

Especiales

- » **Estudio bibliométrico de la producción científica publicada por la Revista Ars Pharmaceutica en el periodo 2001 a 2013.**

Javier Sanz-Valero J, Tomás-Gorriz V, Morales Suárez-Varela MM.

Revisiones

- » **Estudio comparado (Europa versus Estados Unidos) sobre el concepto de medicamento genérico**

Montpart Costa E, Martín Barea MP.

Originales

- » **Validación de un método cromatográfico aplicable al control de calidad y estudio de estabilidad del pool de aceite hígado de tiburón microencapsulado**

García Caridad M, Fernández M, Castiñeira M, Martínez V, López Orestes D, Nogueira A.

- » **Design, Development and In vitro Characterization of Pioglitazone Loaded Mucoadhesive Buccal Devices**

Malik RK, Malik P, Gulati N, Nagaich U.

- » **Perfil de consumo de anticonceptivos orales en la ciudad de Córdoba, Argentina.**

Real JP, De Santis M, Correa Salde V, Arce J, Paraje G, Palma SD.

Nota metodológica

- » **Validez de los cuestionarios utilizados en ciencias de la salud.**

García-Corpas JP, Pareja-Martínez E, Esquivel-Prados E.

Cartas al director

- » **Pirfenidona, el último aliento (FPI)**

López-Viota Gallardo M, Megías Iglesias R, Ruiz Martínez MA, Arias Mediano LJ.

Validación de un método cromatográfico aplicable al control de calidad y estudio de estabilidad del pool de aceite hígado de tiburón microencapsulado

Margarita García Caridad¹, Mirna Fernández², Mirta Castiñeira², Vivian Martínez¹, Darío López Orestes¹, Antonio Nogueira¹

1. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

2. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL)

Original Paper Artículo Original

Correspondence/Correspondencia:

DraC. Mirna Fernández Cervera
Dpto. Tecnología y Control de los Medicamentos
Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL).
Universidad de la Habana
Calle 23 No. 21425 e/ 214 y 222, La Habana.
Cuba. Teléfonos: 271-4075, 271-9534
Email: mirnafc@ifal.uh.cu; mirnafc@yahoo.com

Competing interest / Conflicto de intereses:

Authors declared that there was no conflict of interest associated with this research work.

Fundings / Financiación:

The authors declare that they haven't received funding.

Received: 03.01.2014

Accepted: 14.02.2014

RESUMEN

Objetivo: Se validó un método cromatográfico para la determinación del contenido de vitamina A en el *pool* de aceite microencapsulado de hígado de tiburón.

Material y Método: Los parámetros evaluados se correspondieron con lo establecido internacionalmente para técnicas cuantitativas como: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, robustez y límites de detección y cuantificación. El método se basó en la separación de la vitamina A, a través de una columna cromatográfica Lichrosorb RP – 18, a una longitud de onda de 325 nm, empleando una fase móvil compuesta por metanol: agua, en proporción 90:10, y la cuantificación de la misma frente a una muestra de referencia empleando el método del estándar externo.

Resultados: Se demostró que el procedimiento desarrollado, fue lo suficientemente lineal, con un límite de detección de 2 µg/mL y 6 µg/mL como límite de cuantificación, específico, preciso, exacto y robusto para la determinación del contenido de vitamina A en el *pool* de aceite microencapsulado.

Conclusiones: La determinación del contenido de vitamina A en el *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado, a través de un método por cromatografía líquida de alta resolución, resultó específico, lineal, preciso, exacto y robusto, aplicable al control de calidad y estudio de estabilidad.

PALABRAS CLAVE: Aceite de hígado de pescado, Cromatografía líquida, Estudio de validación, microencapsulación, Vitamina A.

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to validate, in accordance with international standards, a chromatographic method to determine the vitamin A in the *pool* of shark liver oil microencapsulated.

