

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria  
Fundación Oswaldo Cruz

# Farmacopea Brasileña

Volumen 1

Esta tradução é um produto de termo de cooperação entre a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), e não substitui a versão em português.

This translation is a product of a cooperation agreement between Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA) and Pan American Health Organization (PAHO), and does not replace the portuguese version.

Esta traducción es un producto del acuerdo de cooperación entre la Agencia Brasileña de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) y la Organización Panamericana de Salud (OPAS), y no sustituye la versión en portugués.

5ª edición

Brasilia

2010

Copyright © 2010 Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria y Fundación Oswaldo Cruz/Editora  
Todos los derechos reservados. Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra, siempre que sea citada la fuente.

5ª edición



**Presidente de la República**

Luiz Inácio Lula de la Silva

**Ministro de Estado de la Saúde**

José Gomes Tiemporão

**Director-Presidente**

Dirceu Raposo de Mello

**Adjunto del Director-Presidente**

Pedro Ivo Sebba Ramalho

**Directores**

Dirceu Aparecido Brás Barbano

José Agenor Álvares da Silva

Maria Cecília Martins Brito

**Adjunto de Directores**

Luiz Roberto da Silva Klassmann

Neilton Araujo de Oliveira

Luiz Armando Erthal

**Chefe de Gabinete**

Iliana Alves Canoff

**Elaboración y edición:**

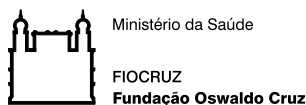
AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200

71205-050, Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Sitio web: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)



**Presidente**

Paulo Gadelha

**Vicepresidente de Ensino, Información y Comunicação**

Maria del Carmo Leal



**Directora**

Maria do Carmo Leal

**Editor Ejecutivo**

João Carlos Canossa Mendes

**Editores Científicos**

Nísia Trindade Lima y Ricardo Ventura Santos

**Consejo Editorial**

Ana Lúcia Teles Rabello

Armando de Oliveira Schubach

Carlos E. A. Coimbra Jr.

Gerson Oliveira Penna

Gilberto Hochman

Joseli Lannes Vieira

Lígia Vieira da Silva

Maria Cecília de Souza Minayo

---

Brasil. Farmacopea Brasileira, volumen 2 / Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Brasília: Anvisa, 2010.  
546p., 1v/il.

1. Sustancias farmacéuticas químicas, vegetales y biológicas. 2. Medicamentos y relacionados. 3. Especificaciones y método de análisis. I Título.

ISBN 978-85-88233-41-6

---

## RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN COLEGIADA - RDC N° 49, DE 23 DE NOVIEMBRE DE 2010

Apruebalas Farmacopea Brasileña, 5a edición y da otras providencias.

La Dirección Colegiada de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, en el uso de la atribución que le otorga el inciso IV del art. 11 del Reglamento aprobado por el Decreto n°. 3.029, de 16 de abril de 1999, y teniendo en vista lo dispuesto en el inciso II y §§ 1° y 3° del art. 54 del Reglamento Interno aprobado en los términos del Anexo I de la Ordenanza N° 354 de la ANVISA, del 11 de agosto del 2006, reeditada en el DOU (Diario Oficial de la Unión) de 21 de agosto de 2006, y además lo que consta del art. 7° inciso XIX de la Ley n°. 9.782, del 26 de enero de 1999, en reunión realizada el 11 de noviembre del 2010, adopta la siguiente Resolución de la Dirección Colegiada y yo, Director Presidente, determino su publicación:

Art. 1° Queda aprobada la Farmacopea Brasileña, 5a edición, constituida del Volumen 1 - Métodos Generales y textos y Volumen 2 - Monografías.

Art. 2° Los insumos farmacéuticos, los medicamentos y otros productos sujetos a la vigilancia sanitaria deben atender a las normas y especificaciones establecidas en la Farmacopea Brasileña.

Párrafo único. En la ausencia de monografía oficial de materia prima, formas farmacéuticas, relacionados y métodos generales en la quinta edición de la Farmacopea Brasileña, para el control de insumos y productos farmacéuticos se admitirá la adopción de monografía oficial, en su última edición, de códigos farmacéuticos extranjeros, en la forma dispuesta en normas específicas.

Art. 3° Está prohibida la impresión, distribución, reproducción o venta de la Farmacopea Brasileña, 5a edición sin la previa y expresa anuencia de la ANVISA.

Párrafo único. Sin perjuicio de lo dispuesto en el encabezado de este artículo, la ANVISA dispondrá gratuitamente en su sitio web copia de la quinta edición y de sus actualizaciones.

Art. 4° Queda autorizada la Fundación Oswaldo Cruz, por medio de la Editora Fiocruz, para la comercialización de los ejemplares de la quinta edición de la Farmacopea Brasileña

Art. 5° Quedan revocadas todas las monografías y métodos generales de las ediciones anteriores de la Farmacopea Brasileña.

Art. 6° Esta Resolución entrará en vigor noventa (90) días después de a su publicación.

Brasilia, 24 de noviembre del 2010

DIRCEU RAPOSO DE MELLO

Director Presidente de la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria

Publicada en el DOU N° 224, 24 de noviembre del 2010

---

# ÍNDICE

---

## **Volumen 1**

- 1** PREFACIO
- 2** HISTÓRICO
- 3** FARMACOPEA BRASILEÑA
- 4** GENERALIDADES
- 5** MÉTODOS GENERALES
  - 5.1** Métodos generales aplicados a medicamentos
  - 5.2** Métodos físicos y físico químicos
  - 5.3** Métodos químicos
  - 5.4** Métodos de farmacognosia
  - 5.5** Métodos biológicos, ensayos biológicos y microbiológicos
  - 5.6** Métodos inmunoquímicos
  - 5.7** Métodos físicos aplicados a materiales quirúrgicos y hospitalarios
- 6** RECIPIENTES PARA MEDICAMENTOS Y RELACIONADOS
  - 6.1** Recipientes de vidrio
  - 6.2** Recipientes plásticos
- 7** PREPARACIÓN DE PRODUCTOS ESTÉRILES
  - 7.1** Esterilización y garantía de esterilidad
  - 7.2** Indicadores biológicos
  - 7.3** Proceso aséptico
  - 7.4** Salas limpias y ambientes controlados asociados
  - 7.5** Procedimientos de liberación
- 8** PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS APLICABLES A LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS
  - 8.1** Glosario de símbolos
  - 8.2** Fundamentos
  - 8.3** Valores atípicos
  - 8.4** Ensayos directos
  - 8.5** Ensayos indirectoscuantitativos
  - 8.6** Promediosmóviles
  - 8.7** Ensayos indirectos “todo o nada”
  - 8.8** Combinación de estimativas de potencia
  - 8.9** Tablas estadísticas
  - 8.10** Ejemplos de cálculos estadísticos aplicados en ensayos biológicos
- 9** RADIOFÁRMACOS

