

ARTÍCULOS ORIGINALES

## **Eficiencia del proceso de lavado en la obtención del citrato de calcio y magnesio a escala de banco**

### **Effectiveness of washout process to obtain calcium and magnesium citrate at bench scale**

**Jorge E. Rodríguez Chanfrau<sup>I</sup>; Alicia Lagarto Parra<sup>II</sup>; Viviana Bueno Pavón<sup>III</sup>; Isbel Guerra Sardiña<sup>IV</sup>; Yamilet Vega Hurtado<sup>IV</sup>**

<sup>I</sup>Máster en Química Farmacéutica. Investigador Auxiliar. Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. <sup>II</sup>Máster en Ciencias en Toxicología Experimental. Investigador Auxiliar. CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup>Médico Veterinario. CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>IV</sup>Técnico Medio en Química. CIDEM. La Habana, Cuba.

---

#### **RESUMEN**

Como parte de la optimización del proceso tecnológico para obtener citrato de calcio y magnesio a partir de dolomitas, se estudió a escala de banco la etapa de lavado para disminuir el contenido de ácido cítrico libre. Las variantes de lavado estudiadas permitieron disminuir el contenido de ácido cítrico libre por debajo del 3 %, mientras que los valores de calcio y magnesio son similares a los del lote antes de realizar el proceso de lavado. Por otro lado, el estudio toxicológico en ratas, comprobó que los lotes a los cuales se les aplicó las diferentes variantes de lavado no provocaron irritabilidad gástrica a las dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal, por lo que se puede afirmar que el proceso de lavado establecido es adecuado para garantizar la calidad de la materia prima.

**Palabras clave:** Citrato de calcio y magnesio, lavado, dolomita, ácido cítrico.

---

#### **ABSTRACT**

As part of the technological process optimization to obtain calcium citrate and magnesium from dolomites, we studied at bench scale, the washout stage to decrease the free citric acid content. Washout variants allowed to decrease the free citric acid content under 3 %, whereas the calcium and magnesium values are similar to those of batch before to carry out the washout process. On the other hand, toxicity study in rats, proved that the batches where different washout variables were applied not provoke gastric irritability at doses of 2 000 mg/kg of body weight confirming that above mentioned established process is appropriate to guarantee the raw material quality.

**Key words:** Calcium citrate and magnesium, washout, dolomite, citric acid.

---

## INTRODUCCIÓN

Como parte de los estudios que se realizan para obtener materias primas de calidad farmacéutica, se desarrolló un procedimiento para la obtención de citrato de calcio y magnesio a partir de dolomitas cubanas,<sup>1</sup> con el objetivo de desarrollar posteriormente formas farmacéuticas ricas en calcio y magnesio.

En los procesos tecnológicos para la obtención de un producto se realizan diversas operaciones básicas,<sup>2</sup> las cuales deben ser conocidas para garantizar su optimización durante los diferentes procesos de escala que se realizan desde el laboratorio hasta la industria.

Uno de los aspectos a controlar en el proceso desarrollado para obtener la materia prima en estudio, fue el contenido de ácido cítrico libre que como parte del proceso tecnológico quedaba ocluido en el producto después de filtrado y secado. Este aspecto revertía mayor interés debido a que las formas farmacéuticas a desarrollar con esta materia prima presentan una alta concentración del principio activo pues son empleadas como suplementos nutricionales y a la vez serían ingeridas en tratamientos prolongados, lo que podría a la larga provocar irritación gástrica en las personas que ingirieran estas.

El objetivo de este trabajo fue estudiar un proceso de lavado del citrato de calcio y magnesio para garantizar que el contenido de ácido cítrico libre estuviese por debajo del 3 % y que no provocara irritabilidad gástrica.

## MÉTODOS

Para la realización de este estudio se elaboró un lote a escala de banco (2 L); se empleó para ello la metodología establecida por *Rodríguez* y otros,<sup>1</sup> la cual consiste en hacer reaccionar en condiciones previamente establecidas dolomita con ácido cítrico. Este proceso consta de 3 etapas fundamentales: reacción, filtración y secado.

Partiendo de los objetivos trazados, se estudió adicionar al proceso tecnológico antes mencionado, un proceso de lavado que permitiese la disminución del contenido de ácido cítrico libre en el material, sin afectar las concentraciones de calcio y magnesio presentes en este. Para ello se efectuó la siguiente metodología:

Se realizó la reacción, a la escala propuesta de la dolomita y el ácido cítrico y antes de efectuar la filtración se dividió el lote en 3 partes iguales. Se realizó la filtración de cada una de las partes por separado. Se efectuó el proceso de lavado por dilución, añadiendo el volumen de líquido a emplear en el embudo de filtración, eliminándose posteriormente por succión al vacío. Una vez realizado este paso, se continuaron las otras etapas establecidas en el proceso tecnológico.

