

DETERMINACIÓN CONDUCTIMÉTRICA DE LA RELACIÓN MOLAR SULFATO/CARBOXILATO DE ENOXAPARINA SÓDICA

CONDUCTIMETRIC DETERMINATION OF THE MOLAR RATIO SULFATE/CARBOXYLATE OF ENOXAPARIN SODIUM

Jorge L. Santana Tolosa^{a*} (0000-0001-9629-4717).
Vivian M. Tolosa Cubela^b (0000-0003-4823-6648).
Yania Suárez Pérez^c (0000-0003-2985-2656).
Yusimí Tussell Martínez^d (0000-0003-0654-2540).

^aUnidad de Desarrollo e Innovación, Empresa Laboratorios AICA, Ave. 39 A, No. 4602 e/ 46 y 48, CP 11300, Playa, La Habana, Cuba.

^bUnidad de Desarrollo e Innovación, Empresa Laboratorios AICA, Ave. 39, A No. 4602 e/ 46 y 48, CP 11300, Playa, La Habana, Cuba.

^cInstituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. Calle 222, entre 23 y 29, # 2317, La Coronela, La Lisa, La Habana, Cuba, CP 13600. Cuba.

^dUnidad de Desarrollo e Innovación, Empresa Laboratorios AICA, Ave. 39 A, No. 4602 e/ 46 y 48, CP 11300, Playa, La Habana, Cuba.

* jorges@aica.cu

Recibido: 19 de marzo de 2023;

Aceptado: 07 de septiembre de 2023;

RESUMEN

Las condiciones instrumentales especificadas en las correspondientes farmacopeas para la determinación de la relación molar sulfato/carboxilato en Enoxaparina Sódica no se encuentran actualmente disponibles en la Empresa Laboratorios AICA. Implementar un método para la determinación conductimétrica de la relación sulfato/carboxilato en enoxaparina sódica para el control de calidad de su materia prima. Se estudió la influencia de dos factores (la temperatura y resina de intercambio catiónico) en el tratamiento de la muestra mediante ensayos a dos niveles de cada factor. Para cada condición de temperatura y resina se compararon los resultados de tres ensayos realizados un mismo día con los obtenidos a partir de un ensayo diario durante tres días. Ensayos del mismo día: con independencia de las condiciones ensayadas de temperatura y resina las gráficas de valoración fueron afectadas por la pérdida del punto final de carboxilato y se obtuvieron valores de la relación sulfato/carboxilatos que incumplieron el límite de especificación vigente en farmacopeas. Ensayos diarios por tres días: todos los valores de la relación sulfato/carboxilatos cumplieron el límite de especificación de farmacopeas y las condiciones de temperatura y resina no tuvieron sobre aquellos un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0 %. Estas últimas condiciones experimentales se consideraron satisfactorias para el futuro uso del método en el control de calidad de la relación sulfato/carboxilato en materias primas de enoxaparina sódica.

Palabras claves: Relación molar sulfato/carboxilato; heparinas de bajo peso molecular; enoxaparina sódica.

ABSTRACT

The instrumental conditions specified in the corresponding pharmacopoeias for the determination of the sulfate/carboxylate molar ratio in Sodium Enoxaparin are not currently available at AICA Laboratories Enterprise. Implement a method for the conductometric determination of the sulfate/carboxylate ratio in sodium enoxaparin for the quality control of its raw material under the available instrumental conditions. The influence of two factors (temperature and cation exchange resin) on the treatment of the sample was studied by means of tests at two levels of each factor. For each condition of temperature and resin, the results of three tests carried out on the same day were compared with those obtained from a daily test for three days. Tests on the same day: regardless of the temperature and resin conditions tested, the titration graphs were affected by the loss of the carboxylate end point and values for the sulfate/carboxylate ratio were obtained that did not meet the current specification limit in pharmacopoeias. Daily tests for three days: all the values of the sulfate/carboxylate ratio met the pharmacopoeia specification limit and the temperature and resin conditions did not have a statistically significant effect on them with a confidence level of 95.0 %. These last experimental conditions were considered satisfactory for the future use of the method in the quality control of the sulfate/carboxylate ratio in Sodium Enoxaparin raw materials.

Keywords: Sulfate/carboxylate molar ratio; Low-molecular-weight heparins; Sodium Enoxaparin.

INTRODUCCIÓN

Las heparinas de bajo peso molecular (HsBPM), como la enoxaparina sódica, son fármacos anticoagulantes derivados de la heparina (USP 40, 2017; BP, 2020). Comparten con esta última los principales aspectos de su estructura química (*Figura 1*).

UNIDADES REPETITIVAS EN LOS POLISACÁRIDOS DE HEPARINA

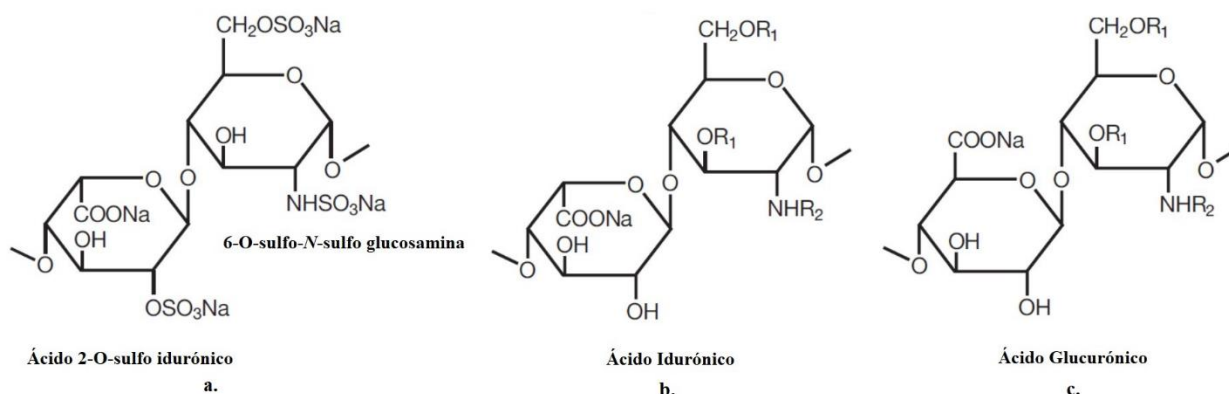


Fig. 1. Aspectos fundamentales de la estructura química de las heparinas presentes en las HsBPM (Szajek et al, 2016). a: Unidad disacáridica mayoritaria. b: Unidades de ácido idurónico (minoritarias) y c: Unidades de ácido glucurónico (minoritarias), $R_1 = -H$ o $-SO_3Na$, $R_2 = -H$, $-Ac$ o $-SO_3Na$.

