

Centro Nacional de Biopreparados. Bejucal. Provincia Mayabeque. Cuba

SOBRE LAS MEJORAS DE LA CALIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE SUPLEMENTOS NUTRICIONALES CON HIERRO HEMÍNICO PARA LA PREVENCIÓN DE LA ANEMIA FERROPÉNICA

Yenela García Hernández^{1¶}, Nashelly Esquivel Crespo^{2¶}, Mislén Gómez Matos^{3§}, Eduardo Rodolfo Besada Maribona^{4¶}, Rosa María Simpson Ferrales^{5¶}.

RESUMEN

Introducción: Los suplementos NEOTROFIN®, NEOTROFIN CF®, COMBIFER® y TROFINVITAL® son empleados en la prevención de la anemia en grupos vulnerables. Estos productos contienen un hidrolizado enzimático de sangre bovina (HSD) como materia prima activa. El benzoato de sodio se incluye como sustancia conservadora en el HSD y el TROFINVITAL®. Las nuevas exigencias de los procesos productivos implican la introducción de mejorías analíticas y la (re)definición de las especificaciones de calidad para cada antianémico, el tiempo de duración en estante (léase también estabilidad) entre ellas. **Objetivo:** Evaluar el impacto de las mejorías analíticas introducidas en el proceso de producción sobre la estabilidad predefinida del antianémico. **Locación del estudio:** Centro (BioCen) Nacional de Biopreparados (Bejucal, Mayabeque, Cuba). **Diseño del estudio:** Experimental. **Métodos:** Se introdujeron nuevos métodos analíticos para la determinación del hierro hemínico y las proteínas totales contenidas en el HSD y la forma terminada del antianémico. Se introdujo también un método HPLC para la cuantificación del benzoato de sodio en el HSD y el TROFINVITAL® en suspensión. Se completaron estudios de estabilidad del producto a 3, 6, 9 y 15 meses de acuerdo con las nuevas especificaciones de calidad. **Resultados:** Las nuevas especificaciones de calidad quedaron como sigue: *Hierro hemínico:* HSD: 14.0 %; NEOTROFIN CF®: 19.0 %; COMBIFER®: 18.0 %; TROFINVITAL®: 15.0 %; *Proteínas totales:* HSD: 13.0 %; NEOTROFIN CF®: 14.0 %; COMBIFER®: 17.0 %; TROFINVITAL®: 14.0 %; y *Benzoato de sodio:* HSD: 10.0 %; y TROFINVITAL®: 17.0 %; respectivamente. Las nuevas especificaciones de estabilidad de los productos ensayados fueron las siguientes: *HSD:* Hasta los 9 meses; NEOTROFIN CF®: Hasta los 12 meses; COMBIFER®: Hasta los 12 meses; y TROFINVITAL®: Hasta los 24 meses; respectivamente. **Conclusiones:** Las mejorías analíticas introducidas en los procesos productivos, y los cambios hechos en las especificaciones de calidad de la materia

¹ Doctora en Ciencias. Investigadora Titular. ² Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. ³ Máster en Ciencias. Investigador Agregado. ⁴ Licenciado en Química. ⁵ Licenciada en Química.

¶ Laboratorio de Antianémicos y Nutracéuticos. Centro Nacional de Biopreparados (Biocen). Carretera Beltrán kilómetro 1½. Bejucal. Mayabeque. § Facultad de Química. Universidad de la Habana. La Habana. ¶ Empresa Laboratorio Farmacéutico Roberto Escudero. Avenida 20 de Mayo # 540 esquina a Calle Marta Abreu. Cerro. La Habana.

Recibido: 16 de Agosto del 2022.

Aceptado: 21 de Septiembre del 2022.

Yenela García Hernández. Laboratorio de Antianémicos y Nutracéuticos. Centro Nacional de Biopreparados. Carretera Beltrán kilómetro 11 ½. Bejucal. Provincia Mayabeque. Cuba.

Correo electrónico: yenela@biocen.cu.

prima y el antianémico terminado, fueron aprobados por el Sistema de Gestión de la Calidad de BioCen, e incorporados al registro sanitario de los productos en el Instituto de Hematología, Epidemiología y Microbiología (INHEM) de La Habana (Cuba). **García Hernández Y, Esquivel Crespo N, Gómez Matos M, Besada Maribona ER, Simpson Ferrales RM.** Sobre las mejoras de la calidad de la producción de suplementos nutricionales con hierro hemínico para la prevención de la anemia ferropénica. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2022;32(2):283-297. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Palabras claves: *Hierro / Anemia / Suplementos nutricionales / Control de la calidad.*

INTRODUCCIÓN

La carencia de micronutrientes, la deficiencia de hierro (Fe) entre ellas, es un problema de salud aún no resuelto mundialmente.¹⁻² Según el reporte más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia global de anemia es del 24.8 %, lo cual se corresponde con 1,620 millones de personas en todo el mundo.²⁻³ Las mujeres serían las más afectadas por la anemia. La prevalencia de anemia en las mujeres no embarazadas asciende al 30.2 %, lo que equivale a 468,4 millones de ellas en todo el mundo.⁴ Por otro lado, existen 56,4 millones de embarazadas con anemia, lo que representaría el 41.8 % de esta subpoblación a escala mundial.⁵

La anemia afecta a la tercera parte de la población cubana.⁶ Sin embargo, un estudio publicado en el año 2014 que describió la evolución de la anemia en las embarazadas durante 15 años reportó la disminución de la prevalencia de esta condición desde un 25.1% hasta un 13.9 % ($\Delta = +11.2$ %) durante el primer trimestre de la gestación, y desde un 39.5 % hasta un 21.6 % ($\Delta = +17.9$ %) en el tercer trimestre del embarazo.⁷ A pesar de estos resultados, que reflejarían las intervenciones hechas para la paliación de esta condición, el 18.2 % de las embarazadas inicialmente no anémicas se hicieron anémicas en el tercer trimestre. Si bien predominan las formas leves de la anemia, la extensión de esta condición la coloca como un problema

importante de salud pública en Cuba, y justifican la continuidad y la permanente mejoría de las estrategias que se implementen para el combate y prevención en última instancia del mismo.