Se empleó un embudo de porcelana, el cual presentaba un área de filtración de  $1,06 \times 10^{-2} \text{ m}^2$  y como medio filtrante se utilizó lona. La presión constante ( $9,99 \times 10^4 \text{ kg/m.s}^2$ ) se garantizó con una bomba de vacío, acoplada a un regulador de vacío.

Previamente aplicando la ecuación de Choudhurg y Dahlstrom,<sup>3</sup> se calculó el volumen de líquido de lavado necesario a emplear para garantizar una eficiencia del lavado del 90 % y una disminución del ácido cítrico libre en la torta de un 50 %, lo que permitiría que los valores estuviesen por debajo del 3 %.

Se estudiaron las siguientes variantes de lavado:

*Variante 0:* después de efectuado el proceso de filtración, se procedió al secado y molido de la materia prima.

*Variante I:* después de efectuado el proceso de filtración, se lavó con una mezcla de etanol-agua (1:1), se filtró nuevamente y se procedió al secado y molido de la materia prima.

*Variante II:* después de efectuado el proceso de filtración, se lavó con agua, se filtró nuevamente y se procedió al secado y molido de la materia prima.

A cada una de las variantes se le determinó el contenido de calcio, magnesio y ácido cítrico libre en el producto obtenido; se empleó para ello el método elaborado por Rodríguez y otros,<sup>4</sup> el cual consiste en el caso del calcio y magnesio en una valoración con EDTA y negro de eriocromo T como indicador y para el caso del ácido cítrico libre en una valoración ácido-base con hidróxido de sodio y fenolftaleína como indicador. Todos estos métodos fueron validados según las exigencias de la literatura internacional.<sup>5,6</sup> Se determinó además, el contenido de calcio y magnesio en el líquido residual, empleándose para ello un método de determinación por espectrofotometría de absorción atómicas.<sup>7</sup>

### **Ensayo de irritación gástrica**

Paralelamente se realizó la determinación del potencial irritante sobre la mucosa gástrica en ratas para cada una de las variantes estudiada.<sup>8,9</sup>

Para ello se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g de peso), procedentes de la colonia de la UCTB Control Biológico, mantenidos en un cuarto a temperatura controlada de  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , con ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 h. La alimentación consistió en ración peletizada y agua a voluntad.

Los animales permanecieron en ayuna durante 16 h antes de la administración del producto en ensayo, el cual fue administrado por vía oral mediante cánula intragástrica, suspendiendo en carboximetilcelulosa sódica de alta viscosidad (CMC) 0,5 %.

Se formaron 4 grupos de 6 animales cada uno. A tres de ellos se les administró el producto en estudio (según las variantes de lavado) en dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal, mientras que el cuarto grupo se empleó como control el cual recibió CMC 0,5 %.

Los animales fueron pesados y se les administró el tratamiento correspondiente. Transcurrido 15 min posteriores a la administración, los animales fueron sacrificados; se empleó para ello dosis letal de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal y cada estómago fue extraído, colectándose el contenido gástrico en tubos de centrifugas, el cual fue centrifugado a 2 000 rev/min<sup>-1</sup> durante 20 min. Se midió el volumen total mediante el empleo de una probeta y se calculó la acidez total (expresada en mEq/V<sub>Jg</sub> en 100 g de peso corporal) aplicando la metodología establecida por *Rodríguez* y otros,<sup>10</sup> la cual consiste en una valoración potenciométrica con hidróxido de sodio 0,01 mol/L.

Posteriormente, se realizó un corte al estómago a lo largo de la curvatura mayor, se lavó con agua destilada para eliminar el contenido y se evaluó microscópicamente cualquier daño que pudiese presentar la mucosa.

Seguidamente, se pesó el estómago y se tomó una sección de la zona glandular y no glandular, las cuales se fijaron en formaldehído al 10 % y se procesaron rutinariamente para el examen histopatológico<sup>8</sup> con el objetivo de evaluar cualquier daño que pudiera presentarse en la mucosa.

