo experimento fue llevado a cabo usando en este caso el método B de HPLC para analizar las alícuotas extraídas.

8.7.2 Separación de productos formados por fotólisis

Preparación de la solución preparativa: 1.0 g de alprazolam fue disuelto en 130 ml de metanol, esta solución se llevó a un litro con buffer fosfato-citrato pH 2.0. La solución obtenida se envasó en matraces y se irradió durante 10 días.

La solución se alcalinizó a pH 8.0 con NaOH, se enfrió, y así se formó un precipitado amarillo que fue removido mediante filtración. (*Sólido*).

El sobrenadante se extrajo con diclorometano, (*Extracto*), lavándose repetidas veces con agua para eliminar sales provenientes del buffer. En primera medida se estudió los compuestos presentes en este extracto.

Resolución del Extracto

Para la separación de los productos de degradación se examinó un alto número de sistemas de elusión mediante TLC cualitativa hasta obtener las condiciones óptimas de separación. Los resultados muestran que el extracto es una mezcla compleja de compuestos imposible de resolverse mediante la aplicación de cromatografía de columna. Entonces la mezcla se resolvió mediante la aplicación de sucesivas placas de cromatografía en capa preparativa, de esta manera se lograron separar tres productos de degradación mayoritarios:

La primera resolución se realizó usando placas de sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) preparativas y como eluente EtOAc:MeOH:TEA, 70:30:0.4. Se revelaron con luz UV 254 y 366 nm cuatro manchas las cuales fueron removidas de la placa y extraídas con metanol. La suspensión se filtró y luego evaporó a sequedad. El residuo obtenido se redisolvió en cloroformo, nuevamente se filtró y evaporó. Las fracciones obtenidas se continuaron purificando por TLC y HPLC como se indica abajo para separar los productos de degradación:

Triazolbenzofenona

Este compuesto se purificó trabajando con cromatografía preparativa con sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄), e isopropanol 100% como solvente (R_f alprazolam 0.20 y R_f triazolbenzofenona 0.27). En seguida se aplicó cromatografía preparativa usando celulosa y como eluente NaOH 0.2N (R_f alprazolam 0.35 y R_f triazolbenzofenona 0.49). En ambos casos se reveló con lámpara UV 254nm.

Las fracciones obtenidas se terminaron de purificar con HPLC, columna C-8, fase móvil: agua-acetonitrilo, 60-40, detector UV 220 nm, (t_r alprazolam 14.3 y t_r triazolbenzofenona 12.0). Las fracciones se llevaron a sequedad a presión reducida, después se redisolvieron en cloroformo por sonicación, finalmente se filtraron y se llevaron a sequedad.

Este compuesto también se aisló de la irradiación de una solución de alprazolam en metanol, en este caso la separación se logró mediante cromatografía preparativa con sílica gel

con AcOEt-MeOH-TEA, 50-50-0.5 para las primeras placas y luego con AcOEt-CH₂Cl₂-TEA 30-70-0.5.

Este compuesto también se aisló de tabletas de alprazolam sometidas a degradación usando la lámpara descrita, y se separó como se indica arriba.

8H alprazolam: (1-metil-6-fenil-4H-s-triazo-[4,3- α][1,4]benzodiazepina),

Este compuesto se purificó desarrollando placas de sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) en cloroformo-metanol, 100-5, (R_f alprazolam 0.56 y R_f 8H alprazolam 0.52). Las manchas se visualizaron con luz UV, 254 nm, y se extrajeron de la sílica con metanol, se filtró y evaporó y el residuo se redisolvió en cloroformo y se sometió a una segunda separación por cromatografía preparativa, esta vez usando celulosa (Aldrich) y NaOH 0.2N (100%), como solvente. (R_f 8H alprazolam 0.65). Las manchas se removieron con metanol, se filtró y evaporó; después de redisolvieron con cloroformo, se filtró para remover restos de celulosa y se llevó a sequedad.

El residuo se redisolvió en una mezcla de buffer acetato 0.025M (pH 4.5): acetonitrilo (40:60 v/v) y se procedió a una última purificación con HPLC usando el método de gradiente con las mezclas: A: buffer acetato 0.025M –acetonitrilo 80-20 y B: buffer acetato 0.025M –acetonitrilo 20-80. Aplicando el siguiente gradiente: 5 min B (50%), 7 min B (100%). (t_r alprazolam 10.7 min y t_r 8H alprazolam 8.1 min)

Triazolaminoquinolina

Este compuesto se purificó aplicando los siguientes sistemas de cromatografía de capa preparativa: sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) con acetato de etilo-cloruro de metileno-trietilamina 70:30:0.4 (R_f alprazolam 0.05 y R_f quinolina 0.15). Como revelador se usó luz UV 254 nm y 366nm. Finalmente se extrajo de la sílica con metanol como se indica arriba.

Resolución del precipitado

Después de 10 días de irradiación se observó un precipitado amarillo en la solución irradiada. Este precipitado se separó por filtración, lavó y secó; el sólido así obtenido solamente fue posible solubilizarlo en metanol. En los primeros análisis que se hicieron por TLC usando

sílica gel, no se encontró un eluyente apropiado; con metanol se logró eluirlo pero de manera muy difusa, la adición de ácidos o bases no mejoró la separación.

