



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 955 019**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61P 7/08 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2020 PCT/US2020/020517**

⑧7 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2020 WO20176894**

⑨6 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2020 E 20717359 (2)**

⑨7 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2023 EP 3930686**

⑮ Título: **Composiciones de hierro novedosas y métodos para preparar y utilizar las mismas**

⑩ Prioridad:

28.02.2019 US 201962812028 P

⑪ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.11.2023

⑬ Titular/es:

**RENIBUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
206 Grand Avenue, Suite 225
Southlake, TX 76092, US**

⑭ Inventor/es:

**KEYSER, DONALD JEFFREY;
GUILLEM, ALVARO F. y
ZAGER, RICHARD A.**

⑮ Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 955 019 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de hierro novedosas y métodos para preparar y utilizar las mismas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la solicitud provisional nº. 62/812.028, presentada el 28 de febrero de 2019, titulada Novel Iron Compositions and Methods of Marking and Using the Same.

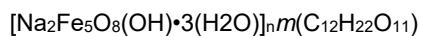
Antecedentes de la invención

10 Los agentes de hierro intravenoso (IV) son coloides que consisten en nanopartículas de hierro-hidrato de carbono esferoidales como se muestra en la Figura 1. En el núcleo de cada partícula hay un gel de hierro-oxihidróxido y el núcleo está rodeado por una cáscara de hidrato de carbono que estabiliza el hierro-oxihidróxido (la función principal del ligando es estabilizar el complejo y protegerlo contra una mayor polinuclearización).

15 Los complejos de carbohidratos de hierro se comportan como profármacos, ya que el hierro debe liberarse del núcleo de hidróxido de hierro (III). Según el mecanismo propuesto, tras la administración, los complejos estables (Tipo 1) como la carboximaltosa férrica y el dextrano de hierro son captados por endocitosis por los macrófagos del sistema reticuloendotelial (RES). Véase Danielson, J. Structure, chemistry, and pharmacokinetics of intravenous iron agents. Am. Soc. Nephrol. 2004, 15, S93-S98.

20 En el caso de carbohidratos de hierro (III) menos estables (Tipo 2), pueden liberarse cantidades significativas de hierro lábil del complejo y provocar la saturación de transferrina y, por lo tanto, a cantidades significativas de hierro no ligado (NTBI), particularmente si se administran dosis altas. Este Fe³⁺ débilmente unido se absorbe fácilmente de una manera no regulada por las células y puede inducir estrés oxidativo. Evans, R.W.; Rafique, R.; Zarea, A.; Rapisarda, C.; Cammack, R.; Evans, P.J.; Porter, J.B.; Hider, R.C. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and the thalassemic era. J. Biol. Inorg. Chem. 2008, 13, 57-74.

30 Existen cinco tipos de productos inyectables de hierro-carbohidratos aprobados actualmente por la FDA (1) INFeD®/ Dexferum® (hierro dextrano), Ferahem® (ferumoxitol), Injectafer® (carboximaltosa férrico), Venofer® (sacarosa de hierro), Ferrlecit® (complejo de gluconato férrico de sodio). La sacarosa de hierro, comercializada con el nombre Venofer®, se formula como una suspensión coloidal que tiene un peso molecular (M_w) de aproximadamente 34.000-60.000 dáltones y una fórmula molecular de la siguiente manera:



35 donde n es el grado de polimerización de hierro y m es el número de moléculas de sacarosa (C.sub.12 H.sub.22 O.sub.11) en complejo con el núcleo de hierro polinuclearizado:



40 Cada ml contiene 20 mg de hierro elemental como sacarosa de hierro en agua para inyección. El Venofador® está disponible en viales de dosis única de 5 ml (100 mg de hierro elemental por 5 ml) y viales de dosis única de 10 ml (200 mg de hierro elemental por 10 ml). El producto farmacéutico contiene aproximadamente 30 % de sacarosa p/v (300 mg/ml) y tiene un pH de 10,5-11,1. El producto no contiene conservantes. La osmolaridad de la inyección es de 1.250 mOsmol/l.

50 Los métodos para sintetizar carbohidratos de hierro se describen en la patente WO 97/11711 (1997) por Lawrence y col., que describen composiciones de oxihidróxido-dextrano fermentadas para tratar la deficiencia de hierro que tiene partículas elipsoidales con un rango de peso molecular preferido de aproximadamente 250.000 a 300.000 dáltones.

55 Recientemente, se ha utilizado hierro sacarosa en combinación con protoporfirina de estaño (SnPP) para inducir la citorresistencia adquirida sin causar lesiones en el órgano. Véase la patente US- 9.844.563 de Zager y col. Los presentes inventores han descubierto la necesidad de una formulación de sacarosa de hierro que pueda combinarse fácilmente con protoporfirina de estaño (SnPP), que sea estable y pueda inyectarse en un paciente para tratar la deficiencia de hierro o por sus efectos protectores renales, ya sea sola o en combinación con otro agente como la SnPP.

60 La patente alemana número DE862482 describe un proceso para preparar soluciones inyectables estables de sal de hierro trivalente. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos número US-2005/309187 describe un proceso para preparar un complejo de sacarosa de hierro, sustancialmente libre de excipientes, para proporcionar un complejo de sacarosa de hierro coprecipitado con sacarosa, y para proporcionar complejos de sacarosa de hierro en solución acuosa. La patente alemana número DE19547356 describe un adsorbente para fosfato de un medio acuoso, en particular para fosfato inorgánico o unido a nutrientes de fluidos corporales o nutrientes. El adsorbente contiene hidróxido de beta-hierro polinuclear estabilizado por carbohidratos y/o ácido húmico. El número de publicación PCT de la patente WO2018148217A1 describe composiciones, kits y métodos para proteger a los órganos mediante la inducción de la citorresistencia adquirida sin causar lesiones en el órgano. Las composiciones,

kits y métodos utilizan complejos de Me-porfirina, proteínas hemo, moléculas que contienen hierro y/o vitamina B12 y, opcionalmente, agentes que inciden en el metabolismo de las proteínas hemo.

Resumen de la invención

5 La descripción se refiere a composiciones acuosas de sacarosa de hierro que tienen propiedades deseables. En un aspecto de la descripción, la composición acuosa de sacarosa de iones comprende sacarosa de hierro y bicarbonato. En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica de hierro acuosa que comprende: sacarosa; bicarbonato; y un portador acuoso farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la 10 invención se refiere a una composición de hierro acuosa que comprende sacarosa de hierro y bicarbonato para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno renal que comprende administrar por vía intravenosa una composición de hierro acuosa en una cantidad terapéuticamente eficaz, en donde la 15 composición de hierro acuosa comprende sacarosa de hierro y bicarbonato.

15 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra la estructura de un carbohidrato de hierro.

20 La Figura 2 es una transferencia Western de riñón a las 18 horas después de la administración de composiciones acuosas de hierro.

La Figura 3 muestra cromatogramas de GPC de tres preparaciones S1.

25 La Figura 4 muestra una vista ampliada de la Figura 3.

La Figura 5 muestra cromatogramas de GPC de tres preparaciones S1.

30 La Figura 6 muestra una vista ampliada de la Figura 5.

30 La Figura 7 muestra cromatogramas de GPC de tres preparaciones S1.

La Figura 8 muestra una vista ampliada de la Figura 7

35 La Figura 9 muestra una comparación de GPC para S1, S2 y S3.

La Figura 10 muestra una vista superior y lateral de AFM para S1.

40 La Figura 11 muestra el análisis de tamaño de partículas S1 en la ubicación 1.

La Figura 12 muestra el análisis de sección manual S1 de tres partículas.

La Figura 13 muestra los espectros de FTIR de S1 y la mejor coincidencia de la biblioteca, la sacarosa.

45 La Figura 14 muestra los espectros de FTIR de S2 y la mejor coincidencia de la biblioteca, la sacarosa.

La Figura 15 muestra los espectros de FTIR de S3 y la mejor coincidencia de la biblioteca, el dextrano.

50 La Figura 16 muestra los espectros de RMN 1H de la preparación S1 1

50 La Figura 17 muestra los espectros de RMN 1H de la preparación S2 1

La Figura 18 muestra los espectros de RMN 1H de la preparación S3 1

55 La Figura 19 muestra los espectros de RMN 13C de la preparación S1 1

La Figura 20 muestra los espectros de RMN 13C de la preparación S2 1

60 La Figura 21 muestra los espectros de RMN 13C de la preparación S3 1

60 La Figura 22 muestra la comparación de datos sin procesar para las tres muestras (liofilizadas)

La Figura 23 muestra la superposición de desplazamiento de los datos de las tres muestras (dos repeticiones para S3)

65 La Figura 24 muestra el termograma de TGA de S1, S2 y S3 en condiciones de purga de nitrógeno.

La Figura 25 muestra termogramas de DSC de S1, S2 y S3.

Descripción detallada de la invención

- 5 En un aspecto, la presente descripción implica una composición acuosa de sacarosa de hierro (FeS) y bicarbonato (FeS-bicarbonato). Los presentes inventores han descubierto que esta composición tiene propiedades beneficiosas. En un aspecto, la composición de FeS-bicarbonato de la presente descripción puede utilizarse como un agente protector renal. Los inventores han descubierto que la composición de FeS-bicarbonato según aspectos de la descripción se absorbe preferiblemente en el riñón en comparación con las formas disponibles comercialmente de FeS. Además, los inventores han descubierto que FeS-bicarbonato da como resultado una regulación positiva preferencial de la(s) molécula(s) protectora(s) del riñón en relación con el FeS solo. En otro aspecto, la composición de FeS-bicarbonato de la presente descripción puede combinarse de forma ventajosa con otros agentes protectores renales tales como la protoporfirina de estaño (SnPP) para formar fácilmente agentes protectores renales inyectables.
- 10 Una ventaja de utilizar el FeS-bicarbonato es que esta composición da como resultado efectos de protección renal elevados. Específicamente, los inventores encontraron que FeS-bicarbonato se reguló de forma preferencial por las moléculas protectoras renales con respecto a FeS solo. Sin pretender imponer ninguna teoría, los presentes inventores han propuesto que el bicarbonato añadido al FeS puede alterar los niveles relativos de Fe (III) y Fe (II) presentes. Debido al enrojecimiento observado en el producto FeS-bicarbonato, los inventores han propuesto que las composiciones de la descripción pueden incluir niveles elevados de Fe (II). Esto podría explicar los efectos protectores renales elevados, dada la mayor reactividad de Fe (II) con respecto a Fe (III).
- 15 25 Una ventaja de utilizar el FeS-bicarbonato es que el bicarbonato tiene un efecto tamponador. Cuando se utiliza una composición de protoporfirina de estaño, esto puede ser ventajoso, ya que la SnPP se almacena mejor a pH bajo para evitar la dimerización no deseada durante el almacenamiento. Según la presente descripción, la composición de SnPP puede combinarse con la composición de FeS-bicarb en una relación inferior que o igual a aproximadamente 1:1 SnPP:FeS, tal como aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:100, aproximadamente 1:1000, aproximadamente 1:10.000, aproximadamente 1:100.000, aproximadamente 1:1.000.000.
- 30 35 En un aspecto, la composición tiene un peso molecular medido mediante la utilización de GPC como se describe en el Ejemplo 1. El PM está preferiblemente dentro del rango de entre 25.000 y 35.000 dáltones, más preferiblemente entre 28.000 y 32.000 dáltones, y con máxima preferencia aproximadamente 29.000 dáltones. El PM está preferiblemente dentro del rango de entre 25.000 y 45.000 dáltones, más preferiblemente entre 30.000 y 40.000 dáltones, aún más preferiblemente entre 33.000 y 38.000 dáltones, y con máxima preferencia aproximadamente 34.000 dáltones. La M está preferiblemente dentro del rango de entre 15.000 y 30.000 dáltones, más preferiblemente entre 20.000 y 25.000 dáltones, y con máxima preferencia aproximadamente 24.000 dáltones. La polidispersidad (PDI) está preferiblemente dentro del rango de 1,35 a 1,60, más preferiblemente dentro del rango de 1,38 a 1,5, aún más preferiblemente dentro del rango de 1,40 a 1,48, y con máxima preferencia aproximadamente 1,4.
- 40 45 En un aspecto, la composición tiene un potencial zeta estable de -3,0 mV o menos, más preferiblemente -7,0 mV o menos, y con máxima preferencia aproximadamente -10mV. En un aspecto, la composición tiene un carbono orgánico total inferior a 8,5 %, preferiblemente inferior a 8,0 % y, con máxima preferencia, aproximadamente 7,7 %. En un aspecto, la osmolalidad medida según el Ejemplo 1 está dentro del rango de 550 a 1600 mOsm/kg, dentro del rango de 1500 a 1580 mOsm/kg, y con máxima preferencia aproximadamente 1540 mOsm/kg.
- 50 55 Cualquier ejemplo que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines comparativos.
- Ejemplo 1
- 60 65 La presente descripción implica una composición que se prepara disolviendo suficiente complejo de sacarosa de hierro en agua (aproximadamente 3,5 l) para dar una solución de 12 mg/ml (expresada como hierro) cuando se diluye a 6,0 l. La cantidad de sacarosa de hierro necesaria se calculó para el volumen final de líquido, 6100 ml (6,1 l) de modo que la concentración final es 12 mg/ml. Esto requiere 73,2 g de hierro. La potencia de utilización de la sacarosa de hierro es 0,0550. Por lo tanto, se necesita 73,2 g/0,0550 o 1331 g \pm 1 g de sacarosa de hierro. Se pesó sacarosa de hierro, 1331 g \pm 1 g directamente en un matraz Erlenmeyer de 6,0 l. Aproximadamente 3-3,5 l de agua se añaden al frasco Erlenmeyer, y el contenido del frasco se agita.

Se añade bicarbonato de sodio en una cantidad tal que la concentración final de bicarbonato de sodio es 10 mg/ml cuando se diluye a 6,0 l. Se pesa bicarbonato de sodio, 109,8 \pm 0,1 g, y se añade al frasco de 6,0 l.

Se añade cloruro de sodio en una cantidad tal que la concentración final de cloruro de sodio es de 9,0 mg/ml tras la dilución. Se pesa cloruro de sodio, $54,9 \pm 0,1$, y se añade al frasco de 6,0 l. La suspensión se agita durante 30-120 minutos para dar una solución opaca negra.

- 5 El pH de la solución se controla con un medidor de pH mientras se añade hidróxido de sodio 1M en pequeñas porciones hasta que se alcanza el pH 10,30 y permanece estable. Se añadió hidróxido de sodio, $40,0 \pm 0,1$ g, a un frasco Erlenmeyer de 1,0 l. Se añade $1,0 \pm 0,1$ l de agua al frasco Erlenmeyer de 1,0 l y se agita hasta que se disuelve todo el hidróxido de sodio. Se fija una sonda de pH para controlar el pH del frasco Erlenmeyer de 6,0 l y se añade el hidróxido de sodio en porciones de 100 ml hasta el pH = $10,3 \pm 0,1$. Despues, la solución se agita durante 10 minutos. El pH se comprueba de nuevo transcurridos 10 minutos y, si es necesario, se ajusta a un pH = $10,3 \pm 0,1$.

15 Despues, la solución se transfiere a un frasco preciso volumétricamente y se diluye a 6,1 l con agua. Se utiliza un frasco volumétrico de 2 l dos veces para transferir exactamente 4 l de la solución de pH 10,3 a un frasco Erlenmeyer de 6 l. La solución restante de pH de 10,3 se diluye a 2 l en un frasco volumétrico y se añade al frasco Erlenmeyer de 6 l. Se utiliza el cilindro graduado de 100 ml para añadir $100 \pm 0,1$ ml al frasco Erlenmeyer de 6,0 l, y la solución resultante se agita durante 10 minutos.

20 La solución de producto resultante parece de rojo oscuro a marrón. Dos isótopos de hierro están presentes en la preparación de la muestra en una relación consistente con la de la preparación estándar. El material resultante tenía un pH de 10,3, que está dentro de los límites preferidos de 10,1-10,4. El material resultante tenía 11,5/11,6 partes por mil (mg/ml) de hierro según SOP 174472, que determina el hierro a través de espectroscopía de masas con plasma acoplado inductivamente.

25 Las propiedades adicionales de la composición resultante se encuentran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Propiedades de la composición del Ejemplo 1

Prueba	Observación/Resultados	Especificación	Referencia al método de ensayo
Descripción	Polvo de color marrón a marrón oscuro	Polvo de color marrón a marrón oscuro	Internamente
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua. Prácticamente insoluble en metanol	Fácilmente soluble en agua. Prácticamente insoluble en metanol	
Identificación			
Hierro	Descarga de color rojo	El color rojo debe descargar	Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38
Sacarosa	Conforme	El tiempo de retención del pico principal en el cromatograma de la preparación del ensayo corresponde a que en el cromatograma de la preparación estándar, como se obtiene en el ensayo de sacarosa.	Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38.
Peso molecular			
PM	52.149 Da	Entre 34.000 y 60.000 Da	Monografías de inyección de sacarosa de hierro_Validar método de USP38
M	35.897 da	No menos de 24.000 Da	
PM/M	1,453	No más de 1,70	
pH	11,04	Entre 10,50 y 11,0	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38<791>
Gravedad específica	1,156	Entre 1,135 y 1,165 a 20 °C	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38<841>
Turbidez	A pH de 4,67	pH entre 4,40 y 5,30	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38

(continuación)

5	Alcalinidad	0,68 ml	Entre 0,5 ml y 0,8 ml de ácido clorhídrico 0,1 N consumido por ml.	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38
10	Límite de hierro (II)	0,16 % p/v	No más del 0,40 % p/v	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38
15	Compuestos de Fe (II) y Fe (III) de bajo peso molecular	No se observaron picos adicionales en los polarogramas del límite del hierro (II)	No deben observarse picos adicionales en los polarogramas del límite del hierro (II)	Monografía de inyección de sacarosa de hierro de USP38
20	Contenido de cloruro	0,013 % p/p	Entre 0,012 % p/p y 0,025 % p/p	Monografías de inyección de sacarosa de hierro_Validar método de USP38
25	Ensayo de sacarosa (por HPLC)	85,21 % p/p	Entre 80,00 % (p/p) y 90,00 % (p/p) sobre una base seca	Monografías de inyección de sacarosa de hierro_Validar método de USP38
30	Ensayo de hierro (III) total (por AAS)	5,66 % p/p	Entre 5,00 % p/p/y 6,00 % p/p/en base seca.	Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38
35	Pérdida por secado	1,24 % p/p	No más del 5,00 % p/p	USP38
40	Metales pesados			
45	Arsénico	Menos de 2,0 ppm	No más de 2,0 ppm	Internamente
50	Cobre	Menos de 20 ppm	No más de 20 ppm	Internamente
55	Plomo	Menos de 20 ppm	No más de 20 ppm	Internamente
60	Disolventes residuales	Metanol: 2624,41 ppm Acetona: 366 ppm	Metanol: NMT 3000 ppm Acetona: NMT 5000 ppm	USP38<467>
65	Osmolaridad	1220 mOsmol/l	Entre 1150 y 1350 mOsmol/l	Monografías de USP38<785> de inyección de sacarosa de hierro
70	Partículas en suspensión	54,66 1,66	≤10 µm 6000 por recipiente ≤25 µm 600 por recipiente	Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38<785> Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38<785>
75	Endotoxina bacteriana	Menos de 3,70 UE/mg de hierro	No más de 3,7 UE/mg de hierro	Monografías de inyección de sacarosa de hierro de USP38<785>
80	Límite microbiano			
85	Bacterias aeróbicas totales	20 UFC/g	No más de 100 UFC/g	USP38<61>
90	Total de levaduras y moho	Menos de 10 UFC/g	No más de 10 UFC/g	
95	Recuento de enterobacteriaceae	Menos de 10 UFC/g	No más de 10 UFC/g	
100	E. Coli total	Ausente	Debería estar ausente	
105	Stapha. Aureus	Ausente	Debería estar ausente	
110	Pseudomonas aeruginosa	Ausente	Debería estar ausente	
115	Salmonella	Ausente	Debería estar ausente	

60 La composición de FeS-bicarbonato resultante tiene la siguiente estequiometría y constantes físicas se muestran en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2: Estequiometría y constantes físicas			
Reactivos	PM	Porcentaje activo	Cantidad nominal

Tabla 2: Estequiometría y constantes físicas			
Reactivos	PM	Porcentaje activo	Cantidad nominal
Sacarosa de hierro	736	5,5	1331 g
Bicarbonato sódico	84	100	110 g
Cloruro de sodio	58	100	55 g
Hidróxido de sodio	40	100	39 g
Agua	46,07	1000	6,1 l

Ejemplo 2

La administración intravenosa de la composición de bicarbonato de hierro de hierro (FeS) del Ejemplo 1 se realizó durante 4 horas y dio como resultado una elevada hemo oxigenasa renal 1 (HO-1) en relación con la composición de sacarosa de hierro (FeS) comercializada con la marca, Venofer®. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: ARNm de riñón HO-1 / GAPDH			
Ciclo n.º	Control	4 h IV FeS, Venofer®	4 h IV FeS-bicarb
1	0,22	1,52	3,2
2	0,04	1,23	2,01
3	0,06	1,11	1,99
4	0,07	2,23	2,23
5		1,86	1,86
Promedio	0,1	1,59	2,34
Estándar Error	0,04	0,21	0,23

El nivel elevado de HO-1 observado en el riñón no se observó en el hígado. En cambio, no se observó que el nivel de HO-1 aumentara para el FeS-bicarbonato en relación con lo que se observó para Venofer®. Los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: ARNm hepático HO-1 / GAPDH			
Ciclo n.º	Control	4 h IV FeS, Venofer®	4 h IV FeS-bicarb
1	0,09	0,99	0,49
2	0,13	1,06	0,36
3	0,11	0,51	0,93
4	0,08	1,24	0,92
5		1,07	0,49
Promedio	0,1	0,97	0,64
Estándar Error	0,01	0,12	0,12

El BUN y la creatinina en plasma fueron similares para FeS, Venofer® y FeS-bicarbonato como se muestra en las Tablas 5 y 6 más a continuación.

Tabla 5: BUN - Plasma			
Ciclo n.º	Control	4 h IV FeS, Venofer®	4 h IV FeS-bicarb

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
Tabla 5:
BUN - Plasma

Ciclo n.º	Control	4 h IV FeS, Venofer®	4 h IV FeS-bicarb
1	28	20	23
2	22	18	23
3	23	22	22
4	35	25	24
5		25	28
Promedio	27	22	24

Tabla 6:
Creatinina – Plasma

Ciclo n.º	Control	4 h IV FeS, Venofer®	4 h IV FeS-bicarb
1	0,32	0,27	0,34
2	0,31	0,29	0,31
3	0,31	0,28	0,31
4	0,31	0,25	0,32
5		0,32	0,30
Promedio	0,31	0,28	0,32

Ejemplo 3

La composición de FeS-bicarbonato del Ejemplo 1 se filtró y se colocó en un vial y tenía una concentración de FeS de 12 mg/ml (CoreRx, lote n.º 111002-18011). La osmolaridad de esta solución de 12 mg/ml fue de 831 mOsm. Para la inyección de sacarosa de 20 mg/ml de Venofer®, American Regent, Lote núm. 8243A, la osmolaridad fue de 1742 mOsm. Estas mediciones de osmolaridad se realizaron sin dilución.

Ejemplo 4

En la Figura 2 y la Tabla 7 se muestra una transferencia Western de riñón a las 18 horas después de la administración de composiciones acuosas de hierro:

Tabla 7

Riñón	Normal	<u>Venofer</u>	RBT3
ARNm HO-1	$0,1 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,21$	$2,34 \pm 0,23$
		<0,001	<0,001 (<0,05)
ARNm Ftn LC	$1,10 \pm 0,06$	$1,36 \pm 0,04$	$1,47 \pm 0,09$
		<0,01	<0,02 (NS)
ARNm Ftn HC	$1,38 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,03$	$1,49 \pm 0,06$
		NS	NS (<0,05)*
Hígado	Normal	<u>Venofer</u>	RBT3
ARNm HO-1	$0,10 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,012$	$0,64 \pm 0,12$

(continuación)

Riñón	Normal	Venofer	RBT3
		<0,001	0,01 ± (0,085)
ARNm Ftn LC	3,65 ± 0,15	4,02 ± 0,1	3,63 ± 0,13
		NS	NS
ARNm Ftn HC	1,71 ± 0,11	1,82 ± 0,1	1,71 ± 0,14
		NS	NS

15 A la izquierda, hay una transferencia Western específica de cadena pesada de riñón a las 18 h después de SnPP, FeS (Venofer) o Fe+ SnPP. N = control normal. Glyc es glicerol, utilizado como control de ferritina de cadena H positiva. N= muestras normales (controles). Como es evidente, el Fe induce un aumento de la cadena pesada en el riñón.