Fuente: Szajek et al, 2016.

Las heparinas presentan una unidad disacáridica trisulfatada que constituye aproximadamente un 75 % del polisacárido, en el cual también se presentan secuencias de unidades de ácido glucurónico y ácido idurónico con menor grado de sulfatación (*Figura 1*) (Casu, Naggi, Torri, 2015).

La principal diferencia estructural entre las HsBPM y su sustancia de origen es que las primeras presentan una menor masa molecular. La masa molecular promedio en peso de las HsBPM es inferior a los 8000 Da y al menos el 60 % de su masa total presenta una masa molecular inferior a los 8000 Da (BP, 2020). En comparación, la masa molecular de las cadenas de heparinas utilizadas como ingredientes farmacéuticos activos pueden encontrarse en el intervalo de 5000 a 50000 Da (Aláez-Versón, Lantero, Fernández-Busquets, 2017). En particular, la masa molecular promedio en peso de la enoxaparina sódica para uso como ingrediente farmacéutico activo se presenta en el intervalo de 3800 Da a 5000 Da con un valor característico de 4500 Da (USP 40, 2017; BP, 2020). Las HsBPM son oligosacáridos aniónicos que pertenecen a la familia de los glucosaminoglucanos (GAGs) sulfatados, a la cual también pertenecen otros polisacáridos lineales con carga eléctrica negativa como heparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato, queratán sulfato y ácido hialurónico (Szajek et al, 2016).

El origen de la carga eléctrica negativa de estos oligosacáridos se debe a la existencia de grupos sulfato y carboxilato en la estructura de las cadenas oligosacáridicas (*Figura 1*). A la razón molar entre ambos grupos funcionales se le denomina comúnmente relación molar sulfato/carboxilato ($R_{S/C}$), la cual es una medida de la densidad de carga promedio por unidad disacáridica y del grado de sulfatación del fármaco (Gardini et al, 2017). Estas características están relacionadas con la función biológica de estos oligosacáridos y por tanto con su calidad como ingredientes farmacéuticos activos. Por estas razones en las farmacopeas se establece la determinación obligatoria de la $R_{S/C}$ como parte del control de calidad de Enoxaparina Sódica (USP 40, 2017; BP, 2020). Su valor no debe ser menor de 1,8 según límite de especificación establecido en las referidas farmacopeas. Fuentes

de la literatura académica ubican el valor de $R_{S/C}$ para Enoxaparina Sódica en aproximadamente 2 (Spadarella *et al*, 2019).

Casu & Gennaro (1975) desarrollaron un método conductimétrico para la determinación de las concentraciones de los grupos sulfato y carboxilato en muestras de heparina y otros mucopolisacáridos, que emplearon además para la determinación de la relación molar sulfato/carboxilato en las sustancias mencionadas. El método referido se aplica actualmente con los mismos propósitos en muestras de mucopolisacáridos extraídos de mucosa intestinal porcina (Gardini *et al*, 2017). El procedimiento consiste en dos etapas: tratamiento de la muestra por intercambio catiónico para transformar al polisacárido a su forma ácida y posterior análisis del eluato mediante valoración conductimétrica con una solución de hidróxido de sodio.

En monografías oficiales de farmacopea para heparinas de bajo peso molecular existen versiones modificadas del método (USP 40, 2017; BP, 2020). La principal modificación introducida en BP (2020) es la aplicación de una temperatura de 4 °C al lecho intercambiador y a la muestra en la etapa del intercambio catiónico, lo cual sugiere la utilización de columnas de intercambio iónico enchaquetadas y baños de recirculación de agua con enfriamiento. Las pequeñas cantidades de volumen de muestra (2 mL) y volumen de la bureta (2 mL) sugieren que el procedimiento debe realizarse con valoradores automáticos. La principal modificación al método introducida en USP 40 (2017) es la incorporación de una columna de intercambio aniónico (forma cloruro) en serie con la de intercambio catiónico. Además, en el procedimiento operatorio se especifica el flujo en 1 mL/min, lo cual sugiere la utilización de un cromatógrafo de intercambio iónico o un montaje instrumental con bombas peristálticas. En USP 40 (2017) se declara la concentración de la disolución de la muestra, pero no el volumen de la alícuota que se debe aplicar sobre el lecho intercambiador. Además, no se encontró información publicada en la que se proporcionen argumentos a las modificaciones existentes al método original de Casu & Gennaro (1975).

Como parte del desarrollo de la forma farmacéutica inyectable de Enoxaparina Sódica en la Empresa Laboratorios AICA se requiere de un método analítico para el control de calidad de la $R_{S/C}$ en las muestras de materia prima del fármaco. Sin embargo, el instrumental analítico actualmente disponible en la Empresa Laboratorios AICA no permite la realización del método en las condiciones especificadas en los métodos oficiales. Por tanto, se consideró implementar un método para la determinación conductimétrica de la relación sulfato/carboxilato en enoxaparina sódica para el control de calidad de su materia prima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumentos:

- Balanza analítica (modelo SECURA 224-1S, Sartorius Lab Instruments GmbH, Alemania).
- Agitador magnético (HANNA Instruments, Estados Unidos de América).
- Sonda conductimétrica: DuraProbe®, Modelo 013005MD, celda de conductividad de 4 electrodos de epoxi/grafito, constante de celda nominal de 0,475 cm⁻¹ e intervalo de medición de 1 μS/cm a 200 mS/cm. (ThermoScientific, Estados Unidos de América).
- Conductímetro: Orion, Modelo 3Star. (ThermoScientific, Estados Unidos de América).
- Bureta de 10 mL, con la menor división entre unidades de 0.05 mL.