El *Codex Alimentarius* define como “Alimentos para Regímenes Especiales” (ARE) aquellos que son elaborados o preparados especialmente para satisfacer necesidades particulares de alimentación que están determinadas por condiciones físicas o fisiológicas particulares y/o enfermedades o trastornos específicos, y que se presentan como tales.⁸ En consecuencia, los suplementos dietéticos son considerados ARE porque aportan fitonutrientes y otros compuestos bioactivos que benefician la salud a partir de mecanismos de acción enteramente fisiológicos.⁹

Las intervenciones nutricionales para la prevención de la anemia por deficiencia de Fe se han enfocado habitualmente en la administración de suplementos contentivos de la especie iónica del mineral en forma de sales ferrosas como serían los casos del sulfato y el fumarato. Sin embargo, estos preparados suelen tener una efectividad limitada, dada en gran medida por la ocurrencia de reacciones gastrointestinales adversas que se presentan entre el 30 – 50 % de los pacientes, y provocan por consiguiente la baja adherencia a la suplementación.¹⁰ Las reacciones gastrointestinales adversas observadas después de la administración de suplementos de Fe se deben fundamentalmente a la baja

biodisponibilidad del mineral en estos preparados (de entre el 1 – 5 %), lo que obliga a emplear cantidades mayores en la formulación para lograr el incremento deseado en las concentraciones plasmáticas del mineral.

En Cuba se ha demostrado la utilidad de la sangre animal como materia prima para el desarrollo de suplementos nutricionales orientados a la prevención de la anemia.¹¹⁻¹² En este sentido, se pueden mencionar los suplementos nutricionales desarrollados en los últimos 20 años por el Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) de Bejucal (Mayabeque, Cuba) como el TROFINVITAL®, el NEOTROFIN®, el NEOTROFIN CF®, y el COMBIFER®, todos los cuales han demostrado eficacia y seguridad elevadas en la prevención de la anemia en las embarazadas.¹³⁻¹⁴ Los resultados obtenidos con la aplicación de estos productos se explicarían por la mayor biodisponibilidad del Fe hemínico que es aportado por la hemoglobina presente en la sangre bovina. Otros grupos poblacionales, como los adultos de ambos sexos, los ancianos,¹⁵ y los niños¹⁶ también tienen requerimientos nutricionales de Fe que pueden ser satisfechos con los suplementos nutricionales antes mencionados.

El aseguramiento continuo de la inocuidad de los suplementos antianémicos y el acceso previsto (y provisto) a nuevos (y más exigentes) mercados han justificado la conducción de ejercicios de mejoría de la calidad de la producción de los mismos. En el momento actual, no se tiene un método analítico para la determinación con fines de control de calidad del benzoato de sodio: la sustancia conservadora que se emplea en las formulaciones antianémicas. El benzoato de sodio es un aditivo cuyas concentraciones en alimentos (y por extensión los suplementos nutricionales) están regulados en todo el mundo, y ello incluye también a Cuba.¹⁷ En el caso de las formas sólidas el nivel máximo permitido del benzoato de sodio es del

0.2 %, mientras que para las formas líquidas de los preparados se acepta la presencia de hasta el 1 % de concentración del aditivo.¹⁷

En segundo lugar, todavía se emplea un método potenciométrico Redox en la cuantificación del Fe como parte de los ejercicios de control de la calidad en las distintas etapas del proceso de producción de los antianémicos. La potencimetría Redox es un método clásico de análisis químico cuantitativo,¹⁸ y fue muy empleada en el pasado siglo XX por su bajo costo. Sin embargo, el completamiento del análisis en duplicado de un solo lote de producción del suplemento antianémico requiere entre 2 – 3 horas debido a la inestabilidad de las lecturas instrumentales, lo que entorpece el flujo de trabajo del Laboratorio de Control de Calidad del centro. Ante estas insuficiencias, se ha propuesto la implementación de sendos métodos espectrofotométricos UV/VIS para la cuantificación del Fe basado el primero en la transformación del grupo *hemo* contenido en la hemoglobina en hematina en un medio alcalino, o la extracción de grupo *hemo* con acetona en un medio ácido para obtener la hemina el segundo.¹⁹⁻²¹

En tercer (y último) lugar, no se tiene un método de cuantificación de las proteínas totales que componen el antianémico. En el momento actual, solo está incorporado el contenido de nitrógeno amínico como requisito de calidad del producto TROFINVITAL®, pero este indicador refleja los grupos aminos libres. El contenido de proteínas totales del producto debe completar la información requerida sobre la composición química del hidrolizado de proteínas que se utiliza como materia prima. En consecuencia, se ha propuesto el método de Kjeldhal para la cuantificación de las proteínas totales contenidas en los antianémicos que se producen en el centro. Se ha de decir que el método de Kjeldhal devuelve la concentración de proteínas totales en la muestra problema después de aplicar un

factor de conversión al contenido determinado de nitrógeno total.²² El método de Kjeldhal es fiable y se emplea en muchos lugares como método de referencia.²³⁻²⁴

Una vez introducidas, las mejoras analíticas traerían consigo una mayor durabilidad de las formulaciones finales. Asimismo, la introducción de las mejoras analíticas expuestas más arriba conllevarían al establecimiento de nuevos requisitos de calidad para la producción de los suplementos antianémicos. En consecuencia, se ha realizado el presente trabajo que ha tenido como objetivo evaluar los nuevos requisitos de calidad de la producción de los suplementos nutricionales desarrollados por BioCen tras la introducción de las mejoras analíticas, y estimar la estabilidad de los nuevos requisitos durante la durabilidad (léase también tiempo de garantía) de los productos.

MATERIAL Y MÉTODO

Diseño del estudio: Experimental.

Locación del estudio: Laboratorio de Antianémicos y Nutracéuticos del Centro Nacional de Biopreparados (BioCen) de Bejucal (Provincia Mayabeque, Cuba).

Presentación de la petición de un proceso de cambios e incorporación de nuevos requisitos de calidad: Se solicitó la apertura de un proceso de cambios e incorporación de nuevos requisitos de calidad en la producción de los antianémicos teniendo en cuenta las exigencias del sistema de gestión de calidad (SGC) del BioCen y la norma ISO 9000:2015: el estándar empleado en la certificación del SGC. La solicitud incluyó la incorporación de nuevos requisitos de calidad para el hidrolizado de sangre deshidratado (HSD): la materia prima con el que se elaboran las tabletas de 2 formas terminadas, y el producto TROFINVITAL® que se comercializa en forma líquida.

Los cambios en, y la incorporación de, los nuevos requisitos de calidad se hicieron tras la introducción de nuevos métodos analíticos o la sustitución de los existentes por otros operacionalmente superiores, a saber: un método HPLC para la determinación del benzoato de sodio en la materia prima y la forma líquida del antianémico, un método UV-VIS para la determinación del Fe hemínico en la materia prima y la forma líquida, un método de determinación del Fe hemínico en las formas sólidas (léase también tabletas) del antianémico, y un método de determinación de las proteínas totales en la materia prima y las diferentes formas terminadas (tabletas | suspensión) de los antianémicos.

