

Evaluación de la estabilidad en vida de estante del TROFIN® deshidratado

Shelf-life Stability Evaluation of Dehydrated TROFIN®

Dayana Callejo Díaz¹ <https://orcid.org/0000-0003-2107-3148>

Yenela García Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4575-8275>

Mislén Gómez Matos² <https://orcid.org/0000-0002-5666-5381>

Rosa María Simpson Ferrales³ <https://orcid.org/0000-0002-0401-5264>

Eduardo Rodolfo Besada Maribona³ <https://orcid.org/0000-0002-1664-0593>

¹Centro Nacional de Biopreparados. Mayabeque, Cuba.

²Universidad de la Habana. Cuba.

³Empresa Laboratorio Farmacéutico “Roberto Escudero”. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: yenela@biocen.cu

RESUMEN

Introducción: La anemia ferropénica es la deficiencia nutricional más extendida en Cuba. Con la finalidad de reducir el impacto funcional de esa deficiencia, en el Centro Nacional de Biopreparados se está evaluando el TROFIN® deshidratado, ingrediente farmacéutico activo para utilizarlo en la producción de antianémicos.

Objetivo: Determinar la calidad y estabilidad química, física y microbiológica del TROFIN® deshidratado, ingrediente farmacéutico activo.

Métodos: Se realizó un estudio de estabilidad en vida de estante en los lotes 8P08AI, 8P09AI y 8P09BI. Para ello las muestras del ingrediente farmacéutico activo fueron envasadas en doble bolsa de polietileno de baja densidad que se colocaron dentro de contenedores cilíndricos de cartón con tapa de plástico y

cierre metálico ajustable para protegerlo del efecto de la humedad y de la luz. El contenedor con las bolsas se colocó en un local climatizado cuya temperatura se encontraba de 15 a 25 °C y la humedad residual ≤ 70 %. Se evaluaron parámetros físico-químicos en los tiempos 0, 1, 2, 3, y 6 meses y los ensayos microbiológicos se realizaron en los tiempos 0 y 6 meses.

Resultados: Los tres lotes se comportaron dentro de los límites de aceptación de todos los parámetros de calidad establecidos para el ingrediente farmacéutico activo durante los 6 meses. Además, el análisis de tendencia de los parámetros cuantitativos demostró que el producto pudiera ser estable hasta 10 meses.

Conclusiones: El trabajo demostró que el TROFIN® deshidratado ingrediente farmacéutico activo es estable hasta 6 meses bajo las condiciones de envase y ambientales especificadas anteriormente y por lo tanto puede ser empleado en la producción de medicamentos para la anemia ferropénica.

Palabras clave: TROFIN® deshidratado ingrediente farmacéutico activo; estabilidad; hierro hemínico.

ABSTRACT

Introduction: Iron deficiency anemia is the most widespread nutritional deficiency in Cuba. In order to reduce the functional impact of this deficiency, the National Center of Biopreparations is evaluating dehydrated TROFIN®, an active pharmaceutical ingredient to be used in the production of anti-anemia drugs.

Objective: To determine the chemical, physical and microbiological quality and stability of dehydrated TROFIN®, active pharmaceutical ingredient.

Methods: A shelf-life stability study was carried out on lots 8P08AI, 8P09AI and 8P09BI. For this purpose, the samples of the active pharmaceutical ingredient were packed in double low density polyethylene bags which were placed inside cylindrical cardboard containers with plastic lid and adjustable metal closure to protect it from the effect of moisture and light. The container with the bags was placed in an air-conditioned room whose temperature was 15 to 25 °C and

residual humidity ≤ 70 %. Physicochemical parameters were evaluated at times 0, 1, 2, 2, 3, and 6 months and microbiological tests were performed at times 0 and 6 months.

Results: All three batches performed within the acceptance limits of all quality parameters established for the active pharmaceutical ingredient during the six months. In addition, trend analysis of quantitative parameters showed that the product could be stable up to 10 months.

Conclusions: The work demonstrated that the dehydrated TROFIN® active pharmaceutical ingredient is stable up to six months under the specified packaging and environmental conditions and therefore can be employed in the production of drugs for iron deficiency anemia.