Reactivos

- Hidróxido de sodio, Lote B1336798 632 (Merck, Estados Unidos de América).
- Agua purificada de uso farmacéutico, producida en un sistema de tratamiento de aguas de la Empresa Laboratorios AICA, con no más de dos semanas desde su fecha de producción; su proceso de fabricación implica desgasificación de dióxido de carbono.

Procedimiento

Se implementó un procedimiento modificado con referencias en la literatura consultada (Casu & Gennaro, 1975; BP, 2020):

- Muestra para análisis: materia prima de Enoxaparina Sódica (Lote DLME220326EP, Yantai Dongchen Biochemicals Co., Ltd., China).
- Muestra de ensayo: 12.5 mg/mL de Enoxaparina Sódica en agua purificada para uso farmacéutico.
- Volumen de aplicación sobre el lecho intercambiador: 4 mL (contiene una carga de muestra de 50 mg). Se trabajó con un volumen de muestra de ensayo inferior al 30 % del volumen de lecho empleado.
- Dimensiones y soporte del lecho: volumen aproximado de 16 mL de resina de intercambio catiónico soportado en un tubo de vidrio de 14 cm de longitud. Diámetro interno de aproximadamente 1,8 cm. Base inferior de tapón de lana de vidrio. A este tubo soporte se le ajustó una carcasa de plástico para sostener baños de agua con hielo triturado en contacto con la pared externa del soporte del lecho intercambiador.

Se ensayaron dos condiciones de temperatura en el proceso de intercambio catiónico:

- 0-5 °C: con aplicación del baño de agua con hielo en la carcasa de plástico. Para garantizar esta condición se proporcionó un tiempo de contacto de aproximadamente 25 min entre el baño frío y la columna. Durante esta etapa el nivel del baño frío se mantuvo a la misma altura que el nivel del lecho de resina. Antes de su aplicación sobre el lecho, la alícuota de 4 mL de la muestra de ensayo se aplicó primero en un tubo de ensayos de 10 mL con tapón. Este se sumergió durante aproximadamente 1 min en un baño de agua con hielo triturado para su enfriamiento. A continuación, el contenido del tubo de ensayos fue vertido sobre el lecho para su tratamiento por intercambio catiónico. Se aplicó el proceso de intercambio catiónico a dos porciones adicionales sucesivas de 2 mL para arrastre de posibles cantidades remanentes de la muestra en el tubo de ensayos.
- Ambiente (25 °C ± 2): sin aplicación del baño de agua con hielo en la carcasa de plástico. La alícuota de 4 mL de la muestra de ensayo se aplicó suavemente, con ayuda de una pipeta aforada, sobre la superficie interna del tubo soporte. El proceso de intercambio catiónico se aplicó a dos porciones sucesivas de 2 mL. Estas porciones tuvieron como propósito el arrastre de posibles cantidades remanentes de la muestra que pudieran quedar en las paredes internas del tubo soporte.

Las dos resinas de intercambio catiónico utilizadas fueron:

- AG[®]-50W-X8: Bio-Rad Laboratories (USA); No. Cat.: 142-1451; grado: analítico; forma iónica: hidrógeno; capacidad total (húmeda): 1.7 meq/mL; tamaño de mesh (Estándar U.S.): 200-400; intervalo real de mesh en estado húmedo (Estándar U.S.):

100-230, que corresponde a 63-150 μm de diámetro. En la etapa del montaje del lecho de resina AG[®]-50W-X8 se midió de forma aproximada el flujo de salida, bajo cada condición de temperatura. Con este propósito se midió el tiempo de llenado de 1 mL de eluato en una probeta de 10 mL.

- Amberlite[®] IR(H)-120: Merck (USA); No. Cat.: 1.15131.0500; grado: analítico; forma iónica: hidrógeno; capacidad total (húmeda): ≥ 1.8 mol/L (equivalente a ≥ 1.8 meq/mL); Diámetro: ≥ 90 % de las partículas en el intervalo de 0.3-1.1 mm.

Para cada condición de temperatura y lecho de resina se realizaron dos grupos de tres ensayos:

- Tres ensayos en un mismo día.
- Un ensayo diario por 3 días.

Este último factor se consideró con el objetivo de estudiar la posible influencia del tiempo que media entre la aplicación de dos muestras consecutivas sobre la forma de las gráficas de valoración y la calidad de los valores determinados de $R_{S/C}$.

En todos los experimentos, una vez aplicada la muestra de ensayo sobre el lecho, el menisco de la disolución se colocó justo por encima de su superficie. A partir de este momento se consideró un tiempo de contacto en reposo de 5 minutos para permitir un tiempo suficiente al proceso de intercambio catiónico. Se verificó el volumen de elución de la muestra con papel indicador universal de pH (tornasol) mediante colección de porciones de aproximadamente 2 mL de eluato hasta completar 30 mL del mismo.

La colección del eluato comenzó desde el momento en que se comenzó a introducir la muestra en el lecho de resina. La elución se realizó con agua purificada para uso farmacéutico, hasta obtener aproximadamente 30 mL del eluato en vaso de polipropileno de Mettler-Toledo (España). Este eluato se diluyó hasta aproximadamente 70 mL con el eluyente. La valoración con NaOH 0,05 mol/L se realizó en el mismo envase en que el eluato se colectó y diluyó. Se registraron los datos de conductividad eléctrica en $\mu\text{S}/\text{cm}$ en función del volumen adicionado del valorante con paso de adición de 0.1 mL.