Después de muchas manipulaciones se observó que un sólido amarillo también precipita al alcalinizar la solución. Este sólido es soluble en solventes menos polares, haciendo más fácil separarlo de las sales del buffer mediante la solubilización del sólido en acetato de etilo, seguido de varios lavados y extracción, después se secó con sulfato de magnesio y se evaporó.

Los ensayos por TLC mostraron que se trata de una mezcla de compuestos de diferentes polaridades, por lo tanto se emprendió a hacer la primera separación en una columna que permitiera separar los compuestos más polares de los menos polares.

Esta se hizo usando sílica gel y como solventes:

AcOEt-MeOH, 7-3 para recoger la fracción 1

MeOH-TEA, 50-0.1 para recoger la fracción 2

El análisis de la fracción 1 mediante TLC y estándares revela que ésta es una mezcla de los productos separados en el extracto I.

La fracción 2, no fue posible analizarla con TLC usando sílica gel como soporte, ya que no se encontró una fase móvil adecuada, nuevamente se obtuvo una mancha difusa que solamente eluye al frente del solvente con metanol y TEA.

Por este motivo se buscaron otros soportes para la separación, se ensayó primero en fase reversa. Usando metanol y ácido fórmico se separa la mezcla en varias manchas difusas, las cuales se procedieron a separar mediante columna, usando como solventes:

MeOH -buffer fórmico pH 2.8, 50-50 y 70-30 para eluir manchas no definidas

MeOH-ácido fórmico 50%, 10-0.8 para eluir la mancha más definida. *Compuesto 4*.

Por otra parte, el análisis por TLC usando alúmina como soporte indicó que en esta fase el sólido obtenido se separa en tres manchas. Se realizó una columna usando mezclas progresivas de acetato de etilo-metanol-TEA, 50-5-0.5, 50-10-0.5 para separar el *compuesto 5* y 30-70-0.5 para separar el *compuesto 6* y *compuesto 4*. Esos números se refieren a los compuestos cuyas estructuras se muestran en el capítulo 5.

8.8 Cromatografía en placa preparativa

Las placas de cromatografía para separaciones preparativas se prepararon con sílica gel G₂₅₄, se emplearon placas de 1 mm de espesor que fueron activadas como mínimo 3 horas en 105 °C. En algunos casos se utilizaron dos o más corridas consecutivas que se detalla en el caso correspondiente. Se revelaron con luz UV.

Las placas de celulosa preparativa se prepararon usando 10 gramos de celulosa (Aldrich) en 30 ml de agua, usando extensor de placas, con un espesor de 1mm, no fue posible preparar placas de mayor espesor con este absorbente porque al secarse se resquebrajan.

8.9 Irradiación de soluciones metanólicas de Alprazolam

8.9.1 *Estudios cinéticos*: Se preparó una solución de 3.27×10^{-3} M de alprazolam en metanol, la solución resultante se envasó en un matraz y se irradió artificialmente durante 5 días. Se sacaron alícuotas de 5 ml que se analizaron por HPLC usando el método A.

8.9.2 *Fotodegradación de alprazolam con H₂O₂ en metanol*. A 50 ml de una solución de alprazolam (3.02×10^{-2} M) se le adicionó 2 ml de peróxido de hidrógeno (200 vol). La solución resultante se irradió como se describe arriba. La reacción se monitoreó durante 9 días, sacando alícuotas que se trataron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se analizaron por TLC con sílica gel e isopropanol como eluente.

8.9.3 *Aislamiento de los principales productos de descomposición*: 500 mg de alprazolam se disolvieron en 500 ml de metanol, la solución obtenida se irradió artificialmente durante 10 días. El solvente de la solución irradiada fue removido por evaporación.

El residuo se analizó por TLC, usando placas de sílica gel (Merck TLC Silica 60 F₂₅₄) con acetato de etilo-metanol-TEA, 95-5-0.4. Las manchas se revelaron con luz UV, 254 nm, y se extrajeron de la sílica con metanol. El solvente se evaporó a presión reducida. Los extractos se disolvieron en cloroformo, se filtraron por succión y el solvente nuevamente se evaporó. Después se purificó nuevamente por TLC usando como eluente isopropanol, los productos se extrajeron de la sílica como se acaba de describir.

8.10 Medidas de Fluorescencia

Se utilizaron soluciones de alprazolam con concentración 2.75×10^{-3} M reguladas con buffer fosfato (6.4×10^{-4} M) - citrato (6.8×10^{-4} M), al que se adicionó NaOH o H_3PO_4 para conseguir pHs: 2.0, 3.6 y 5.0. La fuerza iónica de cada solución se ajustó a 0.335 con NaCl.

Las soluciones se envasaron en frascos matraces y se irradiaron con una lámpara de Metal Haluro de Media presión, Philips HPA- 400 watos. Alícuotas de 5 ml se removieron periódicamente e inmediatamente se analizaron usando un espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer, LS-5. La fotodecomposición se estimó midiendo la emisión a 435 nm después de excitar con una longitud de onda de 260.

Soluciones de buffer sin alprazolam también se irradiaron y se les midió la fluorescencia.

8.11 Medidas de Absorbancia.

Se preparó una solución de alprazolam 2.75×10^{-3} M en buffer pH 3.6. La solución se irradió, alícuotas de 5 ml se retiraron periódicamente, se diluyeron a 6.64×10^{-5} M con buffer pH 2.0 y se registró el espectro UV inmediatamente usando un espectrofotómetro Shimadzu, UV-1601PC. Otras muestras se mantuvieron en la oscuridad y su espectro se registró al mismo tiempo que la solución irradiada.