- 10 EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA Y BIOEQUIVALENCIA DE MEDICAMENTOS
- 11 AGUA PARA USO FARMACÉUTICO
- 12 SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA
- 13 SUSTANCIAS COLORANTES
- 14 REACTIVOS
  - 14.1 Indicadores y soluciones indicadoras
  - 14.2 Reactivos y soluciones reactivas
  - 14.3 Soluciones volumétricas
  - 14.4 Tampones
- ANEXO A - TABLA PERIÓDICA DE LOS ELEMENTOS QUÍMICOS - NOMBRES, SÍMBOLOS Y MASAS ATÓMICAS
- ANEXO B - UNIDADES DEL SISTEMA INTERNACIONAL (SI) USADAS EN FARMACOPÉIAS Y EQUIVALENCIAS CON OTRAS UNIDADES
- ANEXO C - SOLVENTES PARA CROMATOGRAFÍA
- ANEXO D - ALCOHOLIMETRÍA

## **Volume 2**

<b>ESTRUCTURA GENERAL DE LAS MONOGRAFÍAS</b>	555
<b>MONOGRAFÍAS</b>	557
<b>ÍNDICE ALFABÉTICO</b>	1383



# 1 PREFACIO

Realizar el prefacio de una obra de la magnitud de una farmacopea nacional no es tarea fácil. Al presentar un trabajo, en que se tuvo participación en todo el proceso constructivo, debe tenerse cuidado para emitir una opinión con la mayor exención posible.

No obstante, es un enorme orgullo poder expresar, en nombre de una Comisión y de diversos Comités, las impresiones finales de una obra de características técnicas y científicas, que será instrumento para acciones de salud pública que se destinan a proteger la población de su país por medio de la prevención del riesgo sanitario. No se debe olvidar la fuerza política que la Farmacopea Brasileña, 5ª edición (FB 5) trae para el País.

Fuimos convocados, por la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para presidir los trabajos que irían a dar forma a la quinta edición de la Farmacopea Brasileña, no titubeamos ni un minuto porque conocemos el nivel de competencia, compromiso y responsabilidad de los integrantes de la Comisión de la Farmacopea Brasileña (CFB). Posteriormente, la CFB nombró a los coordinadores de los Comités Técnicos Temáticos (CTT) y estos formaron sus equipos utilizando el mismo criterio.

Tenemos, ahora, una obra que es un marco divisor de esta y de las futuras ediciones, así como en las relaciones profesionales entre el cuerpo técnico científico, el administrativo y la sociedad.

Las ediciones anteriores de la Farmacopea Brasileña no fueron, hasta entonces, revocadas y, por lo tanto, legalmente estaban en vigor. Además del perjuicio científico, por la brecha de los métodos descritos, había un cierto obstáculo para las acciones sanitarias que se basan en las descripciones farmacopeicas tanto para el área de registro, como para el área de control de calidad, así como también para la fiscalización.

Por determinación superior, la CFB realizó arduo trabajo de revisión de las mil setecientas veintisiete monografías insertadas en las cuatro ediciones anteriores y propuso exclusiones, reevaluaciones textuales, reevaluaciones metodológicas, actualizaciones para procedimientos más seguros, inclusiones de nuevos textos, entre otros.

Se dio inicio a proyectos financiados por la Anvisa con participación de conceptuadas Instituciones de Enseñanza e Investigación en una forma pionera de trabajo que envolvió dos centenas de profesionales del área de la salud, entre ellos una buena parte del medio académico, proveyendo al país mano de obra calificada para atención al sector farmacéutico brasileño.

El involucramiento con la Academia, como era de esperarse, llevó a la producción de una centena de informaciones técnicas y científicas por medio de publicaciones de arti-

culos, presentación de trabajos en congresos, discusiones en mesas redondas, charlas en eventos nacionales e internacionales, elaboración de tesis de doctorado, disertaciones de maestría y monografías de conclusión de cursos de especialización.

La producción científica emanada de la quinta edición llevó a FB 5 a un grado de destaque técnico científico con reconocimiento por congéneres internacionales.

Nada de eso habría sido realizado, si no fuese por la estructura construida por la Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña, responsable de la cuarta edición, que tiene el mérito de haber establecido la dinámica necesaria para la elaboración de un documento de tamaño responsabilidad y, principalmente, haber consolidado la mentalidad de la real importancia de ese compendio para una sociedad en constante evolución.

De esa forma, puede la CFB y sus Comités, en consonancia con la Anvisa, traer a la sociedad brasileña un nuevo código totalmente revitalizado, presentado en dos volúmenes divididos en Métodos Generales y Monografías. Están incluidos ciento setenta y seis métodos generales y quinientas noventa y nueve monografías, de las cuales doscientas setenta y siete de insumos farmacéuticos, doscientas diez de especialidades, cincuenta y siete de plantas medicinales, seis de relacionados, treinta de productos biológicos y diecinueve de hemocomponentes y hemoderivados.

En el capítulo de Generalidades (4), fue realizada la actualización de las definiciones y la inclusión de numerosas otras, atendiendo a las particularidades de cada Comité.

En Procedimientos técnicos aplicados a medicamentos (5.1) se destacan la completa revisión del método de uniformidad de dosis unitarias (5.1.6), ahora armonizado con nuevos métodos publicados por las principales farmacopeas internacionales. Otro destaque es la inclusión de la prueba de goteo (5.1.8), de gran importancia para los estudios de equivalencia farmacéutica de las formas farmacéuticas líquidas de uso oral.

En Métodos físicos y físico químicos (5.2), fue realizada una revisión completa de los Métodos de espectrometría atómica (5.2.13), así como de los métodos de cromatografía (5.2.17) que fueron reescritos y se encuentran más completos. Fue incluido texto sobre métodos de electroforesis capilar (5.2.22.1) e inúmeros otros que pasaron o por revisión completa o por modificación de texto.

Para los Métodos químicos (5.3), fue realizada revisión completa de los ensayos límite, con énfasis para la eliminación del uso de ácido sulfhídrico y la inclusión de la espectrometría atómica en el Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3). Se incluye el Ensayo yodométrico de antibióticos (5.3.3.10), cuyo procedimiento era, anteriormente, descrito

en cada monografía pasando, ahora, a contar con un método general propio.

Los Métodos de farmacognosia (**5.4**) fueron revistos y ampliados, destacando los Métodos de preparación y análisis de extractos vegetales (**5.4.3**), con el aumento de seis nuevos métodos generales.