La petición del proceso de cambios e incorporación de nuevos requisitos de calidad se realizó teniendo en cuenta la metodología propuesta en la Regulación 33/2003 “Cambios al proceso de producción de productos biológicos registrados” por el Centro para el Control estatal de Medicamentos (CECMED);²⁵ e incluyó el informe de solicitud de cambio contentivo a su vez de un análisis de riesgo y el cronograma de tareas.

Cuantificación de hierro hemínico según el método de la hematina alcalina: Se aplicó la metodología descrita por Gómez *et al.* (2020).²⁶ La molécula de hemo que aporta la hemoglobina de la sangre bovina es solubilizada en una solución de Tritón X-100 al 2.5 % y NaOH 0.1 M. La hemoglobina se transforma químicamente en hematina en presencia de cantidades excesivas de iones OH⁻. La cantidad de hematina presente en la muestra problema se estima a continuación tras comparación con la absorbancia a 575 nm de una solución de concentración conocida de hematina porcina que se preparó bajo las mismas condiciones que la muestra problema. Finalmente, la concentración de Fe unido a la molécula de hematina se calcula teniendo en cuenta la relación entre los pesos moleculares de la hematina y el Fe

que tiene enlazado. El método de la hematina alcalina fue aplicado en la determinación del Fe hemínico en el HSD y el producto en suspensión TROFINVITAL®.

Cuantificación de hierro hemínico por el método de la acetona acidificada: El método analítico se desarrolló a partir del trabajo de Hornsey (1956).²⁷ La molécula de hemo que aporta la hemoglobina de la sangre bovina es extraída en forma de hemina hacia una solución de acetona en medio ácido y estabilizada con cisteína. El proceso de extracción ocurre durante 30 minutos en la oscuridad y es favorecido por ciclos sucesivos de agitación vigorosa. La molécula de interés es colectada en el sobrenadante resultante de la centrifugación de la muestra una vez concluido el proceso de extracción. La hemina presente en la muestra problema se cuantifica a continuación por comparación con la lectura a 640 nm de una solución de concentración conocida de hemina bovina que se preparó bajo las mismas condiciones de la muestra problema. Finalmente, la concentración del Fe enlazado a la molécula de hemina se calcula teniendo en cuenta la relación entre los pesos moleculares de la hemina y el átomo de Fe que tiene enlazada. El método de la acetona acidificada fue aplicado en la determinación del hierro hemínico contenido en las tabletas de NEOTROFIN CF® y COMBIFER®.

Cuantificación de proteínas totales según el método de Kjeldhal: El método analítico se desarrolló a partir de la descripción hecha por Marchante *et al.* (2008).²⁸ Las proteínas presentes en la muestra problema se digieren bajo condiciones controladas, y la concentración del nitrógeno liberado y destilado se obtiene a continuación mediante valoración con HCl.

El HSD y las tabletas fueron preparadas al 10 % (m/v) como paso previo a la determinación. Por el contrario, la muestra de TROFINVITAL® se ensayó sin

diluir. En cada caso, se adicionó en el tubo digestor 0.5 g de la muestra y una pastilla catalizadora. A continuación, se adicionaron 12 mL de ácido sulfúrico concentrado, y se inició la digestión de la muestra a una temperatura de 410°C. La digestión de la muestra transcurre hasta que la coloración de la muestra adquiere el color del catalizador. Las determinaciones se hicieron en triplicado.

Tras la digestión, y una vez que las muestras regresaron a temperatura ambiente, se procedió a la destilación de las mismas con ácido bórico al 4 %. Finalmente, la muestra destilada se valoró con una solución de HCl 0.1 N hasta la aparición de un color pardo. Los mililitros consumidos de HCl se emplearon para calcular el contenido de nitrógeno total en la muestra problema. Finalmente, el valor determinado de nitrógeno total se multiplicó por 6.25 para obtener la cantidad promedio de proteínas totales en la muestra problema. El contenido final de proteínas totales se ajustó en porcentaje para la suspensión líquida, y en miligramos para el caso de las tabletas.

Cuantificación del benzoato de sodio por HPLC: El método analítico se desarrolló de acuerdo con Pylypiw y Grether (2000).²⁹ Se empleó como fase móvil una solución de acetato de amonio 0.2 M, pH 4.2, y que contenía acetonitrilo al 20 % (v/v). El benzoato de sodio (Merck, Alemania) empleado como solución de referencia se disolvió en el volumen apropiado de fase móvil para obtener las concentraciones deseadas. En el día del ensayo se aplicaron 20 µL de la muestra problema y la solución de referencia a una columna C₁₈ de fase reversa a razón de 1.0 mL.minuto⁻¹ y a una temperatura de 30°C. El benzoato de sodio eluido se detectó a 225 nm, y la concentración en el eluato se determinó del cociente entre las lecturas de la muestra respecto de la solución de referencia. Se aseguró siempre que la diferencia entre el tiempo de retención del benzoato de sodio en

la muestra ensayada no fuera mayor de 0.5 segundos del propio de la solución de referencia.

Diseño de los estudios de estabilidad:

Los estudios de estabilidad se diseñaron según la metodología propuesta en la regulación 23/2000 “Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos”.³⁰ Como parte de la ejecución del cronograma de tareas del proceso de cambios e incorporación de nuevos requisitos de control de calidad se produjeron 3 lotes de HSD, y de las tabletas NEOTROFIN CF® y COMBIFER®. Los lotes producidos fueron empleados tanto en la evaluación de los nuevos requisitos de calidad propuestos, como para la realización de estudios de estabilidad para determinar el periodo de validez (durabilidad) de los suplementos nutricionales producidos de acuerdo con los nuevos requisitos.

Los contenidos de Fe hemínico y de proteínas totales en los productos seleccionados (materia prima | productos terminados) se evaluaron trimestralmente. El contenido de benzoato de sodio fue evaluado a los 6 y 9 meses en el HSD, y a los 3 y 15 meses en el TROFINVITAL®.

A la conclusión de las tareas previstas en el cronograma, se presentó el informe correspondiente ante los SGC para revisión y aprobación. Una vez aprobado el informe, se procedió a la implementación de los cambios en los requisitos de calidad mediante la modificación de la documentación técnica pertinente, y donde se incluyeron los procedimientos normalizados de operación (PNO) propios de los nuevos métodos analíticos, la modificación de las especificaciones de calidad de la materia prima y los productos terminados, y los cambios en las especificaciones de los materiales de envase secundario como las etiquetas de los frascos.