20 Ejemplo 5

Un paciente que padece enfermedad renal crónica se trata mediante inyección intravenosa utilizando la composición de hierro acuosa de sacarosa de hierro y bicarbonato del ejemplo 1.

25 Ejemplo 6

Un paciente sometido a trasplante de órganos se trata mediante inyección intravenosa utilizando la composición de hierro acuosa de sacarosa de hierro y bicarbonato del ejemplo 1.

30 Ejemplo 7

Un paciente sometido A trasplante de órganos se trata mediante inyección intravenosa utilizando la composición de hierro acuosa de sacarosa de hierro y bicarbonato del ejemplo 1, en combinación con protoporfirina de estaño.

35 Ejemplo 8

40 Se caracterizaron tres muestras de hierro-sacarosa (S1, S2) e hierro-dextrano (S3) mediante una variedad de técnicas analíticas. S1 se preparó según el Ejemplo 1 anterior. S2 es el producto disponible comercialmente, Venofer® (inyección de sacarosa de hierro). S3 es el producto disponible comercialmente INFeD® (Inyección de dextrano de hierro). Los resultados se resumen en la Tabla 8 a continuación.

TABLA 8: Comparación del Ejemplo 1 con Venofer® e INFeD®

ANÁLISIS	S1		S2		S3	
	FES LÍQUIDO DE 5ML ESTÉRIL	VIAL SIN etiquetar (6R) LOTE: AK2087	VENOFER (INYECCIÓN DE SACAROSA DE HIERRO, USP)	(20 MG/ML) LOTE: 9043	INFED (INYECCIÓN DE DEXTRANO DE HIERRO, USP)	(50 MG/ML) LOTE: 18W11A
GPC	M _P	29.239		35.709		83.090
	M _w	34.355		50.855		92.838
	M _n	23.881		31.345		70.640
	PDI	1,44		1,62		1,31
DLS	Promedio Z	15,30 nm		15,41 nm		16,88 nm
	PDI	0,32		0,31		0,21
Potencial Zeta	Potencial Zeta	-10,16 mV	No se obtuvo lectura estable		-2,61 mV	
	Temperatura de potencial Zeta.	25,0 °C			25,0 °C	
	pH	10,70			10,23	
	Temperatura de pH	25,0 °C			22,2 °C	
AFM	Ubicación	1	1	2	1	2
	Altura media	2,38 nm	3,88 nm	2,43 nm	4,20 nm	3,23 nm
	Altura mínima	1,34 nm	0,99 nm	1,16 nm	1,20 nm	0,91 nm

(continuación)

	Altura máxima	3,62 nm	3,73 nm	8,35 nm	7,76 nm	10,19 nm	7,23 nm		
	σ	0,61	0,73	1,53	1,33	1,46	1,47		
	N.º de partículas	21	29	84	52	117	49		
5	TOC	7,69 %			12,14 %			8,69 %	
10	Osmolalidad	1540 mOsm/kg			1681 mOsm/kg			529 mOsm/kg	
15	Fe ³⁺ vs. Fe ²⁺	Fe (II)	0,41 mg/ml			3,16 mg/ml			0,44 mg/ml
20		Fe (III)	11,43 mg/ml			16,90 mg/ml			50,90 mg/ml
		Total de Fe	11,87 mg/ml			20,02 mg/ml			51,33 mg/ml
		% de Fe (II)	3,4 %			15,8 %			0,8 %
15	ICP-OES	Total de Fe	1,07 % en peso			1,77 % en peso			4,51 % en peso
20		Total Na	1,26 % en peso			0,50 % en peso			0,42 % en peso
25	Análisis ICP-MS para elementos adicionales	Resumen	No se ha encontrado ningún elemento >50 ppm, véase el cuerpo del informe para obtener más información			No se han encontrado elementos >80 ppm, véase el cuerpo del informe obtener más información			No se han encontrado elementos >30 ppm, véase el cuerpo del informe para obtener más información
30		Cono más alto. Elemento	Si, 50 ppm			Si, 80 ppm			Si, 30 ppm
35	Familia química por FT-IR		Sacarosa			Sacarosa			Dextrano

TABLA 8: Comparación del Ejemplo 1 con Venofer® e INFED® (continuación)

	ANÁLISIS		S1	S2	S3		
25	ANÁLISIS		FES LIQUIDO ESTÉRIL 5ML VIAL SIN ETIQUETAR (6R) LOTE: AK2087	VENOFER (INYECCIÓN DE SACAROSA DE HIERRO, USP) (20 MG/ML) LOTE: 9043	INFED (INYECCIÓN DE DEXTRANO DE HIERRO, USP) (50 MG/ML) LOTE: 18W11A		
30	RMN Espectroscopía	¹ H NMR	Los picos intermedios observados, los desplazamientos químicos son consistentes con el dextrano	Se observaron picos muy amplios, los desplazamientos químicos son consistentes con la sacarosa	Los picos intermedios observados, los desplazamientos químicos son consistentes con el dextrano		
35		¹³ C NMR	Los picos son consistentes con la sacarosa	Los picos son consistentes con la sacarosa, aunque ligeramente más anchos de 51	Los picos son consistentes con el dextrano		
40	XRD (material liofilizado)	Fases detectadas	% en peso	Fases detectadas	% en peso		
45		Na ₄ Fe ₂ O ₅ -Óxido de hierro de sodio Monoclínico, SG: P21/n (n = 14) PDF N.º 04-013-8809	5,2	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ -Sacarosa monoclinica, S.G.: P21 (4) PDF N.º 02-063-8998	42,9	Na ₄ Fe ₂ O ₅ -Óxido de hierro de sodio Monoclínico, SG: P21/n (n = 14) PDF N.º 04-013-8809	18,8
50		Materiales amorfos	94,8	Materiales amorfos	57,1	Materiales amorfos	81,2
55		Fases detectadas	% en peso	Fases detectadas	% en peso	Fases detectadas	% en peso
60	XRD (material purificado con MWCO para eliminar azúcares)	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita cúbica, SG: P4332 (212) PDF N.º [04-021-3968]	81,0	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita cúbica, SG: P4332 (212) PDF N.º [04-021-3968]	89,9	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita cúbica, SG: P4332 (212) PDF N.º [04-021-3968]	74,0
65		FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro ortorrómico PDF N.º [04-003-2900]	19,0	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro ortorrómico PDF N.º [04-003-2900]	10,1	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro Ortorrómico PDF N.º [04-003-2900]	26,0
	Degradación ácida del hierro (III) lábil		1,48 %	2,27 %	1,34 %		
	TGA	Temperatura	Conductividad	Pérdida de peso (%)			
		TA a 100°	Nitrógeno	3,4	1,1	3,7	
			Aire	2,5	0,9	4,7	
		100 °C a 245°	Nitrógeno	42,7	45,0	8,2	
			Aire	43,2	43,0	7,8	
		245 °C a 530°	Nitrógeno	30,2	35,4	47,1	
			Aire	37,4	45,1	63,0	

5	245 °C a 530°	Nitrógeno	11,8	8,7	20,8
		Aire	5,7	0,7	3,0
	Residuo 800 °C	Nitrógeno	12,0	9,8	20,0
		Aire	11,2	10,3	21,4
Transición térmica observada					
10	Texo ₁ (°C)	33,8	29,2	39,2	
	ΔHexo ₁ (J/g)	88,0	47,6	99,9	
	Texo ₂ (°C)	154,9	144,6	N/A	
	Inicio Texo ₂ (°C)	141,0	127,1	N/A	
	ΔHexo ₂ (J/g)	171,7	148	N/A	

Finalmente, la muestra recibida S1 se tituló por triplicado con HCl diluido para determinar el valor de hidróxido en solución inyectable de hierro-sacarosa. Los puntos finales de las valoraciones volumétricas tuvieron pH = 7,0. Partiendo del supuesto de que todas las especies básicas valoradas volumétricamente procedían del hidróxido asociado a los núcleos de oxihidróxido férreo, se supuso que el número total de moles de H⁺ utilizados en la valoración volumétrica era igual al número de moles de OH⁻. Considerando el TOC, y el PM (o M) por GPC, la fórmula molecular de la sacarosa de hierro en S1 se calculó como sigue:

Cálculo basado en PM: [Na₆Fe₅O₈(OH)₅ · 3H₂O]₁₃ · 73(C₁₂H₂₂O₁₁) Cálculo basado en Mn: [Na₆Fe₅O₈(OH)₅ · 3H₂O]₉ · 51(C₁₂H₂₂O₁₁). La Tabla 9 a continuación muestra detalles de la preparación e identificación de muestras.

TABLA 9: Preparación e identificación de muestras			
	NÚMERO DE MUESTRA	DESCRIPCIÓN	FECHA EN QUE SE RECIBIÓ
30	S1	FeS líquido estéril 5 ml vial sin etiquetar (6R) Lote: AK2087 Cantidad: 15	11 de julio de 2019
40	S2	Venofer (inyección de sacarosa de hierro, USP) 100 mg de hierro elemental por 5 ml (20 mg/ml) Lote: 9043 Exp: Febrero de 2021 (2 cada uno de 10 x 5 ml)	11 de julio de 2019
50	S3	INFED (inyección de dextrano de hierro, USP) 100 mg hierro elemental/2 ml (50 mg/ml) Exp: 10/2021 Lote: 18W11A (4 cada uno de 10 x 2 ml)	11 de julio de 2019

Preparación de muestras: Las muestras se liofilizaron hasta un residuo seco antes del análisis a menos que se indique lo contrario.

Cromatografía de permeación en Gel (GPC): LA GPC se utiliza para determinar la distribución de peso molecular de los polímeros. En el análisis de GPC, una solución del polímero se pasa a través de una columna compactada con un gel poroso. La muestra se separa en función del tamaño molecular con moléculas más grandes que eluyen más rápidamente que las moléculas más pequeñas. El tiempo de retención de cada componente se detecta y se

compara con una curva de calibración, y los datos resultantes se usan entonces para calcular la distribución de peso molecular para la muestra.

Una distribución de pesos moleculares en lugar de un peso molecular único es característica de todos los tipos de 5 polímeros sintéticos. Para caracterizar esta distribución, se utilizan promedios estadísticos. El más común de estos promedios es el “peso molecular promedio en número” (M) y el “peso molecular promedio en peso” (PM).

El peso molecular promedio en número es similar a la media aritmética estándar asociada a un grupo de números. 10 Cuando se aplica a polímeros, el peso molecular promedio en número se refiere al peso molecular promedio de las moléculas en el polímero. El peso molecular promedio en número se establece dando la misma cantidad de significancia a cada molécula independientemente de su peso molecular individual. El peso molecular promedio en número se establece mediante la siguiente fórmula donde N_i es el número de moléculas con una masa molar igual a M_i .

15

$$\bar{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

20 Un cálculo ligeramente diferente y un significado mucho diferente es el peso molecular promedio en peso, PM. El peso molecular promedio en peso es otro descriptor estadístico de la distribución de peso molecular que proporciona más importancia a las moléculas más grandes que a las moléculas más pequeñas de la distribución. La siguiente fórmula muestra el cálculo estadístico del peso molecular promedio en peso.

25

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

30 Para GPC, las muestras se prepararon diluyendo en tampón fosfato (según el método de la monografía de la USP) y se analizaron para determinar las distribuciones de peso molecular en cada muestra. Los resultados se resumen a continuación en las Tablas 10-12. Los cromatogramas representativos del análisis se presentan en las Figuras 3-9.

35 Existen dos razones generales para el peso molecular promedio en peso. En primer lugar, si se compara, por ejemplo, la tenacidad, las moléculas más largas influyen en la tenacidad de la distribución del polímero más de las moléculas más cortas realizadas. El cálculo del peso molecular promedio en peso da énfasis a estas moléculas más largas, y proporciona un número comparativo que puede describir la contribución relativa de las moléculas largas 40 presentes en una distribución de peso molecular. El peso molecular promedio en peso también es un número que está directamente correlacionado con la determinación del peso molecular de los polímeros mediante dispersión de luz, dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS) y velocidad de sedimentación.

45 En segundo lugar, el peso molecular promedio en peso proporciona información de la forma de una distribución de peso molecular. Este valor, en relación con el peso molecular promedio en número, proporciona una determinación de la relación de la ampliación de la distribución de peso molecular denominada como el índice de polidispersidad o PI. El PI se define como la relación de PM/M . Cuanto mayor sea el PI, más dispersa es la distribución. El valor más bajo de PI puede ser 1. Esto representa una muestra monodispersa, un polímero con todas las moléculas en la distribución que es el mismo peso molecular.

50 El “peso molecular promedio z” (M_z) no es tan común, pero también se proporciona. Este promedio del peso molecular es un valor que describe aún más la distribución del peso molecular. Este valor puede determinarse fácilmente a partir del equilibrio de sedimentación.

55 También se incluye a veces el peso molecular máximo, M_p . El valor del peso molecular máximo se define como el modo de distribución del peso molecular. Indica el peso molecular que es más abundante en la distribución. Este valor también proporciona información de la distribución del peso molecular.

60 La mayoría de las mediciones de GPC se realizan en relación con un patrón de polímero diferente (normalmente poliestireno). La precisión de los resultados depende de lo estrechamente que las características del polímero que se analizan coincidan con las de la norma usada. El error esperado en reproducibilidad entre diferentes series de determinaciones, calibrado por separado, es aproximadamente un 5-10 % y es característico de la precisión limitada de las determinaciones de GPC. Por lo tanto, los resultados de GPC son más útiles cuando se realiza una comparación entre la distribución de peso molecular de diferentes muestras durante la misma serie de determinaciones.

Las precisiones y sesgo de GPC se basan en datos estadísticos tales como un promedio de mediciones, desviación estándar, diferencia de porcentaje relativa y/o porcentaje de desviación estándar relativa. Para los análisis cuantitativos, las cantidades enumeradas en las tablas anteriores se referenciaron a una cantidad conocida de estándar y son cuantitativas. Se prepararon curvas de calibración y se hace referencia a la desviación estándar relativa y la información de diferencia porcentual relativa en el informe anterior. Para la reproducibilidad típica semicuantitativa, según lo determinado por el control del proceso estadístico del sistema de medición se estima en aproximadamente el 10 % (con un nivel de confianza del 95 %, $k \sim 2$). Esta reproducibilidad es una estimación de la incertidumbre de una única medición estándar a lo largo del tiempo, y la incertidumbre en una medición específica debe determinarse caso por caso. Para los análisis cualitativos, los estándares de referencia analítica no se analizaron para confirmar la presencia de los componentes individuales. En tales casos, no es posible asignar un valor numérico a la "incertidumbre" de las coincidencias proporcionadas.

Obsérvese que las muestras S1 y S2 contenían dos picos con distribuciones de peso molecular únicas mientras que la muestra S3 contenía tres picos. Obsérvese también que un M_p no pudo calcularse para el "Pico 2" (pico de molécula pequeña, probablemente sacarosa) porque el pico saturó el detector; las muestras se analizaron a una concentración que fue apropiada para la caracterización de las especies de mayor peso molecular, con el gasto de saturación del detector con las especies de menor peso molecular de menor interés.

TABLA 10: Resumen de datos de GPC para la muestra S1

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	PREPARACIÓN	INYECCIÓN	M_p	M_n	M_w	M_z	PD	
Pico S1 1	1	1	28.558	23.158	33.501	49.457	1,45	
		2	28.558	22.954	34.613	52.469	1,51	
	2	1	29.137	24.149	33.976	47.218	1,41	
		2	29.727	24.329	34.908	51.148	1,44	
	3	1	29.727	24.188	34.658	48.687	1,43	
		2	29.727	24.510	34.471	47.718	1,41	
	Promedio		29.239	23.881	34.355	49.450	1,44	
	Desviación estándar		575	655	520	2028	0,04	
	% RSD		2,0	2,7	1,5	4,1	2,6	
	Pico S1 2	1	1	Detector saturado; Pico máximo no disponible ¹	256	281	306	1,10
			2		256	281	306	1,10
		2	1		249	278	307	1,12
			2		249	278	307	1,12
		3	1		251	279	306	1,11
			2		251	279	306	1,11
		Promedio		N/A	252	279	306	1,11
		Desviación estándar		N/A	3	1	1	0,01
		% RSD		N/A	1,3	0,5	0,2	0,8

TABLA 11: Resumen de datos de GPC para la muestra S2

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	PREPARACIÓN	INYECCIÓN	M_p	M_n	M_w	M_z	PD
Pico S2 1	1	1	35.587	30.778	51.407	91.042	1,67
		2	34.884	31.180	50.455	83.903	1,62
	2	1	35.587	31.206	51.080	86.265	1,64
		2	35.587	31.442	50.835	84.143	1,62
	3	1	36.303	31.997	50.985	82.454	1,59
		2	36.303	31.469	50.368	80.420	1,60
	Promedio		35.709	31.345	50.855	84.705	1,62

(continuación)

TABLA 11: Resumen de datos de GPC para la muestra S2

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	PREPARACIÓN	INYECCIÓN	M _P	M _n	M _w	M _z	PD
Pico S2 2	Desviación estándar		535	404	392	3660	0,03
	% RSD		1,5	1,3	0,8	4,3	1,7
	1	1	Detector d saturado; Pico máximo no	242	286	327	1,18
		2		243	286	328	1,18
		1		241	287	331	1,19
		2		240	287	331	1,20
	2	1		245	286	326	1,17
		2		243	288	332	1,19
	Promedio		N/A	242	287	329	1,18
	Desviación estándar		N/A	2	1	2	0,01
	% RSD		N/A	0,7	0,3	0,8	0,9

TABLA 12: Resumen de datos de GPC para la muestra S3

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	PREPARACIÓN	INYECCIÓN	M _P	M _n	M _w	M _z	PD
Pico S3 1	1	1	83.090	71.378	93.965	124.983	1,32
		2	83.090	70.426	92.618	121.641	1,32
	2	1	83.090	70.660	92.582	121.443	1,31
		2	83.090	70.030	92.525	123.025	1,32
	3	1	83.090	70.719	92.723	121.912	1,31
		2	83.090	70.627	92.615	121.900	1,31
	Promedio		83.090	70.640	92.838	122.484	1,31
	Desviación estándar		0	440	556	1342	0,00
	% RSD ¹		0,0	0,6	0,6	1,1	0,3
	1	1	6749	4235	6558	9203	1,55
		2	6607	4209	6503	9096	1,55
Pico S3 2	2	1	6607	4179	6492	9135	1,55
		2	6607	4156	6434	8988	1,55
	3	1	6607	4175	6496	9143	1,56
		2	6607	4162	6488	9140	1,56
	Promedio		6631	4186	6495	9118	1,55
	Desviación estándar		58	30	40	72	0,01
	% RSD ¹		0,9	0,7	0,6	0,8	0,3
	1	1	373	305	331	353	1,09
		2	373	310	334	355	1,08
Pico 3 S3	2	1	373	334	353	367	1,06
		2	373	342	359	373	1,05
	3	1	373	342	360	374	1,05
		2	373	344	361	375	1,05
	Promedio		373	330	350	366	1,06
	Desviación estándar		0	17	14	10	0,02

ES 2 955 019 T3

(continuación)

TABLA 12: Resumen de datos de GPC para la muestra S3									
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	PREPARACIÓN	INYECCIÓN	M _P	M _N	M _w	M _z	PD		
	% RSD ¹				0,0	5,3	3,9	2,7	1,4

5 Dispersión dinámica de la luz

10 El análisis PSD se realizó con un difractor láser. La medición calcula una distribución de volumen a partir del patrón de difracción láser de una nube de partículas. A continuación, estos datos de dispersión sin procesar se procesan con un algoritmo y se presentan sobre la base del diámetro esférico equivalente. Los resultados se han resumido en una base de volumen (masa) en un histograma que proporciona el porcentaje de volumen diferencial menor y mayor que el tamaño indicado.

15 El análisis del tamaño de las partículas se realizó en un instrumento de dispersión dinámica de la luz (DLS) Malvern® Zetasizer Nano ZS. DLS es una técnica de conjunto que analiza la luz dispersada por partículas que se mueven en movimiento browniano y genera una distribución de tamaño de partícula basada en la velocidad de difusión de la partícula. Los datos de dispersión sin procesar se procesan utilizando un algoritmo complejo y se presentan sobre la base de un diámetro hidrodinámico ponderado por intensidad. La técnica analítica se resume en la ISO 22412:2008 Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering (DLS), así como en la ASTM E2490-09(2015) Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS).

20 25 Las muestras recibidas fueron agua para inyección (WFI) y se analizaron mediante DLS para dar la dimensión física global de las partículas. Los resultados ponderados de intensidad y volumen del análisis se presentan en la Tabla 13 y la Tabla 14, respectivamente.

TABLA 13: Resumen de los resultados de DLS (ponderados por intensidad)								
ID DE LA MUESTRA	RÉPLICA	RESULTADOS ACUMULADOS		Resultados NNLS ¹				
		Promedio Z ²	PDI ₃	PICO 1 (nm)	PICO 1 ANCHO (nm)	PICO 2 (nm)	PICO 2 ANCHO (nm)	PICO 3 (nm)
S1	Réplica 1	13,55	0,30	17,12	10,45	2419	1460	Sin pico
	Réplica 2	14,72	0,35	14,48	6,11	522,4	218,3	4668
	Réplica 3	17,64	0,30	16,22	6,91	705,5	425,1	959,1
	Promedio	15,30	0,32	15,94	7,82	1215,6	701,1	4598
S2	Réplica 1	15,76	0,32	18,79	10,60	3271	1497	Sin pico
	Réplica 2	15,69	0,35	16,39	7,83	1017	574,5	4213
	Réplica 3	14,79	0,27	18,33	11,76	4037	1136	672,2
	Promedio	15,41	0,31	17,84	10,06	2775	1069,2	2442,6
S3	Réplica 1	17,35	0,22	20,9	11,18	3726	1240	379,5
	Réplica 2	16,17	0,20	18,43	8,10	3444	1425	Sin pico
	Réplica 3	17,13	0,22	20,27	9,95	3466	1276	812,4
	Promedio	16,88	0,21	19,87	9,74	3545,3	1313,7	596,0

1 NNLS = datos por mínimos cuadrados no negativos; ² Promedio Z = distribución de tamaño de partículas, ³ PDI = índice de polidispersidad

TABLA 14: Resumen de los resultados de DLS (volumen ponderado)									
ID DE LA MUESTRA	RÉPLICA	RESULTADOS ACUMULADOS		Resultados NNLS ¹					
		Promedio Z ²	PDI ₃	PICO 1 (nm)	PICO 1 ANCHO (nm)	PICO 2 (nm)	PICO 2 ANCHO (nm)	PICO 3 (nm)	PICO 3 ANCHO (nm)
S1	Réplica 1	13,55	0,30	7,94	3,89	1354	455,9	Sin pico	Sin pico
	Réplica 2	14,72	0,35	2,89	0,65	9,292	3,711	714,3	317,9
	Réplica 3	17,64	0,30	10,70	4,11	970,4	413,9	4904	993,8
	Promedio	15,30	0,32	7,18	2,88	777,9	291,2	2809	655,9
S2	Réplica 1	15,76	0,32	8,55	4,46	1398	406,3	4450	1157
	Réplica 2	15,69	0,35	8,19	4,39	1138	406,7	Sin pico	Sin pico
	Réplica 3	14,79	0,27	8,88	4,21	Sin pico	Sin pico	Sin pico	Sin pico
	Promedio	15,41	0,31	8,54	4,35	1268,0	406,5	4450	1157,0
S3	Réplica 1	17,35	0,22	11,66	5,03	Sin pico	Sin pico	Sin pico	Sin pico
	Réplica 2	16,17	0,20	11,61	4,62	4511	1135	Sin pico	Sin pico
	Réplica 3	17,13	0,22	11,66	5,03	1210	430,7	Sin pico	Sin pico
	Promedio	16,88	0,21	11,64	4,89	2860,5	782,9	Sin pico	Sin pico
1 NNLS = datos por mínimos cuadrados no negativos; ² Promedio Z = promedio de distribución de tamaño de partículas; ³ PDI = índice de polidispersidad									

1 NNLS = datos por mínimos cuadrados no negativos; ² Promedio Z = promedio de distribución de tamaño de partículas; ³ PDI = índice de polidispersidad

30 Potencial zeta

Las muestras se prepararon para el potencial zeta mediante dilución en tampón (el instrumento no pudo lograr lecturas estables cuando se diluyó en NaCl 10 nm por nanomateriales 2018, 8, 25). El pH y la temperatura se registraron en el momento del análisis de potencial zeta. Los resultados se resumen de la Tabla 6 a la Tabla 8 a continuación. No se pudo obtener una lectura estable de S2. Los resultados del ensayo de potencial zeta se presentan en las Tablas 15-17.