Los Métodos biológicos, ensayos biológicos y microbiológicos (**5.5**) son presentados con la inclusión de una serie de Métodos biológicos (**5.5.1**), tales como la determinación de cantidades de factores de la coagulación sanguínea humana, totalizando dieciséis nuevos métodos. Se realizó el trabajo de reorganización; revisión y ampliación de los ensayos biológicos (**5.5.2**) y microbiológicos (**5.5.3**).

En Recipientes para medicamentos y relacionados (**6**), así como en Métodos de preparación de productos estériles (**7**), fueron realizadas revisiones completas con reorganización y ampliación de textos para medicamentos y relacionados.

Nuevos ejemplos de ensayos fueron incorporados y, aquellos constantes de la cuarta edición de la Farmacopea Brasileña fueron revisados en Procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (**8**).

Tres nuevos capítulos fueron incluidos: Equivalencia Farmacéutica y Bioequivalencia (**10**); Agua para uso farmacéutico (**11**) y Sustancias químicas de referencia (**12**). La inclusión de nuevos capítulos fue iniciativa de los referidos Comités y trae a la luz informaciones de literatura aliada a las experiencias profesionales de sus respectivos miembros. El capítulo de Sustancias colorantes (**13**) fue revisado y ampliado.

Trabajo especial fue la consolidación del capítulo de Reactivos (**14**). En ese capítulo fueron congregados todos los indicadores, soluciones indicadoras, reactivos, soluciones reactivas, soluciones volumétricas y tampones descritos en las monografías del volumen 2 de la FB 5. Con eso, se eliminó la descripción del reactivo en la propia monografía

dando una lectura más dinámica por medio de la utilización del capítulo específico. Son descritos, actualmente, mil cincuenta y un títulos que representan un aumento de cien por ciento con relación a la edición anterior.

Todos los anexos fueron revisados y fue incluido el Anexo C, que trata de solventes comúnmente empleados en análisis cromatográficos

No podemos tener la ingenuidad de pensar una farmacopea sin errores. A pesar de que todos los textos hayan sido sometidos a consulta pública y a una revisión cuidadosa, en el caso de que haya sido incluida alguna información inadecuada, que pueda llevar a la dificultad de la comprensión final, habrá en la Coordinación de la Farmacopea Brasileña un procedimiento para aclarar las dudas y proveer la sustitución, se llegara a ser el caso, con rapidez. Nuevos textos o correcciones estarán expuestos en el medio electrónico de la farmacopea, novedad de la presente edición.

No estaríamos entregando la FB 5 no fuese por la dedicación extrema de todos los miembros de la CFB, de los CTT, de la COFAR y de todos los colaboradores. Sin el conocimiento técnico científico de esas personas y sin la conducción firme de la Directora Maria Cecília Brito Martins, nuestro camino hubiese sido más difícil.

A pesar de insistir en los agradecimientos, entendemos que esas personas, por identificarse con los problemas sanitarios del País, participaron de todo ese proceso imbuidos en un espíritu cívico ya que son, en su mayoría, voluntarios.

Reiteramos que todo el proceso que culminó con la publicación de la FB 5 se perderá se no es implementada una real política de Estado que nos garantice la continuidad de los trabajos de la Comisión de la Farmacopea Brasileña y de los CTT responsables de los demás productos: Farmacopea Homeopática, Formulario Nacional, Denominaciones Comunes Brasileñas, Sustancias Químicas de Referencia y Formulario Fitoterapéutico.

Gerson Antônio Pianetti

Presidente de la CFB



## PREFACIO DE LA FARMACOPEA DE BRASIL, 1ª EDICIÓN

Hasta la fecha de la independencia de Brasil – 7 de Septiembre de 1822 – predominó como código farmacéutico oficial la “Farmacopea General para el Reino y dominios de Portugal”, de autoría del Dr. Francisco Tavares, profesor de la Universidade de Coimbra, y publicada en 1794 por orden de la reina fidelísima D. Maria I.

De esa fecha en adelante, a pesar de nuestra emancipación política, continuó siendo adoptada no sólo la misma farmacopea, como también el “Codex medicamentarius” francés, después de 1837.

El Reglamento de la Junta de Higiene Pública, mandado a ejecutar por el Decreto n. 828, del 29 de Septiembre de 1851, sin determinar explícitamente cual es la farmacopea que debería ser seguida, estableció una lista de los libros que las farmacias tendrían que tener y que son los siguientes: “Codex francés, Conspecto de las farmacopeas, por Jourdan; Materia médica, formulario de Bouchardat; Farmacopea General; Farmacopea de Foy; Código Farmacéutico y Farmacografía del Agostinho Albano de la Silveira Pinto (última edición)”.

La primera mención legal estableciendo obligatoriamente el Codex francés como farmacopea oficial de Brasil es la que consta del artículo 58 del Reglamento que vino con el Decreto n. 8.387, del 19 de enero de 1882, que expresa lo siguiente: “para, la preparación de los, remedios oficinales se seguirá la farmacopea francesa, hasta que esté compuesta una farmacopea brasileña, para lo que el Gobierno nombrará una Comisión de personas competentes. Después de publicada por autorización del Gobierno la farmacopea brasileña, los farmacéuticos tendrán los preparados según las formulas de esta farmacopea, lo que no inhibirá de tenerlos según las formulas de otras para que cumplan las prescripciones de los facultativos, los cuales pueden recetar como lo entiendan”.

Redactado, sin embargo, para un país tan diferente del nuestro, como es Francia, el “Codex medicamentarius gallicus” no podría satisfacer nuestras necesidades, por lo que todos estuvieron de acuerdo en proclamar, sin que nuestros dirigentes, siempre sordos e indiferentes a los pedidos de la clase farmacéutica, tomaran cualquier iniciativa para darle a Brasil un código farmacéutico.

En vista de tal desatención del poder público las asociaciones farmacéuticas y médicas buscaron llevar adelante la organización de nuestra farmacopea, habiendo, sin embargo, fracasado en todos los intentos por falta de apoyo oficial y debido a impedimentos de todo tipo.

Brasil, sin embargo, que siempre ha sabido igualarse con las demás naciones civilizadas en todos los ramos de las ciencias, de las artes, etc., no podía continuar a ser regido, en cuanto al ejercicio de la Farmacia, por un código extranjero, que, a pesar de que es óptimo para su país, no satisfacía en absoluto nuestras necesidades. Por eso, a pesar de que reconociendo el arrojo de tal iniciativa, resolvimos asumir

la ardua tarea y alta responsabilidad de redactar nuestro futuro código farmacéutico, confiados que nuestro grande amor a la profesión venciera todos los óbices. Después de más de dos lustros de paciente trabajo, tuvimos la ventura de presentar nuestro proyecto de Farmacopea Brasileña al Excmo. Sr. Dr. Carlos Chagas, entonces, director general del Departamento Nacional de Salud Pública, solicitando de S. Ej. El nombramiento de una comisión para juzgarlo, la cual quedó así constituida: Profesores Drs. Antonio Pacheco Leão, Renato de Souza Lopes y Artidonio Pamplona y Farmacéuticos Alfredo da Silva Moreira, Malhado Filho e Isaac Werneck, da Silva Santos.