Los valores de peso corporal, acidez gástrica y peso relativo de estómago fueron expresados como media  $\pm$  desviación estándar. Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía seguido de una prueba de Duncan en los casos requeridos, con un nivel de significación de  $p < 0,05$ .<sup>11</sup> El índice de irritación primario de mucosa oral se expresó como la media del grupo, y el índice de irritación comparado como la diferencia entre el índice de los grupos tratados y el grupo control.

Este estudio fue conducido en conformidad con lo establecido por el Canadian Council for Animal Care Guidelines,<sup>12</sup> siendo aprobado el protocolo de estudio por el Comité de Ética del CIDEM.

## RESULTADOS

El cálculo para estimar la cantidad de líquido a emplear en el lavado, dio como resultado que para la escala de banco (2 L) era necesario emplear 0,400 L de solvente.

Los resultados del estudio empleando dos variantes de líquido de lavado se muestran en la [tabla 1](#). Como se observa se logró con estas variantes, disminuir el contenido de ácido cítrico libre por debajo del 3 %, mientras que los valores de calcio y magnesio son similares a los del lote antes de realizar el proceso de lavado. Se comprobó además, que el contenido de calcio y magnesio en los líquidos

residuales (variante I: 0,05 % Ca y 0,03 % Mg y variante II: 0,03 % Ca y 0,04 % Mg) es despreciable.

El análisis estadístico demostró que no existían diferencias entre los tipos de lavado y sí entre las muestras antes de lavar y posterior al lavado.

### Ensayo de irritación gástrica

En la [tabla 2](#) se muestran los resultados de la determinación de la acidez total para cada uno de los tratamientos estudiados, observándose que existen diferencias significativas ( $p = 0,105$ ) entre el grupo tratado con la muestra sin lavar y los grupos tratados con las muestras lavadas por las diferentes variantes empleadas.

**Tabla 2.** Resultados del análisis de la acidez total

Tratamiento	Acidez total (mEq/100 g)
Variante 0	0,11 ± 0,06 <sup>a</sup>
Variante I	0,04 ± 0,01 <sup>b</sup>
Variante II	0,04 ± 0,02 <sup>b</sup>
Control	0,02 ± 0,02 <sup>b</sup>

Letras desiguales representan diferencias significativas para  $p < 0,05$ .

El análisis macromorfológico sobre la mucosa gástrica mostró como resultado que las alteraciones fundamentales fueron petequias, mínima equimosis y erosión ligera de la zona glandular y no glandular, siendo superiores en el grupo tratado con la variante 0 (muestra sin lavar).

Por otro lado, las observaciones microscópicas mostraron que las alteraciones detectadas fueron congestión/hemorragia y degeneración/erosión de la mucosa superficial y presencia de neutrófilos en la submucosa con grado de mínimo a ligero, en el grupo tratado con la variante 0, mientras que los grupos tratados con las variantes I y II no presentaron prácticamente ninguna alteración (solamente en el grupo tratado con la variante I se observó una mínima congestión en la zona glandular del estómago).

## DISCUSIÓN

Se comprobó con este estudio que ambas variantes de lavado disminuyen el contenido de ácido cítrico libre en las muestras de citrato de calcio y magnesio obtenidas por el proceso tecnológico desarrollado.<sup>1</sup> Se demostró que no existen diferencias significativas entre las variantes de lavados estudiadas, por lo que pudiese emplearse cualquiera de los dos sistemas de solventes para realizar el proceso de lavado de la materia prima con eficiencia.

Se comprobó además, que para el caso del calcio y el magnesio, las variantes de lavado estudiadas no provocaron disminución significativa de estos, lo que garantiza que no existan pérdidas de dichos cationes durante el proceso establecido.

En nuestro caso, teniendo en cuenta estos resultados se estableció el lavado con agua por ser este desde el punto de vista económico menos costoso.

El tracto gastrointestinal es un órgano de considerable complejidad, el cual está formado por numerosos tipos de tejidos y supervisa múltiples funciones. Consecuentemente, posee posibles lugares para la producción de efectos tóxicos por la acción de sustancias químicas. Además, este órgano constituye la entrada habitual a los componentes de la dieta, y tiene un considerable potencial para la exposición a agentes tóxicos.<sup>13</sup>

El estudio toxicológico demostró que el empleo de la variante 0 (muestra sin lavar) incrementa significativamente la acidez gástrica con respecto al grupo control y a los grupos en los cuales se emplearon las variantes I y II (muestras lavadas), resultado éste provocado por el contenido de ácido cítrico libre presente en esta muestra, que como se observa en la tabla 2 es superior al 3 %.

Por otro lado, los análisis histológicos confirmaron que el grupo tratado con muestras sin lavar presentaba mayores alteraciones que los grupos que fueron tratados con las muestras lavadas.