TABLA 15: Datos de potencial zeta para la muestra S1										
ID DE LA MUESTRA	ALÍCUOTA	RÉPLICA	POTENCIAL ZETA (mV)	PROMEDIO POTENCIAL ZETA (mV)	TEMPERATURA DE POTENCIAL ZETA (°C)	PH	TEMPERATURA DE PH (°C)	CONDUTIVIDAD (mS/cm)	PROMEDIO Conductividad (mS/cm)	TEMPERATURA DE CONDUCTIVIDAD (°C)
V1KCJ4 05 S1	1	1	-8,77	-10,42	25	10,7	25	10,0	11,2	25
		2	-8,87					11,1		
		3	-12,2					11,6		
		4	-9,08					11,7		
		5	-13,2					11,8		
	2	1	-10,1	-9,90	25	10,6	25	10,1	11,4	25
		2	-8,86					11,4		
		3	-8,25					11,7		
		4	-11,4					11,8		
		5	-10,9			9		11,9		

TABLA 16: No se han alcanzado los datos de potencial zeta de la muestra S2 (lectura estable)											
	ID DE LA MUESTRA	ALÍCUMA	RÉPLICA	POTENCIAL ZETA (mV)	PROMEDIO POTENCIAL ZETA (mV)	TEMPERATURA DE POTENCIAL ZETA (°C)	P H	TEMPERATURA DE PH (°C)	CONDUTIVIDAD (mS/cm)	PROMEDIO Conductividad (mS/cm)	TEMPERATURA DE CONDUCTIVIDAD (°C)
V1KCJ4 05 S2	1	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		2	N/A						N/A		
		3	N/A						N/A		
		4	N/A						N/A		
		5	N/A						N/A		
	2	1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		2	N/A						N/A		
		3	N/A						N/A		
		4	N/A						N/A		
		5	N/A								

TABLA 17: Datos de potencial zeta para la muestra S3											
5	ID DE LA MUESTRA	ALÍCUOTA	RÉPLICA	POTENCIAL ZETA (mV)	PROMEDIO POTENCIAL ZETA (mV)	TEMPERATURA DE POTENCIAL ZETA (°C)	PH	TEMPERATURA DE PH (°C)	CONDUTIVIDAD (mS/cm)	PROMEDIO Conductividad (mS/cm)	TEMPERATURA DE CONDUCTIVIDAD (°C)
10	V1KCJ4 05 S3	1	1	-3,35	-2,972	25	10,2 5	22,0	7,15	7,828	25
15			2	-2,23					7,80		
20			3	-2,13					8,00		
25			4	-3,41					8,08		
30			5	-3,74					8,11		
35		2	1	-1,78	-2,254	25	10,2	22,4	7,32	8,012	25
40			2	-3,07					7,99		
45			3	-0,37					8,19		
50			4	-2,53					8,27		
55			5	-3,52					8,29		

25 Microscopía de fuerza atómica (afm)

Las muestras tal como se recibieron se diluyeron 50x utilizando agua filtrada MilliQ (18,2 MΩ/cm, 4ppb TOC). Aproximadamente 10 µl de estas soluciones diluidas se depositaron sobre piezas recién cortadas de mica y se dejaron incubar durante aproximadamente un minuto. A continuación, las muestras se enjuagaron 5x con agua MilliQ y se secaron con nitrógeno. Se obtuvieron imágenes de dos áreas de 1 µm x 1 µm en cada muestra. Las diferencias topográficas de estas imágenes se presentan en colores donde el color marrón es bajo y el blanco es alto. Los rangos z se indican en la barra de escala vertical a la derecha de las imágenes. También se incluyen vistas en perspectiva (3-D) de estas superficies con exageraciones verticales señaladas en los pies de foto.

35 Se realizaron análisis del tamaño de partícula para caracterizar las alturas de las partículas presentes dentro de cada área. Se utilizó un umbral de altura de 0,5 nm para identificar las partículas de interés mientras se excluye las características no representativas. La altura máxima, la altura mínima y los resultados de la altura media se resumen en la Tabla 18.

TABLA 18: Resultados del análisis de tamaño de partícula							
	ID DE LA MUESTRA	UBICACIÓN	ALTURA MEDIA (nm)	ALTURA MÍNIMA (nm)	ALTURA MÁXIMA (nm)	σ	N.º DE PARTÍCULAS
45	S1	1	2,38	1,34	3,62	0,61	21
		2	2,43	1,16	3,73	0,73	29
50	S2	1	3,88	0,99	8,35	1,53	84
		2	3,49	1,20	7,76	1,33	52
55	S3	1	4,20	1,19	10,19	1,46	117
		2	3,23	0,91	7,23	1,47	49
En blanco		1	n/a	n/a	n/a	n/a	0

55 Se realizaron análisis de sección para medir manualmente las alturas de las partículas representativas. El análisis seccional para S1 en la ubicación 1 se muestra en las Figuras 10, 11 y 12. Los resultados se resumen en la Tabla 19 para cada uno de S1, S2, un S3.

TABLA 19: Resultados del análisis de tamaño de partícula				
ID DE LA MUESTRA	UBICACIÓN	ALTURA DE LA PARTÍCULA 1 (nm)	ALTURA DE LA PARTÍCULA 2 (nm)	ALTURA DE LA PARTÍCULA 3 (nm)
65	S1	1	3,50	3,35
		2	3,67	2,67

(continuación)

TABLA 19: Resultados del análisis de tamaño de partícula				
ID DE LA MUESTRA	UBICACIÓN	ALTURA DE LA PARTÍCULA 1 (nm)	ALTURA DE LA PARTÍCULA 2 (nm)	ALTURA DE LA PARTÍCULA 3 (nm)
S2	1	4,96	2,68	4,77
	2	3,51	3,95	6,48
S3	1	3,75	6,81	3,89
	2	4,37	4,27	3,81

Carbón orgánico total (toc)

El carbono orgánico total (TOC) en las muestras se calculó restando el carbono inorgánico del carbono total (determinado mediante la utilización del analizador de carbono de combustión). Los resultados se resumen en la Tabla 20 a continuación.

TABLA 20: Cálculos de carbono orgánico total (TOC)								
ID DE LA MUESTRA	RÉPLICA	CARBÓN TOTAL (% en peso) ¹	CARBÓN TOTAL PROMEDIO	% de RSD	CARBÓN INORGÁNICO TOTAL	CARBÓN TOTAL PROMEDIO	% RSD ₂	PROMEDIO DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL (% en peso) ¹
S1	Réplica 1	8,07	7,92	1,8 %	0,23 %	0,23	0,0 %	7,69
	Réplica 2	7,89			0,23 %			
	Réplica 3	7,79			0,23 %			
S2	Réplica 1	12,27	12,17	0,8 %	0,03 %	0,03	0,0 %	12,14
	Réplica 2	12,15			0,03 %			
	Réplica 3	12,08			0,03 %			
S3	Réplica 1	8,56	8,69	2,5 %	<0,03 %	<0,03	-	8,69
	Réplica 2	8,57			<0,03 %			
	Réplica 3	8,94			<0,03 %			

1 % en peso = porcentaje del peso,² % RSD = desviación estándar relativa

Osmolalidad

La osmolalidad de las muestras se midió utilizando el método de presión de vapor. El método de presión de vapor determina la osmolalidad a temperatura ambiente con la muestra en equilibrio natural. Los resultados de la prueba de osmolalidad se resumen en la Tabla 21.

TABLA 21: Resumen de resultados de osmolalidad				
ID DE LA MUESTRA	RÉPLICA	Osmolalidad (mOsm/kg)	Osmolalidad promedio (mOsm/kg)	% RSD ¹
S1	Réplica 1	1539	1540	0,1 %
	Réplica 2	1541		
	Réplica 3	1539		
S2	Réplica 1	1677	1681	0,2 %
	Réplica 2	1682		
	Réplica 3	1683		
S3	Réplica 1	533	529	0,7 %
	Réplica 2	527		
	Réplica 3	526		

Fe⁺³ vs. Fe⁺²

Una alícuota de cada muestra se diluyó en ácido clorhídrico concentrado según la referencia del método proporcionada por el cliente, Gupta y col.¹ Las muestras se analizaron según el método descrito por Stookey.² Los resultados se muestran en la Tabla 22.

TABLA 22: Resumen de la especiación del hierro											
ID DE LA MUESTRA	RÉPLICA	Fe (II) (mg/ml)	Fe promedio (III) (mg/ml)	% de RSD	Fe (III) (mg/ml)	Fe PROMEDIO (III) (mg/ml)	% de RSD	Fe (REDUCIDO) (HIERRO TOTAL, mg/ml)	Fe PROMEDIO (III) (mg/ml)	% de RSD	% de Fe (II)
S1	Réplica 1	0,43	0,41	4,3 %	11,20	11,43	1,8 %	11,70	11,87	1,3 %	3,4 %
	Réplica 2	0,41			11,60			12,00			
	Réplica 3	0,39			11,50			11,90			
S2	Réplica 1	3,16	3,16	1,6 %	16,80	16,90	1,0 %	19,90	20,03	1,2 %	15,8 %
	Réplica 2	3,21			17,10			20,30			
	Réplica 3	3,11			16,80			19,90			
S3	Réplica 1	0,45	0,44	2,0 %	51,70	50,90	1,7 %	52,20	51,33	1,8 %	0,8 %
	Réplica 2	0,43			51,00			51,40			
	Réplica 3	0,43			50,00			50,40			

% RSD = desviación estándar relativa

Análisis elemental por espectrometría de masas/plasma acoplado inductivamente (icp/ms) y contenido total de hierro y sodio por espectroscopía de emisión óptica/plasma acoplado inductivamente (icp/oes)

ICP/OES es una técnica espectroscópica utilizada para identificar y cuantificar componentes por elementos. En ICP, el acoplamiento inductivo transfiere energía de alta frecuencia a un flujo de gas inerte, que contiene la muestra como aerosol. La energía hace que el aerosol se vaporice, mientras que excita los átomos libres resultantes para que emitan luz. La intensidad de esta luz se relaciona entonces con la concentración de los átomos emisores. Esta técnica requiere la calibración del instrumento y una verificación de calibración de segunda fuente antes, durante y después de la finalización de la secuencia de ejecución analítica. Además, los instrumentos en blanco siguen cada estándar de verificación. Esto asegura que no se lleve a cabo durante la secuencia analítica. Las mediciones de concentración de los elementos principales realizados por ICP tienen una incertidumbre típicamente en el intervalo del 3 al 5 % (con un nivel de confianza del 95 %). La incertidumbre en las concentraciones de oligoelementos podría ser significativamente mayor.

Las muestras S1 a S3 se analizaron mediante ICP-MS para metales y/u otros elementos. Las muestras también se analizaron por ICP-OES para determinar el contenido total de hierro y sodio. Las muestras se analizaron tal como se recibieron por triplicado. Los resultados se resumen en las Tablas 23-25.

TABLA 23: Resumen de los elementos detectados por ICP en S1				
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S1 (ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN S1 (ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN S1 (ppm % en peso) ¹	PROMEDIO S1 (ppm % en peso)
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso)
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	4,2	4,1	4,1	4,1
Na ²	1,27 %	1,25 %	1,25 %	1,26 %
Mg	0,9	0,9	0,9	0,9
Al	6,9	6,8	7,0	6,9
Si	50	49	51	50
P	2,3	2,5	2,5	2,4
K	10	10	10	10
Ca	2	1	<1	<2
Sc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ti	0,2	0,2	0,2	0,2
V	0,4	0,4	0,4	0,4

(continuación)

Cr	4,6	4,4	4,6	4,5
M	8,4	8,5	8,7	8,5
Fe ²	1,07 %	1,07 %	1,07 %	1,07 %
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	1,1	1,1	1,1	1,1
Cu	0,3	0,3	0,3	0,3
Zn	1,2	1,2	1,2	1,2
Ga	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	0,2	0,2	0,2	0,2
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nb	0,2	0,2	0,2	0,2
Mo	0,6	0,6	0,6	0,6
Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

TABLA 23: Resumen de los elementos detectados por ICP en S1 (continuación)

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S1	CONCENTRACIÓN S1	CONCENTRACIÓN S1	PROMEDIO S1
	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 1	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 2	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 3	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso)
Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sn	0,2	0,1	0,1	0,1
Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ba	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hf	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ta	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
W	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Re	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Os	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ir	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

(continuación)

Pt	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Au	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tl	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Th	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
U	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

TABLA 24: Resumen de los elementos detectados por ICP en S2				
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S2	CONCENTRACIÓN S2	CONCENTRACIÓN S2	PROMEDIO S2
	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 1	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 2	(ppm % en peso) ¹ RÉPLICA 3	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso) ¹
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	6,8	6,8	6,8	6,8
Na ²	0,50 %	0,50 %	0,50 %	0,50 %
Mg	1,9	1,9	1,9	1,9
Al	5,6	5,8	5,7	5,7
Si	78	80	79	78,5
P	1	1	1	1
K	10	10	10	10
Ca	11	12	12	11,7
Sc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ti	1,0	1,0	1,0	1
V	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
M	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Fe ²	1,77 %	1,76 %	1,77 %	1,77 %
Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ni	0,1	0,1	0,1	0,1
Cu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zn	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ga	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sr	0,2	0,2	0,2	0,2
Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Mo	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sn	0,4	0,4	0,4	0,4
Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

(continuación)

TABLA 24: Resumen de los elementos detectados por ICP en S2 (continuación)

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S2	CONCENTRACIÓN S2	CONCENTRACIÓN S2	PROMEDIO S2
	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso) ¹
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	
Ba	3,7	3,7	3,6	3,7
La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hf	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ta	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
W	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Re	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Os	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ir	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pt	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Au	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Tl	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Bi	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Th	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
U	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

TABLA 25: Resumen de los elementos detectados por ICP en S3

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S3	CONCENTRACIÓN S3	CONCENTRACIÓN S3	PROMEDIO S3
	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso) ¹
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	
Li	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Be	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
B	1,0	0,9	0,9	0,9
Na ²	0,42 %	0,42 %	0,42 %	0,42 %
Mg	1,5	1,6	1,5	1,5
Al	1,0	1,1	1,0	1,1

TABLA 25: Resumen de los elementos detectados por ICP en S3 (continuación)

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S3	CONCENTRACIÓN S3	CONCENTRACIÓN S3	PROMEDIO S3
	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	(ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso) ¹
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	
Si	30	30	30	30,0

ES 2 955 019 T3

(continuación)

	p	3	3	3	3,0
	K	3	4	3	3,3
	Ca	3	4	3	3,3
5	Sc	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ti	0,4	0,4	0,4	0,4
	V	0,1	0,1	0,1	0,1
10	Cr	0,3	0,2	0,2	0,2
	M	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
15	Fe ²	4,50 %	4,52 %	4,52 %	4,51 %
	Co	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ni	0,7	0,5	0,5	0,6
20	Cu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Zn	0,6	0,7	0,5	0,6
	Ga	0,2	0,2	0,2	0,2
25	Ge	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	As	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
30	Se	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Rb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Sr	0,1	0,1	0,1	0,1
35	Y	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Zr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Nb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
40	Mo	0,5	0,5	0,5	0,5
	Ru	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Rh	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
45	Pd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ag	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Cd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
50	In	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Sn	2,0	1,9	1,9	1,9
	Sb	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Te	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
55	Cs	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ba	0,5	0,5	0,5	0,5
	La	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Ce	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
60	Pr	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Nd	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	Sm	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
65	Eu	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

TABLA 25: Resumen de los elementos detectados por ICP en S3 (continuación)

ELEMENTO	CONCENTRACIÓN S3 (ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN S3 (ppm % en peso) ¹	CONCENTRACIÓN S3 (ppm % en peso) ¹	PROMEDIO S3 (ppm % en peso) ¹
	RÉPLICA 1	RÉPLICA 2	RÉPLICA 3	CONCENTRACIÓN (ppm % en peso) ¹
Gd	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Tb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Dy	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Ho	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Er	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Tm	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Yb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
Lu	<0,1	<0,1	<0,1	0,1

(continuación)

	Hf	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Ta	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	W	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
5	Re	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Os	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Ir	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
10	Pt	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Au	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
15	Hg	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Tl	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Pb	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
	Bi	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
20	Th	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
25	U	<0,1	<0,1	<0,1	0,1

Espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (ft-ir)

20 La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es una herramienta de elección para la
 5 identificación de materiales. En FT-IR, las bandas de absorción de infrarrojos se asignan a grupos funcionales
 10 característicos. Basándose en la presencia de varias de tales bandas, puede identificarse el material en cuestión. La disponibilidad de espectros de compuestos conocidos aumenta la probabilidad de realizar una identificación positiva.
 15 Las muestras liofilizadas se analizaron mediante reflectancia total atenuada horizontal (HATR), basada en la
 20 reflexión interna de la radiación infrarroja (IR). El espectro FT-IR de S1 con una coincidencia espectral de biblioteca
 25 se presenta en la Figura 13 a continuación. Los datos sugieren que el material es consistente con la sacarosa. Los
 30 espectros de FT-IR de S2 y S3 se presentan en la Figura 14 y la Figura 15. La asignación de la absorción frente a
 35 los grupos funcionales se muestra en la Tabla 26 -Tabla 28.

30 **TABLA 26: Asignación de bandas de absorción de IR características para sacarosa en preparaciones de S1 liofilizadas**

	SACAROSA ³	ONDULADORES S1P1 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S1P2 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S1P3 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)
35	Cambio en la longitud de OH 3566-3263 cm ⁻¹	3301 cm ⁻¹	3315 cm ⁻¹	3319 cm ⁻¹
	Cambio en la longitud de C-H 3014 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
40	Cambio en la longitud CH ₂ 2995-2914 cm ⁻¹	2923 cm ⁻¹	2907 cm ⁻¹	2918 cm ⁻¹
	Cambio en la longitud CH 2896-2847 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
45	CH ₂ deformación, cambio de ángulo entre el plano de 1477-1391 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
	Cambio en la longitud simétrica de OH 1386 cm ⁻¹	1372 cm ⁻¹	1375 cm ⁻¹	1371 cm ⁻¹
50	Cambio de ángulo de CH 1366-1280 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
	Deformación de OH 1238-1209, 1161 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
55	Cambio en la longitud de C-C 1171, 1073, 1069, 943, 921 cm ⁻¹	924 cm ⁻¹	926 cm ⁻¹	926 cm ⁻¹
	Cambio en la longitud de CO 1138-1087, 1053-991, 914, 909, 868 cm ⁻¹	1135, 1050, 993 cm ⁻¹	1135, 1050, 993 cm ⁻¹	1135, 1050, 993 cm ⁻¹
60	Cambio de ángulo entre dos planos de CH ₂ 850 cm ⁻¹	832 cm ⁻¹	831 cm ⁻¹	833 cm ⁻¹
65	Cambio en la longitud de C-O 734 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado

TABLA 27: Asignación de bandas de absorción de IR características para sacarosa en preparaciones de S2 liofilizadas

SACAROSA ³	ONDULADORES S2P1 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S2P2 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S2P3 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)
Cambio en la longitud de OH 3566-3263 cm ⁻¹	3560 cm ⁻¹	3562, 3386, 3337 cm ⁻¹	3619, 3338 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de C-H 3014 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
Cambio en la longitud CH ₂ 2995-2914 cm ⁻¹	No detectado	2941 cm ⁻¹	2926 cm ⁻¹
Cambio en la longitud CH 2896-2847 cm ⁻¹	No detectado	2891 cm ⁻¹	2891 cm ⁻¹
CH ₂ deformación, cambio de ángulo entre el plano de 1477-1391 cm ⁻¹	1450, 1404 cm ⁻¹	1476, 1432, 1406 cm ⁻¹	1463, 1450, 1435 cm ⁻¹
Cambio en la longitud simétrica de OH 1386 cm ⁻¹	No detectado	No detectado	No detectado
Cambio de ángulo de CH 1366-1280 cm ⁻¹	1343, 1320, 1279 cm ⁻¹	1344, 1322, 1279 cm ⁻¹	1344, 1320, 1278 cm ⁻¹
Deformación de OH 1238-1209, 1161 cm ⁻¹	1237, 1205, 1161 cm ⁻¹	1238, 1207 cm ⁻¹	1236, 1208 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de C-C 1171, 1073, 1069, 943, 921 cm ⁻¹	1116, 1066, 921 cm ⁻¹	1170, 1116, 1067, 943 cm ⁻¹	1116, 1067, 942 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de CO 1138-1087, 1053-991, 914, 909, 868 cm ⁻¹	1050, 990 cm ⁻¹	1052, 1013, 1004, 989, 909 cm ⁻¹	1051, 1013, 1004, 989, 910 cm ⁻¹
Cambio de ángulo entre dos planos de CH ₂ 850 cm ⁻¹	867, 850 cm ⁻¹	868, 850 cm ⁻¹	867, 849 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de C-O 734 cm ⁻¹	No detectado	731 cm ⁻¹	No detectado

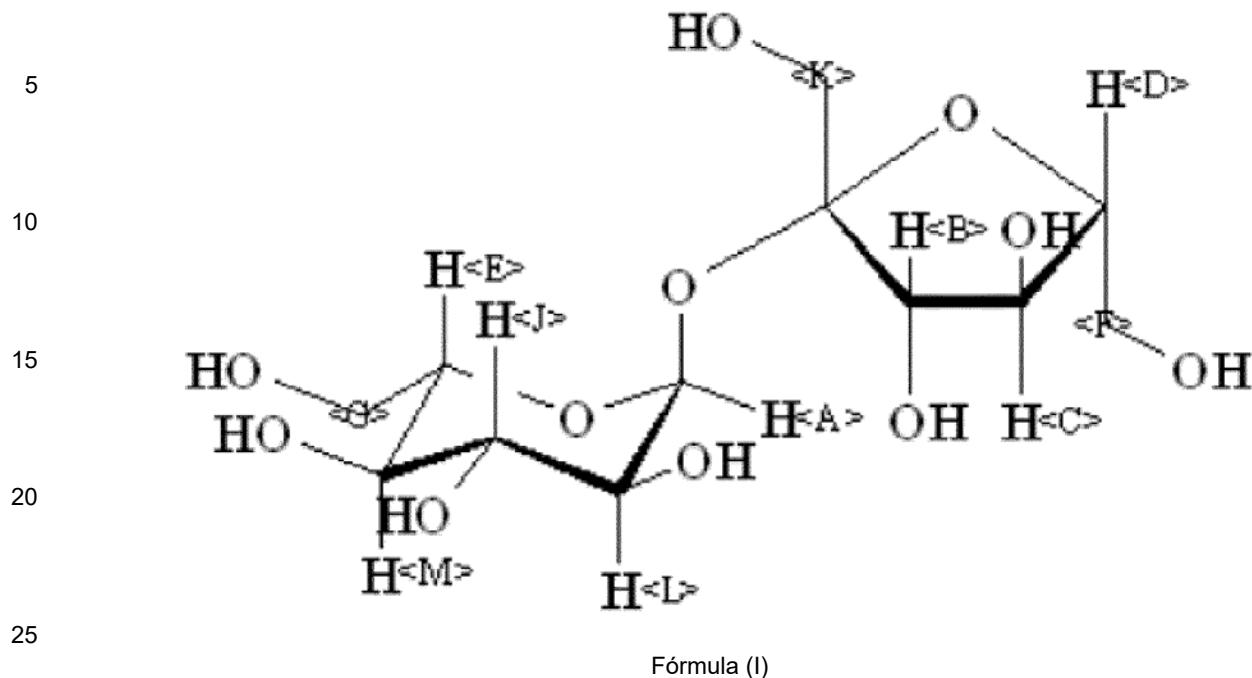
TABLA 28: Asignación de bandas de absorción de IR características para sacarosa en preparaciones de S3 liofilizadas