Materials and Methods: The valued parameters belonged together with what settles down internationally for technical quantitative, among those that we can mention: specificity, lineality, accuracy, precision, robustness and detection and quantification limits. The method based on the separation from the vitamin A to inclination a chromatographic column Lichrosorb RP - 18 to a wavelength of 325 nm, using a mobile phase composed by methanol: water, of proportion 90:10, and the quantification of the same ones in front of referee samples using the method of the external standard.

Results: It was demonstrated that the developed procedure, was the sufficiently lineal thing, with a detection limit of 2 µg/mL and 6 µg/mL like quantification limit, specific, precise, exact and robust for the determination of the vitamin A content in the *pool* of microencapsulated oil, for what can be an employee in the quality control and stability study.

Conclusions: The determination of the vitamin A content in the microencapsulated *pool* of shark liver oil, through a method for high resolution liquid chromatography, was specific, lineal, precise, exact and robust, for quality control and stability study.

KEY WORDS: Chromatography, High pressure liquid, Microencapsulation, Validation studies, Vitamin A.

INTRODUCCIÓN

El aceite de hígado de tiburón constituye una importante fuente natural de vitaminas, principalmente vitamina A, además de otras vitaminas del complejo B. Este aceite posee múltiples beneficios, entre los que se destacan: fortalece el sistema inmune, ayuda contra la fiebre, sinusitis y alergia; alivia el dolor de la artritis; ayuda a mantener saludable la piel y beneficia a pacientes con soriasis y otras enfermedades dermatológicas; trabaja contra los efectos indeseables de las radiaciones; tiene grandes propiedades anticancerígenas y antioxidantes; reduce el colesterol; protege al organismo contra sustancias tóxicas; ayuda a lograr una recuperación completa en pacientes asmáticos; fortalece contra los resfriados y la gripe; proporciona energía a pacientes que padecen del síndrome de fatiga crónica; por lo que se ha empleado en la producción de suplementos alimenticios¹.

Estudios previos han demostrado la presencia de las vitaminas A, D y E, en el *pool* de aceite de tiburones costeros de Cuba, resultando la vitamina A el componente mayoritario luego de realizar el análisis de la misma por técnicas cromatográficas validadas para estos fines²⁻³. Para la obtención del *pool* de aceite se han empleado diferentes especies de tiburones, aledañas a las costas cubanas, específicamente del litoral norte occidental, ya que resulta muy difícil la captura de tiburones de una misma especie.

Con el objetivo de lograr una mayor estabilidad de las vitaminas presentes en el aceite de hígado de tiburón, se realizó la microencapsulación del aceite, empleando goma arábica y maltodextrina como agentes encapsulantes, a través del método de secado por atomización.

La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un proceso de fabricación o método de análisis es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos⁴⁻⁶.

Al validar un procedimiento se logra un alto grado de confianza y seguridad del proceso productivo o del método analítico, así como también en la calidad de los resultados, además permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento, disminuyendo el número de fallas y repeticiones con el consiguiente ahorro de los costos asociados.

El presente estudio tiene como objetivo validar una técnica cromatográfica desarrollada para determinar el contenido de vitamina A, en el control de la calidad y estudio de estabilidad del *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos y reactivos

Pool de aceite de hígado de tiburón suministrado por el Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP, Cuba) y *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado obtenido a través de un proceso de secado por aspersión en el Grupo de Materias Primas del CIDEM (Cuba). La sustancia de referencia química de acetato de vitamina A fue suministrada por el Grupo de Sustancias de referencias del CIDEM, Cuba. El resto de los reactivos y soluciones fueron de calidad analítica (Merck, Alemania).

Técnica cromatográfica empleada

Las muestras del *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado, y el patrón de referencia del acetato de vitamina A, fueron procesadas según la metodología que se describe a continuación²⁻³:

La preparación de la sustancia de referencia se realizó pesando con exactitud 15,1 mg de patrón de vitamina A acetato, los que se trasvasaron a un frasco volumétrico de 25 mL, disolviéndose en 10 ml de solución de hidróxido de potasio metanólico (KOH met) 0,5 N. La disolución resultante se colocó en baño de maría a 60°C por espacio de 15 minutos, transcurrido este tiempo, se colocó en un baño ultrasónico y se enrasó con solución de hidróxido de potasio metanólico.

