

Centro Nacional de Biopreparados. Mayabeque. Cuba

EVALUACIÓN DE UNA APLICACIÓN CLAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO FÓLICO PRESENTE EN TABLETAS DE UN SUPLEMENTO NUTRICIONAL

Yenela García Hernández¹.

RESUMEN

Justificación: CombiFer[®] (BioCen, Mayabeque, Cuba) es un suplemento nutricional utilizado en la prevención de la anemia en las embarazadas que se oferta en tabletas y contiene Trofin deshidratado (BioCen, Mayabeque, Cuba): 300 mg; ácido ascórbico (AA): 60 mg; fumarato ferroso (FF): 50 mg; y ácido fólico (AF): 0.24 mg. Interesa un método para cuantificar el AF presente en la tableta. **Objetivo:** Evaluar una aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para cuantificar el contenido de AF de la tableta. **Material y método:** Una cantidad de polvo de CombiFer[®] equivalente al peso promedio de una tableta fue pesada, disuelta en agua destilada, dejada precipitar por gravedad, y redisuelta en agua destilada. Se completaron tres ciclos de solubilización-precipitación por gravedad-resolubilización. El precipitado resultante (contenitivo de AF + FF) se disolvió con ultrasonido en una mezcla de NaClO₄ (7.5 g.L⁻¹) + K₂HPO₄ (0.6 g.L⁻¹) + Metanol (135 mL) a pH 7.2 durante 3 minutos. Las muestras se analizaron mediante la aplicación CLAR con una columna de fase reversa C18. Como fase móvil se utilizó una mezcla de NaClO₄ (9.4 g.L⁻¹) + K₂HPO₄ (0.75 g.L⁻¹) a pH 7.2 a un flujo de 1 mL.minuto⁻¹. Los eluatos se detectaron a 277 nm. Bajo las mismas condiciones se ensayaron muestras de referencias de AF, FF, Trofin deshidratado, y AA. **Resultados:** El FF interfirió en la cuantificación del AF, lo que resultó en bajos contenidos de AF en los tres lotes ensayados: *Lote #3001*: 0.034 ± 0.002 mg.tableta⁻¹ (14.25% de recobrado); *Lote #2*: 0.055 ± 0.001 mg.tableta⁻¹ (22.85%); y *Lote #3003*: 0.044 ± 0.001 mg.tableta⁻¹ (18.59%). Estos resultados pueden deberse al pH ácido del medio en el que se produce la separación del AF que favorece la oxidación de la molécula. **Conclusiones:** Bajo las condiciones experimentales utilizadas la aplicación CLAR evaluada no permite la cuantificación del AF. **García Hernández Y.** Evaluación de una aplicación CLAR para la cuantificación del ácido fólico presente en tabletas de un suplemento nutricional. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2015;25(2):292-300. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.

Palabras claves: Anemia / Ácido fólico / Tableta / CombiFer[®].

¹ Doctora en Ciencias Biológicas.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro (Fe), y la anemia por deficiencia de Fe, constituyen serios problemas de salud pública que acarrear consecuencias negativas en la mortalidad materna e infantil. Actualmente, más de 1,600 millones de personas son anémicas, lo que corresponde aproximadamente a la cuarta parte de la población mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo el 42% de las mujeres embarazadas, el 30% de las mujeres en edad fértil de 15 a 50 años, y el 47% de los niños en edad preescolar de 0 a 5 años son anémicos.¹ Las causas principales de la deficiencia de Fe son la ingestión de una dieta con bajo contenido del mineral, la disminución de la absorción del mineral, y/o el aumento de los requerimientos en estados fisiológicos como el crecimiento y el embarazo.² En Cuba aproximadamente el 30% de las mujeres en el tercer trimestre del embarazo presentan anemia.³

Para enfrentar los estados deficitarios de Fe en Cuba, el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) ha desarrollado desde hace más de 15 años una línea de suplementos nutricionales obtenidos a partir de la sangre bovina para la prevención de la anemia. En este sentido se pueden mencionar NeoTrofin®, el NeoTrofinC® y el NeoTrofinCF®, presentaciones de antianémicos en tabletas que han demostrado una alta efectividad en la prevención de la anemia durante el embarazo, sin que se observen las reacciones adversas reportadas comúnmente con los preparados de Fe iónico.⁴ Recientemente se ha registrado el CombiFer®: un nuevo suplemento nutricional que presenta en su composición Trofin deshidratado: 300 mg.tableta⁻¹; ácido ascórbico (AA): 60 mg.tableta⁻¹; fumarato ferroso (FF): 50 mg.tableta⁻¹; y ácido fólico (AF): 0.24 mg.tableta⁻¹; respectivamente.