DEXTRANO ⁴	ONDULADORES S3P1 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S3P2 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)	ONDULADORES S3P3 LIOFILIZADOS (cm ⁻¹)
Cambio en la longitud de OH ² 3566, 3263 cm ⁻¹	3304 cm ⁻¹	3353 cm ⁻¹	3340 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de CO Exocíclico 1150 cm ⁻¹	1154 cm ⁻¹	1153 cm ⁻¹	1153 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de CO + deformación de C-C, 1107 cm ⁻¹	1106 cm ⁻¹	1105 cm ⁻¹	1107 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de C-O-C 1080 cm ⁻¹	1075 cm ⁻¹	1075 cm ⁻¹	1079 cm ⁻¹
Cambio en la longitud de CH 1018 cm ⁻¹	1016 cm ⁻¹	1016 cm ⁻¹	1015 cm ⁻¹

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear 1h (rmn)

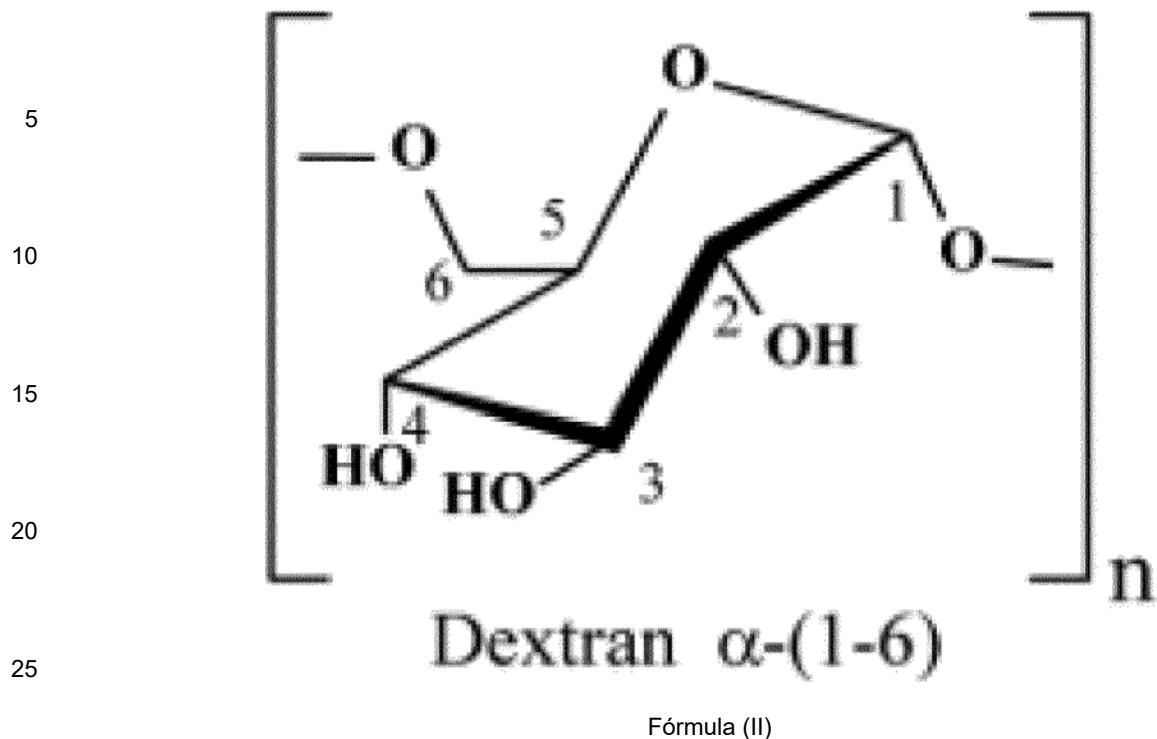
La espectroscopía de RMN es un método extremadamente útil para la caracterización de materiales. La RMN es un fenómeno físico basado en la propiedad magnética del núcleo de un átomo. La RMN estudia un núcleo magnético (normalmente el de un átomo de hidrógeno), alineándolo con un campo magnético externo muy potente y perturbando esta alineación mediante un impulso electromagnético. Se registra la respuesta a la perturbación, proporcionando cada núcleo individual una respuesta específica a su entorno químico, electrónico y espacial.

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en óxido de deuterio (D2O) y se analizaron mediante espectroscopía de RMN 1H.



La estructura para sacarosa se muestra anteriormente con la anotación de hidrógeno de la Fórmula (I). La RMN ^1H para S1 se muestra en la Tabla 29 a continuación:

ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (6 ppm)			
	SACAROSA	S1P1	S1P2	S1P3
A	5,418	5,43	5,43	5,43
B	4,219	4,22	4,22	4,22
C	4,055	4,06	4,07	4,06
D	3,89			
E	3,86			
F	3,826	3,83 (ancho)	3,83 (ancho)	3,83 (ancho)
G	3,817			
J	3,762			
K	3,679	3,69	3,69	3,69
L	3,563	3,58	3,58	3,57
M	3,476	3,49	3,49	3,48



30 La estructura del dextrano se muestra más arriba con la anotación de hidrógeno de la Fórmula (II). La siguiente Tabla 30 muestra la RMN ^1H para S3.

ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (6 ppm)			
	DEXTRANO	S3P1	S3P2	S3P3
1	4,99	5,01 (hombro)	5,01 (hombro)	5,00 (hombro)
2	3,58			
4	3,52	3,60 (ancho)	3,61 (ancho)	3,60 (ancho)
3	3,74	3,77 (ancho)	3,78 (ancho)	3,77 (ancho)
5	3,92			
6	3,99	3,97 (ancho)	3,97 (ancho)	3,97 (ancho)

50 Los espectros de RMN de las muestras preparadas se presentan en las Figuras 16-18. Cuando sea posible, las asignaciones provisionales de los principales desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN se basaron en los espectros de referencia de los compuestos relacionados disponibles en la bibliografía.

55 Los datos indican que la sacarosa está presente en la muestra S1, y los desplazamientos químicos coinciden bien con los informados en la bibliografía. Sin embargo, no se observaron patrones de división de pico, que podrían deberse a múltiples razones tales como la presencia de nanopartículas o el propio hierro paramagnético.

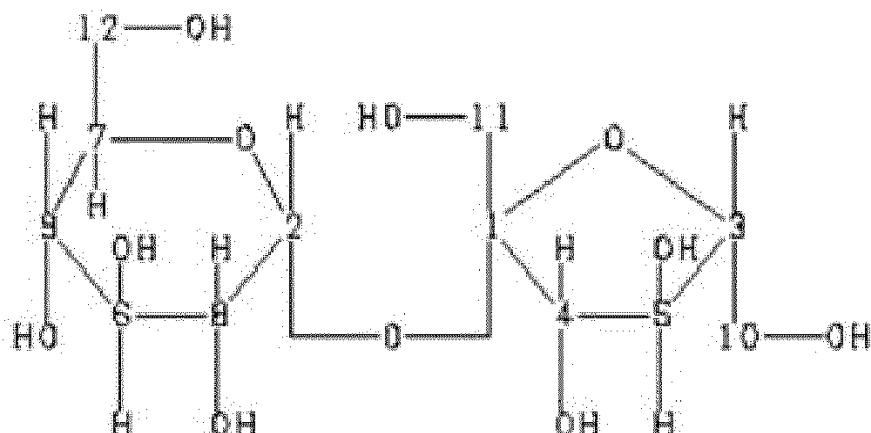
60 Los espectros de RMN ^1H para la muestra S2 muestran una cantidad significativa de ensanchamiento de los picos. Se desconoce si esto se debe a partículas que crean un mayor número de entornos químicos, o si la naturaleza del hierro en la muestra podría ser responsable de la falta de resolución. Debido a la extensión del ensanchamiento, no se podrían realizar asignaciones de picos. Sin embargo, las intensidades de pico generales y los desplazamientos químicos son consistentes con los observados para sacarosa, ya que se observó una gran respuesta amplia a partir del cambio químico 2,5-4,2 ppm, con un ligero hombro visible en el pico de disolvente cerca de 5,5 ppm.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear ^{13}C (rmn)

65 Las muestras liofilizadas se reconstituyeron en óxido de deuterio (D_2O) y se analizaron mediante espectroscopía de RMN ^{13}C .

Los resultados se resumen en las Tablas 28-30. Los espectros de RMN de las muestras preparadas se presentan en las Figuras 19-21. Cuando sea posible, las asignaciones provisionales de los principales desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN se basaron en los espectros de referencia de los compuestos relacionados disponibles en la bibliografía.

Los datos indican que la sacarosa está presente en la muestra S1 y S2, y los desplazamientos químicos coinciden bien con los informados en la bibliografía. Obsérvese que, al igual que los espectros de protones, la muestra S2 parecía haber aumentado en un mayor grado que la muestra S1. Finalmente, los picos observados en la muestra S3 coinciden bien con los valores de la literatura para el dextrano, lo que indica que está presente en la muestra.



La estructura de sacarosa se muestra anteriormente con la anotación de carbono. Los resultados de RMN ^{13}C se muestran en las Tablas 31 a continuación:

Tabla 31: Asignaciones de RMN ^{13}C de sacarosa y S1 en D_2O

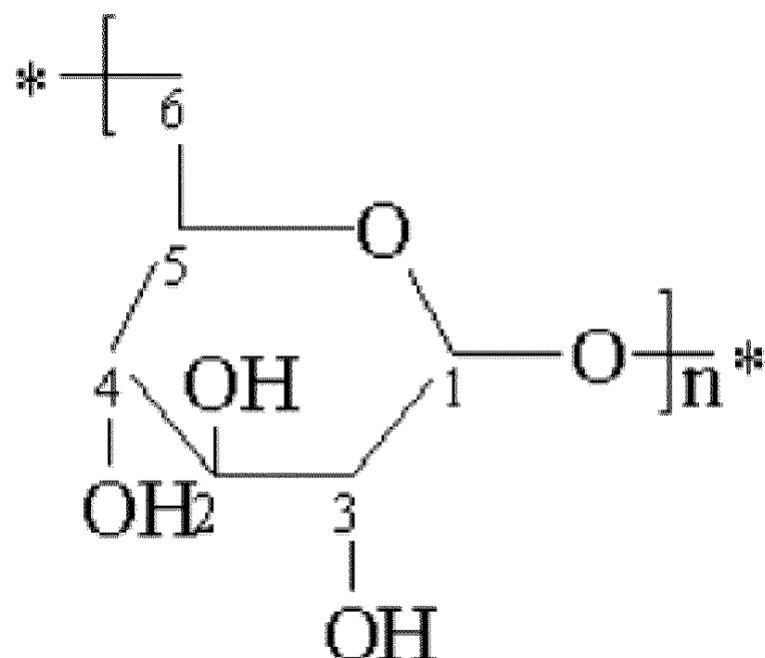
ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (6 ppm)			
	SACAROSA	S1P1	S1P2	S3P3
1	104,71	102,23	102,24	103,58
2	93,20	90,73	90,73	92,07
3	82,42	79,90	79,90	81,25
4	77,51	74,98	74,98	76,33
5	75,09	72,55	72,55	73,89
6	73,68	71,10	71,10	72,45
7	73,44	70,95	70,95	72,30
8	72,14	69,61	69,61	70,97
9	70,31	67,76	67,76	69,11
10	63,44	60,94	60,94	62,29
11	62,46	59,89	59,89	61,23
12	61,24	58,67	58,66	60,01

Tabla 32. Asignaciones de RMN ^{13}C de sacarosa y S2 en D_2O

ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (6 ppm)			
	SACAROSA	S2P1	S2P2	S2P3
1	104,71	103,53	103,71	103,69
2	93,20	91,97	92,19	92,23
3	82,42	81,15	81,42	81,38
4	77,51	76,17	76,41	76,28

(continuación)

Tabla 32. Asignaciones de RMN C ¹³ de sacarosa y S2 en D ₂ O				
ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)			
	SACAROSA	S2P1	S2P2	S2P3
5	75,09	73,75	73,98	74,01
6	73,68			
7	73,44			
8	72,14	70,93	70,97	70,97
9	70,31	68,99	69,38	69,14
10	63,44	62,06	62,34	62,29
11	62,46	61,07	61,36	61,16
12	61,24	59,85	60,11	59,98



Fórmula (III)

La estructura del dextrano se muestra anteriormente con anotaciones de carbono de la Fórmula (III). La siguiente Tabla 33 muestra la RMN 13C para el dextrano de S3 en D₂O:

Tabla 33. Asignaciones de RMN C ¹³ de dextrano y S3 en D ₂ O				
ASIGNACIONES	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)			
	DEXTRANO	S3P1	S3P2	S3P3
50	98,76	97,65	97,64	97,65
55	74,52	73,34	73,33	73,32
60	72,51	71,35	71,33	71,33
	71,21	70,13	70,11	70,10
	70,75	69,49	69,46	69,47
	66,69	65,50	65,48	65,49

Análisis de difracción de rayos x (xrd) (material liofilizado)

El análisis XRD es un método mediante el cual una muestra inorgánica cristalina se irradia con rayos x monoenergéticos. La interacción de la estructura reticular de la muestra con estas rayos x se registra y proporciona información sobre la estructura cristalina que se irradia. La "huella dactilar" característica resultante permite la identificación de los compuestos cristalinos presentes en la muestra. Mediante un análisis de ajuste de patrón completo (el refinado de Rietveld), es posible realizar análisis cuantitativos en muestras que contienen más de un compuesto cristalino.

Las muestras liofilizadas se analizaron mediante XRD para caracterizar la estructura química y las fases presentes en las muestras. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 34. Obsérvese que este método de preparación de muestras dio como resultado muestras pegajosas para S1 y S2 específicamente (S3 era menos pegajosa). Para S1 y S2, se añadió una gota de metanol a la muestra y el material se extendió sobre el portamuestras. La muestra S3 se trituró en un mortero.

Tabla 34: Identificación de fase XRD y análisis cuantitativo para muestras liofilizadas		
ID DE LA MUESTRA	FASES IDENTIFICADAS	CONCENTRACIÓN % EN PESO ¹
S1	Na ₄ Fe ₂ O ₅ -Óxido de hierro de sodio	
	Monoclínico, SG: P21/n (n = 14)	5,2
	PDF N.º 04-013-8809	
S2	Materiales amorfos	94,8
	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ -Sacarosa	
	Monoclínica, S.G.: P21 (4)	42,9
S3	PDF N.º 02-063-8998	
	Materiales amorfos	57,1
	Na ₄ Fe ₂ O ₅ -Óxido de hierro de sodio	
S3	Monoclínico, SG: P21/n (n = 14)	18,8
	PDF N.º 04-013-8809	
	Materiales amorfos	81,2

La Figura 22 superpone los datos sin procesar de XRD de las tres muestras con pequeños desplazamientos para mayor claridad. La muestra S2 es diferente de las otras dos muestras en términos de intensidades generales, posiciones de pico, así como la forma de los picos. Las formas de los picos amplias en las muestras S1 y S3 indican que estas muestras consisten en una mezcla de materiales nanocrystalinos y amorfos.

Utilizando mejores coincidencias obtenidas comparando los datos experimentales modelados de fondo con la base de datos de difracción ICDD/ICSD para la muestra S1, S2 y S3, respectivamente, se determinó que las muestras S1 y S3 contenían una mezcla de materiales amorfos y nanocrystalinos. El patrón de referencia del óxido de hierro sódico se superpuso a estos datos experimentales. Los marcadores indican la ubicación de los picos de difracción esperados para cada fase y las alturas de los marcadores indican las intensidades relativas de los picos para un material de grano fino orientado aleatoriamente. A diferencia de las otras dos muestras, la muestra S3 se compone principalmente de sacarosa y materiales amorfos.

El análisis semicuantitativo se realizó mediante la utilización de WPF (ajuste de patrón completo), que es un subconjunto del refinado de Rietveld que representa todas las áreas por encima de la curva de fondo. Esta técnica requiere que los factores de estructura y las ubicaciones atómicas o la relación de intensidad de referencia (una forma de comparar la potencia difractante de diferentes fases) son conocidas para todas las fases identificadas. Durante este proceso, el factor estructural (que se relaciona con la concentración), los parámetros de red (que se relacionan con la posición máxima), la anchura pico y la forma de pico se refinan para cada fase para minimizar el valor R, una estimación del acuerdo entre el modelo y los datos experimentales sobre todo el patrón.

Para obtener resultados cuantitativos de la muestra que contiene cantidades medibles de material amorfo, la densidad de la amorfa debe asignarse para determinar cuánto material amorfo está presente. Como resultado, la concentración de material amorfo es incierta. Se supone que las ubicaciones de los picos amorfos en estas muestras son de la sacarosa amorfa que tiene una densidad de aproximadamente 1,59 g/cm³. Dado que WPF intenta tener en cuenta todo en la muestra, cualquier error en la concentración amorfa dará como resultado errores en las fases

cristalinas también. Esto significa que las concentraciones relativas de las fases cristalinas son correctas, pero los valores absolutos serán en error por cantidades proporcionales al error en la concentración amorfa.

5 Análisis de difracción de rayos x (xrd) (material sin azúcar)

10 Las muestras recibidas se diluyeron en agua y se colocaron en un filtro de corte de peso molecular (MWCO) de 10000 Da y se centrifugaron para eliminar las moléculas pequeñas en la formulación (azúcares) que produjo material amorfo en el análisis de XRD anterior. A continuación, las muestras se lavaron cinco veces más con agua para eliminar las moléculas pequeñas residuales. El material resultante (en capacidad para pasar a través del filtro) se liofilizó y se analizó mediante XRD para caracterizar la estructura química y las fases presentes en las muestras. Obsérvese que la muestra S3 contenía dos capas distintas después de la centrifugación, una capa viscosa espesa y una capa superior más delgada. Estas capas se separaron y se liofilizaron por separado y se analizaron como dos muestras. Los resultados se promediaron para proporcionar los valores observados en la Tabla 35, pero las réplicas individuales de cada capa se presentan en las figuras siguientes. Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 35.

Tabla 35: Identificación de fase XRD y análisis cuantitativo para muestras purificadas mediante filtros de MWCO, después se liofilizaron		
20 ID DE LA MUESTRA	FASES IDENTIFICADAS	CONCENTRACIÓN % EN PESO ¹
25 S1 (S1 ≡ S22)	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita	
	Cúbica, SG: P4332 (212)	81,0
	PDF N.º [04-021-3968]	
	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro	
30 S2 (S2 ≡ S23)	Ortortrómbico	19,0
	PDF N.º [04-003-2900]	
	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita	
	Cúbica, SG: P4332 (212)	89,9
35 S3 ² (S3 ≡ S24 y S25)	PDF N.º [04-021-3968]	
	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro	
	Ortortrómbico	10,1
	PDF N.º [04-003-2900]	
40	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita	
	Cúbica, SG: P4332 (212)	74,0
	PDF N.º [04-021-3968]	
	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro	
45	Ortortrómbico	26,0
	PDF N.º [04-003-2900]	
	Fe _{2,67} O ₄ - Maghemita	
	Cúbica, SG: P4332 (212)	
50	PDF N.º [04-021-3968]	
	FeOOH - Hidróxido de óxido de hierro	
	Ortortrómbico	
	PDF N.º [04-003-2900]	
55 % en peso = porcentaje en peso, ±5 %; 2 promedio de preparaciones duplicadas (dos capas observadas)		

60 En la Figura 23 se muestra una superposición de los patrones XRD de las cuatro muestras (dos réplicas de S3). Los patrones están desplazados para mayor claridad. La identificación de la fase se realizó comparando las mejores coincidencias entre los datos experimentales de XRD modelados en segundo plano y la base de datos de difracción ICDD/ICSD de la muestra. Los marcadores de referencia para la fase muestran donde en dos theta los picos experimentales esperados deben ubicarse y la altura de los marcadores indica la intensidad esperada de los picos experimentales, si la muestra está fina y orientada aleatoriamente. Obsérvese que XRD es sensible a la estructura cristalina pero relativamente insensible a la composición de estado elemental o químico. La identificación de fase para estas muestras fue difícil debido a la naturaleza nanocrystalina de las muestras que ensanchan significativamente el pico en los patrones de XRD.

Las mejores coincidencias con los picos presentes en las cuatro muestras son una fase de óxido de hierro conocida como maghemita y una fase de hidróxido de óxido de hierro. La fase de hidróxido de óxido de hierro es atípica ya que se forma a partir del calentamiento del hidróxido de óxido de hierro en fase beta a aproximadamente 300 °C. Desafortunadamente, esta tarjeta de referencia no tiene la relación de intensidad de referencia (RIR) incluida la que se necesita para el análisis semicuantitativo. Pero como la simetría y las composiciones son similares a las del goetita mineral de hidróxido de óxido de hierro (alfa - FeOOH), el RIR promedio de goetita se usó para el hidróxido de óxido de hierro para el análisis semicuantitativo.

El análisis semicuantitativo se realizó mediante la utilización de WPF (ajuste de patrón completo), que es un subconjunto del refinado de Rietveld que representa toda la intensidad por encima de la curva de fondo. Esta técnica requiere que los factores de estructura y las ubicaciones atómicas o la relación de intensidad de referencia (una forma de comparar la potencia difractante de diferentes fases) son conocidas para todas las fases identificadas. Durante este proceso, el factor estructural (que se relaciona con la concentración), los parámetros de red (que se relacionan con la posición máxima), la anchura pico y la forma de pico se refinan para cada fase para minimizar el valor R, una estimación del acuerdo entre el modelo y los datos experimentales sobre todo el patrón.

Degradación ácida del hierro (iii) lábil mediante espectroscopia uv-visible

La espectroscopia UV/Vis se utiliza para determinar la concentración de analitos, ya sea de una sola vez o con frecuencia a lo largo de un período de tiempo deseado. La técnica mide la absorción de luz a través de las longitudes de onda de luz ultravioleta y visible a través de una muestra líquida. Las muestras se dispensan en un vial pequeño y se colocan entre la trayectoria de una luz UV/Vis y un detector. Según la ley de Beer-Lambert, con una longitud de trayectoria de luz constante y un coeficiente de absorción conocido dependiendo de la longitud de onda, la concentración de un compuesto en cuestión puede determinarse a partir de la luz absorbida por la muestra a esa longitud de onda.

Las muestras se analizaron mediante el método adaptado de B. S. Barot y col. (2014) que determina la cantidad de hierro lábil (III) en las muestras utilizando espectroscopía UV-Visible. Los resultados se resumen en la Tabla 36 a continuación.

Tabla 36: Resumen de la determinación del hierro (III) lábil					
	MUESTRA	RÉPLICA	HIERRO LÁBIL (III) (%)	HIERRO (III) LÁBIL PROMEDIO (%)	% RSD ¹
35	S1	1	1,32 %	1,48 %	10,2 %
		2	1,52 %		
		3	1,61 %		
40	S2	1	2,14 %	2,27 %	5,3 %
		2	2,38 %		
		3	2,30 %		
45	S3	1	1,40 %	1,34 %	3,7 %
		2	1,33 %		
		3	1,30 %		

Análisis termogravimétrico (tga)

El TGA consiste en medir el cambio de peso de un material en función de la temperatura en una atmósfera controlada. La técnica requiere mediciones precisas de peso, temperatura y cambio de temperatura. El termograma resultante generado a partir del análisis puede determinar el contenido de clases de ingredientes (por ejemplo, disolventes, polímeros, cargas inorgánicas, etc.) y estabilidad térmica de los polímeros. La precisión y el sesgo típicos de las mediciones de TGA se analizan en ASTM E2040.