8.12 Irradiación de Alprazolam en comprimidos

Se ensayó con muestras provenientes de diferentes laboratorios y de diferentes concentraciones. Los comprimidos se colocaron en un lugar del laboratorio donde recibieron la mayor irradiación solar durante el día. Se sometieron a irradiación por un período máximo de 2 años a temperatura ambiente. Una parte de las muestras se irradiaron conservando el envase primario comercial (blister) y otras se irradiaron después de envasar dos comprimidos dentro de cada frasco (de vidrio incoloro) que luego se tapó herméticamente.

8.12.1 Muestras Blanco: Otros comprimidos se almacenaron protegidas de la luz por el mismo tiempo en que se expusieron los comprimidos a irradiación.

8.12.2 Preparación de muestras:

Los comprimidos se disolvieron en metanol por sonicación, después se filtraron usando papel filtro de 90mm, se llevaron a sequedad mediante presión a vacío, se redisolviaron en la mínima cantidad de cloroformo, se filtraron nuevamente y evaporaron. Finalmente se redisolviaron con acetonitrilo para obtener una concentración de alprazolam final de $2.6 \times 10^{-3} \text{M}$ y $2.8 \times 10^{-3} \text{M}$. Se pasaron por filtros antes de inyectar a la columna.

8.12.3 Método de análisis de formas farmacéuticas que contienen Alprazolam.

La concentración de Alprazolam remante en las muestras como también de los productos de degradación se determinó usando estándares externos, las curvas de calibración se construyeron diariamente. Las concentraciones se expresan como Molaridad.

Después de varios ensayos preliminares se determinó el mejor programa de gradiente para una óptima resolución, este consistió en: Fase móvil A: buffer acetato 0.025 M pH 4.5- acetonitrilo 60-40, y fase móvil B buffer acetato 0.025 M pH 4.5- acetonitrilo 20-80, se aplicó el siguiente gradiente: 0-10 min (gradiente lineal fase móvil A: 100% a 50%), 10-14 min (isocrático,

fase móvil A: 50%) y 14-20 min (gradiente lineal fase móvil A: 50% a 0%), guardando las condiciones cromatográficas flujo a 1ml/min y detección a 254 nm.

8.13 Estudios de alprazolam y comprimidos con alprazolam en ambiente húmedo

Se preparó una solución saturada de sulfato de amonio 100g/100ml agua, la cual se envasó dentro de un frasco. Se colocaron los comprimidos a analizar dentro de tubos de ensayo, y estos dentro del frasco de vidrio que contiene la solución saturada de sal y se tapó herméticamente. Finalmente el frasco se llevó a una estufa a 80 °C, obteniéndose de esta manera un porcentaje de humedad relativa de 80%. (International Critical Tables). El frasco se cubrió con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Para el estudio de alprazolam como droga pura, se pesó 2 mg de alprazolam en tubos de ensayo que se dispusieron en ambiente húmedo de 80% HR, como se describe para las tubos que contenían los comprimidos.

Para el estudio de termólisis de alprazolam, droga pura y en comprimidos; se pesó 2 mg de alprazolam en tubos de ensayo y los comprimidos se colocaron en tubos de ensayo, todos se colocaron dentro de un frasco que se protegió de la luz. El frasco se mantuvo en una estufa de calor seco a 80 °C.

Periódicamente se sacaron muestras, los comprimidos se disolvieron en metanol por medio de sonicación, la suspensión resultante se filtró al vacío y se evaporó. El residuo obtenido se redisolvió en cloroformo y se filtró nuevamente usando filtros de vidrio sinterizado y se evaporó a sequedad nuevamente. Finalmente se redisolvió en fase móvil para obtener una solución con una concentración del orden de 10^{-3} M, la cual fue filtrada para ser inyectada al HPLC.

8.14 Medidas de Fluorescencia en comprimidos

Las muestras para realizar las medidas de fluorescencias se prepararon disolviendo en metanol 7 a 12 comprimidos irradiados con luz solar directa por aproximadamente dos años. Se usó un sonificador para ayudar a la disolución, después se filtraron, se evaporaron y se redisolvieron en cloroformo. La suspensión resultante se filtró usando filtros de vidrio sinterizado y se evaporaron a sequedad nuevamente. En algunas muestras fue conveniente hacer una tercera filtración.

Finalmente se redisolvió en metanol grado HPLC para obtener una concentración del orden de 10^{-3} M.

La señal de fluorescencia se midió usando un espectrofluorómetro Photon Technology International, Quanmaster. Se obtuvieron los espectros de emisión después de excitar con una longitud de onda de 260 nm.

Los blancos se obtuvieron de comprimidos sin irradiar que se trataron de igual modo que los comprimidos irradiados.

Los tiempos de exposición a la irradiación solar de las muestras fueron: 605 días para las muestras A y B, y de 792 días para las muestra C y D.