Keywords: TROFIN® dehydrated active pharmaceutical ingredient; stability; heminic iron.

Recibido:13/06/2022

Aceptado:03/12/2022

Introducción

La anemia ferropénica es la deficiencia nutricional más extendida en Cuba. Los recién nacidos, las embarazadas, los niños con edades entre 1-5 años y los ancianos, se encuentran entre los subgrupos demográficos más vulnerables a los estados deficitarios de hierro (Fe).⁽¹⁾ Esta deficiencia se debe a una baja ingesta de Fe, a una mala absorción en el tubo digestivo, a un incremento de las necesidades de consumo como ocurre durante el embarazo y la infancia. También la anemia se presenta por sangrados digestivo o menstrual o a la combinación de algunas de estas causas.^(2,3)

Con la finalidad de reducir el impacto funcional de esa deficiencia de Fe sobre la calidad de vida, en el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) se desarrolla el TROFIN® deshidratado IFA (Ingrediente Farmacéutico Activo) para

utilizarlo en la producción de medicamentos para el tratamiento de la anemia ferropénica. Este IFA se obtiene a partir de un hidrolizado de proteínas de sangre bovina por la acción de un extracto enzimático obtenido del estómago bovino. Además, contiene miel de abejas que por su elevado contenido de sólidos (humedad de 17,7 %)⁽⁴⁾ favorece el proceso de secado por aspersion al que es sometido el hidrolizado de sangre bovina como parte del proceso productivo. También está compuesto por sustancias conservadoras como el extracto alcohólico de propóleos y el benzoato de sodio. En este IFA la hemoglobina (Hb) bovina es la proteína de mayor interés puesto que aporta el hierro hemínico, por el cual ejerce su efecto antianémico.⁽⁵⁾

La formulación del TROFIN® deshidratado IFA se diferencia de la materia prima hidrolizado de sangre deshidratada que se utiliza en BioCen para la producción de suplementos nutricionales en tabletas (NEOTROFIN®®, NEOTROFIN® CF® y COMBIFER®),⁽⁶⁾ en el contenido del preservante benzoato de sodio. Además, otra diferencia está en los límites microbianos regulados para medicamentos, que es inferior al de los suplementos nutricionales.⁽⁷⁾ El objetivo de este trabajo fue determinar la calidad y estabilidad química, física y microbiológica del TROFIN® deshidratado IFA.

Métodos

Preparación de las muestras

Se utilizaron tres lotes de TROFIN® deshidratado IFA que fueron fabricados a nivel industrial (8P08AI, 8P09AI y 8P09BI), en la planta de producción de Medios de Cultivo y TROFIN® de BioCen, se cumplieron las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF). De ellos se obtuvo una muestra de 1 kg que se reenvasó en bolsas dobles de polietileno de baja densidad ya que se trataba de un IFA altamente higroscópico. Para ello se prepararon bolsas de 11 x 12 cm a las que se les adicionó de 20 ± 2 g del TROFIN® deshidratado IFA. El proceso de reenvase se realizó bajo flujo laminar para garantizar condiciones asépticas. Además, se colocaron deshumidificadores (súper, modelo SDH25, Korea) en el

local del flujo laminar para controlar la humedad ambiental ($50 \pm 5 \%$), ya que el TROFIN® deshidratado IFA es altamente higroscópico.

Además, como otro elemento de protección del TROFIN® deshidratado IFA a causa del efecto de la humedad ambiental y de la luz, las bolsas de polietileno doble se colocaron dentro de contenedores cilíndricos de cartón con tapa de plástico y cierre metálico ajustable. Estos contenedores se colocaron en un local climatizado cuya temperatura se encontraba entre 15 y 25 °C y la humedad residual $\leq 70 \%$ en el cual se colocó un termohigrómetro (Cole Parmer, Estados Unidos de América). De lunes a viernes se registró manualmente la lectura de temperatura y humedad ambiental. Las condiciones anteriormente descritas coinciden con las que se utilizan para conservar el IFA del TROFIN® deshidratado durante el proceso productivo, es decir mientras se espera para utilizarlo en la fabricación de los productos farmacéuticos terminados.