Los gráficos de valoración y el cálculo de la relación molar sulfato/carboxilato se procesaron con el software Origin, versión 7.0220. El volumen (en mL) correspondiente a cada punto final del gráfico de valoración se obtuvo mediante intersección de las ecuaciones de las rectas de ajuste de las secciones lineales adyacentes. La relación molar sulfato/carboxilato ($R_{S/C}$) se determinó mediante la siguiente expresión de cálculo:

$$R_{S/C} = \frac{V_S}{V_C - V_S}$$

Donde:

$R_{S/C}$ = Relación molar sulfato/carboxilato.

V_S : volumen del valorante adicionado hasta el punto final de grupos sulfato. Determinado a partir del primer punto cambio de pendiente.

V_C : volumen del valorante adicionado hasta el punto final de grupos carboxilato. Determinado a partir del segundo punto de cambio de pendiente.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (temperatura y tipo de resina) sobre los valores de $R_{S/C}$ determinados. El análisis de los datos se realizó con empleo del software *Statgraphics Centurion XV*, versión 15.2.14, para un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración y volumen de la muestra

La carga de muestra que recibió cada lecho fue 5 veces mayor que la de los métodos oficiales, lo cual permitió utilizar la instrumentación manual para la obtención de las gráficas de valoración conductimétrica. De esta manera se pudo utilizar una bureta de 10 mL en lugar de la de 2 mL que especifica el método oficial en BP (2020). Esto se explicó debido a que una mayor cantidad de muestra implicó un aumento del consumo de equivalentes del reactivo valorante. Además, el volumen de dilución del eluato de intercambio iónico (aproximadamente 70 mL) fue capaz de sumergir a la sección hueca de la sonda conductimétrica utilizada. Esto no hubiese sido posible debido al relativamente pequeño volumen de elución del método de BP (2020), el cual se encuentra en el intervalo de 10-15 mL. Sin embargo, el volumen de dilución del eluato utilizado es similar al del método oficial de USP 40 (2017), que es de 60 mL. Además, al volumen de 70 mL la concentración de la muestra se encontró aproximadamente en el mismo intervalo de concentraciones que en la misma etapa del método especificado en BP (2020).

Se trabajó con un volumen de muestra de ensayo inferior al 30 % del volumen de lecho. Esta acción se realizó con el propósito de evitar que el volumen de la muestra superase el volumen muerto del lecho, lo cual hubiese causado una elución temprana de la muestra. Para descartar o confirmar la ocurrencia de este fenómeno se realizó una prueba de elución de la forma ácida de enoxaparina sódica con papel indicador universal de pH.

Verificación de la elución de la forma ácida de Enoxaparina Sódica

De acuerdo a los ensayos con papel indicador universal de pH, realizados en ambas condiciones de temperatura para cada tipo de resina, se observó la elución de la muestra aproximadamente entre los 6 y los 20 mL. La elución se consideró satisfactoria al haber ocurrido posterior a los 4 mL (el volumen de la muestra). El color rosado del papel de pH, al ser sumergido en cada porción colectada de 2 mL, se consideró indicación de la presencia de la forma ácida de enoxaparina sódica. Su ausencia indicó lo contrario. El comienzo relativamente rápido de la elución de la muestra era el esperado. El mismo se debió tanto a la elevada polaridad del eluyente empleado como a la repulsión entre cargas electrostáticas comunes entre los oligosacáridos aniónicos de enoxaparina y las redes poliméricas aniónicas de las resinas empleadas.

Diferencias en el trabajo con las resinas utilizadas

En relación con las dos resinas utilizadas, la realización de la técnica con empleo de la resina Amberlite® IR(H)-120 mostró mayor facilidad de manipulación y rapidez, lo cual tiene estrecha relación con su mayor tamaño de partícula respecto a AG®-50W-X8. Con la resina Amberlite® IR(H)-120 se obtuvieron flujos rápidos de salida del soporte del lecho que fueron iguales en cualquiera de las condiciones de temperatura ensayadas; sin embargo, en el caso de los flujos de salida del lecho de resina AG®-50W-X8 se apreció una mayor influencia de la temperatura. Flujos de salida de aproximadamente 2,4 mL/min que se midieron en la condición de temperatura ambiente (25 ± 2 °C) se redujeron aproximadamente una unidad en la condición de 0-5 °C. La aplicación de la muestra sobre el lecho de resina AG®-50W-X8 en las condiciones ensayadas implicó mayores dificultades, pues se aplicó con mucho cuidado para evitar la posible resuspensión del lecho. Sin embargo, el pequeño tamaño de partícula de esta resina y la exposición de la cabeza del lecho al impacto directo con la disolución de la muestra o

eluyente siempre causaron la dispersión de una pequeña porción del mismo en cada aplicación. Por esta razón, luego de cada aplicación de muestra, siempre se esperó la redistribución de la porción resuspendida de la cabeza del lecho para continuar con la elución.

Estas razones permitieron considerar a la resina Amberlite® IR(H)-120 más adecuada desde el punto de vista de manipulación para el tipo de aplicación de los intercambios iónicos que ocupa a esta investigación.

Influencia de las condiciones de temperatura y resina de intercambio catiónico en los gráficos de valoración

En el control de calidad de materias primas y productos terminados en la industria farmacéutica es práctica común la realización de ensayos en condiciones que permitan la obtención de resultados similares que cumplan los límites de especificación de calidad establecidos. Con este propósito se estudiaron las condiciones en las que es posible obtener gráficos de valoración con la mayor similaridad posible. Los resultados gráficos de esos estudios se muestran en las Figuras 2 y 3. En las Figuras 2a, 2c, 3a y 3c, independientemente de la condición de temperatura ensayada y de la resina se observa la ocurrencia sistemática de un mismo fenómeno a lo largo de un día de trabajo. El evento se presentó en la forma de:

- Disminución de la pendiente de la zona 3 del gráfico (sección posterior al segundo punto de cambio de pendiente).
- Ligero aumento de la pendiente de la zona 2 del gráfico (sección entre ambos puntos de cambio de pendiente).
- Tendencia al igualado de las pendientes de las zonas antes mencionadas con la consecuente pérdida del cambio de pendientes entre ambas.