CombiFer® es producido por BioCen (Mayabeque, Cuba) atendiendo a las Buenas Prácticas de Producción. A los fines del control de la calidad del proceso productivo, interesó el desarrollo de un método analítico para la cuantificación del contenido de AF en la preparación terminada. Por consiguiente, este trabajo presenta el desempeño analítico de una aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la cuantificación del AF presente en la tableta del antianémico CombiFer®.

MATERIAL Y MÉTODO

Método analítico: Se empleó una aplicación CLAR para la cuantificación del AF en las tabletas de CombiFer®. La aplicación CLAR ha sido referida en la Farmacopea Británica.⁵

Condiciones de trabajo del sistema cromatográfico: Se utilizó un sistema CLAR modelo AKTA Basic (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos), con un detector UV-visible modelo P900. Para los análisis se utilizó una columna de fase reversa C18 (TOSOH, Japón), de longitud 30 cm y con un tamaño de partícula de 3.5 µm. En todos los casos se aplicaron 100 µL de la muestra de ensayo.

Se utilizó como fase móvil una solución de NaClO₄ 9.4 gL⁻¹ + KH₂PO₄ 0.75 g.L⁻¹ a pH 7.2. Las corridas se realizaron a un flujo de 1 mL.minuto⁻¹ y una temperatura de 30°C. Los eluatos se detectaron a una longitud de onda de 277 nm.

Los cromatogramas se integraron mediante el programa de cómputo Unicorn versión 4.0 (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos). En cada instancia se obtuvieron el tiempo de retención y el área del pico del eluato.

Preparación de las muestras de tabletas para ensayo: Se emplearon tres lotes industriales de tabletas de CombiFer® (números 3001, 3002 y 3003), fabricados por

los Laboratorios MedSol (La Habana, Cuba) bajo condiciones de Buenas Prácticas de Producción.

Se seleccionaron 20 tabletas al azar de cada lote, y se pesaron para determinar el peso promedio de las mismas en el lote muestreado que se utilizó en los análisis. Obtenidos estos resultados, se trituraron 10 tabletas; y se pesó por triplicado una cantidad de polvo de tabletas equivalente al peso promedio de una de ellas.

Para obtener la fracción de la tableta donde se encontraba el AF se realizaron tres ciclos de solubilización-precipitación por gravedad-resolubilización, adicionando en cada vuelta del ciclo 7.5 mL de agua destilada. El primer ciclo se realizó durante 5 min en cada paso. En el segundo ciclo, la solubilización se dejó transcurrir durante 2 minutos, mientras que la precipitación fue de 1 minuto. La duración de ambas operaciones en el tercer ciclo fue de 1 minuto. Finalmente, se obtuvo en el fondo del recipiente una fracción sólida que incluía el AF y, además, el FF.

El precipitado resultante (contentivo AF + FF) se disolvió en 8 mL de la solución de extracción (NaClO_4 7.5 g.L^{-1} + K_2HPO_4 0.6 g.L^{-1} + Metanol 135 mL) durante 3 minutos a pH 7.2 con ayuda de ultrasonido, con ciclos de 1 minuto que alternaron con descansos de 30 segundos. Durante este procedimiento, la muestra se colocó en baño de hielo. Finalmente, la muestra se enrasó a 10 mL con la misma solución de extracción.

Preparación de la muestra de referencia de AF: Se utilizó AF con un grado de pureza $\geq 99\%$ (Sigma, Estados Unidos) para preparar la muestra de referencia. Se pesaron 0.0024 g del sólido, para a continuación adicionarle 8 mL de una solución que contenía KH_2PO_4 (5.7 g.L^{-1}) y Metanol (135 mL). El AF se disolvió durante 5 minutos. La solución de referencia resultante se enrasó en un matraz de un solo trazo a 10 mL. Posteriormente se preparó

una dilución 1/10 de esta solución de referencia.