Diseño general del estudio de estabilidad en vida de estante

De acuerdo con la regulación del CECMED,⁽⁸⁾ en los tiempos experimentales 0, 1, 2, 3 y 6 meses se realizaron los ensayos y se observaron características organolépticas, pérdida por desecación, contenido de nitrógeno amínico, hemoglobina bovina, hemo y hierro hemínico. Además, se analizó el crecimiento microbiano, la presencia de patógenos y el contenido de benzoato de sodio en los tiempos 0 y 6 meses.

Descripción de los métodos de ensayo durante el estudio de la estabilidad

En cuanto al color y apariencia del polvo, se homogenizó la muestra invirtiendo varias veces la bolsa. Luego se vertió aproximadamente 5g de polvo en una placa Petri y se observó el color del polvo y la apariencia sobre una mesa con suficiente iluminación.

En cuanto al contenido de hemo y hierro hemínico se aplicó la metodología descrita por Gómez y otros.⁽⁹⁾ Para ello se preparó una solución *stock*

de TROFIN® deshidratado al 1 % para lo cual se pesaron 0,5 g de TROFIN® y se les adicionó aproximadamente 40 mL de agua para inyección. La muestra se disolvió con agitación continua durante 45 min. La porción de ensayo se preparó en tubos Corning de 15 mL al que se le adicionó 5 mL de la solución de hidróxido de sodio 0,2 mol/L y Tritón X-100 al 5 %. En esta solución se adicionaron 5 mL de la solución *stock* de TROFIN® deshidratado, se homogenizó manualmente la muestra dentro del tubo y se dejó reposar por 10 min para posteriormente leer la ABS a 575 nm. Se utilizó como blanco la solución de hidróxido de sodio 0,2 mol/L y Tritón X-100 al 2.5%. Además se leyeron tres réplicas de un patrón de trabajo de hematina porcina a la concentración de 60 µg/mL.

La pérdida por desecación se realizó por el método gravimétrico descrito por *Alfaro*,⁽¹⁰⁾ pero haciendo algunos ajustes debido a las características del TROFIN® deshidratado. Se utilizaron pesafiltros de porcelana previamente secos en la estufa al vacío por 3 h a 105 °C. Posteriormente, se adicionó por triplicado 1 g de muestra y se incubó por 3 h a 105 °C. Después de ese tiempo se corroboró que las muestras alcanzaran un peso constante.

La pérdida por desecación para cada réplica se calculó por la siguiente expresión (ecuación 1):

$$PD = 100_1 - \left(\frac{A-C}{B}\right) \cdot 100 \quad (\%) \quad 1$$

Donde:

A = Peso del pesafiltro con la muestra seca de la réplica (g).

B = Peso de la muestra de la réplica (g).

C = Peso del pesafiltro vacío de la réplica (g).

100 = Coeficiente para expresar el resultado en tanto por ciento.

100₁ = Contenido total de sólidos en la muestra.

Para determinar el contenido de nitrógeno amínico se aplicó el método de valoración por cambio de pH utilizando como referencia el método descrito por *Santos y otros*⁽¹¹⁾ que fue validado en el TROFIN® en forma líquida,⁽¹²⁾ que se

estandarizó para la muestra en forma deshidratada. Primeramente, se preparó la muestra disolviendo 5 g de polvo en agua para inyección y se neutralizó hasta el pH 7,0 con una solución de hidróxido de sodio al 0,1 mol/L. Después se les adicionó formaldehído al 37 % también neutralizado con hidróxido de sodio al 0,1 mol/L. Las muestras se valoraron con hidróxido de sodio al 0,1 mol/L hasta que el pH alcanzó 9,1 o 9,2.