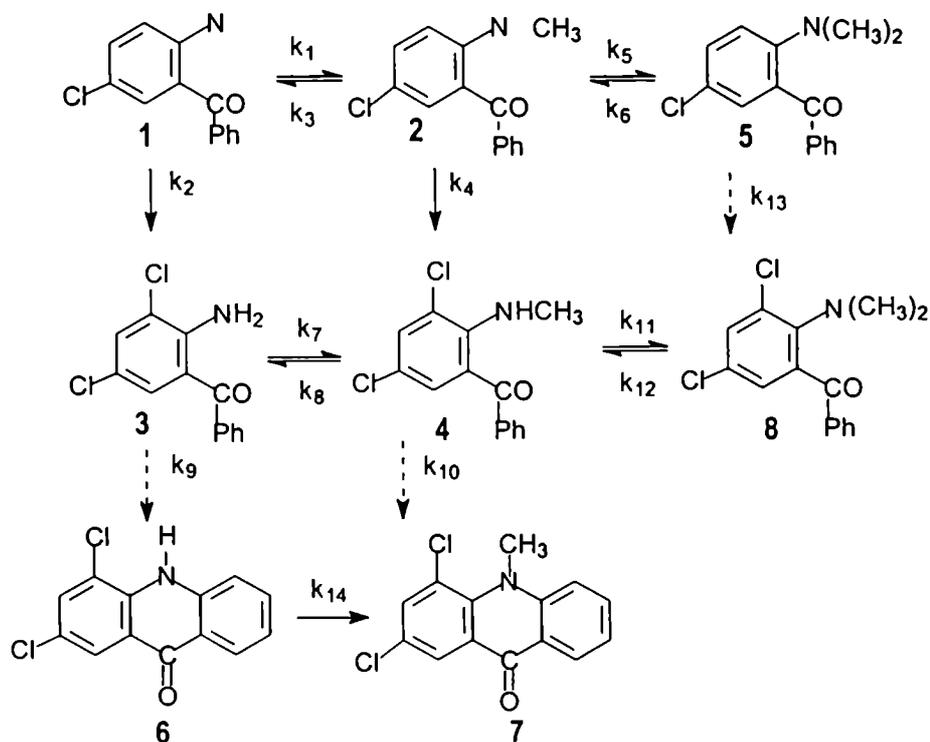
-
- ¹ N.S.Nudelman, R.G. Waisbaum, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 208-211
- ² Sternbach, L.H., Ian Fryer, R., Metlecics, W., Sach G., Stempel, A., *J. Org. Chem.* 1962, 27, 3781.
- ³ Gros E.G. , Gruñeiro E., *J. Org. Chem.* 1971, 36, 1166
- ⁴ Adams T.H., Gupta, P., Shafiq Khan, Lewis , Watt, R.A., *J. Chem Soc.*, 1976, 19, 2089.
- ⁵ S. Yoshioka, Y. Ishihara, T. Terazone, N. Tsunakawa, M. Murai, T. Yasuda, Y Kitamura, *Drug develop. Ind. Pharm.* 20 (1994) 2049-2062
- ⁶ Bovina, E., De Filippis, P., Cavrini, V., Ballardini, R. en Albini, A., Fasani, E., (Eds.), *Drugs: Photochemistry and Photostability*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998, pp. 306
- ⁷ International Conference on Harmonization, "Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Sustances and Products" , Federal Register, 4th Rev.1996

Los trabajos realizados en esta Tesis están relacionados con estudios de estabilidad de diazepam y de alprazolam. En los primeros ensayos este último resultó considerablemente inerte a los agentes degradativos comunes (hidrólisis, catálisis, termólisis). Por lo tanto la primera parte del trabajo experimental se concentró en realizar detallados estudios de hidrólisis, catálisis y solvólisis de aminobenzofenonas derivadas de diazepam a fin de adquirir formación en el estudio de este tipo de reacciones.

Solvólisis de o-aminobenzofenonas

Se describe el estudio cinético realizado con o-aminobenzofenonas, las cuales provienen de la degradación de Diazepam, uno de los medicamentos más ampliamente estudiados en nuestro laboratorio, y del cual quedaban mecanismos sin resolver.

Las reacciones de estas aminobenzofenonas forman un pattern complejo como se muestra en el esquema 9.1 y de acuerdo a nuestras observaciones éste es altamente sensible a las condiciones de reacción, tales como: sustrato, concentración de HCl, composición de solvente, etc.



Con el objetivo de determinar el efecto de estas variables en las reacciones de cloración, metilación, demetilación y anclación que se presentan, se emprendió el estudio cinético de las reacciones de las benzofenonas mencionadas bajo varias condiciones de reacción y desde diferentes aspectos a fin de contribuir a la elucidación del mecanismo complejo de reacción.

Los resultados de determinaciones cinéticas de las reacciones complejas de la 2-Amino-3,5-Cloro-benzofenona, **1**, de la 2-N-Metil-amino-5-Cloro-benzofenona, **2**, con HCl en varias concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 N) y en mezclas binarias de metanol-agua 84-16, y se compararon con los obtenidos en estudios previos en mezclas binarias metanol-agua, 1-1.^{1,2,3} También se estudió la reacción de 2-N-Metil-amino-3,5-dicloro-benzofenona, **4**, con HCl en varias concentraciones (0.5, 1.0 y 1.5 N) y en mezclas binarias de metanol-agua 84-16 y 1-1.

Por otra parte se describen otros experimentos adicionales, que pretenden dar evidencia adicional de los mecanismos propuestos.