Se pesó una cantidad de aceite microencapsulado equivalente a 1 g de aceite de hígado de tiburón, se le adicionaron 35 mL de etanol absoluto, 10 mL de KOH al 50% y 25 mg de hidroquinona (Merck, Alemania), los que se calentaron a reflujo 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 40 mL de agua destilada y 50 mL de una mezcla de éter dietílico - n hexano (1:1), extrayendo durante 5 minutos permaneciendo en reposo hasta la separación de fases. A la fase acuosa se le realizaron cinco extracciones, tomándose únicamente la fase orgánica, lavando cuatro veces con 50 mL de agua acidulada. Posteriormente se adicionaron 2 g de Na₂SO₄ anhidro (Merck, Alemania), concentrando a sequedad en un rotoevaporador Buchi 461 RE 101 (Suiza). Se redisolvió en 25 mL de solución de KOH Met 0,5 N, inyectándose 20 µL.

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron: columna: Lichrosorb RP-18 (5 µm) 250 - 4 mm (Merck, Alemania), fase móvil: metanol - agua (90:10) v/v y velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La longitud de onda empleada fue 325 nm. El procedimiento fue realizado en un cromatógrafo líquido de alta resolución (Merck); integrador Shimadzu modelo CRD 8AV; detector UV (longitud de onda variable) KANUER; bomba KANUER

K-1001; INTERFACE BOX KANUER.

Validación del método

La validación fue realizada según la categoría I (USP-35) y la Regulación 41-2007 (CECMED), evaluándose los parámetros siguientes^{4,6}:

Linealidad

La linealidad se realizó a través del modelo de tres determinaciones para cinco concentraciones diferentes de la sustancia de referencia química: 60, 80, 100, 120 y 140 %. Se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, la prueba de significación estadística de la pendiente S_b rel (%), el coeficiente de variación de los factores de respuesta y el ensayo de proporcionalidad.

Exactitud

El estudio de exactitud se realizó empleando el modelo de tres réplicas para tres concentraciones diferentes: 80, 100 y 120 %, determinando el porcentaje de recuperación, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV). Además se aplicó la prueba de Gochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producía diferencias significativas en los resultados, y la prueba de t de Student para determinar diferencias significativas entre la recuperación media y el 100%.

Robustez

La robustez del método desarrollado se evaluó realizando variaciones en algunas condiciones del proceso: proporción de la fase móvil, columna cromatográfica, proveedores de los reactivos, así como flujo determinando si existían diferencias significativas al ser comparadas con las condiciones del método propuesto.

Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados utilizando la expresión: $k \times S.D/b$, donde $k = 3$ para el LOD y 10 para el LOQ, siendo S.D: la desviación estándar del intercepto (o blanco) y b la pendiente de la curva de calibración.

Para ello se realizaron determinaciones a tres concentraciones inferiores a la curva de linealidad, realizando la estimación de la respuesta del blanco y el intercepto de la curva equivalente a la desviación estándar del blanco.

Precisión

- Repetibilidad

Para la repetibilidad se evaluaron seis muestras con la

concentración equivalente al 100 %. Se calculó el CV y se comparó con el criterio establecido ($\leq 1,5$ %). Las determinaciones las realizó el mismo analista en las mismas condiciones de trabajo.

- Precisión intermedia

Participaron dos analistas, en dos días diferentes, en el mismo laboratorio. Se analizaron seis réplicas en cada caso de muestras equivalentes al 100 %. La prueba de Fisher se utilizó para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados de los analistas que emplearon el mismo método y entre los días en que se realizaron los análisis.

La prueba t de Student se utilizó para comprobar si los valores medios obtenidos entre los analistas, que emplearon igual método, y los dos días en que se realizaron los análisis, eran homogéneos, para un nivel de confianza del 95 %.