Las muestras liofilizadas se analizaron por análisis termogravimétrico (TGA) bajo purga de nitrógeno y purga de aire. La descomposición térmica de las muestras se produce en tres etapas distintas como se muestra en la Figura 24. Los resultados de estas etapas se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37: Análisis termogravimétrico de S1, S2 y S3							
CONDICIÓN ATMOSFÉRICA	MUESTRA ANALIZADA	% de pérdida de peso AMBIENTE A 100 °C	% de pérdida de peso 100 °C A 245 °C	% de pérdida de peso 245 °C A 530 °C	% de pérdida de peso 530 °C A 800 °C	% de RESIDUO A 800 °C	

Tabla 37: Análisis termogravimétrico de S1, S2 y S3						
CONDICIÓN ATMOSFÉRICA	MUESTRA ANALIZADA	% de pérdida de peso AMBIENTE A 100 °C	% de pérdida de peso 100 °C A 245 °C	% de pérdida de peso 245 °C A 530 °C	% de pérdida de peso 530 °C A 800 °C	% de RESIDUO A 800 °C
Método: Rampa 10,00 °C/min a 800,00 °C (purga de N ₂)	Muestra S1	3,3	43,6	17,7	21,9	13,5
	Muestra S1	3,3	42,3	36,4	6,6	11,4
	Muestra S1	3,6	42,1	36,4	6,9	11,0
	Promedio	3,4	42,7	30,2	11,8	12,0
	Muestra S2	1,1	44,9	33,1	11,2	9,7
	Muestra S2	1,0	45,3	36,3	7,6	9,8
	Muestra S2	1,1	44,7	36,8	7,4	10,0
	Promedio	1,1	45,0	35,4	8,7	9,8
	Muestra S3	2,4	8,9	42,8	23,4	22,4
	Muestra S3	4,8	7,7	56,0	15,7	15,6
Isotérmico durante 2,00 min (purga de N ₂)	Muestra S3	4,0	8,1	42,4	23,4	22,0
	Promedio	3,7	8,2	47,1	20,8	20,0
	Muestra S1	3,0	42,8	37,5	5,8	11,0
	Muestra S1	1,9	43,8	37,2	6,0	11,0
	Muestra S1	2,5	42,9	37,6	5,4	11,5
	Promedio	2,5	43,2	37,4	5,7	11,2
	Muestra S2	1,1	42,8	45,0	0,6	10,5
	Muestra S2	0,7	43,4	45,0	0,7	10,2
	Muestra S2	0,8	42,9	45,3	0,8	10,1
	Promedio	0,9	43,0	45,1	0,7	10,3
Isotérmico durante 2,00 min (purga de aire)	Muestra S3	4,2	8,2	63,1	2,9	21,6
	Muestra S3	4,8	7,8	63,7	2,9	20,8
	Muestra S3	5,2	7,4	62,3	3,1	21,9
	Promedio	4,7	7,8	63,0	3,0	21,4

45 Calorimetría diferencial de barrido (dsc) y análisis térmico diferencial (dta)

50 Las muestras liofilizadas se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) bajo purga de argón. La calorimetría diferencial de barrido (DSC) mide la diferencia en los flujos de calor asociados a las transiciones entre una muestra y una referencia inerte en función de la temperatura y el tiempo. Dichas mediciones proporcionan información cuantitativa y cualitativa sobre cambios físicos y químicos que implican procesos endotérmicos o exotérmicos, o cambios en la capacidad calorífica. Véanse los termogramas DSC en la Figura 25. El resumen del DTA se presenta en la Tabla 38 a continuación.

Tabla 38: Resumen de resultados de DTA						
Condición atmosférica	Muestra analizada	Texo ₁ (°C)	AHexo ₁ (J/g)	Texo ₂ (°C)	Inicio Texo ₂ (°C)	AHexo ₂ (J/g)
Rampa de 10,00 °C/min a 200,00 °C (purga de N ₂)	Muestra 1 S1	33,2	63,8	155,8	138,2	187
	Muestra 2 S1	33,2	69,3	153,1	137,6	169
	Muestra 3 S1	35,1	130,9	155,9	147,3	159
Rampa de 10,00 °C/min a 200,00 °C (purga de N ₂)	Promedio	33,8	88,0	154,9	141,0	171,7
	Muestra 1 S2	29,2	47,6	143,5	127,1	148

(continuación)

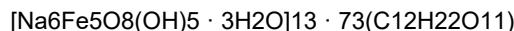
Tabla 38: Resumen de resultados de DTA

Condición atmosférica	Muestra analizada	Texo ₁ (°C)	AHexo ₁ (J/g)	Texo ₂ (°C)	Inicio Texo ₂ (°C)	AHexo ₂ (J/g)
5	Muestra 2 S2	n/a	N/a1	142,8	* ₂	*
	Muestra 3 S2	n/a	n/a	147,6	*	*
	Promedio	29,2	47,6	127,1	127,1	148
	Muestra 1 S3	38,8	117,7	n/a	n/a	n/a
	Muestra 2 S3	44	45,6	n/a	n/a	n/a
	Muestra 3 S3	34,8	136,3	n/a	n/a	n/a
	Promedio	39,2	99,9	n/a	n/a	n/a

n/a = no observado; 2 *Transiciones de superposición posibles

Valor de hidróxido por valoración volumétrica y determinación de la fórmula molecular

- 20 Los puntos finales de las valoraciones volumétricas tuvieron pH = 7,0. La Tabla 39 resume los resultados de esta valoración volumétrica en S1.
- 25 Partiendo del supuesto de que todas las especies básicas valoradas volumétricamente procedían del hidróxido asociado a los núcleos de oxihidróxido férrico, se supuso que el número total de moles de H⁺ utilizados en la valoración volumétrica era igual al número de moles de OH⁻. Considerando TOC y PM por GPC, la fórmula molecular de la sacarosa de hierro en S1 se calculó como sigue:



- 30 Si se considera M para este cálculo, la fórmula molecular es:

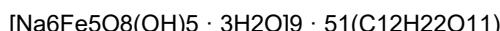


Tabla 39: Resumen de la valoración volumétrica de S1 con HCl 0,01 N

MUESTRA	RÉPLICA	MASA DE S1 UTILIZADA (g)	Volumen de 0,00998N HCl (ml) utilizada para alcanzar el pH = 7,0	% RSD ¹
40	1	1,0020	20,87	2,1 %
	2	1,0007	21,21	
	3	1,0038	20,35	
Promedio		1,0022	20,81	

- 45 Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la descripción y la práctica de la invención descrita en la presente memoria.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de hierro acuosa que comprende sacarosa de hierro y bicarbonato para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno renal que comprende administrar por vía intravenosa dicha composición de hierro acuosa en una cantidad terapéuticamente eficaz.
- 10 2. La composición de hierro acuosa para usar de la reivindicación 1, en donde la composición tiene un pH mayor de 9.
- 15 3. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la composición tiene un pH que varía de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,5.
- 20 4. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-3, en donde la composición tiene una gravedad específica entre 1,135 y 1,165 a 20 °C.
- 25 5. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-4, en donde la composición tiene un PM según GPC de entre 30.000 y 40.000 dáltones.
- 30 6. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-5, en donde la composición tiene un PM según GPC de entre 33.000 y 38.000 dáltones.
- 35 7. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-6, en donde la composición tiene una concentración máxima de hierro (II) de 0,40 % p/v.
- 40 8. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición tiene una concentración de hierro (II) del 0,05 % p/v al 0,40 % p/v.
- 45 9. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición tiene una concentración de hierro (II) del 0,10 % p/v al 0,20 % p/v.
- 50 10. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-9, en donde el método comprende además administrar una protoporfirina.
- 55 11. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-10, en donde el método comprende además administrar protoporfirina de estaño.
- 60 12. La composición de hierro acuosa para usar de las reivindicaciones 1-11, en donde la enfermedad o trastorno es una enfermedad renal crónica, o, en donde la enfermedad o trastorno es el rechazo de trasplante de órganos.
- 65 13. Una composición farmacéutica de hierro acuosa que comprende:
- 70 sacarosa de hierro;
- 75 bicarbonato; y
- 80 un portador acuoso farmacéuticamente aceptable,
- 85 en donde la sacarosa de hierro está presente en una cantidad farmacéuticamente eficaz para proporcionar un efecto protector al riñón de un paciente, la composición farmacéutica tiene un pH que varía de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,5, una concentración de hierro (II) de 0,05 % p/v a 0,40 % p/v, y un PM según GPC está entre 30.000 y 40.000 dáltones.
- 90 14. La composición de hierro acuosa de la reivindicación 13, en donde la composición tiene una gravedad específica entre 1,135 y 1,165 a 20 °C; y/o, en donde el PM según GPC está entre 30.000 y 40.000 dáltones.
- 95 15. La composición de hierro acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en donde la composición tiene una concentración de hierro (II) del 0,10 % p/v al 0,20 % p/v.