En cada una de estas reacciones se determinó la velocidad de desaparición del sustrato y las velocidades de formación de los diversos productos de reacción (**1-5**, **8**), a través de mediciones con CG, y los compuestos (acridinonas **6-7**) se determinaron mediante TLC semi-cuantitativa.

Se calcularon las constantes de velocidad k_{obs} para cada reacción. Las constantes específicas, se calcularon aplicando dos métodos :

A: se obtuvieron directamente de la medición de las concentraciones actual considerando un esquema de reacción simple: tratamiento de reacciones paralelas o consecutivas de acuerdo a cada caso.

B: se usó un conjunto de ecuaciones diferenciales correspondientes a las diversas reacciones paralelas y consecutivas presentes en el esquema, para resolver el sistema se tuvieron en cuenta algunas observaciones experimentales. El ajuste de los valores de k se hizo por un proceso iterativo, obteniéndose en cada caso un buen ajuste entre las gráficas simulados los datos experimentales.

El ajuste satisfactorio entre las velocidades parciales obtenidas por los dos métodos da confianza al método de cálculo de datos cinéticos. De otra manera, un ajuste satisfactorio es también observado cuando se compara cada constante de velocidad parcial obtenida con las diferentes benzofenonas estudiadas. A pesar de la complejidad de las reacciones, los

valores obtenidos de sets de datos completamente independientes son similares, lo cual da confianza en el tratamiento de todos los resultados cinéticos.

Las conclusiones mecanísticas que se pueden inferir de los datos cinéticos respecto a las reacciones de metilación observadas en el esquema 9.1 y medidas por k_1 , k_5 , k_7 y k_{11} , especialmente por k_1 , k_5 , y k_{11} es que estas incrementan con la $[HCl]$, mientras que las constantes de velocidad específicas de la demetilación, k_3 y k_8 , disminuyen con el incremento de $[HCl]$, (k_6 y k_{12} son despreciables), esto sugiere que el agente de metilación podría ser el metanol. Respecto a las reacciones de demetilación, un mecanismo reversible podría estar operando y agua protonada podría ser el agente que ataca el nitrógeno amino. También se observó en las reacciones de **4** que k_{11} , es más alto a altas $[MeOH]$, lo cual es consistente con que el metanol protonado es el agente metilante.

Respecto a las reacciones de cloración se observó que la velocidad de estas reacciones (k_1 y k_4) aumentan al disminuir la $[HCl]$, lo que indica que la cloración podría estar ocurriendo en aminas desprotonadas.

Las reacciones de cloración que sufren las benzofenonas estudiadas presentan las siguientes características: solo se observó la cloración en la posición orto a la amina; no se observó compuestos monoclorados en las reacciones de **4** con HCl lo cual indica la irreversibilidad de las reacciones de cloración (k_2 y k_4). Se observa también en las reacciones de **1** y **2** que $k_2 < k_4$ indicando que la metilación favorece la cloración y en las reacciones de **5** no se encontró **8** en los primeros días de reacción, esto podría indicar que al menos un átomo de hidrógeno en el grupo amino es requerido para que la reacción de cloración ocurra.

Debido a que no es fácil establecer cuál es el agente electrófilo de cloración bajo las condiciones de reacción presentes se hicieron diferentes ensayos: Se chequeo la naturaleza de los gases formados durante la reacción, no se detectó cloro en ningún caso. Al contrario se detectó la presencia de hidrógeno molecular. Se estudió la reacción bajo atmósfera de nitrógeno donde no se observaron diferencias en la proporción de productos de cloración.

Respecto a la ciclación, ésta parece una reacción lenta, el hecho que no se hayan encontrado trazas de productos clorados en la posición 2 podría excluir la posibilidad que la anelación ocurre como una sustitución nucleofílica de un cloruro localizado en esa posición. Además, solamente acridinonas doblemente cloradas se encontraron. Esto sugiere que el segundo átomo de cloro *orto* al grupo amino es necesario para que la anelación ocurra. De otra manera, muy pequeñas cantidades observadas de **7** y no aparece de **6** en las reacciones de **4**, sugieren fuertemente a **4** como un intermediario claro de las acridinonas. Las acridinonas

6 y 7 son estables en soluciones metanólicas acuosas HCl a 80°C, indicando la irreversibilidad de las reacciones medidas para k_9 y k_{10} .

Teniendo en cuenta todas estas observaciones se propuso un mecanismo para las reacciones de cloración y anelación, el cual involucra la formación de un intermediario nitrenio.

La reacción de **2** se llevó a cabo también bajo condiciones especiales buscando evidencias adicionales para el mecanismo propuesto. Es bien conocido que la formación de nitrenio puede ser promovida fotoquímicamente. La observación de los productos de cloración y anelación después de un corto tiempo de irradiación aún a bajas temperaturas, y la comparación con los resultados encontrados para reacciones en la oscuridad son consistentes con el intermediario nitrenio propuesto. De otra manera, en presencia de m-dinitrobenceno no hay modificaciones, pero la p-hidroquinona (un agente reductor bien conocido) inhibe la cloración, según el mecanismo propuesto la p-hidroquinona inhibe fuertemente la oxidación de nitrenio, la cual es la etapa lenta del mecanismo propuesto. Un decrecimiento en las velocidades también se observó bajo atmósfera de nitrógeno positiva, lo cual es consistente con el mecanismo propuesto.

Estudios de estabilidad de alprazolam

En la segunda parte, se describe los estudios de estabilidad de alprazolam, una de las benzodiazepinas más recientes y más frecuentemente usada.