Especificidad

Para el estudio de especificidad se analizaron: la sustancia de referencia de vitamina A, el placebo, muestras de aceite microencapsulado y muestras sometidas a condiciones drásticas tales como: hidrólisis ácida HCl 1 N, hidrólisis básica NaOH 1 N, luz solar y temperatura de 40° C, por un periodo de tres días. No deben obtenerse señales del placebo y de los posibles productos de degradación en la zona de elusión del principio activo a cuantificar. Las áreas bajo las curvas del patrón y del principio activo a cuantificar, en el producto terminado deben ser similares.

RESULTADOS

Los resultados experimentales del estudio de linealidad se muestran en la Tabla 1, mientras que los porcentos de recobro obtenidos en el estudio de exactitud aparecen en la Tabla 2.

El valor del LOD fue 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el del LOQ de 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos valores fueron comprobados experimentalmente obteniendo buenos resultados.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del estudio de robustez, y los de la repetibilidad y precisión intermedia en la Tabla 4.

Se demostró que el método fue selectivo para la vitamina A, bajo las diferentes condiciones en que se realizó el estudio de especificidad del método (Figura 1).

DISCUSIÓN

A través del procesamiento estadístico realizado se demostró el cumplimiento de los parámetros para la

linealidad del método. Los valores de los coeficientes de regresión y de determinación resultaron superiores a los exigidos 0,99 y 0,98 respectivamente, demostrándose con los valores obtenidos, cercanos a la unidad, la existencia de correlación con una probabilidad elevada, así como el grado de relación entre las variables de concentración y respuesta detectada por el equipo empleado. El coeficiente de variación del factor de respuesta y la desviación estándar relativa de la pendiente fueron inferiores a lo establecido para estos indicadores: 5 y 2 %, respectivamente. Ambos son considerados estimadores puntuales que permiten caracterizar la variabilidad. El coeficiente de variación de los factores de respuesta, permite demostrar que existe variabilidad en la relación respuesta y concentración para cada nivel evaluado. El intervalo de confianza del intercepto incluye al cero, por lo que se excluye la significación del error del intercepto. Los resultados obtenidos demuestran la linealidad del método propuesto⁴⁻⁶.

Los porcentos de recobro obtenidos en el estudio de exactitud estuvieron dentro de los límites establecidos para los métodos cromatográficos (98-102 %), así como los valores del coeficiente de variación para cada uno de los niveles de concentración estudiados (≤ 2 %). Al aplicar la prueba de Cochran se obtuvo que la G calculada fue menor que la G tabulada para un 95 % de confianza, por lo tanto, las varianzas de las concentraciones estudiadas fueron equivalentes indicando que la concentración no influyó en la variabilidad de estos resultados.

Los resultados del estudio de robustez demostraron que no existe efecto significativo sobre los valores promedios del contenido de vitamina A ante los cambios estudiados, al no existir diferencias significativas entre los valores promedios del contenido de vitamina A obtenidos, con respecto al método propuesto, siendo los valores de t-Student para cada una de las variables inferiores al valor de t tabulado (2,20), para un 95 % de confianza. Sin embargo, si se observaron variaciones en los tiempos de retención de la vitamina A al emplear diferentes columnas, variaciones de fase móvil y diferentes velocidades de flujo. Estas variaciones fueron similares para la sustancia de referencia química y la muestra analizada, obteniéndose tiempos de retención similares para ambas, sin observar alteraciones en los registros de las señales obtenidas. Cuando se empleó metanol, proveniente de diferentes proveedores, no se detectaron variaciones en los tiempos de retención. Todos estos resultados demuestran que el método analítico desarrollado puede considerarse robusto.