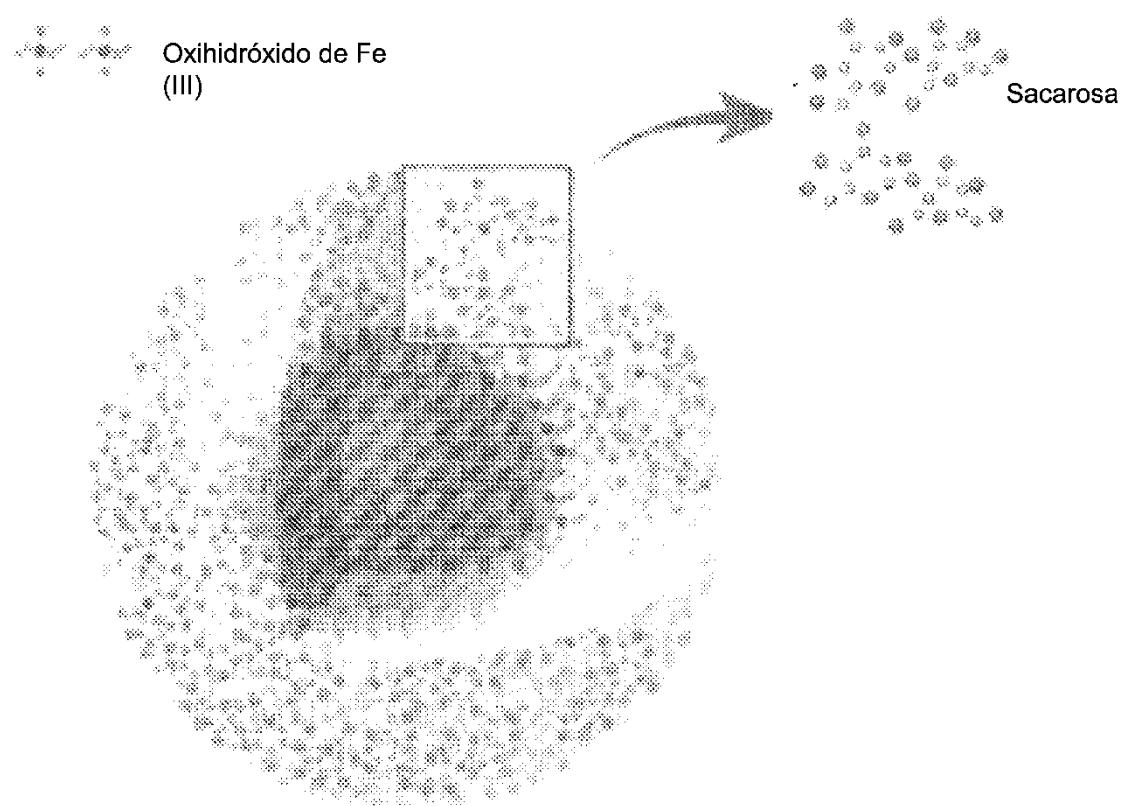


Figura 1

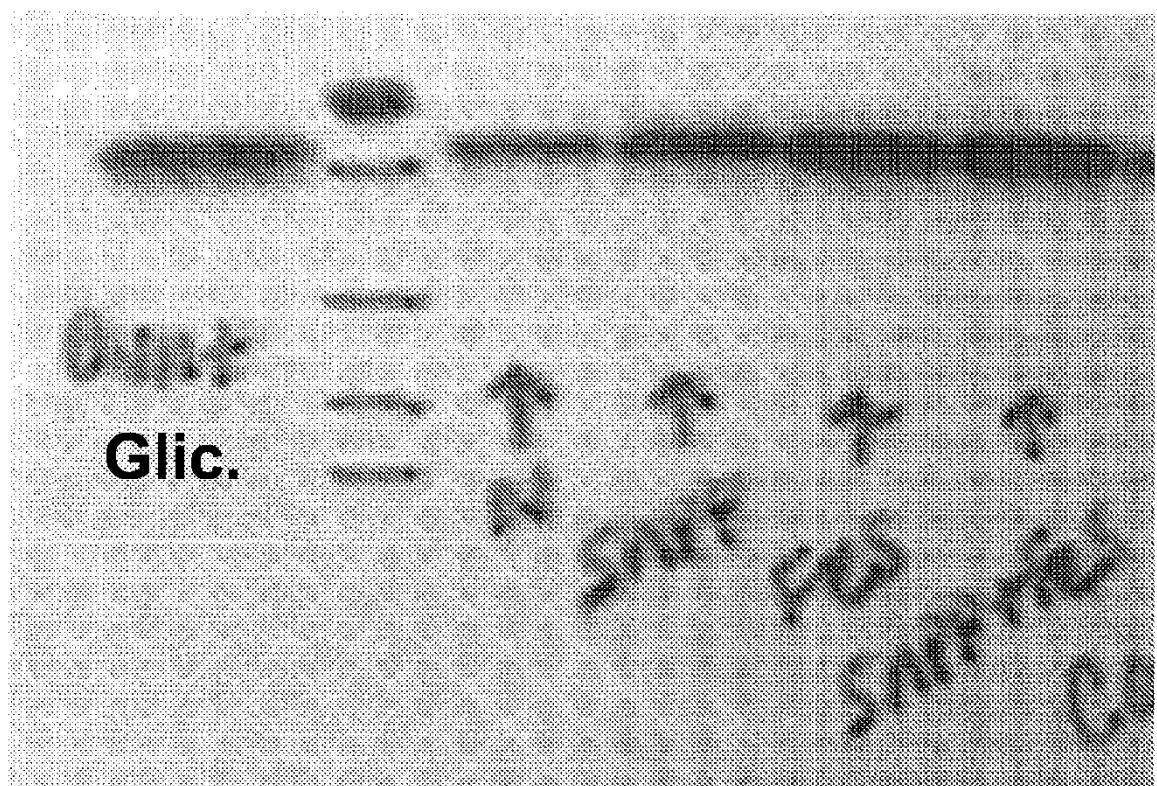


Figura 2

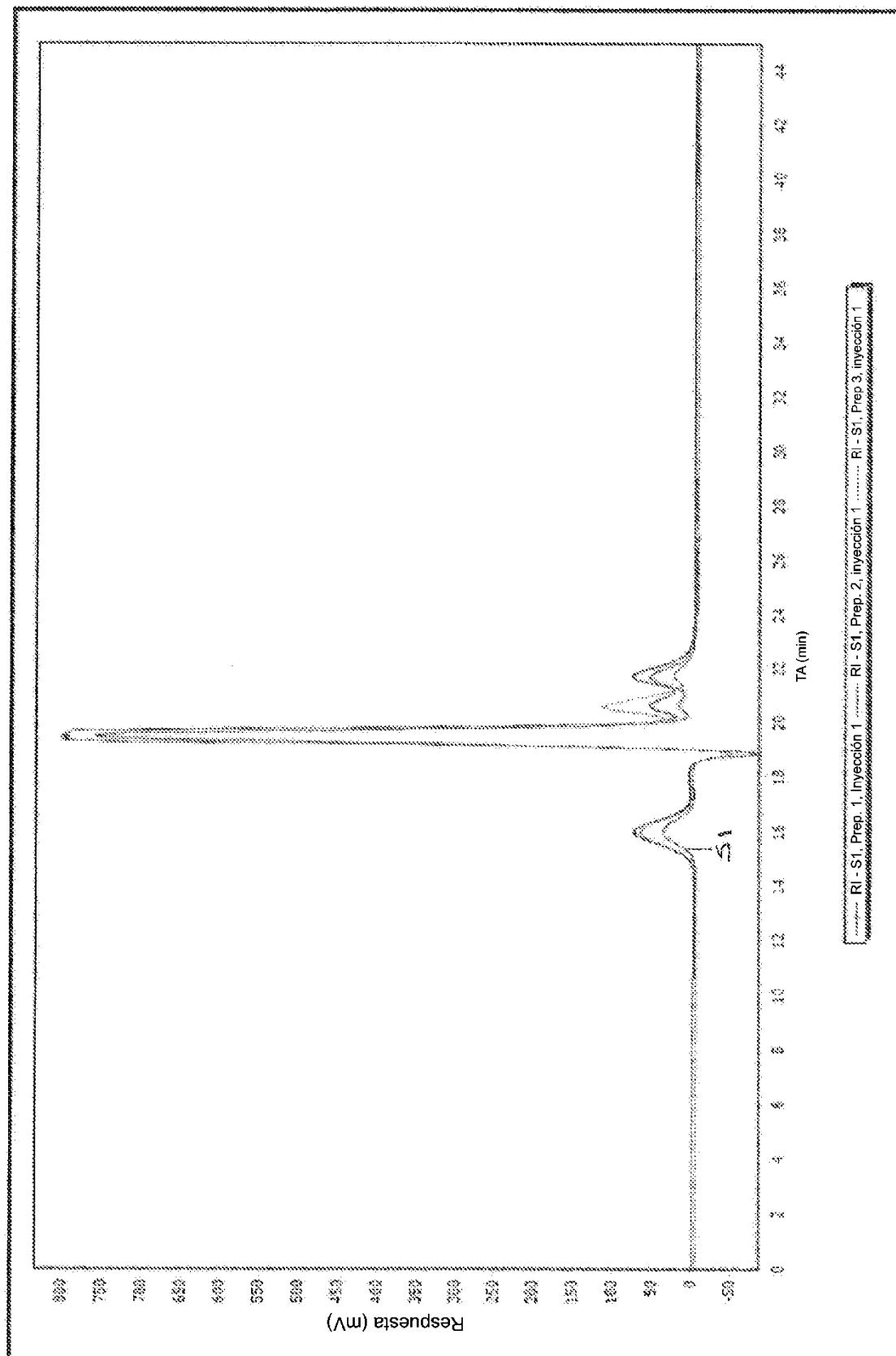


Figura 3

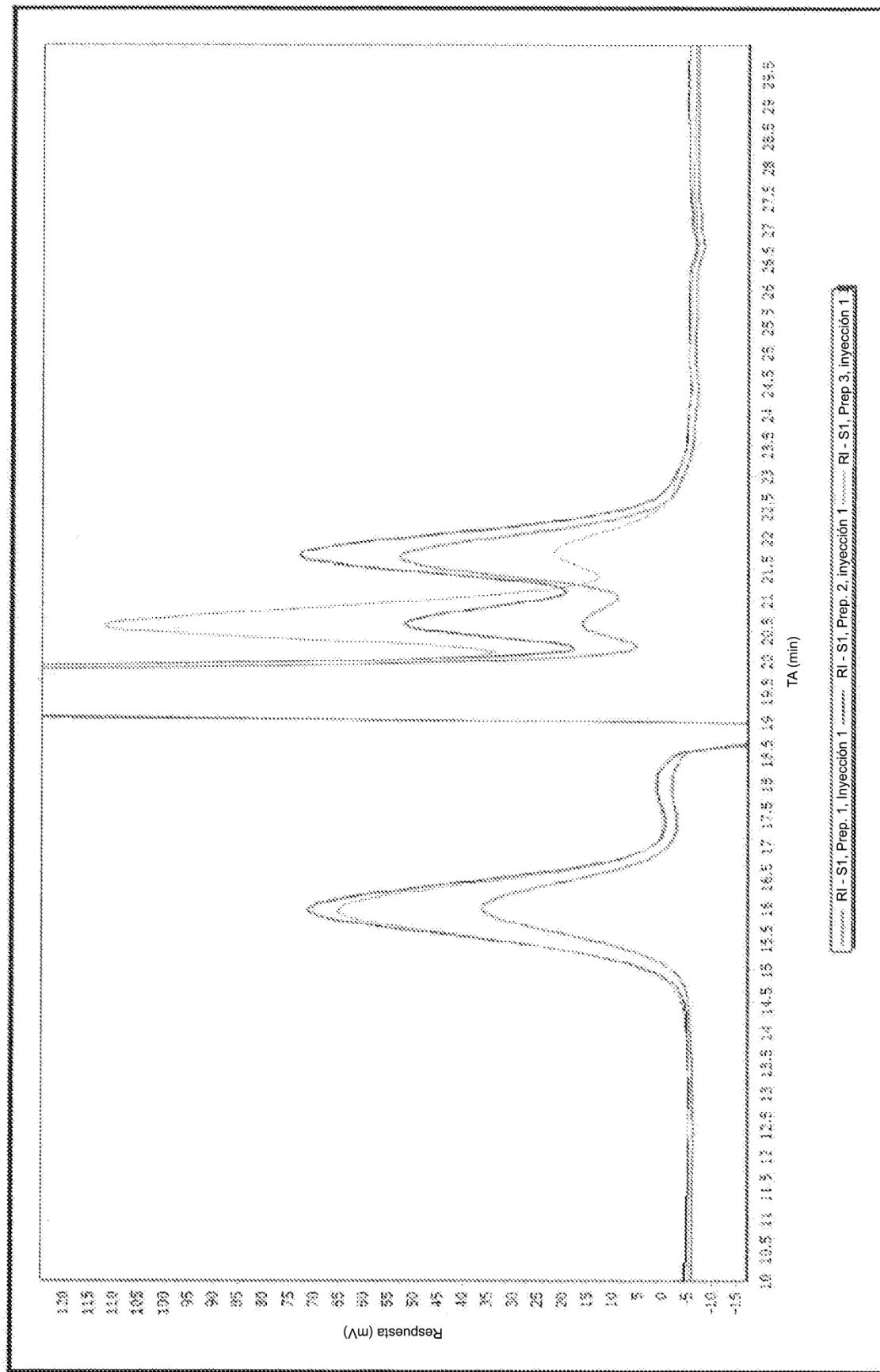


Figura 4

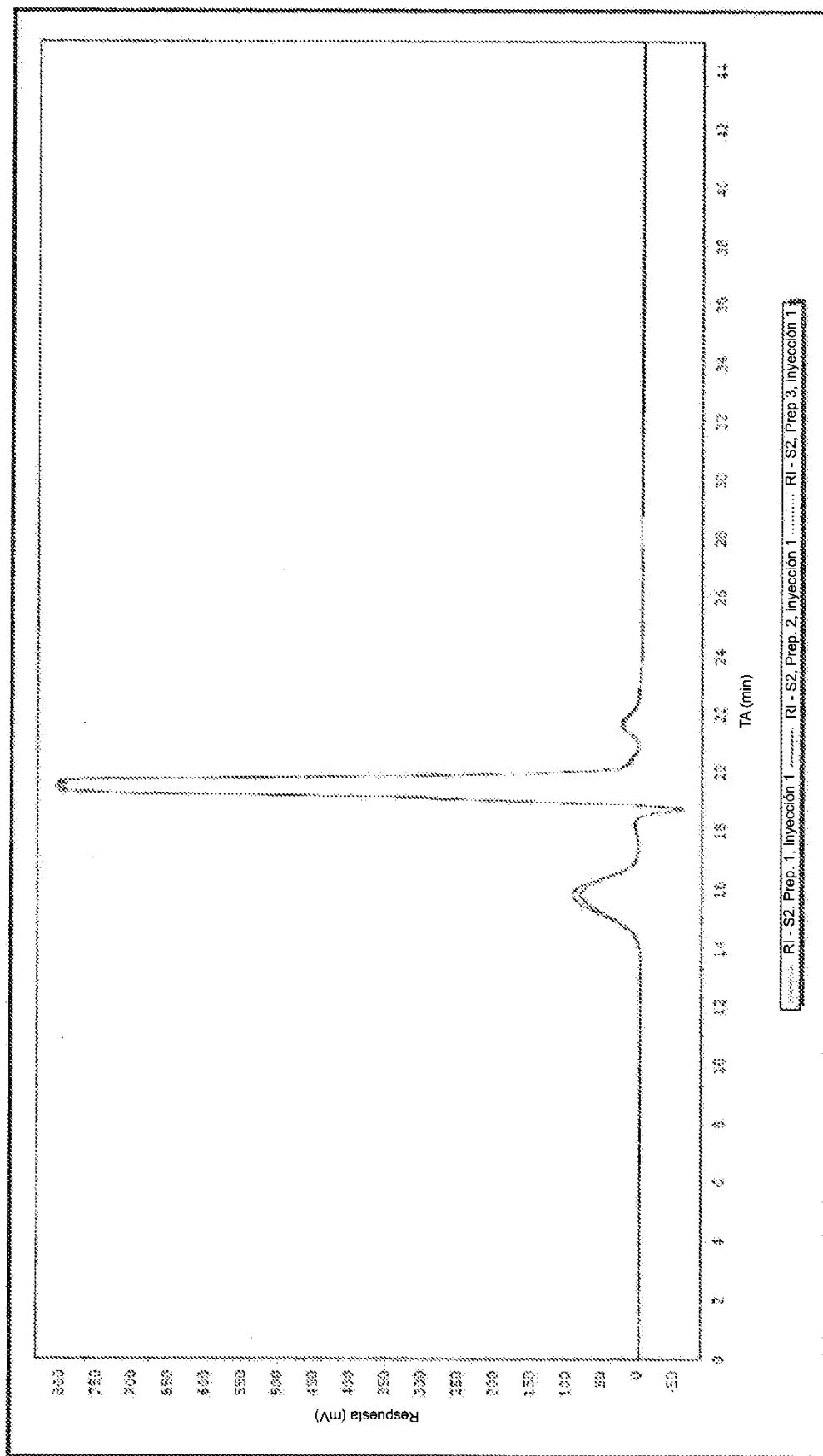


Figura 5

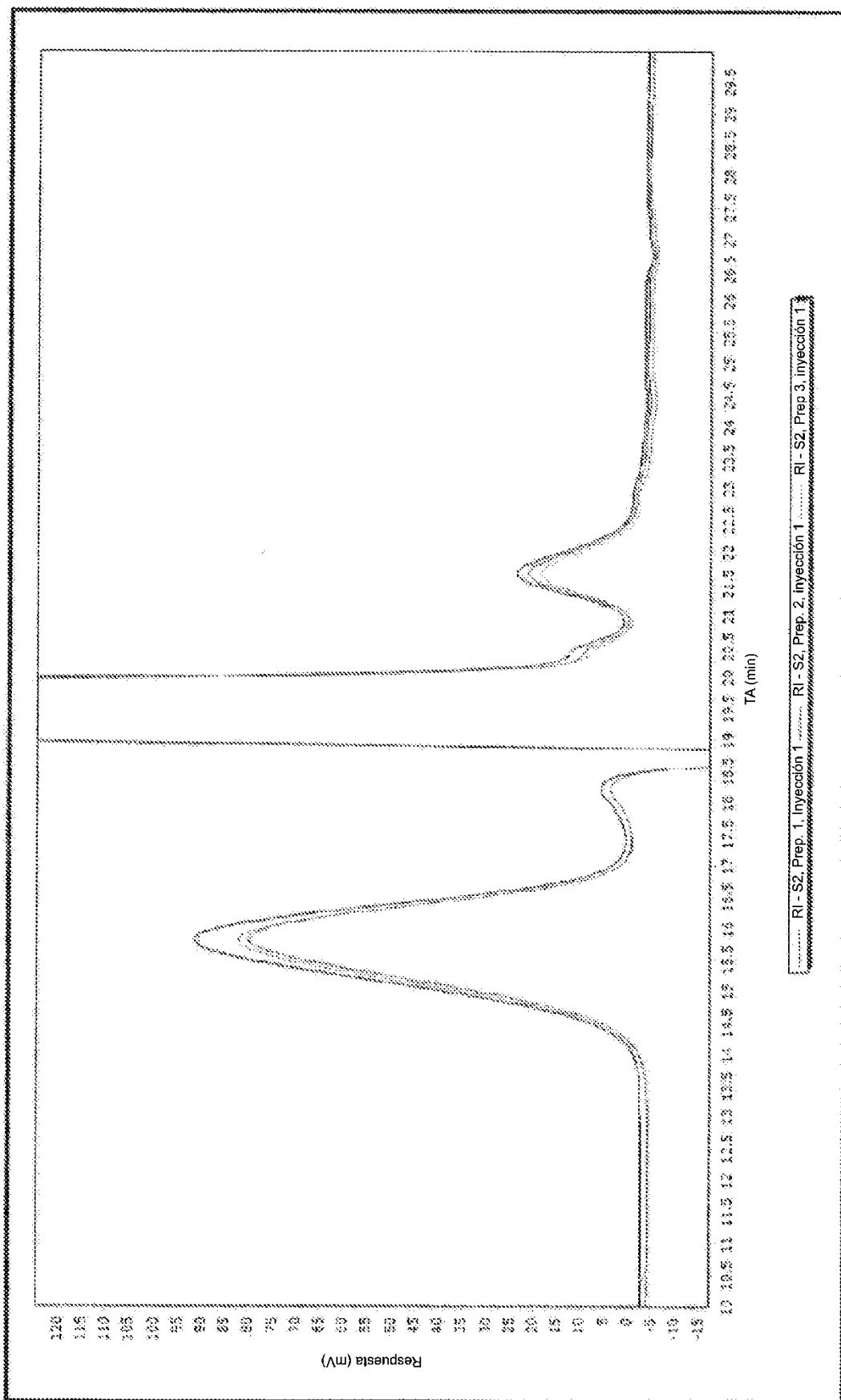


Figura 6

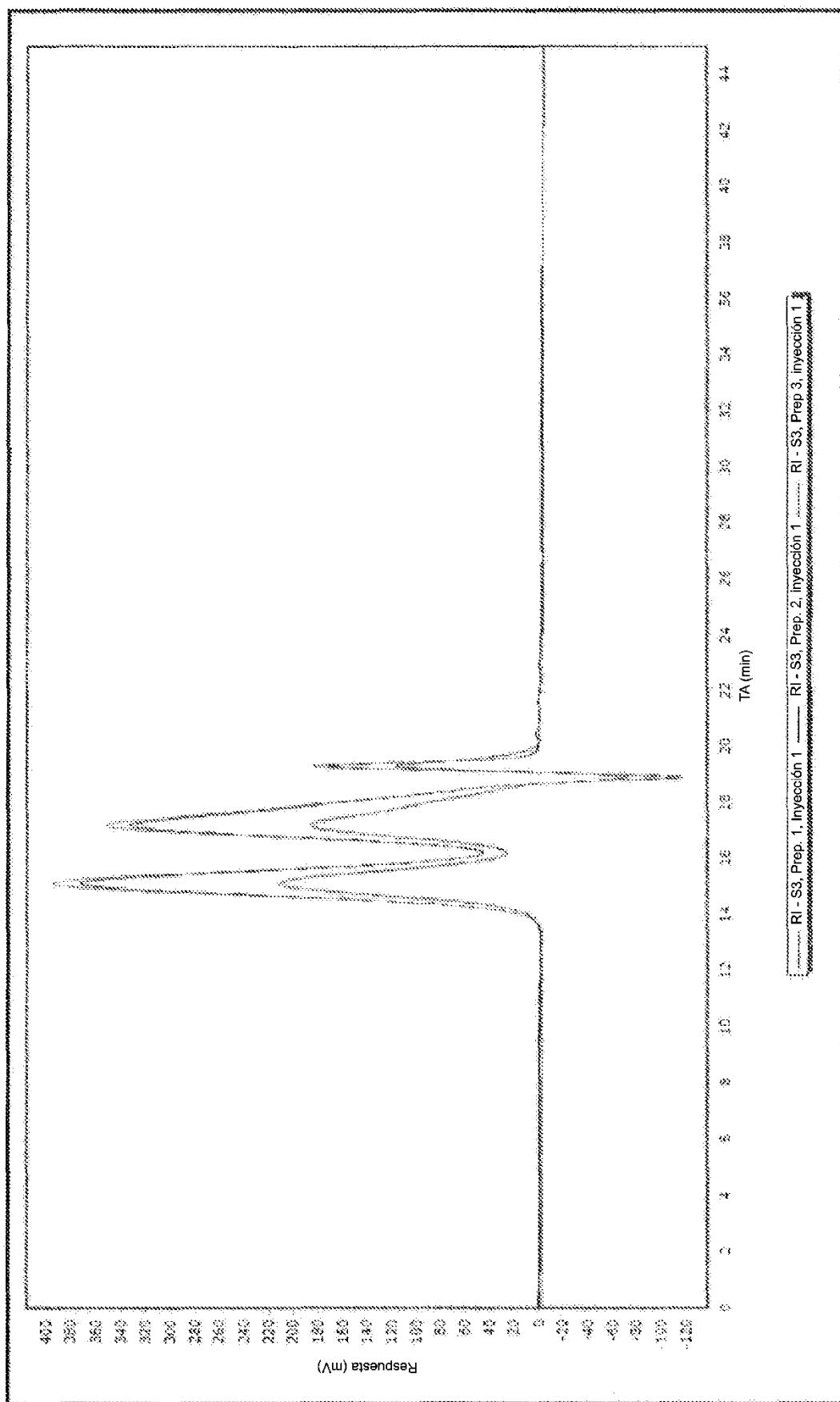


Figura 7

ES 2 955 019 T3

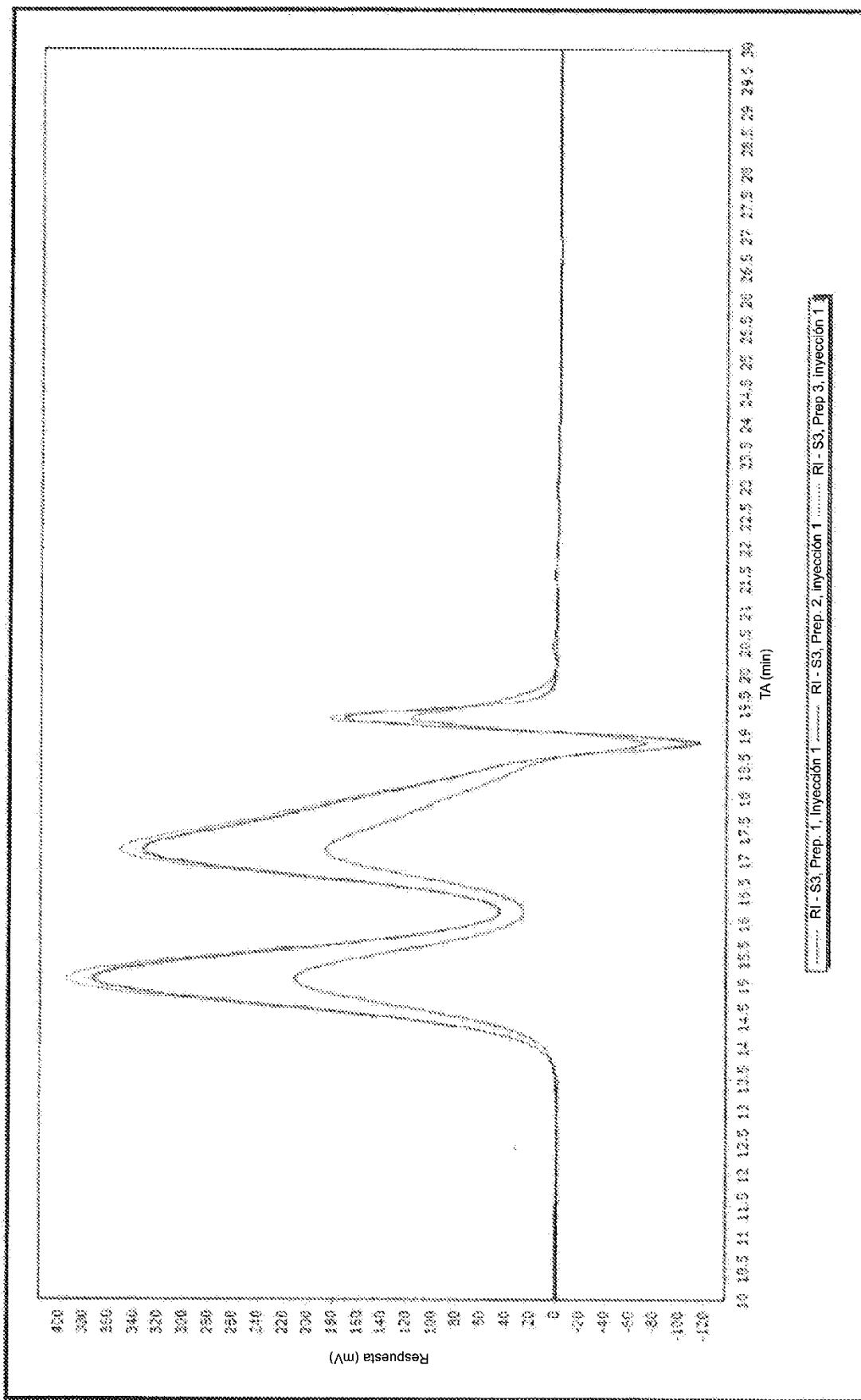


Figura 8

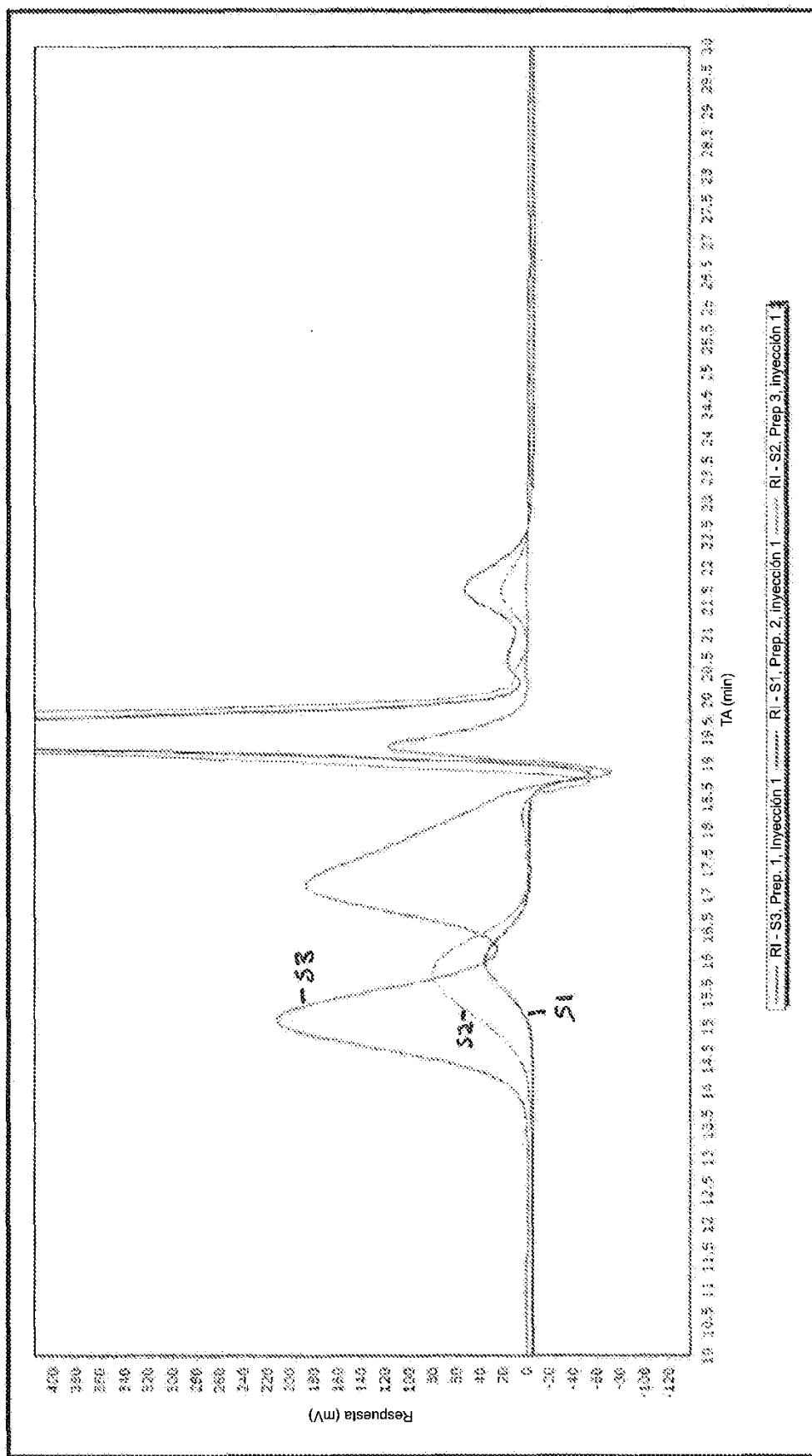


Figura 9

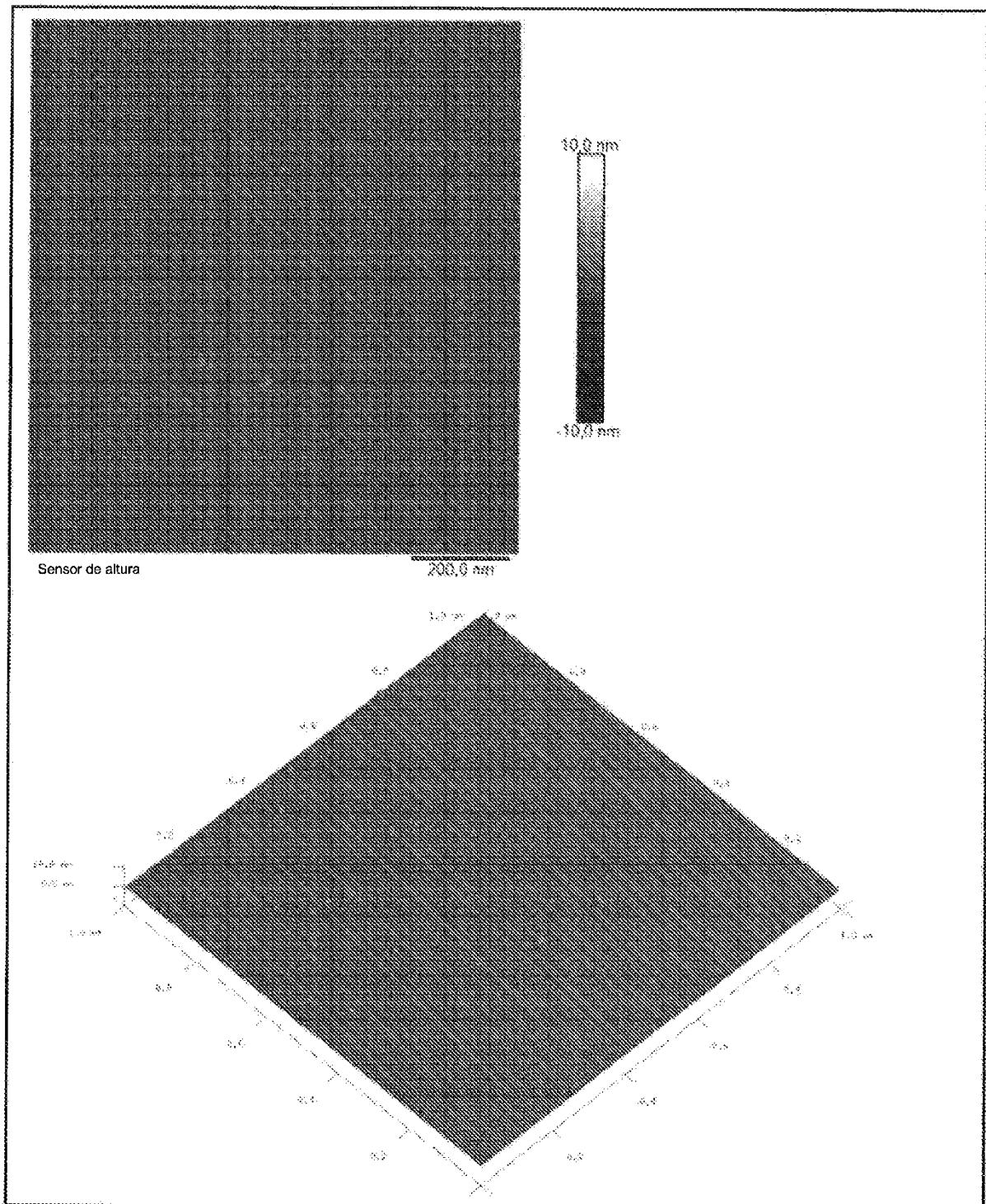


Figura 10

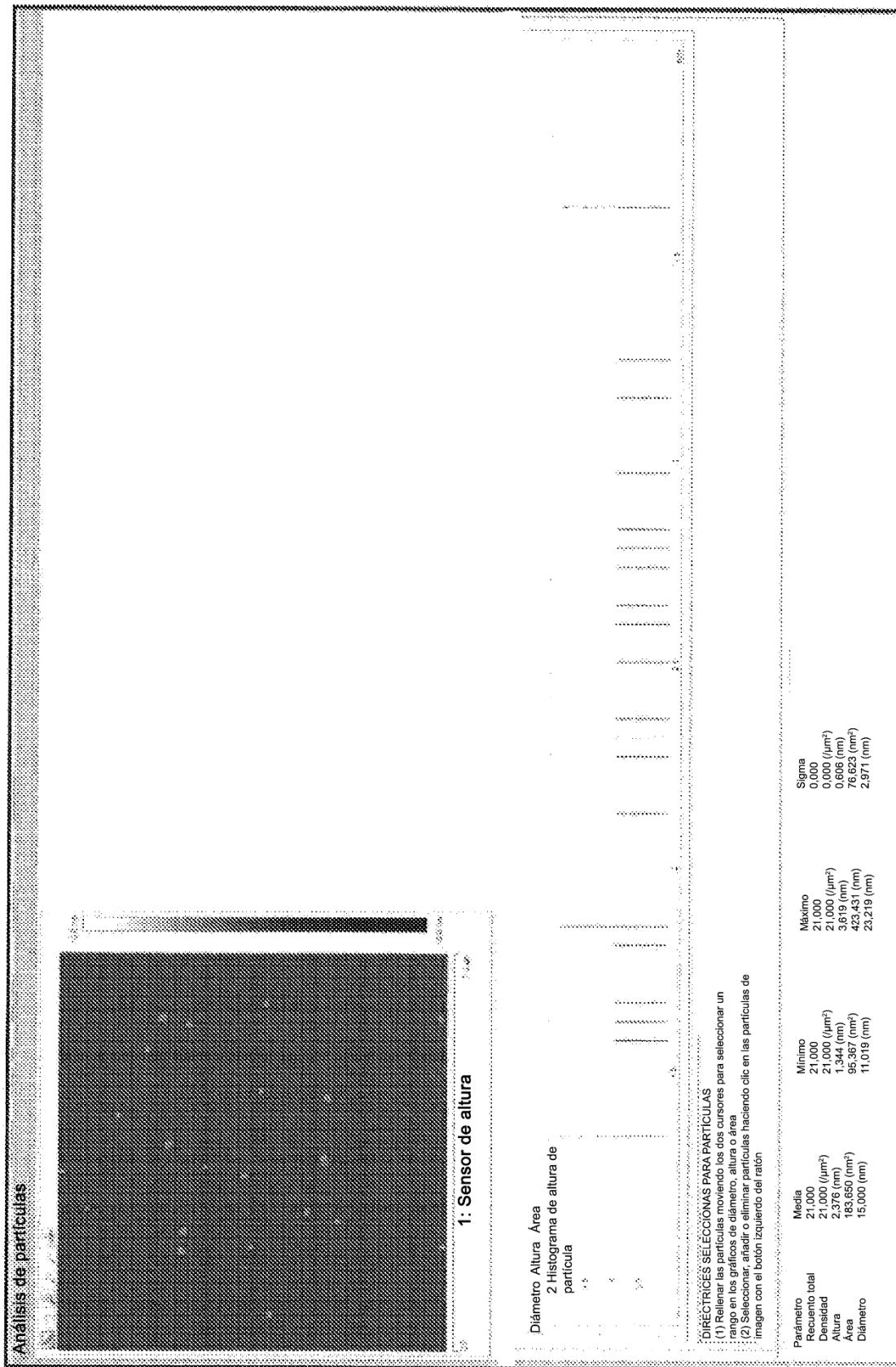


Figura 11

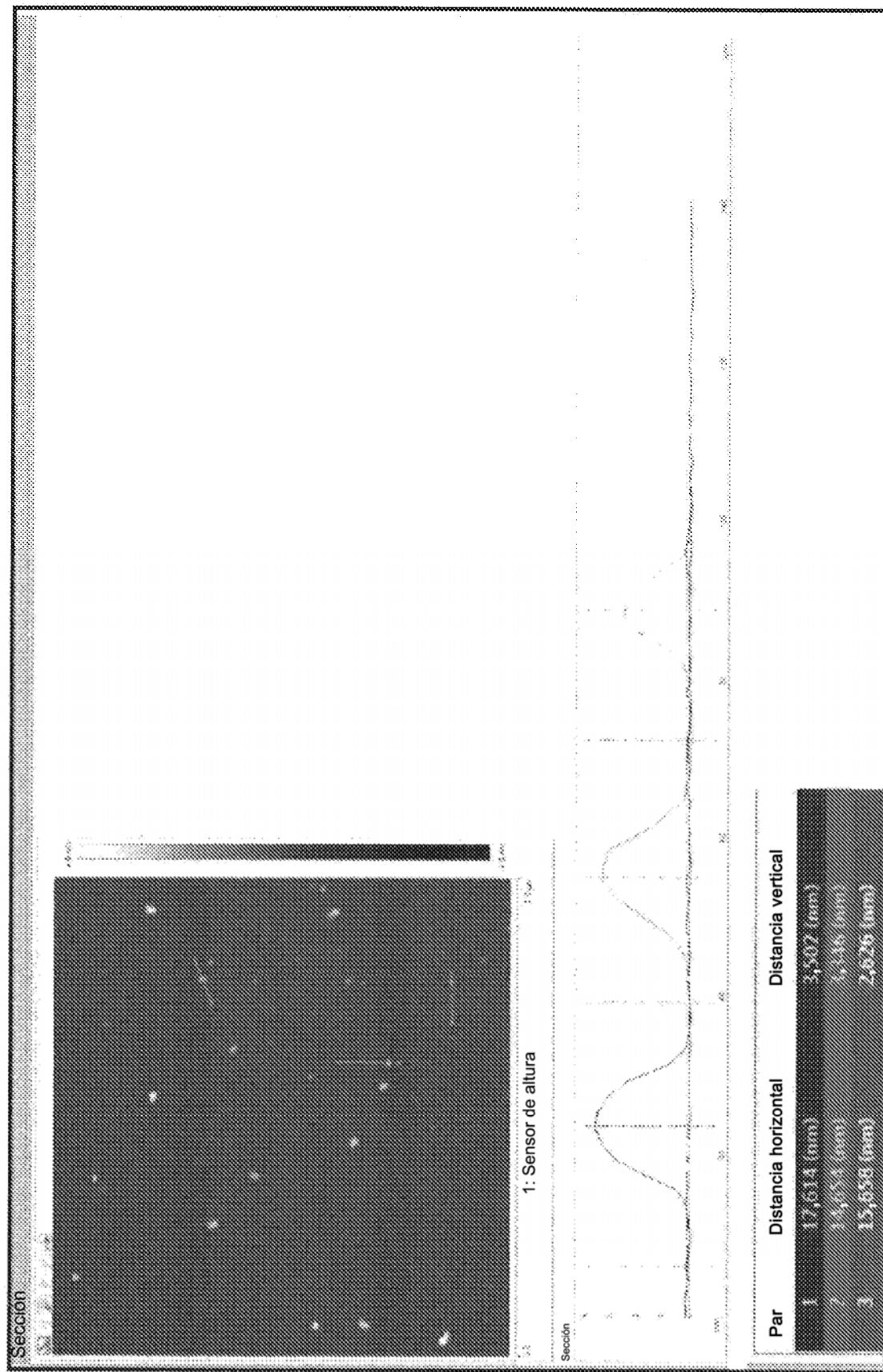