En primera instancia se estudió el efecto de diversos factores sobre la descomposición del alprazolam como droga pura.

Se examinó primero la hidrólisis de alprazolam, a diversos pH: se encontró que la reacción es altamente dependiente de pH y no tiene lugar a $\text{pH} \geq 7$. En medios ácidos la reacción resultó ser reversible y muy lenta por lo que no pudo aislarse el único producto de degradación, formando en mínimas cantidades la 5-cloro-2-(3'-aminometil-5'-metil-1',2',4'-triazol-4'-il)benzofenona que se caracterizó mediante ^1H y ^{13}C RMN. La hidrólisis del alprazolam es diferente del resto de la hidrólisis de otras benzodiazepinas, las cuales se hidrolizan a benzofenona y glicina, en éste la presencia del anillo triazólico estabiliza el producto formado en el primer paso se recicla rápidamente lo que no permite la hidrólisis total del compuesto.

Se llevaron a cabo ensayos de hidrólisis en condiciones severas, donde no se observó la formación de otros productos. También se analizó la sensibilidad del alprazolam a la oxidación, encontrándose que solamente es levemente sensible en condiciones muy severas. Lo que hace muy laborioso el proceso de degradación y separación de productos.

Se estudiaron también muestras en estado sólido sometidas a 80°C durante 88 días, y otras en ambiente húmedo a 80 % RH, 80 °C durante 28 días, encontrándose un porcentaje remanente de 98 % para el primer ensayo y un porcentaje de alprazolam remanente de 86.8 en el segundo ensayo. Esto demuestra nuevamente la alta estabilidad del compuesto y las dificultades que presenta su estudio.

Vista la inercia frente a los procesos degradativos más comunes se examinó el comportamiento de la droga frente a la acción de la luz. Se realizaron diversos ensayos preliminares a fin de determinar las condiciones experimentales óptimas. Se analizaron soluciones irradiadas con luz natural en soluciones buffer de pH 1.8, 3.6 y 10.0. Otras soluciones preparadas de igual manera se sometieron a 80 °C al abrigo de la luz. Los resultados mostraron que al cabo de 88 días se había degradado un 45, 26 y 3% respectivamente en las soluciones irradiadas. Mientras que no se observó degradación en las muestras conservadas en la oscuridad.

Estos primeros ensayos sugirieron que el alprazolam es una molécula estable a la mayoría de los agentes que causan descomposición de drogas, que la luz es el agente que mayor degradación produce. Y la mayor parte de los estudios siguientes se concentran en examinar la fotoquímica del alprazolam.

Aislamiento y caracterización de productos de degradación

Debido a la observación de fotólisis se emprendieron ensayos para conocer los productos de fotólisis formados. Los ensayos se llevaron a cabo usando una lámpara de metal haluro de media presión, la cual es una de las lámparas recomendadas por la normas de la ICH⁴ para ser usada como simulador solar, en los estudios de fotodegradación de drogas.

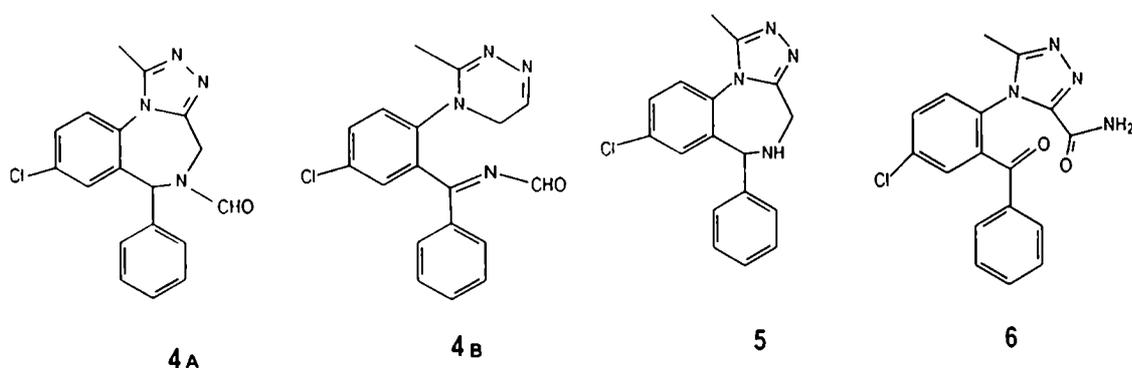
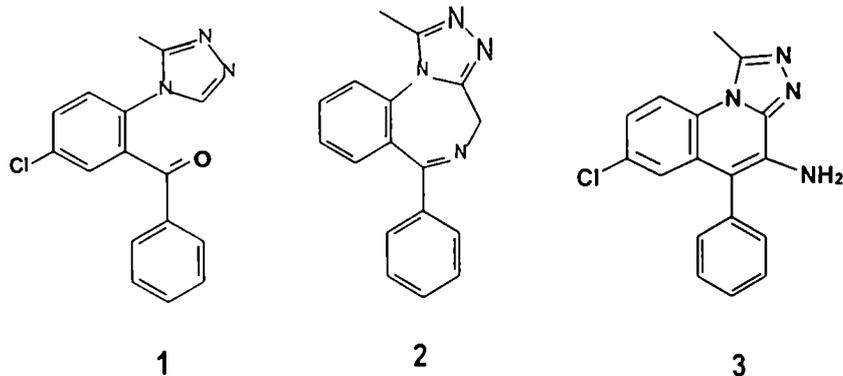
Con esta lámpara se irradió una solución preparativa de alprazolam en buffer fosfato – citrato pH 2.0, pues se había demostrado previamente que a este pH era mayor la fotodegradación.