Estos cambios causan la pérdida del segundo cambio de pendiente, de tal manera que su utilidad analítica se pierde.

La causa más probable de este fenómeno es la ocurrencia de la interferencia del dióxido de carbono disuelto. Si bien el agua que se utiliza ha sido desgasificada de dióxido de carbono, no está equilibrada con la atmósfera, por lo que puede ser propensa a la absorción del gas. La absorción del gas se favorece a mayor grado de agitación y tiempo de exposición a la atmósfera. El efecto de esta interferencia no es fácil de explicar debido a que el dióxido de carbono se disuelve en agua mediante la formación de un complejo sistema de especies en equilibrio entre sí, entre las cuales se encuentran la molécula del propio dióxido de carbono (CO_2), la molécula poco estable del ácido carbónico (H_2CO_3), así como los iones hidrógenocarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}).

Los cambios de pendiente que ocurren en el sistema sin interferencia del dióxido de carbono disuelto pueden explicarse idealmente según lo expuesto por Casu & Gennaro (1975):

- Luego del proceso de intercambio catiónico la enoxaparina sódica se encuentra en su forma ácido, en cuyas condiciones los protones móviles (H^+ , $\lambda_+ = 349,8$) de los grupos sulfato son los causantes de la relativamente elevada conductividad inicial.
- A medida que avanza la adición del reactivo valorante la neutralización de los iones hidronio causa la disminución de la conductividad eléctrica hasta que se alcanza el primer cambio de pendiente.
- En la zona central del gráfico la pendiente aumenta fundamentalmente debido a la contribución de los iones sodio (Na^+ , $\lambda_+ = 50,1$) suministrados por el reactivo

valorante ya que los iones hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$) son neutralizados por los protones mayormente no disociados de los grupos carboxilato de la enoxaparina sódica.

- Al agotarse los protones de los grupos carboxilato la pendiente del gráfico comienza a aumentar de manera brusca debido a que los iones hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$) ya no pueden ser neutralizados, por lo que cada adición sucesiva del reactivo valorante aumenta la pendiente del gráfico en una misma magnitud.

Sin embargo, la presencia de dióxido de carbono disuelto podría causar las siguientes alteraciones:

- Al agotarse los protones móviles de los grupos sulfato el sistema tiene capacidad adicional para neutralizar a los iones hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$) debido al dióxido de carbono disuelto.
- En la zona central del gráfico comienza a ocurrir un aumento de pendiente por encima de lo esperado debido a que los iones hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$) del valorante no solo pueden reaccionar con los protones de los grupos carboxilato sino también con las especies moleculares del gas disuelto.
- Debido a que el eluato se obtuvo de una columna de intercambio catiónico en forma hidrogeniónica, el mismo está acidificado, en cuyo medio las especies predominantes del dióxido de carbono disuelto son la propia molécula del gas y la del ácido carbónico. La reacción de los iones hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$) con dichas moléculas genera fundamentalmente iones hidrógenocarbonato (HCO_3^- , $\lambda^- = 44,5$) en equilibrio con aquellas.
- Como las especies moleculares del gas disuelto, debido a su electroneutralidad, carecen de la posibilidad de contribuir a la conductividad eléctrica del medio, deben ser los iones hidrógenocarbonato (HCO_3^- , $\lambda^- = 44,5$) y sodio (Na^+ , $\lambda_+ = 50,1$) los principales causantes del aumento de pendiente en la segunda zona del gráfico. En estas condiciones los iones hidróxido pueden ser neutralizados, tanto por los protones de los grupos carboxilato de la enoxaparina sódica como por las especies del gas disuelto, por lo que se mantienen sin aportar conductividad eléctrica a la disolución.
- Si la concentración del gas disuelto es lo suficientemente elevada, el cambio de pendiente que inicia la tercera zona del gráfico podría quedar muy atenuado, según puede apreciarse en la gráfica del tercer ensayo de 3c.
- Ya en la tercera zona del gráfico de valoración y en presencia de especies del dióxido de carbono disuelto, la adición sucesiva de cantidades iguales del reactivo valorante causaría la aparición del ión carbonato (CO_3^{2-} , $\lambda^- = 69,3$) en equilibrio con el ión hidrógenocarbonato (HCO_3^- , $\lambda^- = 44,5$) en las cercanías del punto final de los grupos carboxilato. Puede apreciarse que la diferencia entre las conductancias equivalentes de ambos iones es relativamente pequeña, y mucho menores respecto a la del ión hidróxido (OH^- , $\lambda = 198,3$), lo cual implicaría un cambio de pendiente menos brusco de lo esperado en la zona cercana al mencionado punto final.

Otra hipótesis que se consideró para la explicación de los eventos de pérdida del segundo punto final en las gráficas de valoración fueron los posibles cambios que pueden ocurrir en las propiedades mecánicas de la resina como resultado de la aplicación sucesiva de varias muestras a través del lecho intercambiador. Estos fenómenos pueden ocurrir en

aplicaciones de procesos de intercambio iónico bajo flujos impulsados por gravedad, en los cuales son habituales los flujos variables y la variación en la competencia osmótica entre las partículas de la resina y la disolución de muestra. Puede observarse que los ensayos réplica realizados en días diferentes (Figuras 2b, 2d, 3b, 3d), con independencia de la condición ensayada de temperatura y tipo de resina, parecen sugerir la necesidad de un tiempo de reposo considerable entre la aplicación de una muestra y la siguiente. Esto podría contribuir a que la resina recupere sus propiedades mecánicas iniciales, lo cual implicaría un comportamiento repetible durante una siguiente aplicación de muestra. Sin embargo,