Figura 12

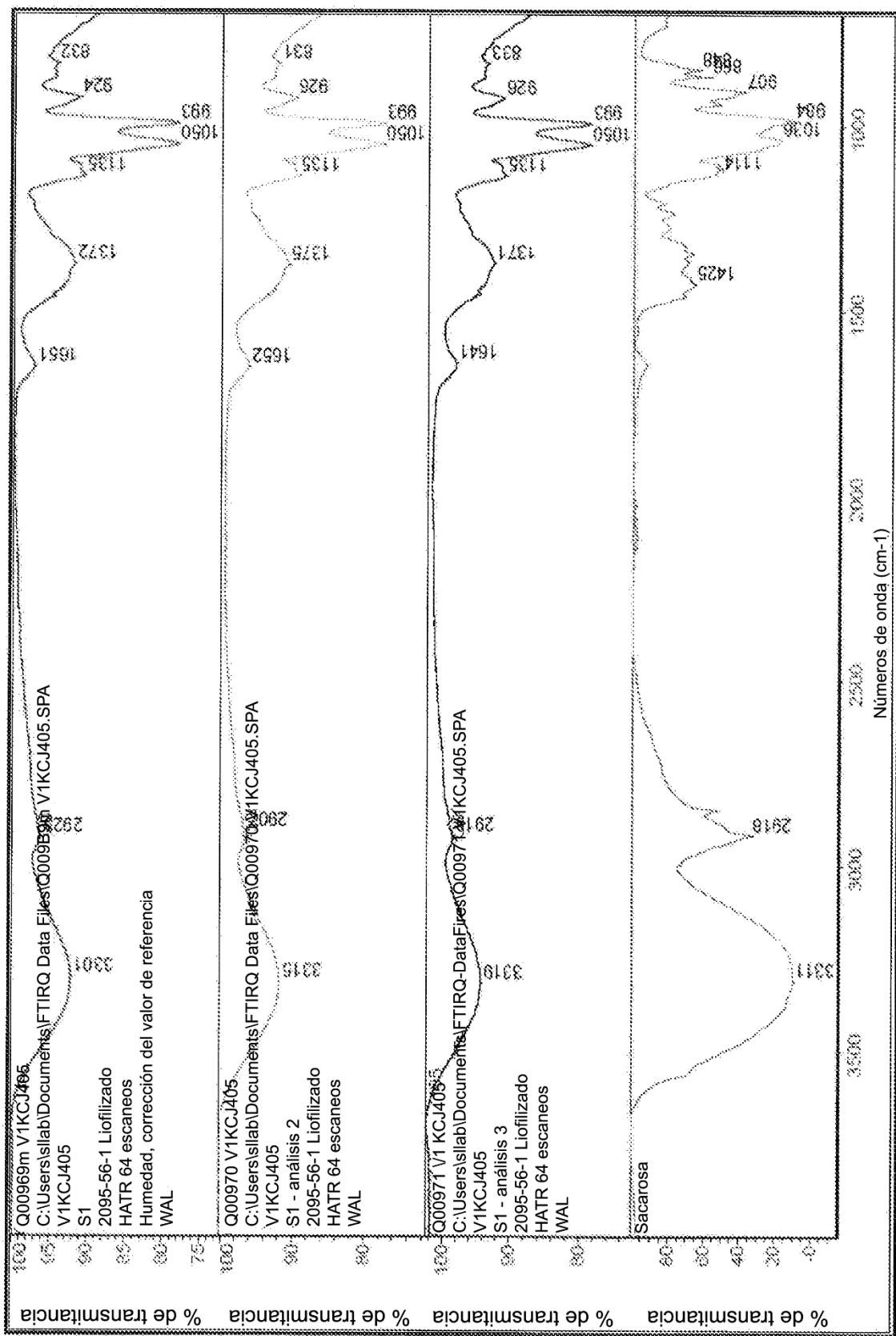


Figura 13

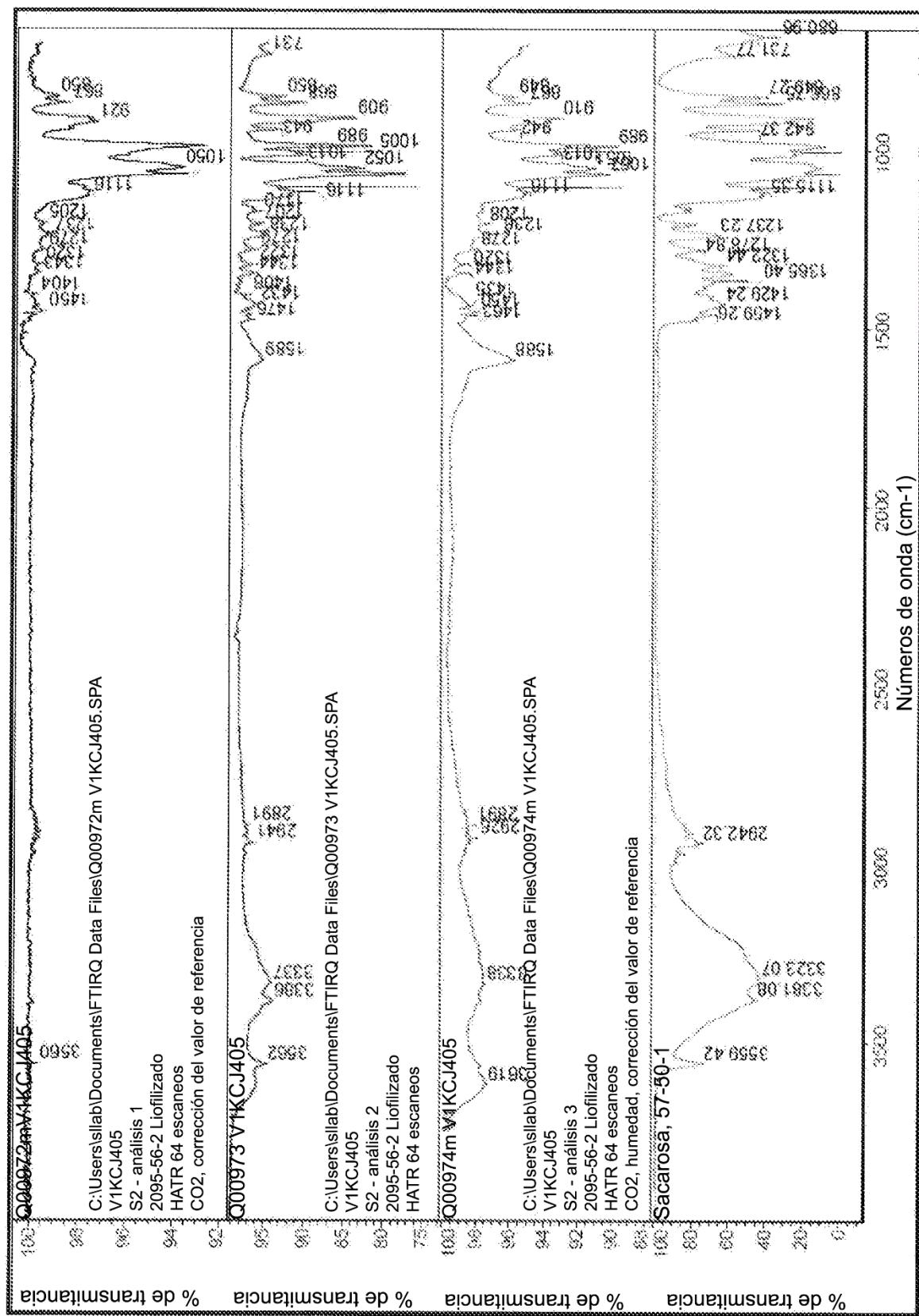


Figura 14

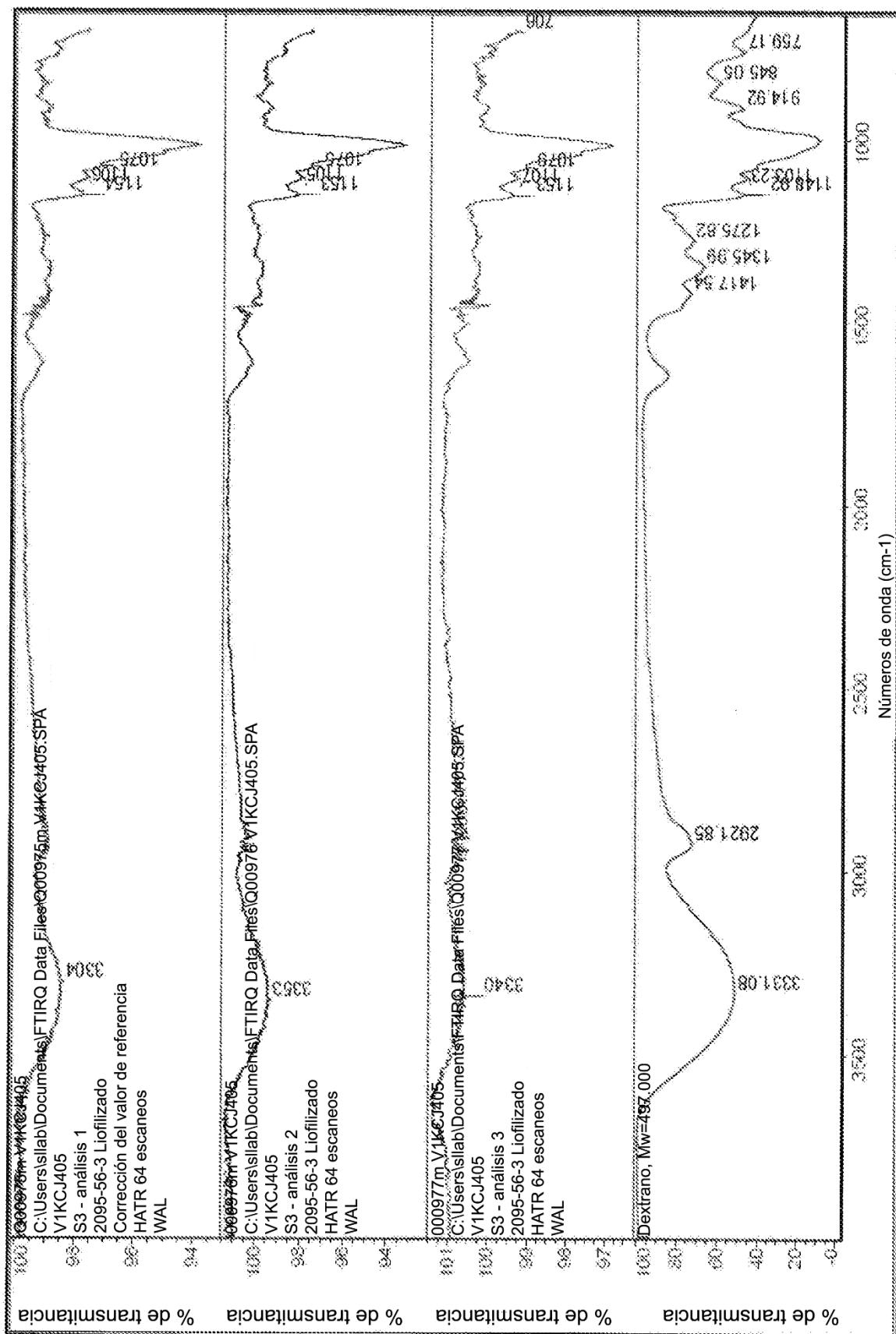


Figura 15

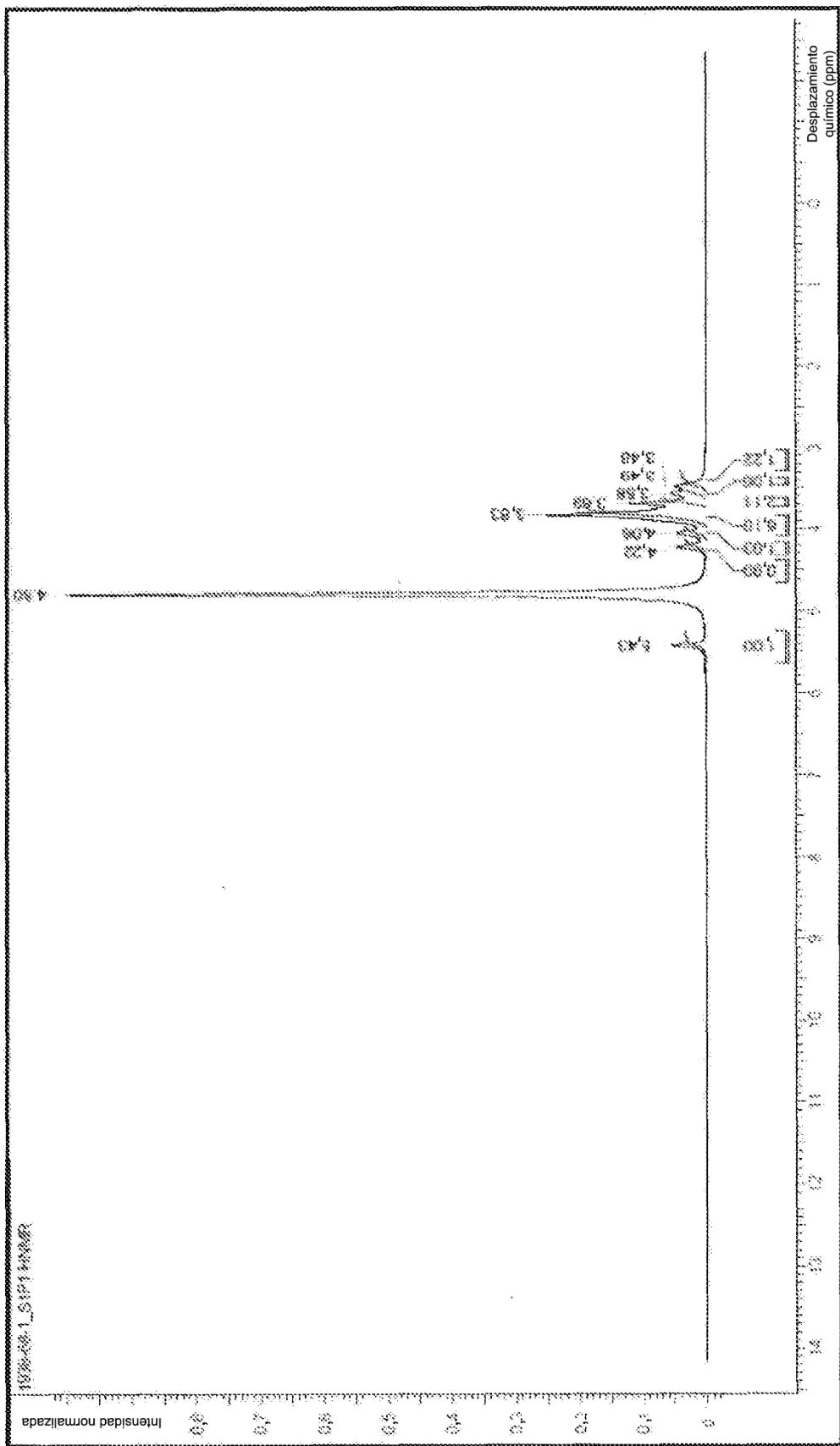


Figura 16: Espectro de 1H NMR de S1 - preparación 1

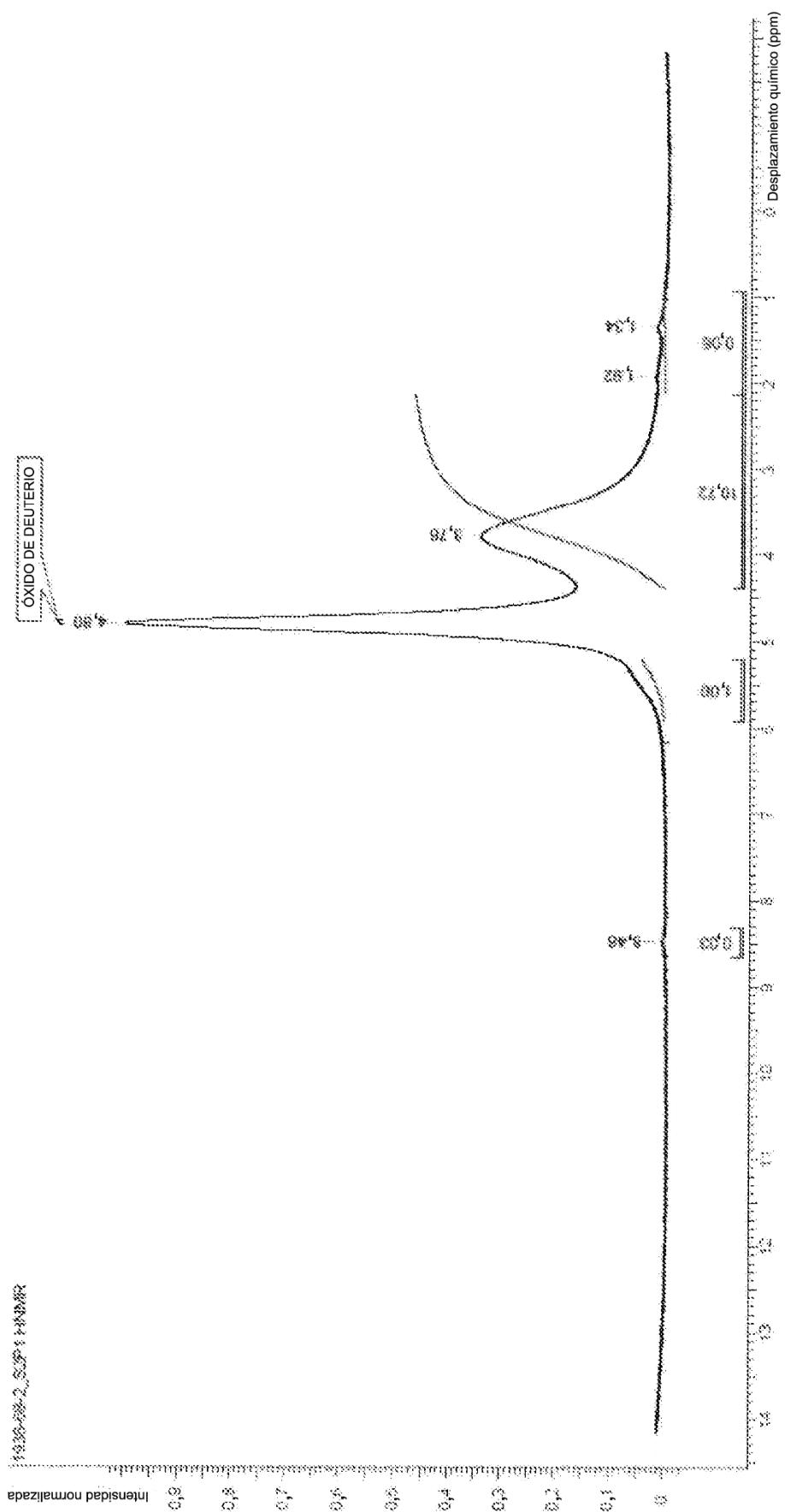


Figura 17: Espectro de ${}^1\text{H}$ NMR de S2 - preparación 1

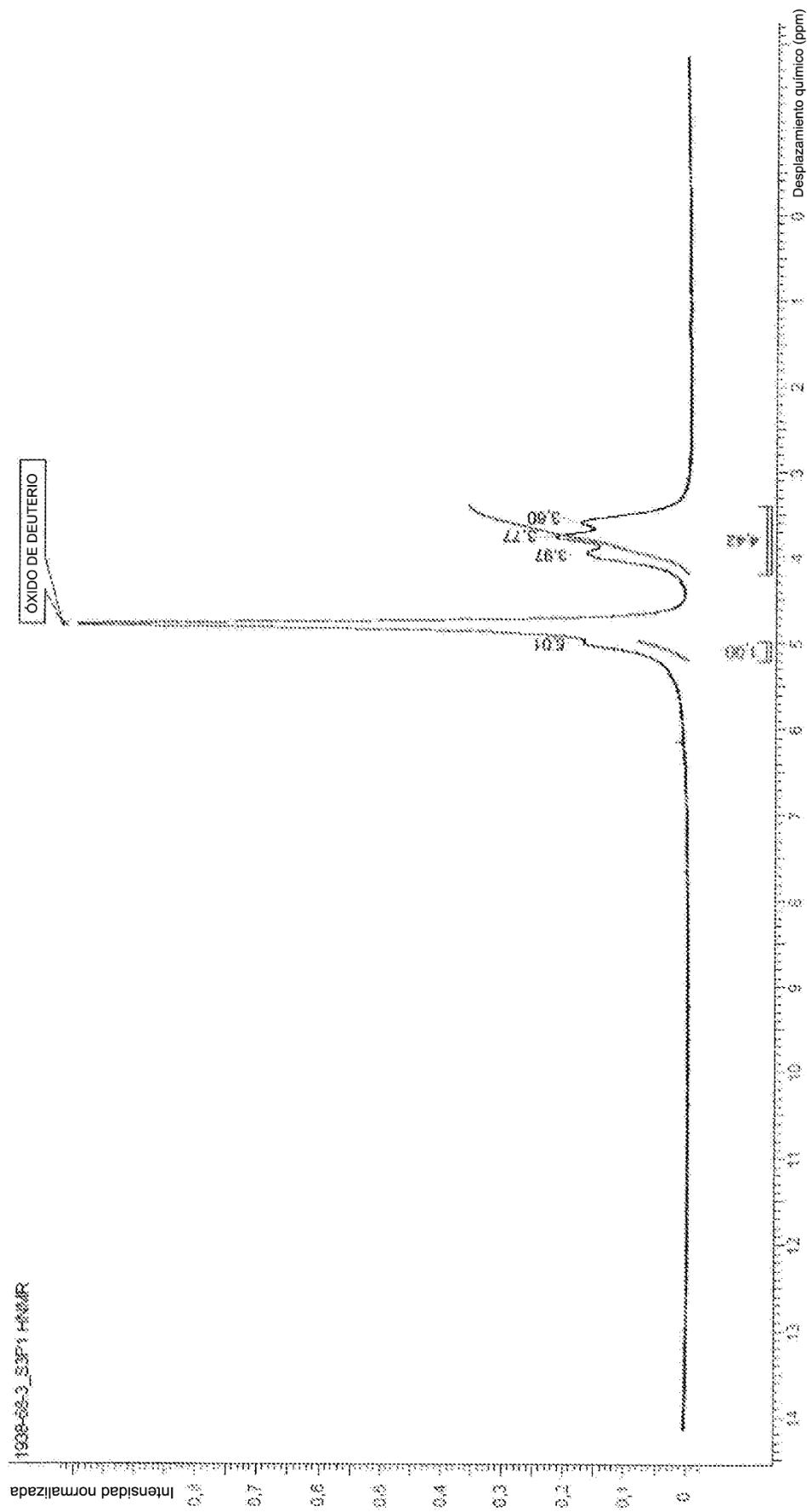


Figura 18 Espectro de ^1H NMR de S3 - preparación 1

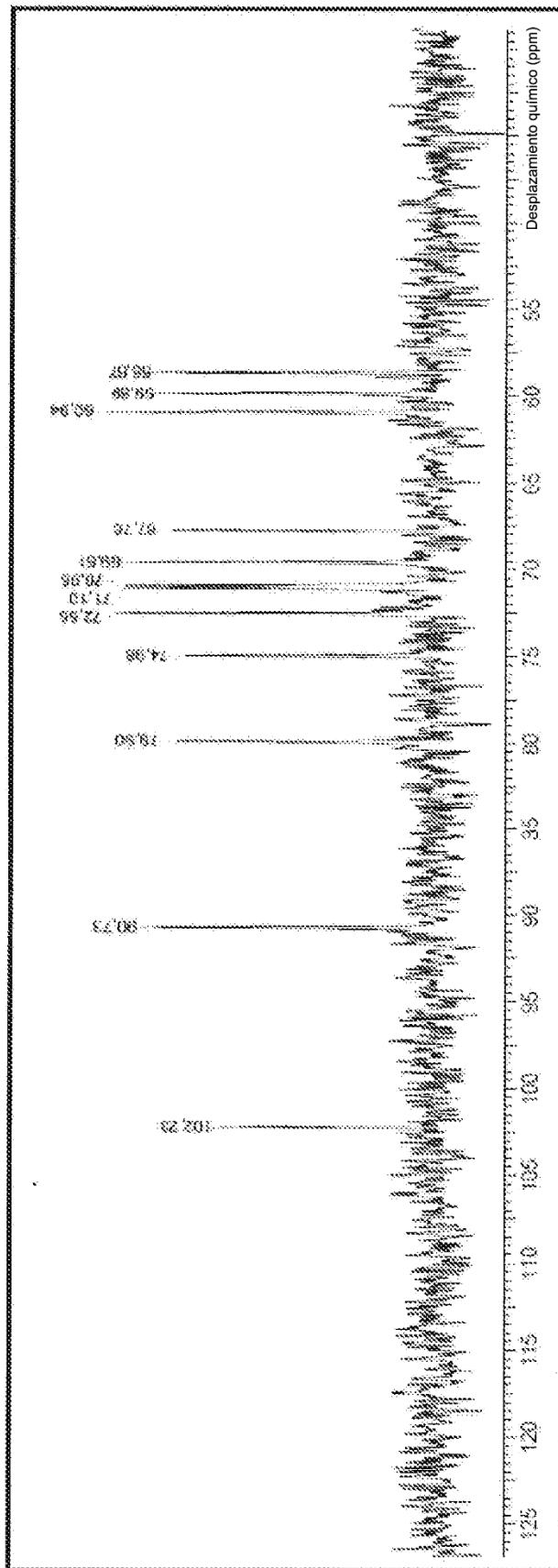


Figura 19 Espectro de ¹³C NMR de S1 - preparación 1

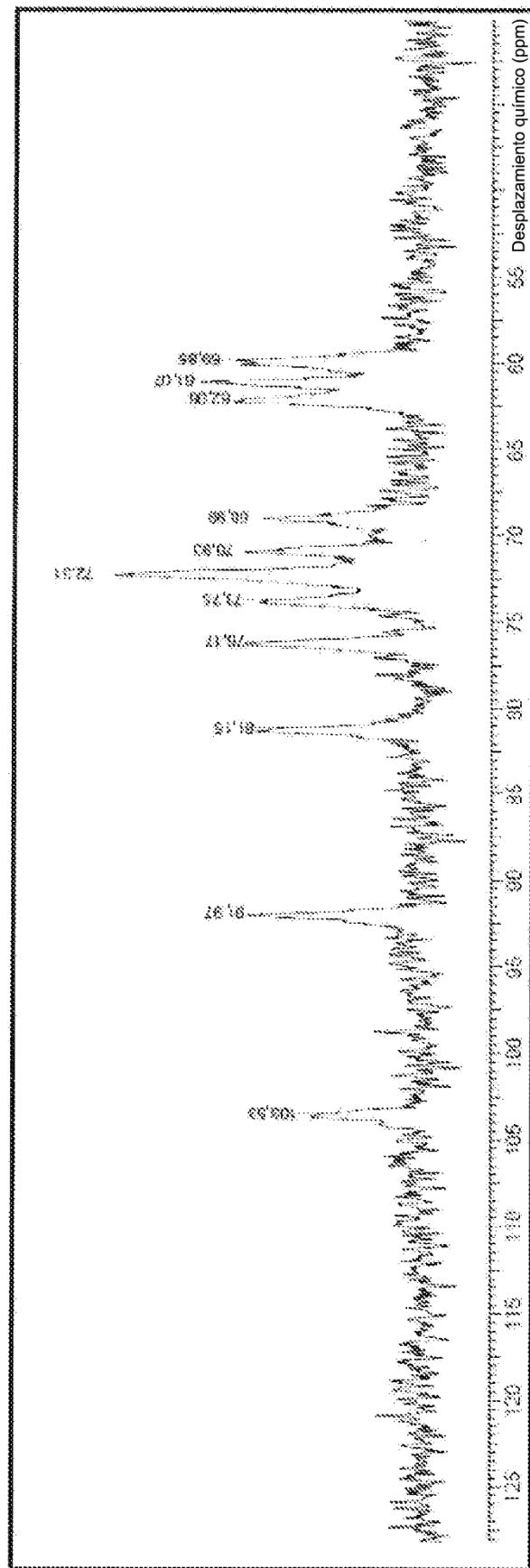