Después de examen minucioso de la obra, esa comisión resolvió aceptarla, solicitando del Gobierno su oficialización como Código nacional farmacéutico, con la supresión, sin embargo, de los artículos siguientes, considerados de uso muy restricto para ser oficializados: Piña – Acetato básico de cobre – Acetylarsanilato de sodio – Acido chrysophanico - Acido dipropylbarbiturico – Acido yodhídrico diluido – Agárico del roble- Agua de Carlsbad artificial – Agua imperial – Alcoholatura vulneraria – Aloe liquefecto – Amilo de arroz – Apocynum – Apozemas amargo, de cusso, de romera, de semen-contra, estomachico, purgativo y sudorífico – Bromuro de estroncio – Bromuro de litio – Caña fistula – Carbonato de estroncio – Cardo santo – Roble - Cataplasma de harina de mandioca – Cataplasma de fécula de papa – Cáustico de Viena – Cerato de espermaceti – Cerato de moscada – Cereza negra – Cereza roja – Cloral formamida – Clorato de oro y de sodio – Mercurio cloroamiduro – Citrato de cafeina efervescente – Citrato de hierro y quinina – Clister de amilo – Clister de manzanilla – Clister laxante – Colodion cantaridado – Colodion yodoformado – Conserva de caña fistula – Coto – Electuarios de caroba compuesto, de copaíba compuesto y de senna – Elixir adyuvante – Elixir de anís – Elixir de antipyrina Elixir de bucco – Elixir de genciana – Elixir de phosphato férrico – Elixir de sucupira – Elixir dentifricio – Emplastro de jabón alcanforado – Emplastro de jabón salicylado – Emplastro oxycrocco – Emulsión de esencia de terebinthina – Espíritu de zimbardo compuesto – Esencia de pimienta – Estaphisagria – Ethylcarbonato de diquinina – Ethylsalicylato de quinina – Extracto de bistorta – Extracto de cardo santo – Extracto de centaurea menor – Extracto de cicuta – Extracto de cimicifuga – Extracto de dulce-amarga – Extracto fluido de angélica – Extracto fluido de calamo aromático – Extracto fluido de canela de la China Extracto fluido de cardo santo – Extracto fluido de roble – Extracto fluido de coto – Extracto fluido de estaphisagria – Extracto fluido de mercurial – Mellito de mercurial – Mercurial – Methylenocitrato de hexamethylenotetramina – Mostaza blanca – Nitrato neutro de bismutho – Paratoluolsulfonodichloramida – Pastillas de bálsamo de Tolú – de bicarbonato de sodio, de borato de sodio, de carbón, de chlorato de potasio, de chlorhydrato de cocaina, del codeina, de azufre, de menta peperina, de ipecacuanha, de ipecacuanha opiadas, de kermes, de kermes opiadas, de phenolphtaleina, de santonina, de santonina compuestas y del tanino – Pediluvio sinapizado – Phosphato de sodio efervescente – Polvos de apocynum, de dulce-amarga y de quebracho – Pulpa de caña fistula purificada – Pomada del chloroamideto de mercurio – Pomada de tanino – Purga de cayapó – Quebra-

cho – Sal de Carlsbad artificial – Soluta de acetotartarato de aluminio, de creosoto, de cresol, de phosphato de sodio compuesto y de sulfato basico de hierro Jugo de ananá – Jugo de cereza – Tintura de coto – Valerianato de zinc – Vino aromático – Vino de cacao

Vinho de ipecacuanha – Jarabe de abacaxi, de acido yodhídrico, de cereza, de cipó azougue, de dulce-amarga, de espelina, de gengibre, del manacá, del mangerona, de muiapuama y de poejo.

#### PREFACIO DE LA FARMACOPEA DE BRASIL, 2ª EDICIÓN

Ya hacía treinta años que estaba en vigor la primera edición de la Farmacopea BRASILEÑA, editada en 1929. En ese largo lapso de tiempo, el Código Farmacéutico Brasileño se tornó anticuado y desactualizado, por el inmenso progreso que alcanzaron las ciencias médicas y farmacéuticas, en todo el mundo.

Desde 1.950 la obra estaba completamente agotada, creando, así, serias dificultades a las nuevas Farmacias y Laboratorios Industriales Farmacéuticos, que legalmente no pueden funcionar sin la presencia de ese Código Oficial. Consecuentemente, de todas las localidades del País eran enviadas a los poderes públicos constantes advertencias resaltando la necesidad de ser elaborada una nueva edición, lo que solamente aumentó durante los nueve años de su agotamiento total.

Eran estas fuertes razones las que empujaban para que se pusiera en marcha la elaboración de una segunda edición. No obstante, dificultades de todo tipo fueron apareciendo, impidiendo que la obra fuera realizada en tiempo y forma, pese el empeño y la buena voluntad de nuestras autoridades sanitarias.

Era necesaria una completa revisión y actualización de todo el contenido de la primera edición, y esa tarea era, sin duda, muy difícil y delicada, especialmente en un País de larga extensión territorial, como es Brasil, cuando se precisa de una colaboración o contribución de carácter nacional, como es exigido en el caso.

Poco tiempo después de la publicación de la Farmacopea y de su uso en los laboratorios farmacéuticos, empezaron a surgir críticas, observaciones, las cuales fueron siendo recopiladas y coordinadas por la ASOCIACIÓN BRASILEÑA DE FARMACÉUTICOS, con sede en la Capital de la República, antes no existía, y también la Comisión Oficial para su estudio y revisión.

En El HISTÓRICO DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, incluido en la presente edición, se encuentran noticias detalladas de las actividades desarrolladas para la completa revisión y actualización de esta segunda edición del Código Farmacéutico Brasileño. Se agrega una Comisión paritaria, constituida de miembros de la Capital de la República y de São Paulo, que tuvo a su cargo la revisión final de la obra en impresión, con poderes para atender dudas y fallas

verificadas, así como el de darle uniformidad al lenguaje farmacopeico adoptado por la Comisión Revisora Oficial.

En la elaboración de la presente edición, la COMISIÓN DE REVISIÓN DE LA FARMACOPEA siguió, en principio, la misma orientación adoptada por la FARMACOPEA NORTEAMERICANA y, en parte, a la de la FARMACOPEA INTERNACIONAL, en lo que se refiere a la distribución de la materia y estudio de las monografías; en lo referido a la última Farmacopea, hay que tener en cuenta que fue Brasil uno de los primeros países, que adoptaron aquel Código de carácter internacional.