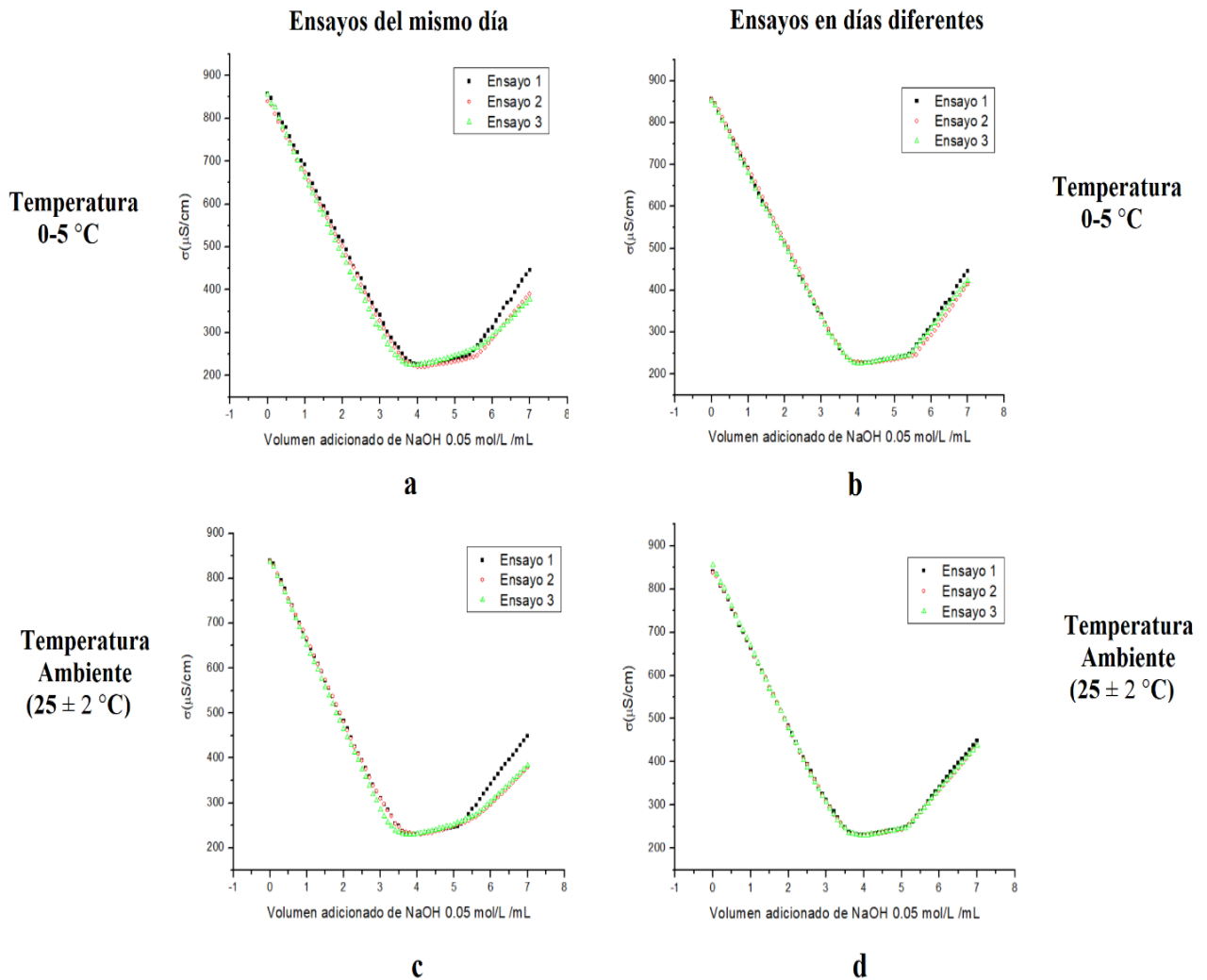
Independientemente de la causa que pueda explicar los fenómenos observados, se encontró que es posible eliminarlo de manera exitosa si se realizan las determinaciones conductimétricas en días diferentes, y con solo un ensayo diario en el mismo lecho de trabajo. Fue interesante el hecho de que no se necesitó de disoluciones regenerantes para la obtención de gráficas de valoración similares.

Es probable que la combinación de la condición de menor temperatura con la resina de mayor tamaño de partícula contrarreste la extensión de la pérdida del segundo punto final por dos motivos principales:

- La mayor rapidez del proceso de intercambio catiónico puede implicar la disminución del tiempo de exposición de la muestra a la atmósfera y por tanto menos probabilidades de absorción de dióxido de carbono.
- Según la literatura consultada (Cai *et al*, 2020), menores valores de la temperatura del agua favorecen la solubilidad del dióxido de carbono disuelto y desfavorecen la disociación iónica del mismo. La aplicación de bajas temperaturas para el tratamiento de la muestra por intercambio catiónico parece tener el propósito de disminuir tanto como sea posible las concentraciones de las especies iónicas del dióxido de carbono disuelto. Estas pueden intercambiar protones con la resina y aumentar el número de los equivalentes de ácido en disolución capaces de neutralizar al ión hidróxido.

A pesar de lo comentado, los resultados mostrados en las Figuras 2a y 3a demostraron que esta operación no pudo evitar la pérdida del punto final de carboxilato con ninguna de las dos resinas en ensayos realizados el mismo día. Una posible explicación para esto consistió en que al aumentar la temperatura del eluato hasta temperatura ambiente, durante el enrase previo a la valoración conductimétrica, es muy posible que la disociación iónica del gas haya vuelto a encontrarse favorecida.