Figura 20 Espectro de ^{13}C NMR de S2 - preparación 1

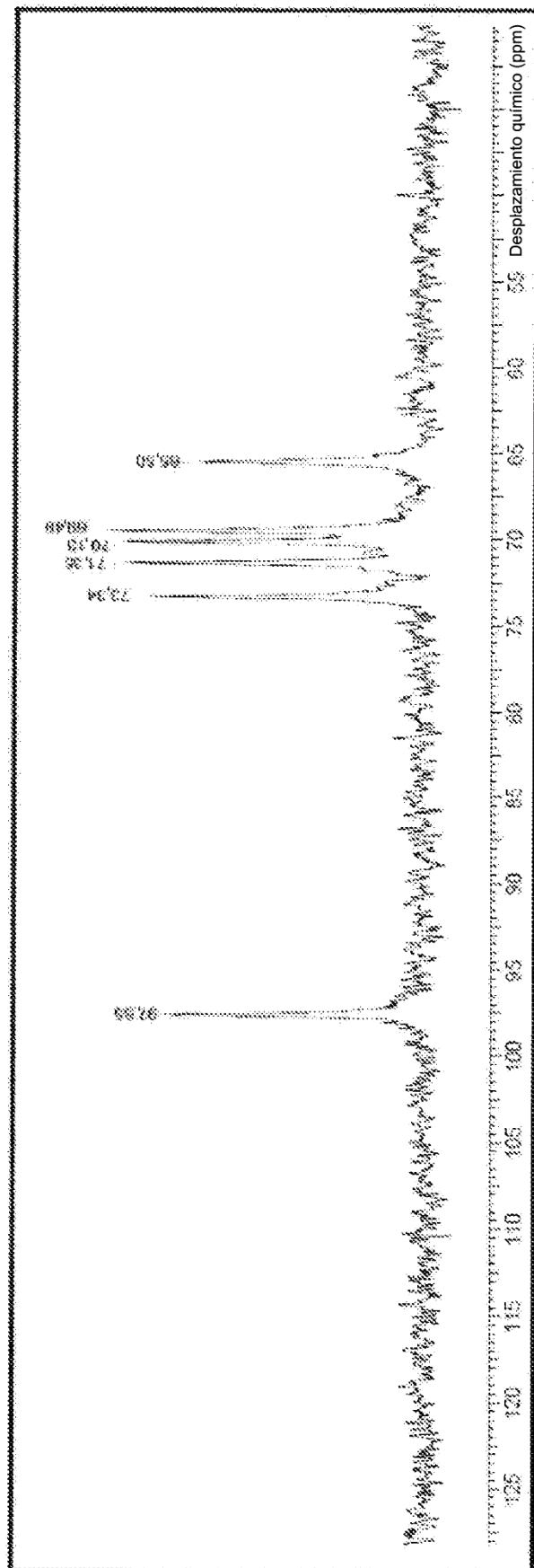


Figura 21: Espectro de ^{13}C NMR de S3 - preparación 1

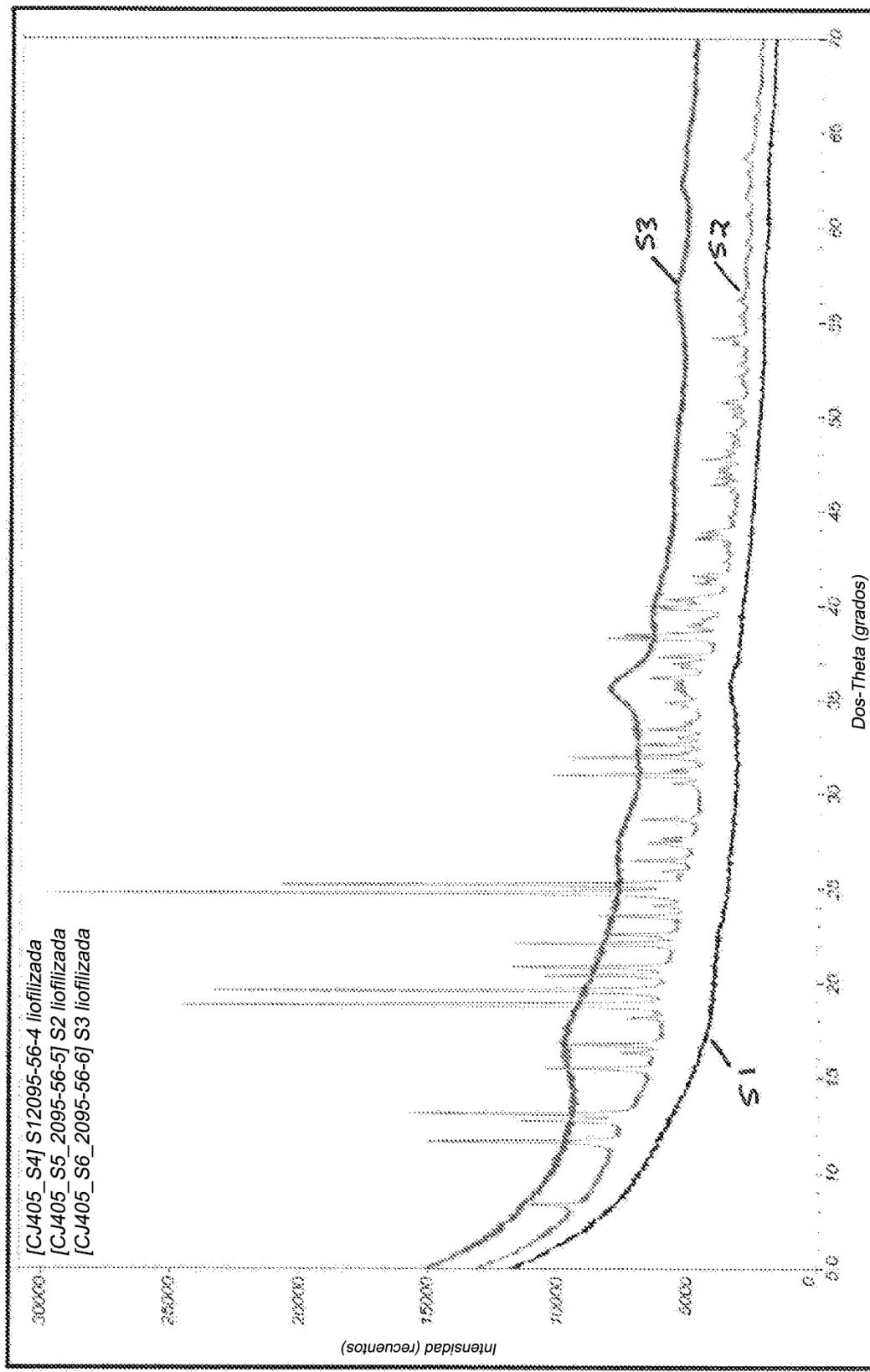


Figura 22: Comparación de datos sin procesar para las tres muestras (liofilizadas)

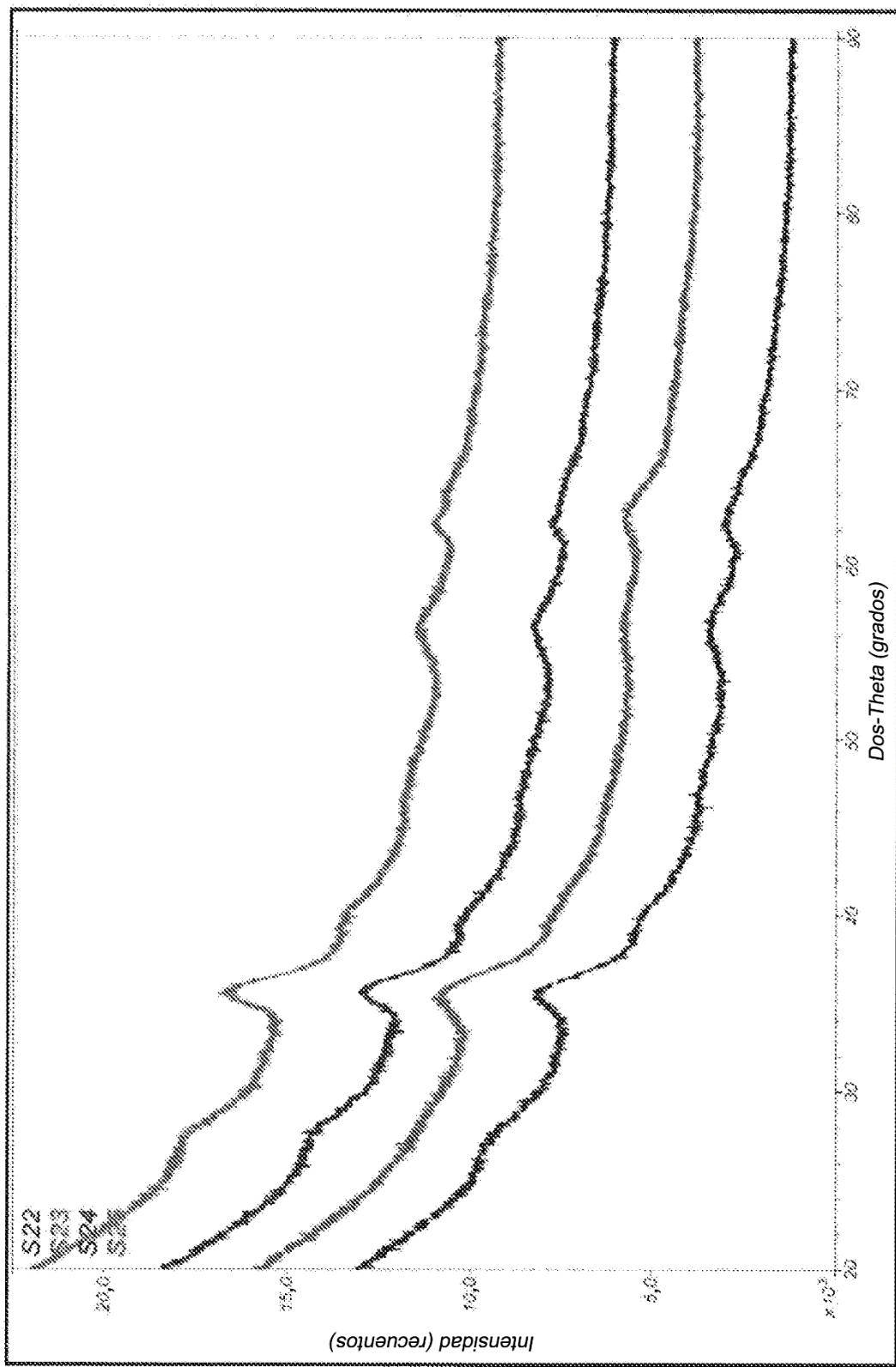


Figura 23: Cubierta de compensación de los datos de las tres muestras (dos réplicas para S3)

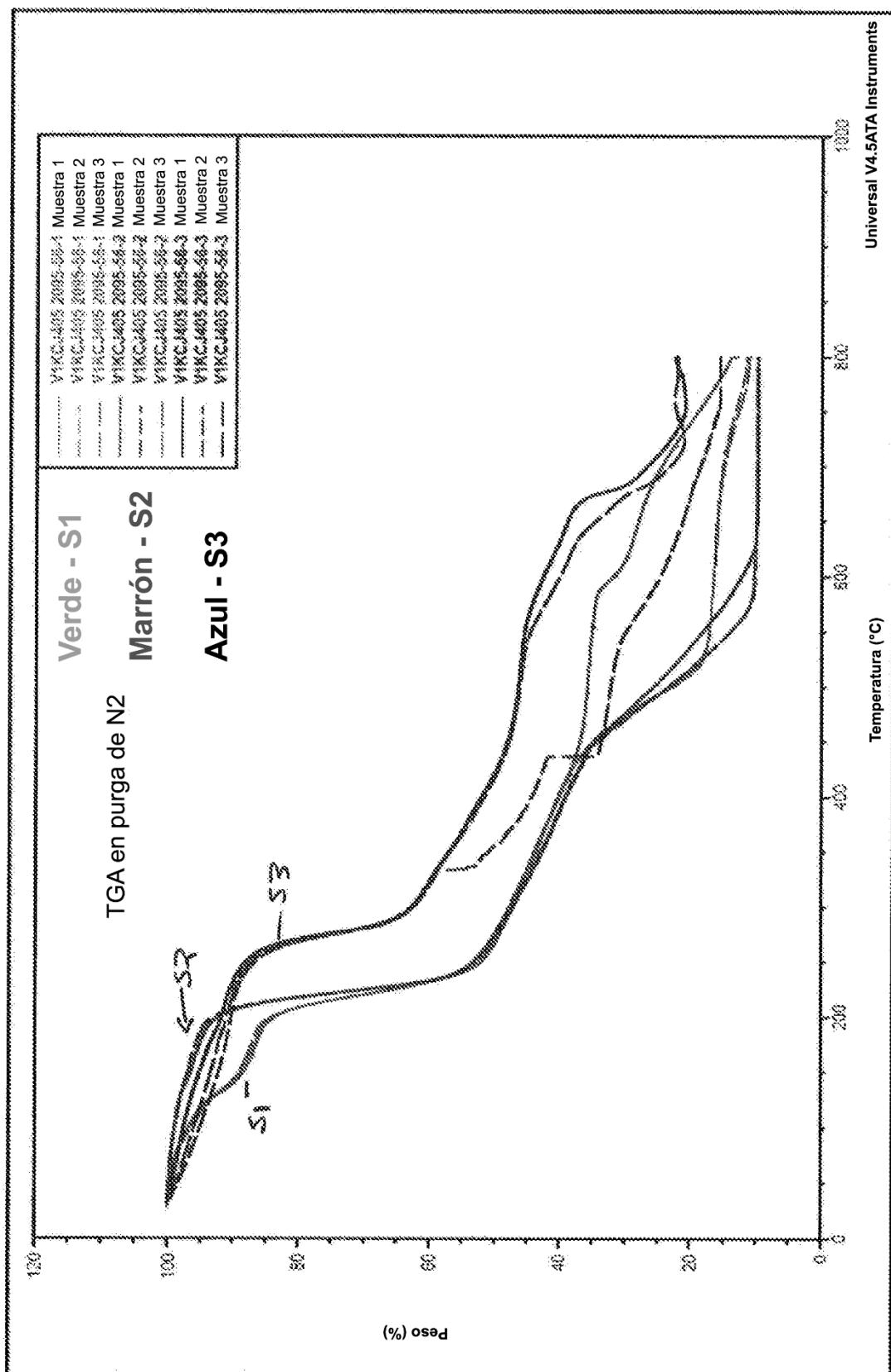


Figura 24: Termograma de TGA de S1, S2 y S3 en condiciones de purga de nitrógeno

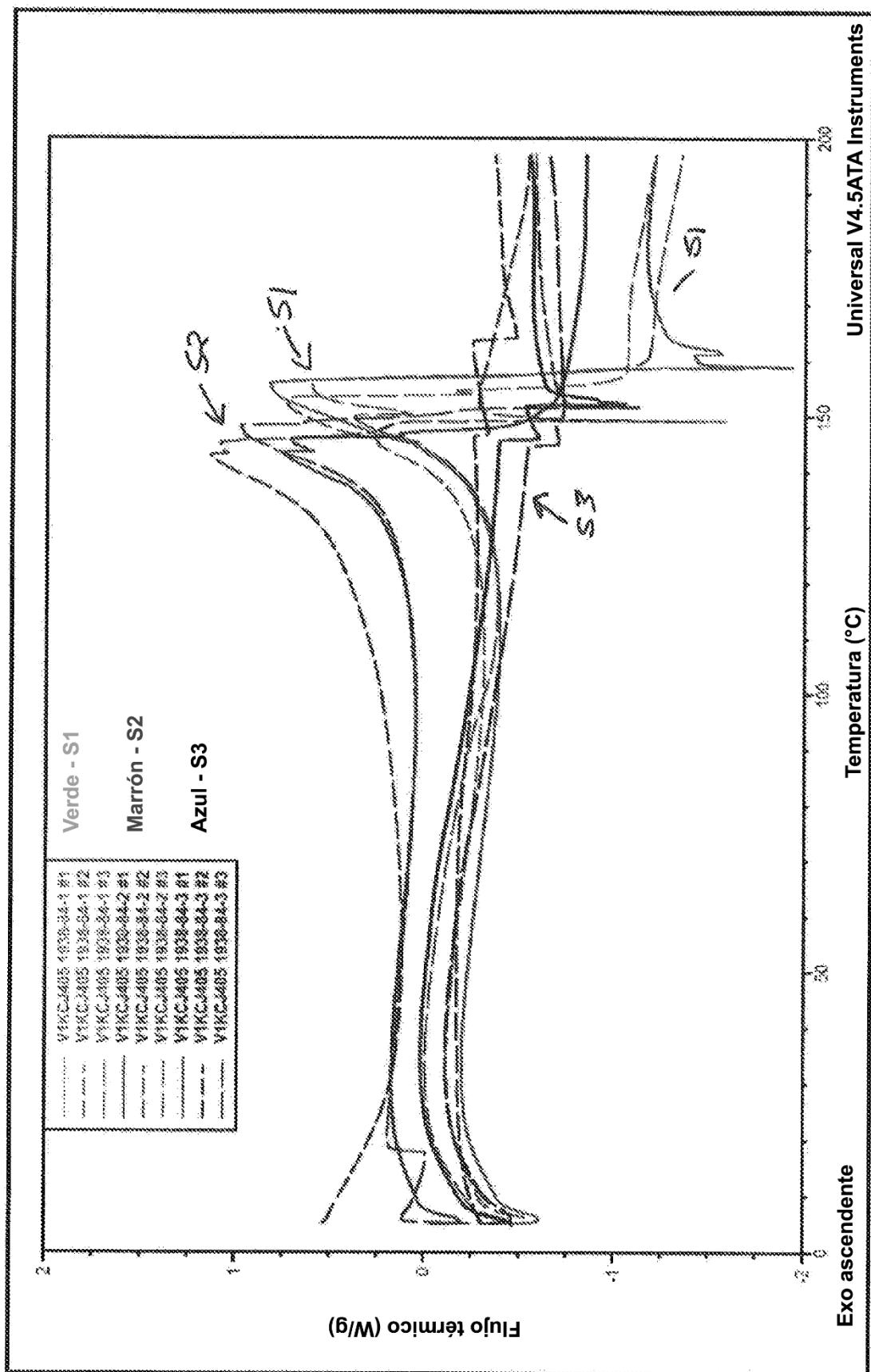


Figura 25: Termogramas de DSC de S1, S2 y S3