Los productos formados tienen estructuras y comportamientos fisico-químico muy semejantes por lo que resultó especialmente ardua la separación de los mismos en las cantidades mínimas requeridas para su caracterización. Mediante la aplicación de diversos

sistemas de TLC preparativa, usando diversos eluentes como también fases estacionarias (sílica gel, alúmina, C-18, celulosa) fue posible aislar los productos de fotodegradación más importantes en medio acuoso y caracterizarlos mediante espectroscopia de RMN y EM, como se describe en el capítulo 5.

En particular el compuesto **3** uno de los productos mayoritarios de la fotodegradación de alprazolam en solución y en estado sólido, que tiene su misma masa molecular se sintetizó independientemente para confirmar su estructura.

Las estructuras de los productos aislados son las siguientes:



Los estudios mecanísticos realizados sugieren que en la fotólisis del alprazolam tienen lugar reacciones de dechlorinación, apertura foto-oxidativa, reducción y reordenamientos.

Para la dechlorinación se propusieron dos mecanismos que involucran transferencia electrónica intra o intermolecular. Del anión-radical generado en ambos mecanismos se separa ion cloruro, dando un radical libre que, finalmente, por abstracción de hidrógeno del

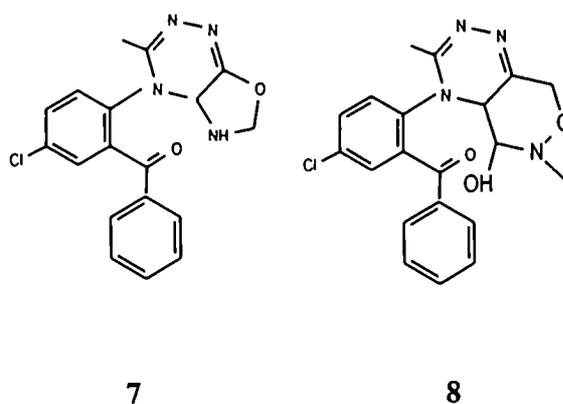
solvente producirá 2. Del catión-radical generado en el mecanismo intermolecular, por abstracción de hidrógeno por el solvente se forma el compuesto 5.

El mecanismo de formación del compuesto 1 involucra una apertura foto-oxidativa del anillo con pérdida de la cadena lateral que se produce. O podría ser formado a través de la fotodescomposición oxidativa de la unión imina del anillo diazepínico, donde se produce, en primer lugar, la benzofenona con cadena lateral de metilénamina, que rápidamente resulta oxidada conduciendo al compuesto 6 que tiene la función amida como cadena lateral.

Mientras que el mecanismo propuesto para el compuesto 3, la deshidratación de la benzofenona con cadena lateral de metilénamina formada, llevaría a la formación de un anillo de seis miembros altamente estable.

El compuesto 4A proviene de la presencia de metanol en el medio de reacción que provoca hidroximetilación del nitrógeno del anillo benzodiazepínico. La contracción del anillo diazepínico a un anillo de 6 miembros y simultánea transformación del anillo triazólico de 5 a 6 miembros, por la fuerza directriz que procura el cambio de anillos de 5 y 7 a dos anillos de 6 miembros, conduce al compuesto 4B.

En intentos previos al aislamiento de los productos de degradación en medios acuosos se aislaron los productos de degradación formados en soluciones metanólicas, ya que en este medio se facilita la recuperación y aislamiento de los mismos, sin embargo, se aislaron también otros productos formados por solvólisis. Los otros dos productos aislados en este medio son:



En la reacción de fotólisis en metanol parecería que la primera etapa de reacción es probablemente la hidrólisis del enlace imina seguido por reacciones de solvólisis. Debido a que los productos aislados son artefactos del solvente, y no propiamente productos de

degradación, no se estudió en detalle esta reacción y se orientaron los esfuerzos a aislar e identificar los productos formados en solución acuosa.

Estudios cinéticos de alprazolam en solución

Con el objetivo de acercarse a la cinética de degradación se prepararon soluciones de alprazolam en buffer y se tomaron alícuotas periódicamente, las cuales se analizaron primero por espectroscopia UV, no encontrándose diferencias importante que puedan señalar la degradación, en el transcurso de la irradiación. Fue necesario entonces buscar otro método de análisis cuantitativo adecuado par poder seguir las cinéticas, se ensayaron diversos métodos analíticos con resultados poco aptos excepto en el caso de determinación espectrofluorométrica.

El estudio por fluorescencia, demostró que la solución aumenta la señal de fluorescencia a medida que aumenta el tiempo de irradiación tanto al exponerse a la luz solar como a la lámpara. De acuerdo a las estructuras de los productos de descomposición mayoritarios identificados esta fluorescencia se debe a la formación del producto 3.

El aumento de la fluorescencia se usó para seguir cinéticamente la formación de los productos de degradación, en soluciones de pH inferiores a pH 5.0, no se estudió a pH superiores ya que en los primeros ensayos realizados se observó que en pH básicos el alprazolam no es fotolábil.