Procesamiento de datos y análisis estadístico-matemático de los resultados:

Los resultados de los experimentos completados se ingresaron en un contenedor digital construido sobre EXCEL para OFFICE de WINDOWS (Microsoft, Redmon, Virginia, Estados Unidos). Los datos se redujeron hasta estadígrafos de locación (media) y dispersión (desviación estándar), según el tipo de la variable.

Se emplearon métodos de regresión lineal para estimar la tendencia de degradación del producto, de acuerdo con el límite inferior de aceptación establecido para el requisito de calidad en cuestión. Mediante este análisis se puede estimar el periodo de estabilidad de los productos almacenados en las condiciones de vida en estante durante un tiempo no mayor al doble del real ejecutado. Por otro lado, las proyecciones estimadas del periodo de estabilidad no deberán exceder los 12 meses.³¹ El *software* GraphPad (Estados Unidos) versión 5.0 se empleó en el análisis estadístico-matemático de los resultados.

Establecimiento de los límites de aceptación de las determinaciones analíticas:

La introducción de nuevos procedimientos analíticos conlleva la definición y establecimiento de los correspondientes límites de aceptación con fines de control de calidad. Los límites de aceptación para los requisitos de calidad de los contenidos de Fe hemínico y proteínas totales en los productos terminados se establecieron según la regulación ICH-Q6B para productos biológicos,³² que es el caso de los que se analizan en este trabajo. De acuerdo con la regulación, los límites de aceptación se establecen a partir del desempeño del producto fabricado durante la conducción de los estudios de la estabilidad.

Tabla 1. Indicadores físico-químicos del hidrolizado de sangre deshidratado empleado como materia prima en la elaboración de los antianémicos. Los indicadores fueron determinados de acuerdo con los nuevos requisitos de calidad después de la introducción de las mejoras analíticas. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la hematina alcalina.

Indicador	Límites de aceptación	Lote de producción		
		Op02E	Op03E	Op05E-A
Contenido de hierro hemínico, mg/g	1.24 ± 0.18 [1.06 – 1.42]	1.25	1.24	1.15
Contenido de proteínas totales, %	48.0 ± 6.0 [42.0 – 54.0]	50.0	49.0	47.0
Contenido de benzoato de sodio, %	≤ 0.33	0.30	0.24	0.04

Fuente: Registros del estudio.

Los límites de aceptación del HSD empleado como materia prima y los productos terminados se establecieron de la concentración promedio del analito correspondiente (acompañada de la desviación estándar) después del ensayo de entre 3 – 6 lotes industriales producidos a título de prueba piloto. En el caso del benzoato de sodio, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica,³³ según la cual se acepta que el contenido del preservativo varíe hasta en un ± 20% de la cantidad agregada en la formulación.

RESULTADOS

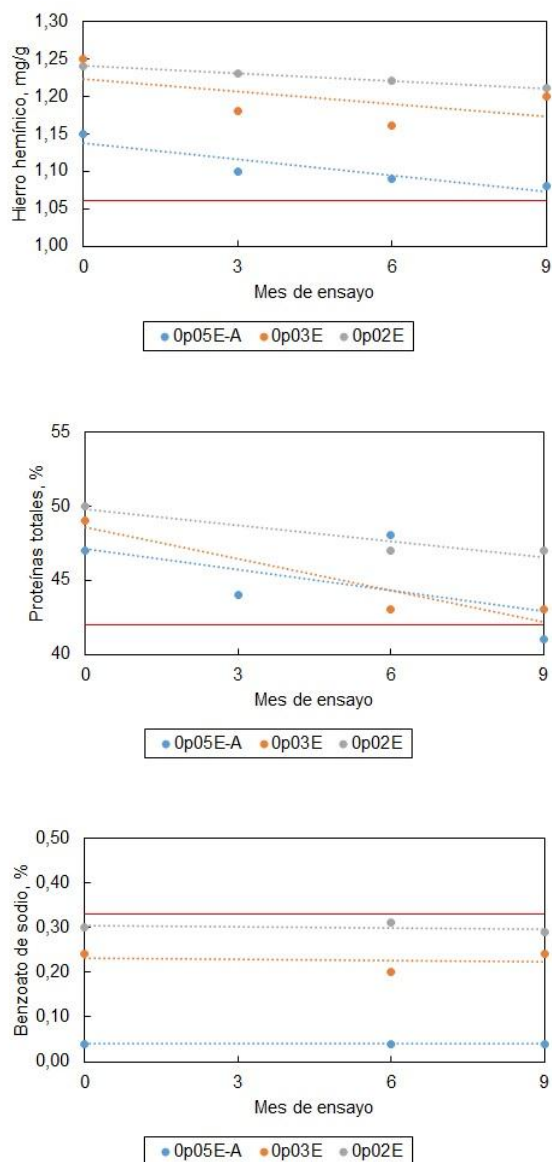
La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos de los indicadores físico-químicos propuestos para el HSD después de la introducción de las mejoras analíticas. Los tres lotes del HSD producidos a escala industrial cumplieron con los límites de aceptación para los nuevos requisitos de calidad establecidos en las especificaciones de calidad del producto. Por su parte, la Figura 1 presenta las proyecciones de la estabilidad del HSD para un tiempo de duración > 9 meses. El HSD es solo estable hasta los 9 meses de producido en condiciones de vida en estante, dado que los

contenidos de Fe hemínico del lote Op05E-A y de proteínas totales del lote Op03E determinados a los 9 meses fueron cercanos al límite inferior de las (nuevas) especificaciones de calidad del producto. Por el contrario, el contenido de benzoato de sodio se mantuvo estable en el HSD incluso más allá de los 9 meses de observación.

La Tabla 2 muestra los resultados de los indicadores físico-químicos determinados en el producto NEOTROFIN CF® terminado como tableta. Los tres lotes producidos de la tableta satisficieron los límites de aceptación establecidos para los nuevos requisitos de calidad. La Figura 2 presenta las proyecciones de estabilidad del producto más allá de los 6 meses. De acuerdo con estos resultados, el producto podría ser estable hasta los 12 meses de producido. En consecuencia, se ha decidido la continuación del ejercicio de estabilidad hasta que se completen los 24 meses de vida de estante.

La Tabla 3 muestra los resultados de los indicadores físico-químicos determinados en las tabletas de COMBIFER®. Los lotes producidos satisficieron los límites de aceptación establecidos de acuerdo con los nuevos requisitos de calidad tras la introducción de las mejoras analíticas.