Preparación de la muestra de la referencia de FF: Para preparar la muestra de referencia de FF, se pesaron 50 mg del producto con un grado de pureza $\geq 99\%$ (Applichem, Alemania). El sólido pesado se disolvió durante 5 minutos con un agitador magnético en aproximadamente 8 mL de la solución de extracción antes descrita. La solución obtenida se enrasó finalmente a 10 mL en un matraz de un solo trazo.

Preparación de la muestra de la referencia de Trofin deshidratado: Se pesaron 300 mg de la formulación de Trofin deshidratado empleada en la producción del CombiFer[®]. A la cantidad así pesada se le adicionó agua destilada para aplicar el mismo procedimiento de separación que se siguió con las muestras de las tabletas. Por lo tanto, en este caso también se realizaron los tres ciclos de solubilización-precipitación en agua destilada-resolubilización utilizando los mismos intervalos de tiempo en cada ciclo. Finalmente, al recipiente se le adicionaron 8 mL de la solución de extracción, se permitió que el sólido se disolviera completamente durante otros 5 minutos, y la solución así obtenida se enrasó a 10 mL.

Preparación de la muestra de la referencia de AA: Se pesaron 60 mg de AA, y se procedió a la preparación de la muestra de referencia del mismo modo que en el caso de la muestra de la referencia de Trofin deshidratado.

Las muestras de las formulaciones de Trofin deshidratado y AA se utilizaron para estudiar la interferencia que cada uno de estos componentes podía ejercer en la cuantificación del AF en la tableta, después de que se realizara el proceso de separación por ciclos repetidos de solubilización y precipitación.

Las muestras de las tabletas y de la referencia de AF se protegieron de la incidencia de la luz durante todo el procedimiento experimental.

Todas las muestras se filtraron a través de filtros para jeringuilla con un tamaño de poro de 0.8 μM , antes de su introducción en el sistema cromatográfico.

Tanto las muestras de las tabletas como las de referencias se prepararon por triplicado. Además, de cada réplica se realizaron dos ensayos para obtener finalmente seis resultados en cada caso.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico de los resultados: El sistema de gestión estadística *StatGrafics* (versión 5.0) se empleó en el análisis estadístico. Los tiempos de retención de los picos que se obtuvieron indistintamente en los cromatogramas de las tabletas y de las referencias se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de múltiples rangos. Las diferencias encontradas se denotaron como significativas si fueron menores que el nivel p prefijado de 0.05.

La cantidad de AF en la muestra de las tabletas se calculó mediante la ecuación (1):

$$\text{AF, calculado, mg.tableta}^{-1} = \frac{\text{Área AF}_{\text{tableta}} \times \text{Peso AF}_{\text{referencia}} \times \text{Masa promedio tableta}}{\text{Área AF}_{\text{referencia}} \times \text{Peso muestra tableta}} \quad (1)$$

En la ecuación anterior: $\text{Peso AF}_{\text{referencia}}$: cantidad de AF que se espera encontrar en la tableta (esto es: 0.24 mg). A partir del contenido calculado de AF, se obtuvo el porcentaje de recobrado según la ecuación (2):

$$\text{Recobrado, \%} = \frac{\text{AF}_{\text{calculado}}}{0.24} \times 100 \quad (2)$$

El porcentaje observado de recobrado se comparó con el valor nominal del 100% mediante un test de Student empleando también un nivel p de significación de 0.05.

RESULTADOS

Para determinar si el método cromatográfico evaluado era específico para la cuantificación del AF en la tableta de CombiFer® (que, además, contiene como componentes mayoritarios el Trofin deshidratado, el AA y el FF, en orden decreciente), las muestras de las tabletas del lote 3003 se compararon por separado con las referencias de cada uno de los cuatro componentes de la tableta. La Figura 1 muestra los cromatogramas de las muestras ensayadas. En el panel superior (marcado como A) se muestra el cromatograma de las tabletas CombiFer®, donde se pueden observar tres picos. Por su parte, el panel intermedio (B) muestra el cromatograma de la referencia de AF, en el que se pueden visualizar 4 picos. Por último, el panel inferior (C) exhibe muestra el cromatograma obtenido en el ensayo de la referencia de FF, donde (a semejanza del AF) se observaron

también tres picos.

En los análisis cromatográficos de las referencias de Trofin deshidratado y AA no se obtuvieron respuestas analíticas a la longitud de onda prefijadas. Este resultado permitió descartar la existencia de interferencias en la determinación de AF por estos dos componentes.