Las monografías que constan en la primera edición y que van a continuar en la segunda sufrieron una completa revisión, para ser actualizadas, en cuanto a los procesos de ensayo, de medición de cantidades y otros requisitos, a fin de cumplan con las exigencias de la técnica moderna.

Fue mantenida la nomenclatura de los medicamentos en portugués, en orden alfabético, como en la edición anterior, así como los sinónimos y corregida la nomenclatura oficial en latín.

Para los productos patentados o registrados, fueron adoptados los nombres por los cuales son conocidos, señalándose con el clásico asterisco (\*).

En la 1ª Edición de la Farmacopea Brasileña, a pesar de que Brasil no había firmado los Protocolos de Bruselas de 1.906 y 1.929, relativos a la Unificación de la Fórmula de los Medicamentos Heroicos fueron acogidas en casi su totalidad las prescripciones en ellos contenidos, conforme se puede verificar en los cuadros comparativos incluidos en la Farmacopea.

Por el nuevo Protocolo del 20 de Mayo de 1.952 fueron derogados los anteriores, siendo adoptadas en cambio las prescripciones correspondientes a las de la Farmacopea Internacional, de la Organización Mundial de Salud. La Farmacopea Internacional fue recibida con aplausos en Brasil, como bien tradujo su delegación en el 2º Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica, realizado en Perú en 1951. La 2ª edición de la Farmacopea Brasileña atendió tanto como fue posible a las referidas prescripciones.

La Comisión de Revisión, después de un meticoloso estudio, deliberó que un gran número de drogas y preparaciones galénicas oficinales diversas, de poco uso, fuese suprimido de la 2ª edición, siendo incluidas, en gran parte, en el Formulario Nacional, que será publicado a la brevedad, como complemento de la Farmacopea.

La Comisión, teniendo en vista la nulidad de la acción terapéutica de muchas drogas y medicamentos, así como el completo desuso actualmente de numerosos otros, deliberó, después de largos debates con todos los miembros de la Comisión Oficial y de las Subcomisiones Estaduales, la exclusión de monografías cuya relación va más adelante.

Tomando en consideración el gran progreso alcanzado en las tres últimas décadas en el campo de la Medicina y de la

Farmacias, fueron incluidas en la presente edición numerosas monografías de valiosos medicamentos, que hoy en día dominan la terapéutica moderna tales como: antibióticos, sulfas, hormonas, vitaminas, barbitúricos, etc., conforme a la relación que se verá más adelante.

Por fin va transcrita la relación completa de todas las personalidades, que, con tanto empeño y entrega, dieron su valiosa colaboración, para que la nueva edición se vuelva una brillante realidad. En este punto, sería injusto se no fuese destacada especialmente la COMISIÓN DE ESTANDARIZACIÓN FARMACÉUTICA DE SÃO PAULO que, patrióticamente, dio preciosa y constante contribución, empleando su máximo esfuerzo para que la nueva edición llegase a su fin, al nivel de las más avanzadas Farmacopeas del Mundo.

La Comisión de Revisión de la Farmacopea se sentirá recompensada por el gran esfuerzo realizado, si la nueva edición puede corresponder, como es de esperar, a su gran finalidad práctica, que es la perfecta selección de las materias primas de empleo medicinal y su estandarización, condición principal de la actividad y eficiencia de los medicamentos, prestando así, un relevante servicio a la salud pública del País.

Rio de Janeiro, 22 de febrero de 1959

Luis Salgado Lima Filho

Presidente de la Comisión de Revisión de la Farmacopea

#### PRESENTACIÓN DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 3a EDICIÓN

En el contexto de los numerosos eventos que vienen señalando la ejecución de los Planes Nacionales de Desarrollo, como marcos históricos en el crecimiento global del país, no podría estar ausente el sector Salud y, entre sus realizaciones básicas, el lanzamiento de la Farmacopea Brasileña, en edición revista y actualizada, para los tiempos de hoy.

De ahí vienen algunas providencias no fructificadas, a partir de 1962, que sólo se corporificaron y vinieron a tener culminación en la actual gestión del Ministro Paulo Almeida Machado, mediante nueva iniciativa, concretizada a través de la Secretaría Nacional de Salud y de su órgano específico, el Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina y Farmacia.

El Sr. Ministro designó la nueva Comisión de Revisión de la Farmacopea, mediante la Odenanza 276/75, colegiado que cumplió su misión, en plazo satisfactorio, habiendo contado con la valiosa cooperación del Consejo Federal de Farmacia.

Aprobando esta 3a edición de la Farmacopea, con la expedición del Decreto 78.840/76, refrendado por el Ministro de la Salud, el Excmo. Sr. Presidente de la República contempló el Ministerio de la Salud y la clase médica y farmacéutica del país, con ese importante instrumento fármaco técnico y normativo de grande alcance, en la secuencia de otras medidas de operacionalización que vienen siendo implantadas en ese destacado Sector de la vida nacional.

Al someter los originales de esta 3a edición a la aprobación del Presidente Ernesto Geisel, el Ministro no sólo lo obtuvo, como pudo, y era de su empeño, conmemorar el cincuentenario de la 1a edición, lanzada, exactamente, en el día 25 de noviembre de 1927, día y mes coincidentes con los de esta publicación.

La revisión realizada sobre la edición anterior fue laboriosa y minuciosa, de modo que los medios interesados pudiesen, contar con un instrumento de normas y consultas de mayor credibilidad y seguridad, lo que se dejará en evidencia al examinar las grandes modificaciones añadidas en el texto actual.

Se consideró que la experiencia internacional ganó más fuertes convicciones que los fármacos utilizados, y los medios de su identificación y control, se generalizan cada vez más. Por lo tanto es debido fortalecer los fundamentos de los valores terapéuticos regionalizados, sobresaliendo evidentemente la uniformización de los controles. Además de los recursos terapéuticos provenientes de la flora – cada vez con menos representación– respondiendo a las distinciones locales, crecen los quimioterápicos, en volumen y en calidad, favoreciendo la uniformización de los métodos de identificación y control. Se desarrollaron de ahí las Farmacopeas Europeas e Internacional, esta última ganando fama de parámetro a ser respetado y seguido.

No fue otro el plan de la Comisión. Mientras fue posible, prevalecieron las normas de la Organización Mundial de la Salud. Así, la nomenclatura latina precediendo a la nacional, el nombre químico y la fórmula molecular, y también los métodos generales de análisis.