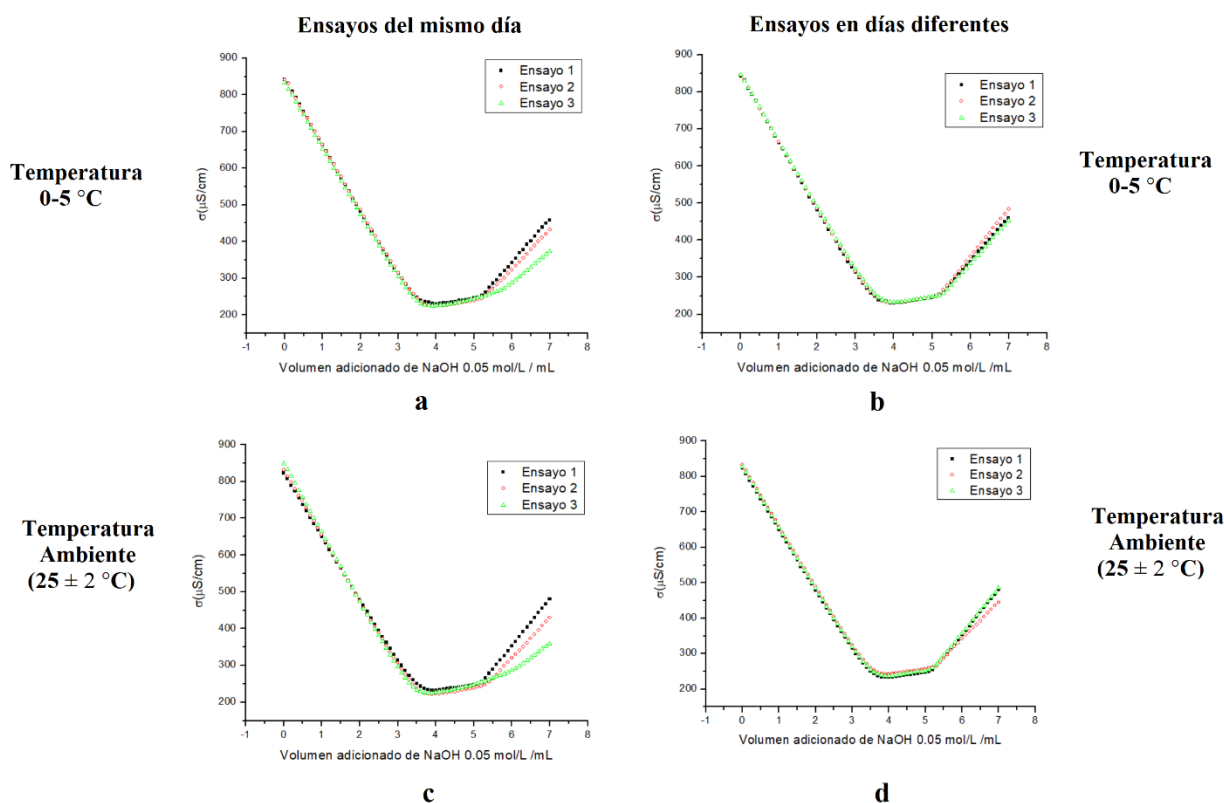
Resina AG[®]-50W-X8



Nota: la temperatura es la aplicada al lecho durante el proceso de intercambio catiónico.

Fig. 2. Ensayos realizados en el lecho de 16 mL x 1.8 cm (diámetro interno) con la resina AG[®]-50W-X8 a partir de muestras de Enoxaparina Sódica. a. Ensayos realizados el mismo día con Temperatura de 0-5 °C; b. Un ensayo diario por tres días diferentes con Temperatura de 0-5 °C. c. Ensayos realizados el mismo día con Temperatura Ambiente (25 ± 2 °C). d. Un ensayo diario por tres días diferentes con Temperatura Ambiente (25 ± 2 °C).

Resina Amberlite® IR(H)-120



Nota: la temperatura es la aplicada al lecho durante el proceso de intercambio catiónico.

Fig. 3. Ensayos realizados en el lecho de 16 mL x 1.8 cm (diámetro interno) con la resina Amberlite® IR(H)-120 a partir de muestras de Enoxaparina Sódica. a. Ensayos realizados el mismo día con Temperatura de 0-5 °C; b. Un ensayo diario por tres días diferentes con Temperatura de 0-5 °C. c. Ensayos realizados el mismo día con Temperatura Ambiente (25 ± 2 °C). d. Un ensayo diario por tres días diferentes con Temperatura Ambiente (25 ± 2 °C).

Influencia de las condiciones de temperatura y resina de intercambio catiónico en los valores de la relación molar sulfato/carboxilato

Los resultados que se muestran en la Tabla 1, que corresponden a los grupos de tres ensayos diarios, permiten la apreciación visual del efecto de las condiciones experimentales utilizadas sobre los valores determinados de la relación molar sulfato/carboxilato. Puede observarse que a medida que se avanza al siguiente ensayo réplica en el mismo día de trabajo los valores tienden a la disminución, mientras la gráfica de valoración correspondiente tiende a presentarse cada vez más afectada por los fenómenos atribuidos a la potencial interferencia del dióxido de carbono disuelto. Obsérvese que incluso es posible obtener valores que no cumplan el criterio de especificación de calidad exigido en farmacopeas (USP 40, 2017; BP, 2020).

En cambio, todos los resultados ilustrados en la Tabla 2, de las determinaciones realizadas en días diferentes, sí se consideraron satisfactorios respecto al cumplimiento del mencionado criterio. Sus coeficientes de variación fueron inferiores al 5 %, límite superior en ensayos de precisión establecidos por la entidad regulatoria nacional (CECMED, 2012) para ensayos fisico-químicos de materias primas de ingredientes farmacéuticos activos, excipientes y productos terminados como el procedimiento analítico estudiado en este trabajo.

Tabla 1. Valores determinados de $R_{S/C}$ a partir de las figuras de cada grupo de tres ensayos realizados un mismo día. ($R_{S/C} = 2.2^*$).

Resina	Temperatura	Día	Ensayo	$R_{S/C}$	Figura
AG [®] -50W-X8	0-5 °C	El mismo día	1	2,19	Fig. 2a
			2	1,96	
			3	1,69	
	Ambiente	El mismo día	1	2,15	Fig. 2c
			2	**	
			3	**	
Amberlite [®] IR(H)-120	0-5 °C	El mismo día	1	2,16	Fig. 3a
			2	2,08	
			3	1,68	
	Ambiente	El mismo día	1	2,19	Fig. 3c
			2	2,03	
			3	**	

*Valor del Certificado de Análisis del fabricante del lote de materia prima de Enoxaparina Sódica con que se realizaron los ensayos. **No fue posible calcular el valor debido a la pérdida del segundo cambio de pendiente.