Figura 1. Estabilidad proyectada del hidrolizado de sangre deshidratado empleado como materia prima en la elaboración de los antianémicos. Se emplearon técnicas de regresión lineal para estimar la estabilidad del hidrolizado en cada momento de observación. El producto se mantuvo a temperaturas de entre 15 – 25°C y protegido de la luz durante la duración del estudio. *Panel superior:* Hierro ferroso. *Panel central:* Proteínas totales. *Panel inferior:* Benzoato de sodio. Para más detalles: Consulte el texto del presente artículo.



Fuente: Registros del estudio.

Mientras, la Figura 3 presenta las proyecciones de estabilidad de las tabletas de COMBIFER® más allá de los 6 meses de producido. De acuerdo con los resultados, el producto sería estable a los 12 meses de vida en estante. A partir de estos resultados, el estudio continúa en ejecución hasta completar los 24 meses de vida de estante.

Por último, la Tabla 4 muestra el estado de los indicadores físico-químicos determinados en la suspensión de TROFINVITAL®. Los 3 lotes producidos cumplieron los límites de aceptación establecidos según los nuevos requisitos de calidad. Por su parte, la Figura 4 presenta las proyecciones de estabilidad del TROFINVITAL® más allá de los 15 meses de producido en base a los valores determinados de los indicadores físico-químicos. Las proyecciones obtenidas sugieren que el producto será estable después de los 24 meses de vida en estante. A semejanza de lo visto con el HSD, el contenido de benzoato de sodio fue el más estable en el tiempo estudiado.

DISCUSIÓN

Este trabajo ha presentado los resultados del proceso de mejoría de la calidad de la producción de antianémicos en el BioCen después de la introducción de nuevos procedimientos analíticos, el establecimiento de los correspondientes límites de aceptación, y la conducción de estudios de estabilidad para definir el tiempo de vida en estante. Los procedimientos analíticos introducidos en el proceso de producción de los antianémicos llenaron espacios vacíos en la marcha analítica y el control de la calidad de los mismos, y con ello, han contribuido a satisfacer las exigencias siempre ascendentes de los clientes y las agencias reguladoras.

Tabla 2. Indicadores físico-químicos de la tableta de NEOTROFIN CF® determinados mediante las mejoras analíticas introducidas en la producción del antianémico. Se presentan, además, los nuevos requisitos de calidad del producto. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la acetona acidificada.

Requisitos de calidad	Límites de aceptación	Lote		
		2101	2102	2103
Hierro hemínico, mg/tableta	0.43 ± 0.08 [0.35 – 0.50]	0.42	0.43	0.40
Contenido de proteínas totales, mg/tableta	185.0 ± 25 [160.0 – 210.0]	170.0	176.0	184.0

Fuente: Registros del estudio.

Los nuevos límites de aceptación establecidos han permitido un control superior de la calidad de los procesos de producción del antianémico, a la vez que construyen una (necesaria) trazabilidad hacia estándares y recomendaciones recogidas en la literatura especializada internacional. Los estudios de estabilidad completados han servido para caracterizar mejor el tiempo de vida en estante de tanto el antianémico como de la materia prima empleada, más aún cuando se avizora la posibilidad de que la exportación de la misma se convierta en otro rubro de ingresos para la institución. En consecuencia con los resultados expuestos, los nuevos requisitos de calidad fueron actualizados en los registros sanitarios de los productos NEOTROFIN CF®, COMBIFER® y TROFINVITAL® en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM) como parte del proceso de renovación que transcurrió entre el periodo de noviembre del 2020 a julio del 2021. En el caso del HSD se solicitó, y fue otorgado por el INHEM, un nuevo registro sanitario para esta materia prima para satisfacer las necesidades de documentación en caso de la entrega a clientes que estén interesados en la comercialización de productos como éstos.

La conveniencia de la modificación hecha en los límites de aceptación de los procedimientos analíticos fue plenamente

justificada cuando el método potenciométrico Redox de determinación del Fe hemínico fue sustituido por otros espectrofotométricos UV/VIS, y se comprobó que sobreestimaba el contenido verdadero de Fe hemínico en los productos terminados. Se ha de decir que se obtuvieron evidencias adicionales del agotamiento operacional del método potenciométrico Redox tras comparaciones hechas con un método de referencia internacional basado en la espectroscopía de absorción atómica (datos inéditos). Los límites de aceptación delimitan una región del espacio analítico donde con (casi) toda seguridad se encontrarán los valores esperados del analito.³⁴⁻³⁵ Muchas veces los límites de aceptación adoptan la forma $\mu \pm k \cdot \sigma$ donde μ corresponde al valor esperado del analito, mientras σ es la desviación estándar de la imprecisión analítica incurrida en la determinación. No obstante, se destaca que los límites de aceptación presentados en este trabajo no se muestran acompañados de la incertidumbre tipo A (como sería el caso expuesto antes) debido a que, en la práctica cotidiana de los laboratorios de control de calidad donde se ensayan las muestras problema, solo se analiza una muestra de cada lote, y no se hacen réplicas de la determinación.

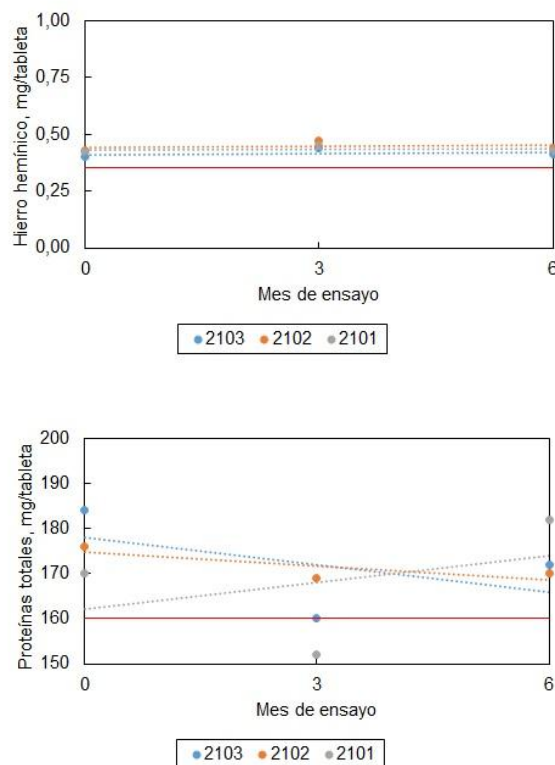
La metodología expuesta de trabajo del laboratorio de control de calidad se justifica por el volumen de trabajo que asume este tipo de laboratorio, y la inmediatez del resultado que se ha de entregar al proceso productivo a los fines de inspección y “liberación” de la producción terminada, y de esta manera, hacer expedito el proceso de entrega y despacho a los distribuidores y clientes. Por tales razones, los límites de aceptación se presentaron como $\mu \pm \%$ para definir un porcentaje aceptable de variación de la cantidad estimada respecto del valor verdadero.