Para el contenido de hemoglobina bovina se aplicó el método espectrofotométrico de la cianometahemoglobina descrito por *González y otros*.⁽¹⁴⁾ La muestra de TROFIN® deshidratado IFA se preparó a partir de una dilución de 10 g en 100 mL de agua para inyección. Luego se tomó 40 µL de muestra por triplicado en 4980 µL de solución de Hemotest (HELFA Diagnostic, Cuba), y se leyó la absorbancia (ABS) en un espectrofotómetro UV-visible (PJ Instruments, Reino Unido) a 540 nm de las muestras y la curva. A partir de la ecuación de la curva patrón de cianometahemoglobina (DIAGEN, Reino Unido), se determinó la concentración de hemoglobina bovina por gramo de TROFIN® deshidratado IFA.

Para el contenido de benzoato de sodio se pesaron 53,6 mg de la muestra y se disolvieron en 10 mL de ácido acético al 10 % durante 15 min, en el baño ultrasónico. Posteriormente, se enrasó a 20 mL con fase móvil (solución de acetato de amonio 0,1 mol/L, pH 4,2 y 20 % de acetonitrilo) y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min. Después se extrajo el sobrenadante de la centrifugación y se filtró por 0,45 µm. Se utilizó como referencia una solución de benzoato de sodio a la concentración teórica esperada que se encuentra en el TROFIN® deshidratado IFA que es 3,06 % y disuelto también en fase móvil a la misma dilución que la muestra. Tanto la muestra como la referencia fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Para los análisis se utilizó un cromatógrafo UV-visible (Jasco, Japón) y una columna C18 (Argilent technologies, Alemania), a razón de 20µL, a un flujo de 1,5 mL/min, 30 ± 1 °C y 225 nm.⁽¹⁴⁾ La concentración de benzoato de sodio se determinó por la siguiente expresión (ecuación 2):

$$\% \text{ de SBz} = \frac{(Am \times Pp) \times 8}{(Ap \times Pm)} \quad 2$$

Donde:

% Sbz = Porcentaje de Benzoato de Sodio en 100g de TROFIN® deshidratado IFA.

AM = Área integrada debajo de la curva de la muestra.

PP = Peso en mg del patrón.

AP = Área de integrada debajo de la curva del patrón.

PM = Peso en mg de la muestra.

8 = Factor matemático de dilución.

Conteo total de bacterias, hongos, levaduras y verificación de ausencia de patógenos

Se utilizó 1 g de muestra para preparar las diluciones que fueron sembradas en los medios de cultivo correspondientes. Las muestras se incubaron a diferentes temperaturas y tiempos. Luego se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) para determinar el crecimiento microbiano y la presencia de patógenos (*Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* sp, *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo y *Escherichia coli*).⁽⁷⁾

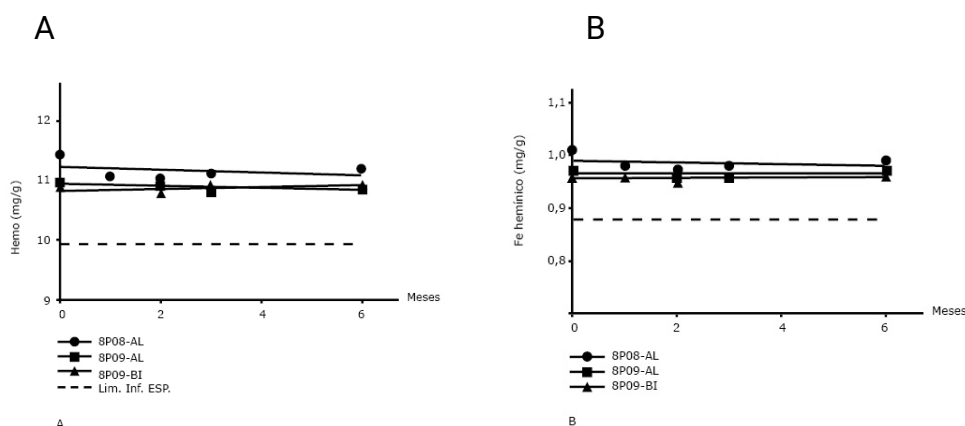
En el estudio de biocarga se lavaron 3 bolsas de 90 x 120 cm (grandes) y tres bolsas de 11 x 12 cm con 100 mL de solución salina fisiológica (NaCl al 0,9 %) estéril para las bolsas pequeñas, y 200 mL para las bolsas grandes. Todo el procedimiento se aplicó bajo flujo laminar. La solución resultante se colectó en frascos estériles y se realizó el ensayo de biocarga.⁽⁷⁾