Tabla 2. Valores determinados de $R_{S/C}$ a partir de las gráficas de cada uno de los ensayos realizados en días diferentes. ($R_{S/C} = 2.2^*$).

Resina	Temperatura	Ensayo	$R_{S/C}$	\bar{x} , s, CV	Gráfico	
AG [®] -50W-X8	0-5 °C	1	2,19	$\bar{x} = 2,15$ $s = 0,059$ CV = 2,73 %	Fig. 2b	
		2	2,08			
		3	2,17			
	Ambiente	El mismo día	1	2,18	$\bar{x} = 2,17$ $s = 0,026$ CV = 1,22 %	Fig. 2d
			2	2,19		
			3	2,14		
Amberlite [®] IR(H)-120	0-5 °C	1	2,10	$\bar{x} = 2,14$ $s = 0,036$ CV = 1,68 %	Fig. 3b	
		2	2,17			
		3	2,15			
	Ambiente	El mismo día	1	2,19	$\bar{x} = 2,18$ $s = 0,046$ CV = 2,10 %	Fig. 3d
			2	2,13		
			3	2,22		

*Valor del Certificado de Análisis del fabricante del lote de materia prima de Enoxaparina Sódica con que se realizaron los ensayos.

Los resultados del análisis de varianza de dos factores realizado sobre los resultados de los ensayos realizados en días diferentes se muestran en la Tabla 3. Puesto que ningún valor- p es menor que 0,05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre los valores determinados de la relación molar sulfato/carboxilato con un nivel de confianza del 95,0 %, lo cual implica que es posible utilizar cualquiera de las condiciones utilizadas de temperatura y resina si los resultados se determinan a partir de ensayos réplica realizados en días diferentes.

Se descartó el análisis de varianza para los resultados de los grupos de tres ensayos realizados un mismo día debido a la tendencia a la pérdida del punto final de carboxilatos. En esas condiciones la mencionada técnica estadística no aportaría información útil para el propósito de este estudio.

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza de dos factores (temperatura y resina)

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos Principales					
A:Resina	0,00000833333	1	0,00000833333	0,00	0,9457
B:Temperatura	0,00300833	1	0,00300833	1,77	0,2158
Residuos	0,015275	9	0,00169722		
Total (corregido)	0,0182917	11			

CONCLUSIONES

La determinación conductimétrica implementada puede utilizarse en el control de calidad de materias primas de Enoxaparina Sódica, con independencia de las condiciones estudiadas de temperatura y tipo de resina, si los valores de R_s/c se determinan a partir de ensayos diarios realizados en días diferentes. En estas condiciones el uso de la resina Amberlite® IR(H)-120 permite ventajas de manipulación respecto a AG®-50W-X8.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aláez-Versón, C. R., Lantero, E., Fernández-Busquets, X. (2017, Junio 21). Heparin: new life for an old drug. *Nanomedicine*. Volumen (12), No. 14. DOI: <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0127>.
- BP. (2020). Low-molecular-weight Heparins (Monograph). *British Pharmacopeia*. Volumen (1), pp. 1232-1235. ISBN: 978 011 3230 761. Great Britain: British Pharmacopeia Commission.
- Cai, W.-J., Xu, Y.-Y., Feely, R. A., Wanninkhof, R., Jönsson, B., Alin, S. R., Barbero, L., Cross, J. N., Azetsu-Scott, K., Fassbender, A. J., Carter, B. R., Jiang, L.-Q., Pepin, P., Chen, B., Hussain, N., Reimer, J. J., Xue, L., Salisbury, J. E., Hernández-Ayón, J. M., Langdon, M., Li, Q., Sutton, A. J., Chen, Ch-T. A., Gledhill, D. K. (2020, Junio 1). Controls on surface water carbonate chemistry along North American ocean margins. *Nature Communications*. Volumen (11), Artículo No. 2691. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16530-z>.
- Casu, B., Gennaro, U. (1975, Enero). A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides. *Carbohydrate Research*. Volumen (39), pp. 168-176. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)82654-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)82654-3)
- Casu, B., Naggi, A., Torri, G. (2015, Febrero 11). Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydrate Research*. Volumen (403), pp. 60-68. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>.
- CECMED. (2012) Validación de Métodos Analíticos (Anexo I). En: Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos (Regulación No. 37-2012). La Habana, Cuba: Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED).
- Gardini, C., Urso, E., Guerrini, M., van Herpen, R., de Wit, P., Naggi, A. (2017, Julio 5). Characterization of Danaparoid Complex Extractive Drug by an Orthogonal Analytical Approach. *Molecules*. Volumen (22), No. 7. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22071116>.

- USP 40. (2017). Enoxaparina Sódica (Monografía Oficial). Farmacopea de los Estados Unidos, Formulario Nacional 35 (NF 35) (Edición en español). Volumen (2), pp 4340-4344. Estados Unidos: Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América.
- Spadarella, G., Di Minno, A., Benedetta Donati, M., Mormile, M., Ventre, I., Di Minno, G. (2020, Enero 31). From unfractionated heparin to pentasaccharide: Paradigm of rigorous science growing in the understanding of the in vivo thrombin generation. Blood Reviews. Article: 100613. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100613>.
- Szajek, A. Y., Chess, E., Johansen, K., Gratzl, G., Gray, E., Keire, D., Linhardt, R., Liu, J., Morris, T., Mulloy, B., Nasr, M., Shriver, Z., Torralba, P., Viskov, C., Williams, R., Woodcock, J., Workman, W., Al-Hakim, A. (2016, junio 9). The US regulatory and pharmacopeia response to the global heparin contamination crisis. Nature Biotechnology. Volumen (34), pp. 625-630. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt.3606>

Este artículo no presenta conflictos de intereses

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Jorge L. Santana Tolosa: conceptualización, investigación, software, análisis formal, metodología, redacción.

Vivian M. Tolosa Cubela: conceptualización, recursos, administración de proyecto, metodología, adquisición de fondos.

Yania Suárez Pérez: conceptualización, recursos.

Yusimí Tussell Martínez: análisis formal, recursos.