Estos resultados corroboran lo reportado por *Lagarto* y otros,<sup>6</sup> quienes encontraron que al emplearse tabletas que contenían como principio activo citrato de calcio y magnesio con valores de ácido cítrico libre superiores al 3 %, un incremento de la acidez gástrica y un daño de la mucosa gástrica producido por este aumento, cuestión que motivó que fuese necesario realizar el estudio del proceso de lavado descrito en este trabajo.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados alcanzados en este estudio, se puede afirmar que el tratamiento establecido para eliminar el contenido de ácido cítrico libre en las muestras es eficiente en cualquiera de las variantes estudiadas, lo cual garantizó que el contenido de este se encuentre por debajo del 3 %, y evitar de esta manera que estas tenga efectos irritantes sobre la mucosa gástrica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodríguez Chanfrau JE, Graveran T, Rodríguez I, Díaz I, Roberto Y, Mateus L, et al. Proceso de obtención de citrato de calcio y magnesio a partir de dolomita. Patente CO1F 1/00; A61K 33/06, A61K 9/00, C07C 51/41. Certificado 22794. 2002.
2. Granges Brown G. Operaciones básicas de Ingeniería Química. La Habana: Edición Revolucionaria; 1967. p. 592-5.
3. Svarovsky L. Solid-Liquid Separation. 4 ed. Oxford: Ed. Butterworth-Heinemann; 2000. p 335-48 y 409-25.
4. Rodríguez Chanfrau JE, Pardo Ruiz Z. Citrato de calcio y magnesio. Técnica de análisis. La Habana: CIDEM; 1999.

5. Castro Cels M, Gascón Fora S, Pujol Forn M, Sans Roca J, Vicente Pla L. Validación de métodos analíticos. Monografía AEFI. Madrid: Hewlett Packard; 1989.
6. United States Pharmacopoeial Convention. USP XXXI. Métodos generales. The United States Pharmacopoeia Convention. 31 ed. Rockville: Mack Printing; 2008.
7. Atomic Absorption Data Book Phillips Scientific. 5 ed. Cambridge: Ed. Unicam Instruments Lim; 1988.
8. Savers LJ, Maurer JK, Reer PJ. The rat as a model to evaluate the gastric irritation potential of alkaline products. *Toxicol Pathol.* 1994;22(3):324-9.
9. Lagarto Parra A, Tillán Capó J, Bueno Pavón V, Rodríguez Chanfrau JE, Pardo Ruiz Z, Ponce Santoyo M, et al. Evaluación toxicológica de las tabletas de ACIMIN: un suplemento nutricional de calcio y magnesio de origen natural. *Rev Toxicol.* 2002;19:41-6.
10. Rodríguez Chanfrau JE, Lagarto Parra A, Pinedas Díaz J. Capacidad neutralizante de tabletas masticables de CALCIDOL®. *Ensayos in vitro e in vivo. Acta Farm Bonaerense.* 2004;23(1):39-46.
11. Sigarroa A. Biometría y diseño experimental. La Habana: Ed. Pueblo y Educación; 1985. p. 430.
12. Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Canadian Council for Animal Care Guidelines. 1998. Disponible en: <http://www.ccac.ca/>
13. Walsh CT. Methods in Gastrointestinal Toxicology. In Wallace Hayes A. Principles and Methods of Toxicology 2 ed. New York: Raven Press; 1989. p. 659-72.

Recibido: 18 de septiembre de 2009.

Aprobado: 21 de octubre de 2009.

M. C. *Jorge E. Rodríguez Chanfrau*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave 26, No. 1 605 entre Boyeros y Calzada de Puentes Grandes, CP 10 600, municipio Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [jorge.rodriguez@infomed.sld.cu](mailto:jorge.rodriguez@infomed.sld.cu)

**Tabla 1.** Resultados analíticos de los lotes antes y después de aplicar las variantes de lavados

Variantes	Calcio (%)	Magnesio (%)	Ácido cítrico libre (%)
0	11,66 ± 0,78 <sup>a</sup>	4,54 ± 0,28 <sup>a</sup>	4,94 ± 0,18 <sup>a</sup>
I	11,60 ± 0,31 <sup>a</sup>	4,51 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,01 <sup>b</sup>
II	11,63 ± 0,52 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,01 <sup>b</sup>

Letras desiguales representan diferencias significativas para  $p < 0,05$  dentro de la misma columna. Los resultados se expresan en media ± desviación estándar.