Se realizó un análisis de tendencia de los parámetros cuantitativos a través del programa GraphPad versión 5.0 (Estados Unidos de América). Se determinó según ese modelo la predicción mínima del tiempo de validez, según los límites establecidos con un 95 % de confianza.^(15,16)

Resultados

Durante todo el estudio la temperatura y la humedad relativa (HR) se comportaron dentro de los límites de aceptación establecidos (HR: $\leq 70\%$ y temperatura: $15-25^{\circ}\text{C}$). Por otra parte, en relación a las características organolépticas, contenido de hemo y hierro hemínico todos los lotes cumplieron con los requisitos de la especificación en todos los muestreos: polvo de color pardo-rojizo, fino, que puede formar aglomerados de diferentes tamaños, con valores de 12 ± 2 mg/g para el contenido de hemo y $1,06 \pm 0,18$ mg/g para el hierro hemínico. El análisis de regresión de estos ensayos se muestra en la figura 1. Para el análisis de regresión de los datos del lote 8P09-AL se excluyó el resultado del tiempo 1 mes, por sobrepasar en más de dos desviaciones estándar de la del grupo.

Este análisis mostró en los tres lotes una cinética de degradación similar ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre las pendientes (tabla 1). Además, la estimación del periodo de validez a partir del límite inferior del intervalo de confianza (IC) para un 95 % mostró un tiempo superior al período de validez propuesto (10,37 meses). En el caso del hierro hemínico tuvo un comportamiento similar al hemo (figura 1B), lo cual se esperaba, ya que es un parámetro que se calcula por una expresión matemática a partir del contenido de hemo, es decir, no se determina de forma directa.

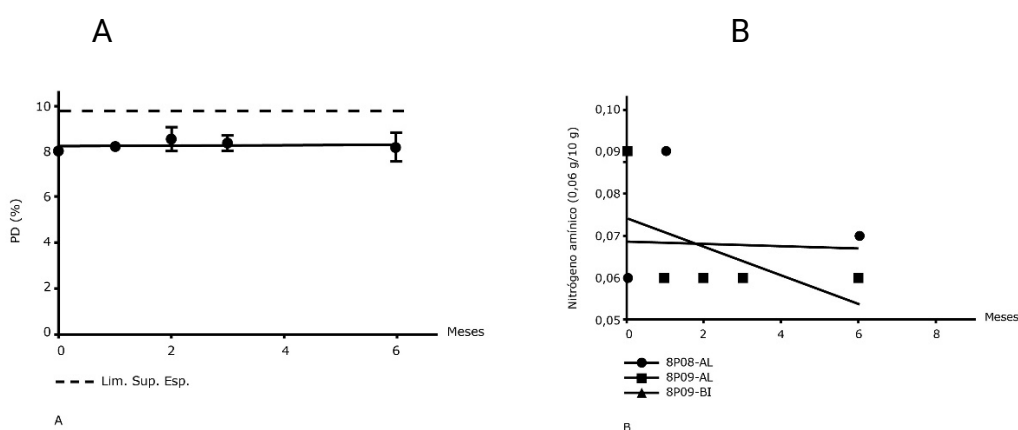


Lim Inf ESP: Límite inferior de especificación.

Fig. - 1 Comportamiento de los parámetros Hemo (A) y hierro hemínico (B) del TROFIN® deshidratado IFA.