En el estudio de la repetibilidad realizado a una misma muestra, por el mismo analista, el mismo día, se alcanzó un coeficiente de variación inferior al límite establecido

Tabla 1. Linealidad del método

| Parámetros | Resultados | Límites |
|--|-----------------------------|----------------------------------|
| Ecuación de la recta | $Y = 1,25X + 124,51$ | $Y = bx+a$ |
| Coefficiente de regresión lineal | $r = 0,999$ | $r \geq 0,990$ |
| Coefficiente de determinación | $r^2 = 0,998$ | $r^2 \geq 0,980$ |
| Significación estadística de la varianza de la pendiente (b) | | |
| Desviación estándar relativa de la pendiente | $Sb \text{ rel}(\%) = 1,56$ | $Sb \text{ rel}(\%) \leq 2,0 \%$ |
| Coeficiente de variación de los factores de respuesta | | |
| Coefficiente de variación del factor de respuesta | $C.V_f = 2,71 \%$ | $C. v_f \leq 5,0 \%$ |

Tabla 2. Exactitud del método

| Niveles | Recuperación (%) | Resultados | Límites |
|---------|------------------|--|--|
| 80% | 100,02 | R media = 99,97 % CV80 % = 0,19 % CV100 % = 0,03 % CV1200 % = 0,08 % t calc. = 1,58 t tab. = 2,30 | 98,0 - 102,0 % t exp. \leq t tab. |
| | 99,82 | | |
| | 100,20 | | |
| 100% | 100,02 | | |
| | 99,95 | | |
| | 99,97 | | |
| 120% | 99,87 | G calc. = 0,613 G tab. = 0,797 | G exp. \leq G tab. |
| | 99,89 | | |
| | 100,05 | | |

Tabla 4. Precisión del método

| Contenido de Vitamina A ($\mu\text{g/g}$) | | | |
|---|--------|---------------------------|---|
| Analista 1 | | Analista 2 | |
| Día 1 | Día 2 | Día 1 | Día 2 |
| 254,32 | 252,89 | 253,57 | 252,87 |
| 255,46 | 253,54 | 252,89 | 253,64 |
| 253,89 | 253,89 | 252,96 | 253,87 |
| 254,13 | 254,02 | 253,87 | 254,03 |
| 253,74 | 253,68 | 253,97 | 254,11 |
| 254,23 | 253,65 | 253,46 | 253,76 |
| Coeficientes de variación | | Coeficientes de variación | |
| 0,14 % | 0,06 % | 0,08 % | 0,08 % |
| Analistas | | Días | Valores tabulados |
| F = 1,82 t = 0,47 | | F = 2,76 t = 1,14 | F tabulado (5/5; 0,05) = 5,05 t tabulado (11; 0,05) = 2,20 |

1,5 %. Los valores obtenidos de las pruebas de Fisher y t de Student, en la evaluación de la precisión intermedia, fueron también satisfactorios demostrando que no existen diferencias significativas entre las dispersiones, ni las medias alcanzadas por los analistas, en diferentes días. Además, se obtuvo un CV total acorde con el criterio de aceptación: $CV_T \leq 3,0 \%$, de manera que errores aleatorios no repercutieron significativamente en el método desarrollado. El conjunto de estos resultados permite asegurar la precisión del método en estudio⁴⁻⁶.

Tabla 3: Influencia de las variaciones en algunas condiciones del método desarrollado.

| Variable | Condición | Vitamina A (µg/g) | | | | | | t calc |
|-------------------------|------------------------|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Metanol:agua (v/v) | 98:2 | 254,32 | 255,46 | 253,89 | 254,13 | 253,74 | 254,23 | |
| | 95:5 | 253,94 | 253,83 | 254,23 | 254,11 | 253,37 | 254,23 | 1,71 |
| | 90:10* | 254,39 | 254,84 | 253,99 | 253,61 | 253,86 | 254,06 | 0,79 |
| Columna (RP-18) (5 µm) | Lichrosorb* 250 - 4 mm | 254,32 | 255,46 | 253,89 | 254,13 | 253,74 | 254,23 | |
| | Lichrospher 125 - 4 mm | 253,65 | 253,16 | 253,07 | 253,67 | 254,82 | 254,61 | 1,69 |
| | Lichrosorb 125 - 4 mm | 254,89 | 252,96 | 253,87 | 254,23 | 254,11 | 253,67 | 1,33 |
| Proveedor de metanol | Merck, Alemania* | 254,32 | 255,46 | 253,89 | 254,13 | 253,74 | 254,23 | |
| | Panreac, España | 254,12 | 253,54 | 253,78 | 254,06 | 253,34 | 253,76 | 2,19 |
| Flujo (mL/min) | 1,5 | 254,32 | 255,46 | 253,89 | 254,13 | 253,74 | 254,23 | |
| | 1,0* | 253,87 | 253,84 | 254,25 | 254,03 | 253,99 | 253,21 | 2,02 |
| t tab (11; 0,05) = 2,20 | | | | | | | | |

*condiciones del método desarrollado

Figura 1. Resultados del estudio de especificidad del método.