En el caso del HSD, se definió un límite de aceptación superior teniendo en cuenta una variación permisible de hasta el 10 % del contenido del preservativo en la formulación. Para el producto TROFINVITAL[®], se establecieron límites de variación de hasta el 17 % del contenido formulado en ambas direcciones. En ambos casos, los límites establecidos de aceptación concordaron con los referidos en la bibliografía especializada, donde se recoge una variación permisible de hasta el 20 %.³³

Respecto de los requisitos de calidad del contenido de Fe hemínico y proteínas totales en el HSD que se emplea como materia prima, los límites de aceptación establecidos constituyeron el 14 y el 13 % respectivamente del valor estimado en las muestras ensayadas. En el caso de las tabletas de NEOTROFIN CF[®], tales límites se fijaron en un 19 y un 14 %, respectivamente. Para el COMBIFER[®] (el otro producto terminado en forma de tabletas), los límites quedaron en el 18 y el 17 %. En el caso de la formulación líquida TROFINVITAL[®], los límites de aceptación establecidos para el contenido de Fe hemínico y proteínas totales constituyeron el 15 y el 14 % de variación, respectivamente. Las diferencias observadas *de-producto-a-producto* se deben, mayormente, a las variaciones intrínsecas de la forma farmacéutica, y en las que las formas sólidas

exhiben los mayores porcentajes de variación, justificadas (en parte) por la mayor complejidad durante el procesamiento de las muestras y la fabricación de las tabletas.³⁶

Figura 2. Proyecciones de la estabilidad de la tableta de NEOTROFIN CF[®]. Se emplearon técnicas de regresión lineal para estimar la estabilidad del producto en cada momento de observación. El producto se mantuvo a temperaturas de entre 15 – 25°C y protegido de la luz durante la duración del estudio. *Panel superior:* Hierro hemínico. *Panel inferior:* Proteínas totales. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la acetona acidificada. Para más detalles: Consulte el texto del presente artículo.



Fuente: Registros del estudio.

Tabla 3. Indicadores físico-químicos de la tableta de COMBIFER® determinados mediante las mejoras analíticas hechas. Se presentan, además, los nuevos requisitos de calidad del producto. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la acetona acidificada.

Indicador	Límites de aceptación	Lote producido		
		2101	2102	2103
Hierro hemínico, mg/tableta	0.34 ± 0.06 [0.28 – 0.40]	0.38	0.40	0.31
Contenido de proteínas totales, mg/tableta	145.0 ± 25.0 [120.0 – 170.0]	134.0	134.0	134.0

Fuente: Registros del estudio.

CONCLUSIONES

La introducción de mejoras analíticas ha hecho posible la robustez de los procesos de producción de antianémicos, a la vez que demostró la factibilidad de la aplicación de nuevos requisitos en el control de la calidad de los productos NEOTROFIN CF®, COMBIFER® y TROFINVITAL®; así como del HSD empleado como materia prima. Además, quedó demostrada la estabilidad en el periodo propuesto en el correspondiente registro sanitario de los suplementos NEOTROFIN CF®, COMBIFER® y TROFINVITAL®, y la materia prima HSD una vez aplicados los nuevos requisitos de calidad.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Los autores participaron a partes iguales en el diseño y ejecución de la presente investigación; la recolección y el procesamiento estadístico-matemático de los datos, el análisis de los resultados, y la redacción del presente artículo.

SUMMARY

Rationale: NEOTROFIN®, NEOTROFIN CF®, COMBIFER® and TROFINVITAL® supplements are used in the prevention of anemia in vulnerable groups. These products contain an enzymatic hydrolysate of bovine blood (HBB) as

active raw material. Sodium benzoate is introduced as preserving substance in HBB and TROFINVITAL®. New demands of the productive processes imply the introduction of analytical improvements and the (re)definition of the quality specifications for each antianemic, among them the shelf-life time (also read as stability). **Objective:** To assess the impact of analytical improvements introduced in the production process upon the predefined stability of the antianemic. **Study location:** Centro (BioCen) Nacional de Biopreparados (Bejucal, Mayabeque, Cuba). **Study design:** Experimental. **Methods:** New analytical methods for determining hem iron and total proteins in HBB and the finished form of the antianemic were introduced. A HPLC method for quantifying sodium benzoate in HBB and TROFINVITAL® as suspension was also introduced. Studies of stability of the product were completed at 3, 6, 9 and 15 months in accordance with the new quality specifications. **Results:** New quality specifications were as follows: Hem iron: HBB: 14.0 %; NEOTROFIN CF®: 19.0 %; COMBIFER®: 18.0 %; TROFINVITAL®: 15.0 %; Total proteins: HSD: 13.0 %; NEOTROFIN CF®: 14.0 %; COMBIFER®: 17.0 %; TROFINVITAL®: 14.0 %; and Sodium benzoate: HBB: 10.0 %; and TROFINVITAL®: 17.0 %; respectively. New stability specifications of the assayed products were the following: HBB: Up until 9 months; NEOTROFIN CF®: Up until 12 months; COMBIFER®: Up until 12 months; and TROFINVITAL®: Up until 24 months; respectively. **Conclusions:** Analytical improvements introduced in the productive processes, and changes made in the quality

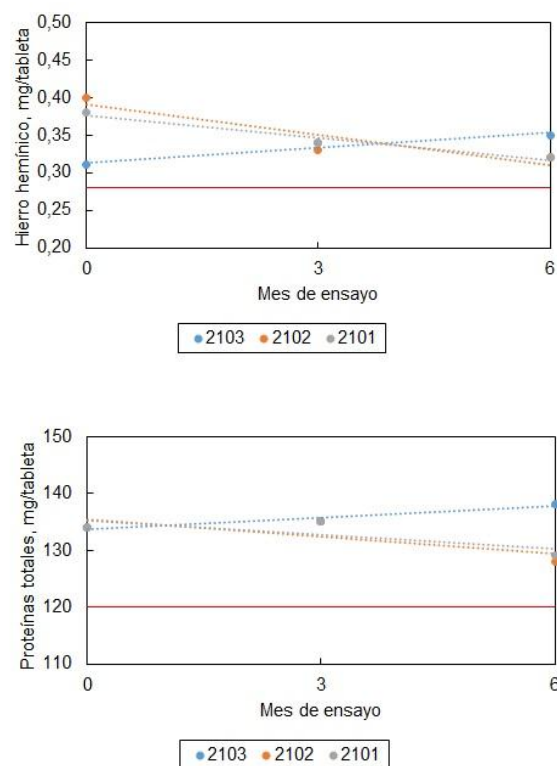
specifications of the raw material and the finished antianemic, were approved by the BioCen's Quality Management System, and incorporated within the sanitary registry of the products at the Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM), Havana city (Cuba). **García Hernández Y, Esquivel Crespo N, Gómez Matos M, Besada Maribona ER, Simpson Ferrales RM.** On the quality improvements of the production of nutritional supplements with hem iron for preventing iron-deficiency anemia. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2022;32(2):282-296. RNPS: 2221. ISSN: 1561-2929.