En la determinación del contenido de humedad también se obtuvieron resultados satisfactorios con valores de pérdida por desecación (PD) $\leq 10\%$ en todos los muestreos (figura 2A). La comparación entre los tres lotes no detectó diferencias significativas entre las pendientes, lo que indicó una cinética de degradación similar. Por lo tanto, se realizó un análisis de regresión agrupado entre los tres lotes cuyos resultados se resumen en la tabla 1. Para este análisis se eliminó el valor de PD al segundo mes del lote 8P09-BI porque se consideró inconsistente con los resultados en el resto de los muestreos, por lo tanto, lo consideramos un error experimental. Además, la predicción de estabilidad correspondiente al límite superior de la especificación del 95 % de confianza arrojó resultados que prácticamente duplican el período de validez propuesto de 6 meses (12,45 meses).

En cuanto al contenido de nitrógeno amínico la pendiente de degradación es similar para los tres lotes, lo que mostró resultados idénticos para los lotes 8P09AI y 8P09BI (figura 2B y tabla 1). Además, el tiempo estimado de vida media según el límite inferior del intervalo de confianza para la recta de máxima pendiente negativa fue el más pequeño, determinado según todos los parámetros estimados, aunque superó el tiempo propuesto para el estudio que es de 6 meses.



Lim Sup Esp: Límite superior de especificación.

Fig. - 2 Comportamiento de los parámetros pérdida por desecación y contenido de nitrógeno amínico del TROFIN® deshidratado IFA.

En este caso el resultado se explicó porque la mayoría de los análisis se encontraban en el límite inferior de la especificación (0,06 g/10g) y esta estimación se realizó para el caso de que el límite inferior fuera de 0, por lo tanto se supone que este tiempo será mucho menor. Sin embargo, si se tiene en cuenta que este parámetro no se relaciona directamente con los otros de mayor impacto en la calidad del producto como la HR y el contenido de hemo/hierro hemínico, el resultado no se tomará en consideración para este estudio. A diferencia de todos los parámetros que se analizaron, el contenido de Hb bovina no muestra degradación (figura 3), por lo tanto se considera que no es un requisito de utilidad para estudios de estabilidad de este IFA en vida de estante.

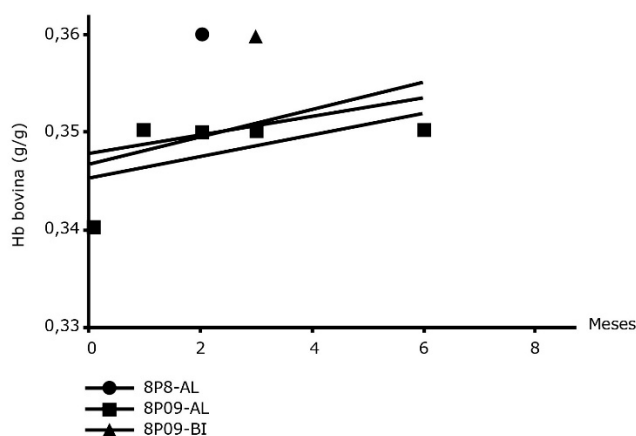


Fig. - 3. Comportamiento de la hemoglobina (Hb) bovina del TROFIN® deshidratado.

Tabla 1 - Resumen del análisis de regresión lineal de los requisitos de calidad del TROFIN® deshidratado IFA

Resultados análisis de tendencia	Pérdida por desecación	Hemo	Hierro hemínico	Nitrógeno amínico	Hemoglobina bovina
Pendiente de la recta ajustada al modelo lineal	0,02005 ± 0,07064	-0,02066 ± 0,03817	-0,001509 ± 0,003702	-0,003396 ± 0,002734	0,0009434 ± 0,001688
Desviación de 0	NS	NS	NS	NS	NS
Intercepto	8,173 ± 0,2281	11,21 ± 0,1207	0,9896 ± 0,01171	0,07415 ± 0,008646	0,3477 ± 0,005337

Estimación de periodo de validez mínimo (IC95%) para límite inferior de la especificación	12,45 meses	10,37 meses	10,14 meses	infinito	infinito
---	-------------	-------------	-------------	----------	----------