No se perdieron de vista los recursos laboratoriales dentro de la realidad nacional. Por eso mismo, y cuando fue posible y necesario, se adoptaron métodos diversos, simples y sofisticados, para un mismo examen. Por otro lado, teniendo presente como necesidad esencial la debida identificación de los agentes terapéuticos constantes de los fitofármacos, sólo fueron incluidos en la Farmacopea aquellos para los cuales ya disponemos de métodos eficaces de identificación y medición de dosis. Ediciones subsiguientes bajo la forma de Suplementos, y el propio Formulario Nacional – que ciertamente se editará – vendrán a llenar lagunas existentes.

El amplio listado de nuevos agentes terapéuticos obliga, necesariamente, a considerar su efectiva necesidad a nivel nacional.

La industria farmacéutica fue invitada a manifestarse, ofreciendo subsidios por vía de las entidades representativas, contribución que mereció prudente clasificación de la Comisión.

Además, que a la par de esa relación y de los subsidios, se tomó por legítimo, también, un levantamiento de los medicamentos de mayor representatividad en el recetario y consumo nacionales.

Se tiene, pues, que ese elenco y, las monografías revistas, remanentes de la 2a edición, constituyen, en el todo,

el acervo monográfico de la 3a edición de la Farmacopea Brasileña.

Por cierto quedarán otras monografías para añadir, tanto como algunas existentes, o persistentes, tal vez puedan ser susceptibles a supresión. Esta evidencia sólo habla a favor de la propia Farmacopea, dinámica como la terapéutica, y pendiente de actualizaciones más frecuentes, como suele ser la propia Farmacología.

Teniendo en cuenta que la 2a edición de la Farmacopea Brasileña se encuentra agotada, y que muchas monografías constantes de la misma, no revistas, representan además fuente bibliográfica de mérito y con fuerza legal, la Comisión decidió que el 1º Suplemento de la 3a edición representará, en el todo y exclusivamente, la constante de aquel acervo, a ser publicado en secuencia inmediata a esta nueva edición.

Críticas, correcciones y observaciones serán aceptados. Y se ruega, desde ahora, que sean hechos de modo claro y objetivo, para mayor facilidad de las ediciones venideras. Todos ellos, cuando sean constructivos, representarán un valioso subsidio para el perfeccionamiento de la Farmacopea Brasileña, como este trabajo pretende ser, comparado con la edición anterior.

#### PREFACIO DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 4ª EDICIÓN

Cumpliendo las disposiciones del Decreto Federal nº 78.840, del 25/11/1976, la nueva edición de la Farmacopea Brasileña viene al encuentro de los deseos de la comunidad técnico-científica brasileña, interesada en la revisión de la edición anterior.

La Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña, constituida por la Ordenanza nº 151/82 del Excmo. Ministro de Salud, sólo puede realizar su trabajo gracias al apoyo decisivo de la Secretaría Nacional de Vigilancia Sanitaria – SNVS – del Ministerio de Salud. Acuerdos y convenios celebrados entre la SNVS, la Central de Medicamentos – CEME – del Ministerio de la Previdencia y Asistencia Social – MPAS – y el Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico – CNPq -, aseguraron a la Comisión recursos financieros indispensables, incluyendo becas de estudios para ejecución de los trabajos.

La elaboración de las monografías fue confiada a profesionales con efectiva experiencia en el asunto; estas monografías fueron revisadas por otros profesionales del mismo campo de actividad. A pesar de esto, eventuales imperfecciones, errores u omisiones son de responsabilidad exclusiva de la Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña, a quien le corresponde la aprobación del texto final.

La 4a Edición de la Farmacopea Brasileña marca el inicio de una nueva era. Se trata de la edición en la cual se adopta un nuevo sistema de presentación. El rápido avance de la tecnología y la creciente complejidad de las sustancias medicinales determinan la necesidad de frecuentes revisiones

de la Farmacopea. Para facilitar estas revisiones y posibilitar introducción de nuevas monografías y métodos de análisis necesarios, la Comisión adoptó esta nueva forma de presentación.

El presente volumen constituye la Parte I de la Farmacopea y comprende las generalidades, y los métodos generales de análisis. La Parte II será constituida de monografías de materias primas y especialidades farmacéuticas, publicadas en fascículos. Un índice indicará el título de las monografías, sus números de referencia y la fecha para su entrada en vigor.

La Farmacopea Brasileña en su 4a edición tiene vigencia en todo el Territorio Nacional. La nomenclatura, los métodos de identificación y análisis y todos los demás datos en ella contenidos prevalecen sobre otros señalados en códigos farmacéuticos diversos. En los casos omisos, pueden ser utilizados la Farmacopea Internacional, la Farmacopea Europea y otros códigos farmacéuticos en sus últimas ediciones.\*

Las monografías de la Farmacopea Brasileña 4a edición establecen parámetros que el producto deberá satisfacer en cualquier momento durante su período de uso y no para ser interpretados solamente como especificaciones para liberación por parte del fabricante.

La no inclusión de un fármaco o adyuvante de fabricación en la 4a edición de la Farmacopea Brasileña no dispensa estas sustancias de análisis según otros códigos oficiales; así como la presencia de impureza no descrita específicamente en la Farmacopea no significa que la sustancia puede ser usada por el simple hecho de que la Farmacopea no lo especifique. En estos casos, la decisión debe ser toma con base en el buen sentido técnico y en las buenas prácticas de fabricación.

La Farmacopea es obra para profesionales debidamente preparados y entrenados. Por este motivo, no provee explicaciones didácticas, presentando las monografías con redacción clara, sucinta y desprovistas de explicaciones juzgadas desnecesarias por la Comisión.

La Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña torna públicos sus agradecimientos a todos aquellos que colaboraron en la preparación de esta edición y, en especial, al Consejo Federal de Farmacia por el apoyo que posibilitó la publicación oficial de la F. Bras. IV.

\* Normas Nacionales extrafarmacopeicas deberán obtener previamente aprobación de la Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña del Consejo Nacional de Salud.



## 2 HISTÓRICO

2

### BREVE ACTUALIZACIÓN HISTÓRICA DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 5ª EDICIÓN

La casi centenaria Farmacopea Brasileña ilustra un ciclo de gran importancia para el país. Partiendo de su primera edición, fruto de un arduo trabajo de un único farmacéutico, atravesó ocho décadas buscando su espacio, de hecho y de derecho, como instrumento fundamental de apoyo a las políticas nacionales de salud emanadas de gobiernos con proyectos serios de protección al ciudadano brasileño.

Si hubiesen sido respetadas las determinaciones de los decretos y resoluciones que indicaban revisión cada periodo quinquenal estaría publicándose su décima séptima edición lo que infelizmente no está ocurriendo, ciertamente por problemas ocurridos pero sin ningún demérito al pasado, dado que nuestro objetivo es siempre mirar hacia adelante.