Subject headings: Iron / Anemia / Nutritional supplements / Quality control.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stevens GA, Beal T, Mbuya MNN, Luo H, Neufeld LM; for the Global Micronutrient Deficiencies Research Group. Micronutrient deficiencies among preschool-aged children and women of reproductive age worldwide: A pooled analysis of individual-level data from population-representative surveys. *The Lancet Global Health* 2022;10(11):e1590-e1599. Disponible en: [https://doi:10.1016/S2214-109X\(22\)00367-9](https://doi:10.1016/S2214-109X(22)00367-9). Fecha de última visita: 16 de Marzo del 2022.
2. Bathla S, Arora S. Prevalence and approaches to manage iron deficiency anemia (IDA). *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022;62:8815-28.
3. Gedfie S, Getawa S, Melku M. Prevalence and associated factors of iron deficiency and iron deficiency anemia among under-5 children: A systematic review and meta-Analysis. *Glob Pediatr Health* 2022;9:2333794X221110860. Disponible en: <https://doi:10.1177/2333794X221110860>. Fecha de última visita: 16 de Marzo del 2022.

Figura 3. Proyecciones de la estabilidad de la tableta de COMBIFER®. Se emplearon técnicas de regresión lineal para estimar la estabilidad del producto en cada momento de observación. El producto se mantuvo a temperaturas de entre 15 – 25°C y protegido de la luz durante la duración del estudio. *Panel superior:* Hierro hemínico. *Panel inferior:* Proteínas totales. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la acetona acidificada. Para más detalles: Consulte el texto del presente artículo.



Fuente: Registros del estudio.

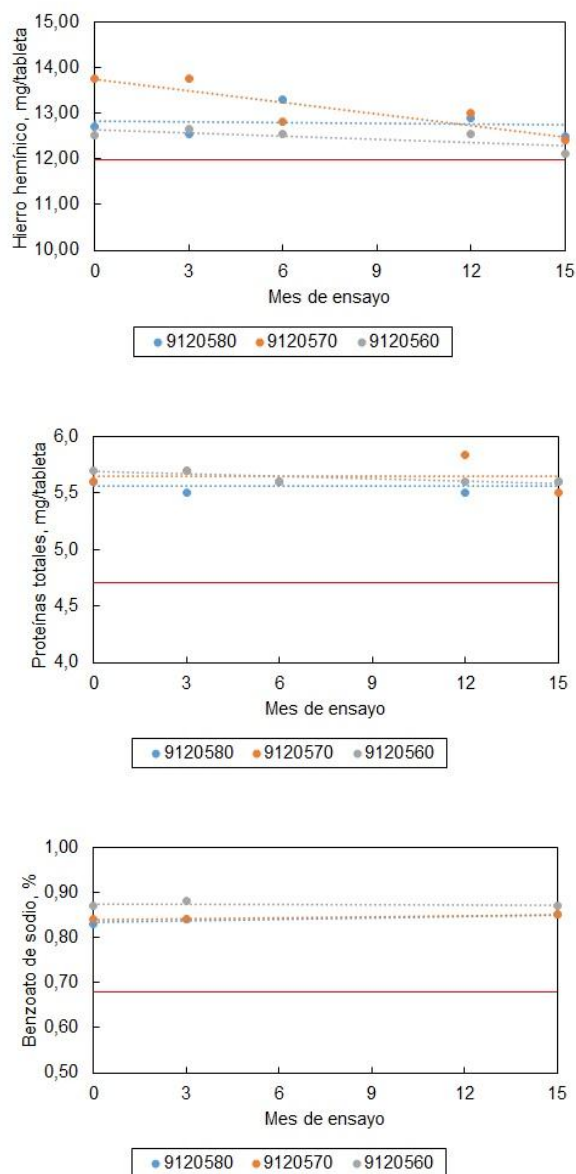
Tabla 4. Indicadores físico-químicos de la suspensión de TROFINVITAL® determinados con las mejoras analíticas introducidas. Se presentan, además, los nuevos requisitos de calidad del producto. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la hematina alcalina.

Indicador	Límites de aceptación	Lote producido		
		9120560	9120570	9120580
Contenido de hierro hemínico, mg/100 mL	14.11 ± 2.12 [11.99 – 16.23]	12.52	13.76	12.70
Contenido de proteínas totales, %	5.5 ± 0.8 [4.7 – 6.3]	5.7	5.6	5.6
Contenido de benzoato de sodio, %	0.82 ± 0.14 [0.68 – 0.96]	0.87	0.84	0.84

Fuente: Registros del estudio.

- Hasan MM, Soares Magalhaes RJ, Garnett SP, Fatima Y, Tariqujjaman M, Pervin S, Ahmed S, Mamun AA. Anaemia in women of reproductive age in low- and middle-income countries: Progress towards the 2025 global nutrition target. *Bull World Health Organ* 2022;100(3):196-204. Disponible en: <https://doi:10.2471/BLT.20.280180>. Fecha de última visita: 16 de Marzo del 2022.
- Karami M, Chaleshgar M, Salari N, Akbari H, Mohammadi M. Global prevalence of anemia in pregnant women: A comprehensive systematic Review and meta-Analysis. *Maternal Child Health J* 2022;26:1473-87.
- Gomez-Alvarez A, Pita-Rodríguez G, Garcia-Pino C, Mollineda-Trujillo A, Bacallao-Gallestey J, Cardella-Rosales L, Valdes-Collazo L. Zinc deficiency and anemia in women of reproductive age, Cuba. *Biomed Sci* 2022;8:63-7.
- Jiménez-Acosta SM, Rodríguez-Suárez A, Pita-Rodríguez G. Prevalencia de anemia durante el embarazo en Cuba. Evolución en 15 años. *Rev Esp Nutr Comunit* 2014;20:42-7.
- Codex Alimentarius. Norma general para el etiquetado y declaración de propiedades de alimentos preenvasados para regímenes especiales. CODEX STAN, 146-1985. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: 1985.
- Registro sanitario de alimentos, cosméticos, juguetes y otros productos de interés sanitario: Regulaciones e indicadores. Ministerio de Salud Pública. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana: 2017.
- Kumar SB, Arnipalli SR, Mehta P, Carrau S, Ziouzenkova O. Iron deficiency anemia: Efficacy and limitations of nutritional and comprehensive mitigation strategies. *Nutrients* 2022;14(14):2976. Disponible en: <https://doi:10.3390/nu14142976>. Fecha de última visita: 16 de Marzo del 2022.
- Gautier du Défaix Gómez H, Forrellat Barrios M, Fernández Delgado N, Gómis Hernández I, Aznar García E, González Hernández R, Almaguer Almaguer J. Evaluación del Trofín en el tratamiento de la anemia ferripriva en niños. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000;16:190-7.