Las constantes de velocidad de formación de los productos de fotodegradación, determinadas como el aumento de la fluorescencia sigue una cinética de primer orden y se muestran en la tabla 9.1:

Tabla 9.1. Constantes de velocidad de Reacciones de Fotodegradación de Alprazolam en medio acuoso^{a, b}

pH	k_{obs} $10^{-5} (s^{-1})$	$t_{1/2}$ (horas)
2.0	3.61	5.3
3.6	1.67	11.5
5.0	0.55	34.7

^a [Alprazolam] = 2.75×10^{-3} M, en buffer fosfato-citrato

^b medida como el incremento en la señal de fluorescencia

(λ_{exc} 260nm, $\lambda_{emisión}$ 435 nm)

Las constantes de velocidad determinadas muestran que el alprazolam es más fotolábil en soluciones ácidas.

Fotoestabilidad de alprazolam en medicamentos

Los resultados anteriores se usaron para estudiar la fotodegradación de alprazolam en comprimidos. Esta es la única forma farmacéutica en que este medicamento es disponible comercialmente, lo que implica una dificultad adicional por la variabilidad de contenidos, escasa reactividad, etc.

El análisis de comprimidos expuestos a irradiación usando la lámpara, mostró que el principal producto de degradación es la triazolbenzofenona, **1**; la cual se identificó por espectroscopía después de haberse aislado de los comprimidos irradiados usando la metodología seguida en el aislamiento de los productos de la solución acuosa. También se observó que se produce en segundo lugar la triazolaminoquinolina, **3**, la cual se identificó a través de la comparación de los t_r con el compuesto sintetizado.

Con el objetivo de conocer reacciones oscuras se hizo un ensayo estudiando sometiendo comprimidos de alprazolam a 80°C y 80 %HR. Los resultados mostraron que el

alprazolam se degrada en estas condiciones formando un producto mayoritario: triazolaminoquinolina, 3.

Con el objetivo de reconocer si la degradación observada bajo la irradiación con lámpara se lleva a cabo también con la irradiación en condiciones naturales, se analizaron muestras comprimidos de cuatro marcas diferentes expuestas a irradiación solar directa.

Las muestras se estudiaron determinando el contenido de alprazolam y los productos de degradación mediante un método de HPLC previamente validado y se siguieron por aproximadamente dos años. La fotodegradación en estas condiciones da lugar a la formación de dos de los compuestos que se observaron en irradiación con lámpara y en solución: triazolbenzofenona, 1 y triazolaminoquinolina, 3, siendo mayoritario el primero.

Los resultados muestran la fotosensibilidad del alprazolam bajo formas farmacéuticas sólidas (comprimidos) al ser irradiado con luz solar directa. A pesar de ser un proceso de acción fotoquímica en superficie se observa que la descomposición alcanza un valor máximo de 10% en una de las muestras en un período de 2 años. La catálisis por los excipientes puede ser un factor importante de carácter físico y/o químico.

Se encontraron diferencias apreciables de acuerdo al envase en que se hizo la exposición. Las muestras irradiadas en el blister mostraron mayor porcentaje de degradación y un mayor porcentaje de formación de la triazolbenzofenona, que las irradiadas dentro de un frasco, probablemente el carácter más hermético del blister incide desfavorablemente en este caso.

Determinada la fotosensibilidad, es claro que los ensayos para evaluar la fotostabilidad de las formas farmacéuticas de este medicamento deben conducirse dentro de su empaque final (blister +caja) para comprobar la eficacia del envase. Además los resultados de los presentes estudios indican claramente que debe evitarse la exposición a la luz durante la manipulación de la droga, elaboración del producto y almacenamiento; así mismo, deben evitarse los medios ácidos en los cuales el alprazolam es especialmente reactivo.

¹ N.S.Nudelman, R.G. Waisbaum, *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 208-211

² Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Pharm. Sci.* 1995, 84, 998.

³ Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G. *J. Phys. Org. Chem.* 1997, 10, 97

⁴ International Conference on Harmonization, "Tripartite Guideline for the Photostability Testing of New Drug Substances and Products", Federal Register, 4th Rev.1996, pp 2

Los siguientes trabajos fueron publicados:

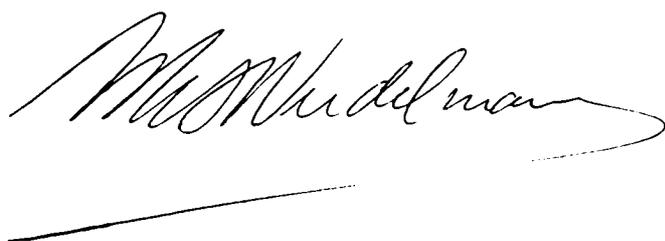
Nudelman, N. S.; Waisbaum, R. G.,Gallardo C. *Atualidades de Fisico-Química Organica*,
1998, 478.

Nudelman, N. S.; Gallardo C. *VITAE*, Septiembre de 1999, 30.

Nudelman, N. S.; Gallardo C. *Atualidades de Fisico-Química Organica*, 1999

Nudelman, N. S.; Gallardo C. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, enviado

Nudelman, N. S.; Gallardo C. *J. Pharm. Sci.*, 2001, enviado



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nudelman', with a long horizontal flourish extending to the left.



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cecilia Gallardo', with a stylized, cursive script.