Los valores promedio de los tiempos de retención de cada uno de los tres picos observados después del ensayo de las tabletas de CombiFer® y de las referencias de AF y FF se muestran en la Tabla 1.

Figura 1. Cromatogramas de las preparaciones ensayadas mediante la aplicación CLAR empleada en este trabajo. A. Tableta de CombiFer[®]. Número del lote ensayado: 3003. B. Referencia de ácido fólico. C. Referencia de fumarato ferroso.

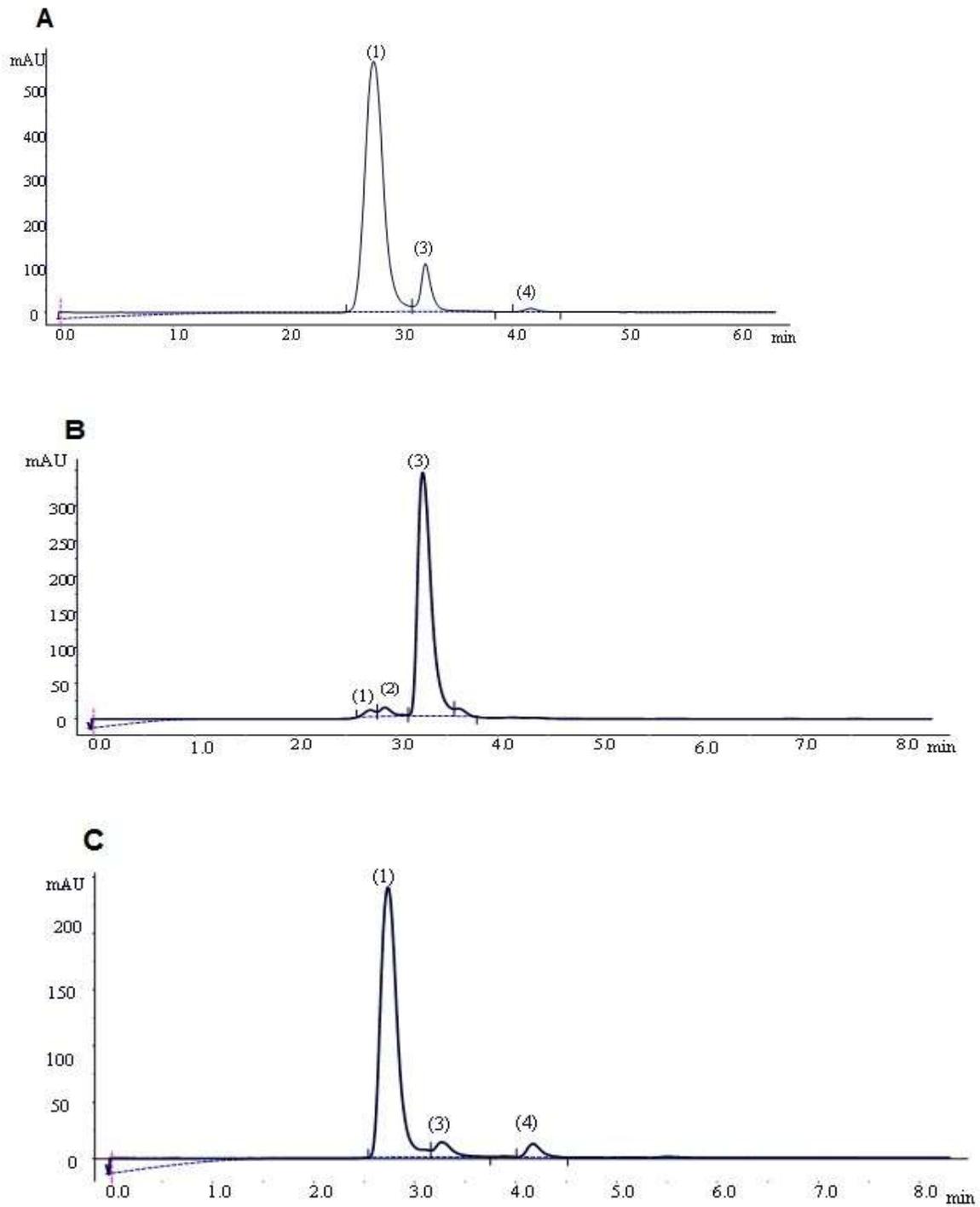


Tabla 1. Valores promedio de los tiempos de retención de las respuestas analíticas obtenidas en los cromatogramas de las tabletas de CombiFer®, y de las referencias de ácido fólico y fumarato ferroso.