IC: Intervalo de confianza

Por otra parte, en el análisis del contenido de benzoato de sodio, en los tres lotes en los tiempos 0 y 6 meses se obtuvieron valores aproximados al 3,06 %, establecido como límite. También en el estudio de biocarga de las bolsas de polietileno que se utilizaron para el envase del TROFIN® deshidratado IFA, se demostró que el aporte de la biocarga fue despreciable (≤ 1 UFC) en relación con el contenido microbiano que poseían los lotes. En cuanto a la evaluación microbiológica los tres lotes cumplieron con los criterios establecidos en la especificación: $\leq 10^3$ UFC/g en el conteo de bacterias aerobias mesófilas y $\leq 10^2$ UFC/g para hongos y levaduras. En este estudio el lote 8P09BI a los 6 meses aumentó el contenido de bacterias, mientras que en los dos restantes lotes disminuyó. Además, en el caso del conteo de hongos y levaduras aumentó a los 6 meses solo en el lote 8P09AI.

Discusión

En relación al conteo total de bacterias hongos y levaduras, los resultados sugieren un efecto protector del benzoato de sodio como preservante en el TROFIN® deshidratado IFA, lo cual se observa también en los estudios realizados con la formulación de TROFIN® como solución oral.⁽¹⁷⁾

El TROFIN® deshidratado IFA en el periodo de estabilidad evaluado en este trabajo, hasta 6 meses, cumple con los límites de aceptación para todos los requisitos de calidad evaluados en este estudio. Por lo tanto, se demuestra que este IFA envasado en doble bolsa de polietileno de baja densidad, que se conservan a su vez dentro de contenedores cilíndricos de cartón con tapa de plástico y cierre metálico ajustable, en temperaturas de 15 a 25 °C, y de HR ≤ 70 %, presenta una estabilidad química, física y microbiológica adecuada para emplearse en el desarrollo de medicamentos antianémicos.

Por otra parte, los resultados de este estudio se aplican en la práctica ya que se ha podido fabricar varios lotes a escala piloto e industrial del nuevo antianémico en desarrollo, COMBIFER-T en polvo para suspensión oral, lo cual demuestra que el tiempo de 6 meses es suficiente para garantizar el ciclo productivo correspondiente. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados del análisis de tendencia que se aplicó en el trabajo, para predecir la estabilidad del estudio de vida de estante, en un tiempo mayor al real ejecutado,^(15,16) el trabajo demuestra que el TROFIN® deshidratado IFA pudiera ser estable hasta los 10 meses. En tal sentido estos resultados permiten recomendar para evaluaciones futuras que se estudie la estabilidad en vida de estante para un periodo superior a 6 meses, lo cual constituiría una ventaja desde el punto de vista comercial si existiera posibilidad de exportación del IFA, donde los ciclos productivos tienden a extenderse.

Referencias bibliográficas

1. Gigato E. La anemia ferropénica. Diagnóstico, tratamiento y prevención. RCAN. 2015 [acceso 19/04/2022];25(2):371-89. Disponible en: <http://revcmhabana.sld.cu/index.php/rcmh/article/view/1838>
2. Moreira VF, López A. Anemia ferropénica. Tratamiento. Rev. Esp. Enferm. Dig. 2009 [acceso 19/04/2022];101(1):1130-0108. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S11300108200900010010
3. Fernández JR, Silva N, Roque T, Aznar E. Sobre la efectividad de una preparación orgánica de hierro en la prevención de la anemia durante el embarazo. RCAN. 2018 [acceso 20/04/2022];28(2):260-71. Disponible en: <http://www.revalnutricion.sld.cu/index.php/rcan/article/view/667>.
4. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Hussain A, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi J.