Al inicio del siglo XX, las boticas son los principales locales de la práctica sanitaria y el país experimenta la convivencia con su joven república. Rodolpho Albino Dias da Silva se entrega a un trabajo hercúleo de pasar para un libro toda una vida de investigación sobre las drogas vegetales y animales, descripción de productos químicos y de preparaciones oficinales. Nace, así, la primera edición de la Farmacopea Brasileña, oficializada por el gobierno federal por medio del decreto N° 17.509 del 4 de noviembre de 1926, sin embargo obligatorio a partir del 15 de agosto de 1929.

Una gran guerra azota al planeta en los años cuarenta y enseguida un gran cambio mundial se hace sentir en todos los países desarrollados o en desarrollo, y nuestra primera edición ya no cumple más su papel. Las boticas son sustituidas, gradualmente, por farmacias que no realizan más el arte de la manipulación magistral y es decretado el inicio del fin del enorme servicio prestado por el profesional de farmacia a la población. El país es invadido por industrias multinacionales que, de a poco, consiguen eliminar todas las pequeñas empresas brasileñas del ramo.

Paralelamente, inicia el acceso de medicamentos modernos que exigen control de calidad diferenciado debido a la producción a gran escala y a la cantidad de fármacos sintetizados y originarios de diversas fuentes. La Farmacopea no escapó del movimiento modernista impreso por el Presidente Juscelino Kubitschek que, en 1959 firma el Decreto N° 45.502 aprobando la segunda edición de la Farmacopea Brasileña.

Ya en otra realidad, aquella edición se presenta orientada para los insumos y especialidades farmacéuticas buscando estándares nacionales de calidad de los bienes de salud a ser usados por la sociedad. Las formulaciones oficinales fueron enviadas para una publicación futura que se pretendía publicar como Formulario Nacional lo que solamente ocurrió en los años ochenta.

La tercera edición de la Farmacopea Brasileña esperó 17 años para ser publicada por medio del Decreto N° 78.840 del 25 de noviembre de 1976 y refuerza la edición anterior ampliando y modernizando su contenido.

De la misma forma que las anteriores, la cuarta edición de la Farmacopea Brasileña fue elaborada a partir de iniciativa de profesionales de la salud. Los trabajos fueron iniciados en 1982 con la creación de la Comisión de Revisión de la Farmacopea Brasileña (CPRFB) nombrada por el Director de la Secretaría Nacional de Vigilancia Sanitaria, Dr. Antônio Carlos Zanini.

Solamente en 1988 fue posible el lanzamiento de la Parte I de la cuarta edición, conteniendo métodos generales, y se dio inicio a la elaboración de la Parte II conteniendo las monografías de fármacos y especialidades. La entrega del primer fascículo se dio en 1996. La dedicación, persistencia e incansable trabajo del Dr. Celso F. Bittencourt, entonces Presidente de la CPRFB, contribuyeron para la creación y mantenimiento de la infraestructura necesaria al desarrollo de los fascículos de la cuarta edición hasta su conclusión reforzando las bases para la continuación de los trabajos hasta el presente. La participación del medio académico, por medio de universidades públicas, fue y continúa siendo, intensa y imprescindible.

Con la creación de la Anvisa, en 1999, la revisión permanente de la Farmacopea Brasileña pasa a ser de responsabilidad administrativa, técnica y científica de la agencia. El sólido apoyo de la Dirección Colegiada, desde entonces, especialmente por su primer Director Presidente Dr. Gonzalo Vecina Neto, llevó a la Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña a alcanzar la madurez de sus trabajos.

Fueron construidas metodologías de trabajo basadas en las más modernas y actualizadas referencias mundiales en comparación con publicaciones de códigos farmacéuticos realizados por congéneres de farmacopeas internacionales de gran respeto en la esfera farmacéutica mundial.

Por medio de contratos y convenios se pudo financiar estudios laboratoriales y es posible, así, que sean lanzados los fascículos 2 (2000); 3 (2002); 4 (2003); 5 (2004) y 6 (2005) este último ya en la gestión del Director-Presidente Dr. Dirceu Raposo de Mello, completando así, la cuarta edición de la Farmacopea Brasileña.

Mientras tanto fueron además publicados, el fascículo 1 de la Farmacopea Homeopática Brasileña 2ª edición, y el Formulario Nacional. Fueron certificados 67 lotes de sustancias químicas de referencia de la Farmacopea Brasileña y monitoreados otros 58 lotes.

El hecho de que una nueva edición de la Farmacopea Brasileña, no revoque ediciones anteriores siempre fue un obstá-

culo para las acciones reguladoras de vigilancia sanitaria. Se decidió, por lo tanto, trabajar la quinta edición para realizar un levantamiento profundo de todos los textos publicados en las cuatro ediciones, evaluar necesidades de permanencia, de sustitución de textos y procedimientos con o sin evaluación laboratorial, y de exclusión de monografías obsoletas.

De esa forma, la quinta edición revoca todas las demás ediciones y pretende servir de núcleo central de ediciones futuras en un proceso continuo de revisión buscando siempre la inserción en una realidad internacional colocándola entre las mejores farmacopeas. Servirá, también, para guiar la propuesta de una farmacopea conjunta con países del Continente suramericano. Actualmente la Comisión de la Farmacopea Brasileña posee asiento como observador de las Farmacopeas Europea e Internacional y reconocimiento mutuo con la Farmacopea Argentina.

La Comisión de la Farmacopea Brasileña y todos sus comités poseen hoy fuertes aliados dentro de la Agência Nacional de Vigilância Sanitária con destaque especial para la Dra. Maria Cecília Martins Brito, incansable luchadora para que se tornen realidad todas las acciones propuestas por el colegiado de la Comisión y de los Comités. No nos ha faltado posicionamiento favorable, ya sea en la conducción de los procesos de aprobación de proyectos inherentes las nuestras actividades, así como en las numerosas necesidades logísticas para facilitación de los trabajos de la Comisión y de los Comités compuestos por profesionales de alto nivel y que ejercían la función por medio del voluntariado.

Tener una farmacopea es una cuestión de seguridad nacional, desarrollo técnico y científico, inserción en un nivel de reconocimiento mundial y no está más en la esfera de una simple política de Gobierno y si de Estado. Este hecho trae a la CFB la tranquilidad de saber que ejecuta un proyecto de interés nacional sin vuelta atrás y con una agenda a ser cumplida dentro de la política sanitaria practicada por el órgano regulador y por el Ministerio de la Salud.