Muestra ensayada	Tiempo de retención (minutos)			
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
Tableta	2.75 ± 0.01 ^a	---	3.24 ± 0.02 ^a	4.19 ± 0.01 ^a
Referencia AF	2.73 ± 0.02 ^b	2.87 ± 0.01	3.25 ± 0.02 ^a	---
Referencia FF	2.74 ± 0.01 ^{ab}	---	3.26 ± 0.01 ^a	4.18 ± 0.01 ^a

^{a,b} Diferencias significativas entre los tiempos de retención de los picos para cada una de las muestras ensayadas.

$p < 0.05$

Test estadístico: ANOVA de múltiples rangos.

Para identificar la pertenencia de los picos observados en los cromatogramas de las tabletas, los tiempos de retención de las respuestas analíticas se compararon con los del cromatograma de las referencias de AF y del FF. Entre el cromatograma de las tabletas y el de AF la única coincidencia en cuanto a valores del tiempo de retención se produjo para el pico 3 ($p > 0.05$). De este primer resultado se puede suponer que el pico 3 corresponde a la respuesta analítica del AF incluido en la tableta.

Sin embargo, la referencia de FF también mostró una respuesta analítica en el pico 3 que tampoco mostró diferencias significativas en los tiempos de retención observados para las tabletas respecto de los de la referencia del AF. Estos resultados permitieron afirmar, además, que en la cuantificación del AF existente en la tableta de CombiFer®, la presencia del FF en la fracción insoluble que se obtiene del proceso de separación puede constituirse en una interferencia del método cromatográfico. En tal sentido, el aporte de este componente debe ser considerado durante la cuantificación de la respuesta analítica del AF en la tableta.

En el caso del pico 1, cuya respuesta es mayoritaria en los respectivos cromatogramas de la tableta de CombiFer® y la referencia de FF, se puede afirmar (a partir del análisis estadístico de los tiempos

de retención) que éste se correspondió con el FF, ya que los valores promedio de los tiempos de retención no fueron diferentes entre sí ($p > 0.05$). Por otra parte, en el cromatograma de la referencia de AF se obtuvo una pequeña respuesta analítica en la posición del pico 1, que no mostró diferencias con el tiempo de retención del pico 1 de la referencia de FF, pero sí con el tiempo de retención del pico 1 del cromatograma de la tableta. Sin embargo, por la similitud del comportamiento de los tiempos de retención del pico 1 en los tres cromatogramas, y la mayor dispersión obtenida en el caso de la referencia del AF, se puede suponer que durante el análisis de la referencia de AF se originan productos derivados de este analito que emiten una respuesta que aporta también al tiempo de retención del compuesto mayoritario en el cromatograma de la referencia del FF. Este resultado debe considerarse de interés cuando se requiera cuantificar la respuesta analítica del FF en la tableta de CombiFer® por este método de análisis, ya que, en tal sentido, el AF puede considerarse una interferencia.

Tabla 2. Respuesta analítica de AF en los lotes de tabletas de CombiFer®.

Lote	Masa de la tableta, mg	Área del pico 3, mAU.minuto ⁻¹			Área final del pico 3, tableta mAU.minuto ⁻¹
		Referencia AF	Tableta	Referencia FF	
3001	504.2 ± 0.010		9.88 ± 0.30		7.26 ± 0.28
3002	512.0 ± 0.012	50.94 ± 1.36	14.18 ± 0.11	2.60 ± 0.30	11.57 ± 0.12
3003	495.5 ± 0.011		12.02 ± 0.10		9.42 ± 0.13

En el caso del pico 4 que se observó en el cromatograma de la tableta CombiFer® como respuesta minoritaria, y cuyo tiempo de retención no mostró diferencias significativas con el pico 4 de la referencia de FF, se puede afirmar que corresponde a otra parte de la respuesta analítica del FF. Sin embargo, por la localización de este pico 4 en el cromatograma de la tableta de CombiFer®, se pudo asegurar que no constituyó causa de interferencia con la cuantificación del AF.