A- Cromatograma del placebo.

B- Cromatograma de la sustancia de referencia química de Vitamina A.

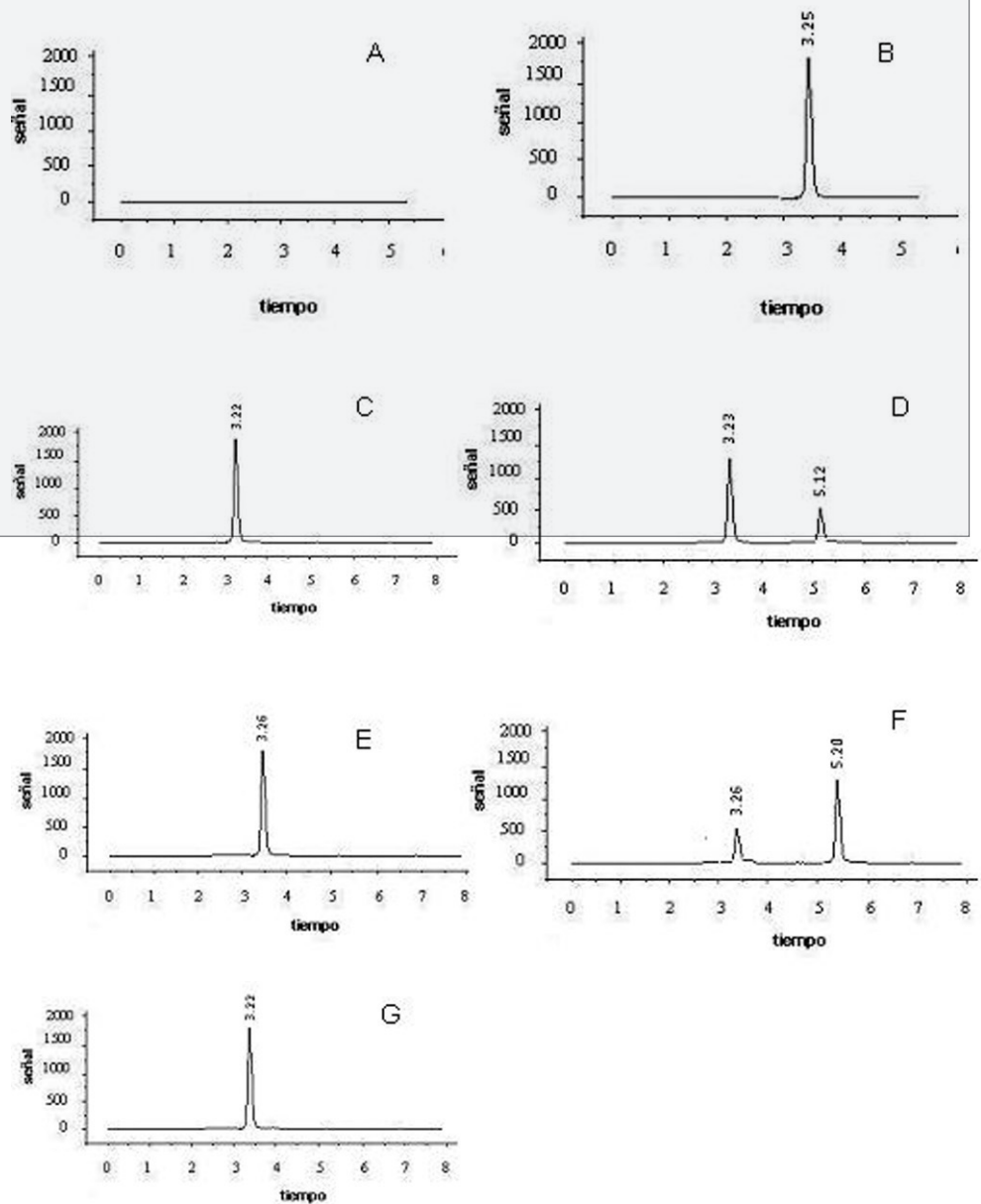
C- Cromatograma de la muestra de pool de aceite de hígado de tiburón microencapsulado.

D- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis ácida.

E- Cromatograma de la muestra sometida a hidrólisis básica.

F- Cromatograma de la muestra sometida a la luz solar.

G- Cromatograma de la muestra sometida a temperatura.



Como se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo (A), no hay ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la obtenida para la sustancia de referencia química (B) y la muestra del aceite microencapsulado (C), indicando que los excipientes no interfieren en la determinación de la vitamina.

En cuanto a las muestras sometidas a condiciones drásticas de hidrólisis básica, ácida, luz solar y temperatura (D, E, F, G) respectivamente, evidencian degradación por la disminución de la altura de los picos del principio activo, con la aparición de picos secundarios en las muestras sometidas a hidrólisis ácida y luz. Estos resultados se corresponden con lo reportado en la literatura como medios drásticos que favorecen la degradación de la vitamina A⁷⁻⁹.

Se comprobó la especificidad del método al no existir interferencias de picos adicionales en la determinación del principio activo, no se evidenciaron interferencias de los excipientes, ni de los productos de degradación^{4,6}.

El cumplimiento de las exigencias internacionales para la validación de técnicas analíticas garantiza que el método cromatográfico desarrollado, sea específico, lineal, con un límite de detección de 2 µg/mL y 6 µg/mL como límite de cuantificación, específico, preciso, robusto y exacto para la determinación del contenido de vitamina A en el *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado.

CONCLUSIÓN

La determinación del contenido de vitamina A en el *pool* de aceite de hígado de tiburón microencapsulado, a través de un método por cromatografía líquida de alta resolución, resultó específico, lineal, preciso, exacto y robusto, por lo que puede ser aplicable al control de la calidad y estudio de estabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nassif A, Meriño E. Ácidos Grasos Omega-3. Pescado de carne azul y concentrados de aceite de pescado. Revista Cubana de Medicina, Base de datos Cuba Ciencia, Infomed. 2003; 42 (2): 49 - 55.
2. García CM, Castiñeira M, Fernández M, Romero JA, Collazo S, Mancebo B et al. Determinación por CLAR de las Vitaminas A y D en Aceite de Hígado de Tiburón. Lat. Am. J. Pharm. 2008; 27 (3): 419-424.
3. Bécquer C, Sánchez M, Castiñeira M, Santa Ana D. Validación de un método cromatográfico (CLAR) para la determinación de vitamina A en aceite de hígado de tiburón. Revista CENIC Ciencias Químicas. 1999; 30 (3): 164 - 167.
4. Regulación No. 41 CECMED. Validación de Métodos Analíticos. MINSAP. Cuba. 2007: 3-25.
5. Pastelnick LA. Analytical. Métodos de Validación. Pharmaceutical Process Validation. 1993. Cap 13. Ed 3ra.
6. United State Pharmacopeia (USP 35). United States Pharmacopoeia (USP 35/2012 NF 30). US Pharmacopoeia Convention, Inc. Washington DC. P. 2012: 967 - 971.
7. Pérez R. Estudio de validación de la metodología para la determinación de vitamina A en alimentos infantiles instantáneos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Rev Med Exp. 2000; 17: 1-4.
8. Such A, Sánchez C, Gomis P, Herreros A. Estabilidad de vitaminas en nutrición parenteral. Nutr Hos. 2009; 24 (1): 1 - 9.
9. Castiñeira M, Cairó A, Perdomo I, Perdomo U. Preformulación de vitamina A en tabletas. Revista Cubana de Farmacia. 1996; 30 (1).