Figura 4. Proyecciones de la estabilidad de la suspensión de TROFINVITAL®. Se emplearon técnicas de regresión lineal para estimar la estabilidad del producto en cada momento de observación. El producto se mantuvo a temperaturas de entre 15 – 25°C y protegido de la luz durante la duración del estudio. *Panel superior:* Hierro hemínico. *Panel central:* Proteínas totales. *Panel inferior:* Benzoato de sodio. El contenido de hierro hemínico se determinó mediante el método de la hematina alcalina. Para más detalles: Consulte el texto del presente artículo.



Fuente: Registros del estudio.

12. González R, Aznar E, González M, Hernández JC, Varela A, Silva P, García Y. Nueva línea de productos para prevenir y tratar la anemia partiendo del hierro hemínico. *Informacéutico* 2008; 15:43-8.
13. de los Ríos AM, Sandoval A, Domínguez A, González R, Aznar E, Reyes-Esparza J, Rodríguez-Fragoso L. Evaluación toxicológica comparativa de dos productos farmacéuticos a base de hierro. *Rev Biomédica* 2006;17:183-94.
14. Silva Leal N, Fernández Massó JR, Aznar García E, Ramos FG. Sobre la efectividad de una preparación orgánica de hierro en el tratamiento de la anemia durante el embarazo. *RCAN Rev Cubana Aliment Nutr* 2019;29:17-29.
15. Aznar E, González R, Carrasco M, Leyva B, Muñoz B. Aplicación del Trofín en Geriátria. *Rev Mejicana Ciencias Farmacéuticas* 1997;28:20-3.
16. Aznar E, González R, Moroño M, González M. Tratamiento antianémico hierro-proteína (Trofín) para uso pediátrico. *Rev Mejicana Ciencias Farmacéuticas* 1997;29:18-21.
17. Chávez RAM, Rangel JJV. Aditivos alimentarios: Aspectos de regulación y seguridad. *Milenaria Ciencia Arte* 2019;14:15-6. Disponible en: <http://www.milenaria.umich.mx/ojs/index.php/milenaria/article/view/31>. Fecha: 17 de Marzo del 2022.
18. Bard AJ, Faulkner LF. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. Second Edition. John Wiley. New York: 2001.
19. King EJ. Alkaline haematin method for haemoglobin determination. *Brit Med J* 1947;2(4521):349.
20. Clegg JW, King EJ. Estimation of haemoglobin by the alkaline haematin method. *Brit Med J* 1942;2(4263):329.
21. Kalyan CV, Naveen CD, Santhoshi B, Mastan RTJ, Ranga RD. Haemoglobin

- estimation by non-cyanide method. *J Clin Diag Res* 2012;6:955-8.
22. Kirk PL. Kjeldahl method for total nitrogen. *Anal Chem* 1950;22:354-8.
 23. Sáez-Plaza P, Michałowski T, Navas MJ, Asuero AG, Wybraniec S. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. *Crit Rev Anal Chem* 2013;43:178-223.
 24. Sáez-Plaza P, Navas MJ, Wybraniec S, Michałowski T, Asuero AG. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. *Crit Rev Anal Chem* 2013;43:224-72.
 25. Regulación número 33-2003. Cambios al proceso de producción de productos biológicos registrados. comparación de productos biológicos. Centro Estatal de Control de los Medicamentos. La Habana: 2003.
 26. Gómez Matos M, García Hernández Y, Echagarrúa Rodríguez A, Pérez Pérez L, Cabrera González AL. Desarrollo de un nuevo método analítico para cuantificar hemo en la formulación ANT-00. *Rev Ciencias Farmacéuticas Alimentarias* 2023;6(1):0-0. Disponible en: <https://revistas.uh.cu/rcfa/article/view/3405>. Fecha de última visita: 22 de Marzo del 2022.
 27. Hornsey HC. The colour of cooked cured pork. I.- Estimation of the nitric oxide-haem pigments. *J Sci Food Agric* 1956;7:534-40.
 28. Marchante P, Zumbado H, González A, Alvarez M, Hernández L. Análisis químico farmacéutico. Métodos clásicos cuantitativos. Editorial de la Universidad de la Habana. La Habana: 2008.
 29. Pylypiw HM, Grether MT. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *J Chromatography A* 2000;883:299-304.
 30. Regulación número 23-2000. Requerimientos de los estudios de estabilidad para el registro de productos farmacéuticos nuevos y conocidos. Centro Estatal de Control de los Medicamentos. La Habana: 2000.
 31. ICH Harmonised Tripartite. Guideline Q1E. Evaluation for stability data. En: International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Geneva: 2003. pp. 1-19.
 32. Rudge SR, Nims RW. ICH Q6B specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. *ICH Quality Guidelines: An implementation Guide*. Geneva: 2017. Pp. 467-486.
 33. United States Pharmacopeial Convention. Agentes antimicrobianos-contenido. Washington DC: 2017. Pp. 344-345.
 34. Chen KS, Hsu CH, Chiou KC. Product quality evaluation by confidence intervals of process yield index. *Sci Rep* 2022;12(1):10508. Disponible en: <https://doi:10.1038/s41598-022-14595-y>. Fecha de última visita: 22 de Marzo del 2022.
 35. Haleem RM, Salem MY, Fatahallah FA, Abdelfattah LE. Quality in the pharmaceutical industry- A literature review. *Saudi Pharmaceutic J* 2015; 463-9.
 36. Prakash G, Chandra SA, Sandhya P, Bidur C, Samir D. Pharmacopoeial comparison of in-process and finished product quality control test for pharmaceutical tablets. *GSC Biol Pharm Sci* 2020;11:155-65.