La respuesta analítica emitida por el FF puede interferir con el método cromatográfico empleado en la cuantificación del AF en la tableta de CombiFer®. No obstante, como la referencia de FF no muestra una respuesta elevada en el tiempo de retención donde se localizaría el AF, la referencia de FF se puede emplear como control durante la utilización de este método analítico. A partir de los resultados de los cromatogramas para la referencia de FF se podría calcular entonces la diferencia entre las áreas de ambos picos, y finalmente obtener la respuesta analítica que corresponde al AF.

Mediante el procedimiento descrito más arriba se calculó la respuesta analítica del AF en términos del área final del pico que corresponde al analito en los tres lotes industriales de las tabletas ensayadas, tal y como se muestra en la Tabla 2. Entonces, a partir de la relación entre las áreas del AF en la tableta y en la muestra de referencia, se calculó el recobrado del analito. La Tabla 3 muestra estos resultados. El contenido de

AF calculado en los tres lotes de tabletas de CombiFer® fue significativamente menor que el contenido nominal ($p < 0.05$); y equivalente al 20% (aproximadamente) del valor diana de 0.24 mg.

DISCUSIÓN

La cantidad de AF que se cuantificó en los lotes de las tabletas de CombiFer® mediante el método cromatográfico evaluado fue muy baja. Por lo tanto, bajo las condiciones descritas en este trabajo, no es factible que se utilice este método en la cuantificación de AF en la tableta final.

Se pudiera especular que la respuesta analítica del AF está sujeta a interferencias dadas por la presencia de restos de FF, cuya respuesta coincide con el tiempo de retención del AF, pero ello fue desechado por el pequeño valor de la misma. También se conoce que el AF es poco soluble en agua.⁶ Por lo tanto, se descarta que puedan ocurrir pérdidas del analito tan elevadas que hayan sido causadas por la solubilidad en el medio acuoso del ensayo.

Se conoce que la degradación del AF se estimula a valores extremos de pH. Un valor ácido de pH (como de hasta 4.2) estimuló en mayor medida la degradación del AF que cuando el pH fue aumentado hasta 8.4.⁷ Al medir el pH de la suspensión acuosa de la tableta de CombiFer®, bajo las mismas condiciones en que se realizaron los lavados para separar el AF, se encontraron valores de entre 2.0 – 2.5. La elevada acidez del medio debe haber sido aportada por la

presencia concurrente de AA (con 60 mg) y FF (50 mg). Se debe hacer notar que el FF es ligeramente soluble en soluciones ácidas diluidas.⁶ Aunque no se tiene referencia de la estabilidad del ácido fólico a pH por debajo de 4.2, la acidez del medio donde se realiza la extracción pudiera explicar los resultados obtenidos en este trabajo.

Tabla 3. Contenido de ácido fólico en los lotes ensayados de las tabletas de CombiFer®. La cantidad esperada de ácido fólico en cada tableta es de 0.240 mg

Lote	AF, contenido calculado mg/tableta	Recobrado, %
3001	0.034 ± 0.002	14.25 ± 0.88
3002	0.055 ± 0.001	22.85 ± 0.58
3003	0.044 ± 0.001	18.59 ± 0.33

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda estudiar la influencia que tiene el pH de la suspensión acuosa que se utiliza para eliminar los contaminantes hidrosolubles durante la metodología analítica que se desarrolle para la cuantificación del AF en la tableta de CombiFer®. En tal sentido, y a partir de los resultados reportados por Yakubu y Muazu, habría que ajustar el pH por encima de 6.0 para minimizar la oxidación de la molécula en el período de una hora que toma el proceso de descontaminación.⁷ Sin embargo, un pH menos ácido podría estimular también la desnaturalización de las proteínas del Trofin y ocasionar con ello su precipitación, lo que dificultaría entonces la separación de las mismas, y afectaría en última instancia la cuantificación del AF.

CONCLUSIONES

La aplicación CLAR evaluada para la cuantificación del AF presente en la tableta de CombiFer® cuantifica solo una parte del

compuesto de interés. Se supone que las pérdidas del mismo se produzcan durante el proceso de separación de la fracción que contiene el AF, ya que la tableta presenta componentes como el AA y el FF que se solubilizan en agua. La solubilización de estos dos componentes en agua destilada puede estimular la disminución del pH de la suspensión durante el lavado, y bajo estas condiciones, promover la degradación del AF. Esfuerzos ulteriores estarán justificados para sortear este inconveniente, y desarrollar un método analítico efectivo para la cuantificación del AF en la tableta terminada, como parte del sistema de control de la calidad del proceso productivo.