- Biol. Sci. 2019 [acceso 09/06/2022];26:1695-703. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864204/pdf/main.pdf>
5. García Y, Carrillo O, Cárdenas R, Castro JD. Advantages of the supplementation with both a protein and hemehydrolyzate and ionic iron during iron deficiency anemia. J Food Nutr Res. 2017 [acceso 20/04/2022];5(1):37-47. Disponible en: <http://www.sciepub.com/portal/downloads?doi=10.12691/jfnr-5-1-7&filename=jfnr-5-1-7.pdf>
6. Aznar E, González R, González M, Suárez S. Utilización del Trofín®, NeoTrofín y sus formulaciones con vitamina C y ácido fólico para disminuir la anemia por deficiencia de hierro. En: Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos (eds). Alimentación, Nutrición y Salud. La Habana: Minsap; 2009. p.173-75.
7. United States Pharmacopeial Convention, I. USP 40. EE. UU.:United States Pharmacopeial Convention. 2017. p. 1, 130-144,1554-1561.
8. Centro para el control estatal de la calidad de los medicamentos, equipos y dispositivos médicos (CECMED). Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de nuevos ingredientes farmacéuticos activos. Regulación 24. La Habana: Minsap; 2020 [acceso 19/04/2021]. Disponible en: https://www.cecmecmed.cu/sites/default/files/adjuntos/Reglamentacion/reg_240_0_regulación_requerimientos_de_los_estudios_de_estabilidad_para_el_registro_de_nuevos_ingredientes_farmacuticos_activos.pdf
9. Gómez M, García Y, Echagarrúa A, Pérez, Cabrera AL. Desarrollo de un nuevo método analítico para cuantificar hemo en la formulación ANT-00. Rev Cien Farm y Alim. 2020 [acceso 12/09/2021];6(1). Disponible en: <http://www.rcfa.uh.cu/index.php/RCFA/article/view/178>
10. Alfaro LJ. Calidad fisicoquímica de lactosa monohidrato materia prima de un laboratorio farmacéutico nacional [Tesis para optar el título de Químico farmacéutico]. [Perú]: Universidad Nacional de Trujillo; 2018. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10688/Alfaro%20Verde%20Lizet%20Janet.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Santos JS, Reis C, Reis EL, Jesús RM, Reis LG, Matias A. Determination of amoniacal nitrogen in samples of food, soil, fertilizers and water based on the

reaction with formaldehyde. jCEC. 2020 [acceso 04/05/2022];6(5). Disponible en: <https://periodicos.ufv.br/jcec/article/download/11334/6385/52217>

12. González P, Domínguez R, Reyes P, González H. Validación de la técnica de determinación del nitrógeno amínico al Trofín® en su forma líquida. Rev Cubana Farm. 2008 [acceso 19/04/2021];42(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152008000100003&script=sci_abstract&tIng=es

13- González M, Otero Y, García Y, Gómez M, García M, Llamas J. Validación de la técnica de cianometahemoglobina en la determinación de hemoglobina al Trofín® deshidratado. RCCB. 2015 [acceso 22/04/2022];46(2):182-90. Disponible en: <https://revista.cnic.cu/index.php/RevBiol/article/download/87/87/204>

14. Sadaf KS, Mallinath SK, Ravikant YP. HPLC Method Development for Simultaneous Estimation of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Food Products. IJFS 2019 [acceso 10/06/2022];7(5):1-5. Disponible en: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijfs/article/view/27074/22366>

15. Capen R, Forenzo P, Huynh-Ba K, Leblond D, Liu O, Neill J, *et al.* Evaluating current practices in shelf life estimation. AAPS PharmSciTech. 2017 [acceso 09/05/2022]; 19:668-80. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1208/s12249-017-0880-4.pdf>

16. Tembhare E, Radheshyam K, Janrao M. An approach to drug stability studies and shelf-life determination. Arch. Curr. Res. Int. 2019 [acceso 09/05/2022];9(1):1-20. Disponible en: <10.9734/acri/2019/v19i130147>

17. González R, Aznar E, González M. Composición físico-química del reconstituyente y antianémico Trofín®. Rev Mex Ciencias Farm. 2004; 36:2-5. Próximamente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización y diseño de la investigación: Yenela García Hernández.

Análisis formal: Mislen Gómez Matos.

Investigación: Rosa María Simpson Ferrales, Eduardo Rodolfo Besada Maribona.

Metodología: Rosa María Simpson Ferrales, Eduardo Rodolfo Besada Maribona.

Visualización: Dayana Callejo Díaz.

Administración del proyecto: Yenela García Hernández.

Redacción: Dayana Callejo Díaz.