SUMMARY

Rationale: CombiFer® (BioCen, Mayabeque, Cuba) is a nutritional supplement used for the prevention of anemia in pregnant women offered as tablets, and containing dehydrated Trofin (BioCen, Mayabeque, Cuba): 300 mg; Ascorbic acid (AA): 60 mg; Ferrous fumarate (FF): 50 mg; and folic acid (FA): 0.24 mg. It was of interest to have an analytical for quantitating the FA present in the tablet. **Objective:** To assess a high performance liquid chromatography (HPLC) application used for quantitating the FA content of the tablet. **Material and method:** A quantity of CombiFer® powder equivalent to the average weight of a Tablet was weighted, dissolved in distilled water, allowed to precipitate by gravity, and redissolved in distilled water. Three solubilization-precipitation by gravity-resolubilization cycles were completed. The resulting precipitate (containing FA + FF) was dissolved by ultrasound in a NaClO₄ (7.5 g.L⁻¹) + K₂HPO₄ (0.6 g.L⁻¹) + Methanol (135 mL) mix at pH 7.2 during 3 minutes. Samples were assayed with the HPLC application using a C18 reverse-phase column. A NaClO₄ (9.4 g.L⁻¹) + K₂HPO₄ (0.75 g.L⁻¹) mix (pH 7.2) at 1 mL.minute⁻¹ flow rate was used as mobile phase. Eluates were detected at 277 nm. Under the same conditions references samples of FA, FF, dehydrated Trofin and AA were also assayed. **Results:** FF

*interfered in the quantitation of FA, resulting in low FA contents in the three assayed lots: Lot #3001: 0.034 ± 0.002 mg.tablet⁻¹ (Recovery: 14.25%); Lot #2: 0.055 ± 0.001 mg.tablet⁻¹ (22.85%); and Lot #3003: 0.044 ± 0.001 mg.tablet⁻¹ (18.59%). It is believed observed results are caused by the acid pH of the milieu in which FA is separated, thus favoring oxidation of the molecule. **Conclusions:** Under used experimental conditions the assessed HPLC application does not allow the quantitation of FA. **García Hernández Y.** Assessment of a HPLC application used for quantitation of folic acid present in tablets of a nutritional supplement. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2015;25(2):292-300. RNP: 221. ISSN: 1561-2929.*

Subject headings: Anemia / Folic acid / Tablet / CombiFer[®].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sant-Rayn P, Drakesmith H, Black J, Hipgrave D, Berveley-Ann B. Control of iron deficiency anemia in low-and middle-income countries. *Blood* 2013; 121:2607-17.
2. Pita GM, Jiménez S, Basabe B, García RG, Macías C, Selva L; *et al.* Anemia in children under five years old in Eastern Cuba, 2005-2011. *MEDICC Review* 2014;16:16-23.
3. Kassebaum NJ, Jasrasaria R, Lozano R, Eisele TP, Brooker SJ, Naghavi M; *et al.* A systematic analysis of global anemia burden from 1990 to 2010. *Blood* 2014; 123:615-24.
4. Aznar E, González R, González M, Suárez S. Utilización del Trofin, NeoTrofin y sus formulaciones con vitamina C y ácido fólico para disminuir la anemia por deficiencia de hierro. En: Alimentación, nutrición y salud. INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. La Habana: 2002. pp 173-75.
5. British Pharmacopoeia 2013. Folic acid and ferrous fumarate tablets. Volume III. Seven Edition. United Kingdom: 2012. pp 101.
6. Marchante PH, Zumbado A, González M, Alvarez M, Hernández L. Análisis químico farmacéutico. Métodos clásicos cuantitativos. Universidad de la Habana. La Habana: 2008. Pp 297.
7. Yakubu S, Muazu J. Effects of variables on degradation of folic acid. *Der Pharmacia Sinica* 2010;1:55-8.
8. González R, Aznar E, Achong A [Inventores]. Hemoderivado en polvo para la profilaxis y tratamiento de la deficiencia de hierro. OCPI Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. La Habana: 2000. Número de registro: CU 22599 A1.