No se puede ser ingenuo en no asumir que algunas fallas en esta quinta edición serán rápidamente identificadas, sin embargo está en fase de creación en la Coordinación de la Farmacopea Brasileña, estructura que espera atender rápidamente a los cuestionamientos de los usuarios dando respuestas rápidas y objetivas que puedan aclarar dudas sobre los textos publicados. Se pretende, al final del 2011, lanzar el primer suplemento trayendo las modificaciones, correcciones e inclusiones.

Es necesario informar que todos los textos publicados en la quinta edición pasaron por consulta pública para acceso del ciudadano y libre manifestación, por tanto es una obra cuya construcción fue colectiva con la participación de los interesados en el tema. Todas las manifestaciones externas fueron consideradas.

La historia de nuestra farmacopea viene siendo contada, como primicia, por nuestros sucesores y contiene datos muy importantes para la comprensión de toda su evolución. Optamos en reproducirlos, con excepción del histórico no contemplado en la 1ª edición, sin ningún retoque

para resguardar la autenticidad y suministrar al lector la impresión de, también, estar participando de esa historia.

Como Presidente de la Comisión de la Farmacopea Brasileña nos queda espacio para expresar los sinceros agradecimientos a todos los que ayudaron a construir esta obra y tener la certeza que continuaremos trabajando de forma colaboradora para que finalmente consigamos mantener actualizada y moderna la FARMACOPEA BRASILEÑA.

Gerson Antônio Pianetti  
Presidente de la CFB

## HISTÓRICO DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 2ª EDICIÓN

La primera mención legal estableciendo obligatoriamente el *Codex* francés como Farmacopea oficial de Brasil es la que consta del Decreto n° 828 del 29 de septiembre de 1.851, que en su artículo 45, expresa lo siguiente:

Prevaleció como código farmacéutico oficial la *Farmacopea General para el Reino y Dominios de Portugal*, de autoría del Dr. Francisco Tavares, profesor de la Universidad de Coimbra, publicada en 1.794 por orden de la Reina D. Maria I.

De esa fecha en adelante, a pesar de nuestra emancipación política, continuó siendo adoptada la misma Farmacopea, y después de 1.837 también el *Codex Medicamentarius*, francés.

“Para la composición de los remedios oficinales se seguirá la Farmacopea Francesa, hasta que se haya organizado una Farmacopea Brasileña, para lo que el Gobierno nombrará una Comisión de personas competentes. Después de publicada la Farmacopea Brasileña, que lo será por autorización del Gobierno, los Boticarios deberán, tener los remedios preparados según las fórmulas de esa Farmacopea, lo que no inhibe que los puedan tener según las fórmulas de otras Farmacopeas para satisfacer a las prescripciones de los facultativos, los cuales pueden recetar como entiendan”.

En el anexo al Reglamento, que contiene la “Tabla de los medicamentos, envases, instrumentos, utensilios y libros, organizado para las boticas del Imperio”, vino la lista de los libros que debían tener las boticas: – “Código Francés; Observación de las Farmacopeas, por Jourdan; Materia médica y Formulario de Bouchardat; Farmacopea General; Farmacopea de Foy; Código Farmacéutico y Farmacografía de Agostinho Albano da Silveira Pinto (última edición).”

El artículo 58 del Decreto n° 8.387, del 19 de enero de 1.882, reprodujo las determinaciones del artículo 45 del Decreto n° 828 de 1.851; apenas hubo la modificación de algunas palabras y de la lista de libros, de cuya última edición, el farmacéutico debía siempre tener un ejemplar. Además del *Codex* francés, eran exigidos los formularios de Dorvault, Bouchardat, Fosagrives, Jeannel, Réveil, Gallois, Chernoviz, Langaard, Farmacia práctica de Deschamps (d’Avallon), Anuario de Méhu, Guía práctica de Le Page y Patrouillaud, Tratado de Farmacia de Soubeiran,

Diccionario de alteraciones y falsificaciones de Chevalier y Baudrimont, Vademecum de Ferrand.

Durante el largo período de 1.851 a 1.929 fue obligatorio el Codex francés, “para la confección de los preparados oficinales, hasta que estuviera organizado el Código Farmacéutico Brasileño”. Así determinaron todos los reglamentos sanitarios, entre ellos los de los Decretos n° 169 de 1.890; n° 1.172, de 1.892; n° 1.647, de 1.894; n° 2.449, de 1.897, cuya tabla de libros fue reducida al Codex francés y a los Formularios de Dorvault, Bouchardat, Chernoviz y Langaard; n° 2.458 de 1.897; 5.156 de 1.904; 14.189 y 14.354, de 1.920 (D. N. S. P.); 15.003, de 1.921 y 16.300, de 31-12-1923.

No obstante, el deseo de los farmacéuticos brasileños tener su propio Código Nacional fue manifestado en muchas oportunidades por los órganos científicos de clase. Varias comisiones fueron nombradas para su elaboración, sin resultado.

Fueron vanos los esfuerzos de Ezequiel Corrêa dos Santos, de Silva Costa, de Corrêa Dutra, Oliveira Fausto, Almeida Rego, Eugênio Marques de Hollanda, Eduardo Julio Janvrot y otros.

Solamente en 1.887, atendiendo a las solicitudes de los centros científicos nacionales, el Gobierno Imperial procuró resolver el problema, instituyendo una comisión, de la cual formaban parte, entre otros, Ezequiel Corrêa dos Santos Filho, Agostinho José de Souza Lima y Marques de Hollanda.

De esa comisión, sin embargo, nada práctico dio resultado, por suerte que, pasados diez años, en 1.897, el Ministro del Interior y Justicia, Amaro Cavalcanti, nombró otra comisión con la misma finalidad y de la cual formaban parte los profesores Agostinho de Souza Lima, César Diogo y Orlando Rangel. Fracasó también la nueva tentativa.

“Brasil, sin embargo, que siempre ha sabido tratar con las demás naciones civilizadas en todos los ramos de las ciencias, de las artes, etc., no podía continuar siendo regido, con respecto al ejercicio de la Farmacia, por un código extranjero, que, a pesar de que óptimo para su país, no satisfacía en absoluto a las nuevas necesidades”. “Por eso, a pesar de que reconociendo el arrojado de tal iniciativa, resolvimos llevar adelante la ardua tarea y alta responsabilidad de redactar nuestro futuro código farmacéutico, confiados en que nuestro gran amor a la profesión venciese todos los óbices, superase todos los obstáculos.” (\*) El Farmacéutico, en la ocasión además de nombre poco conocido, Rodolpho Albino Días da Silva, en 1.924, después de más de diez años de paciente trabajo, pudo presentar su proyecto de Farmacopea Brasileña al Dr. Carlos Chagas, Director General del Departamento Nacional de Salud Pública. Para juzgar ese trabajo, nombró el Dr. Chagas una comisión, constituida por los Profesores Doctores Antônio Pacheco Leão, Renato de Souza Lopes y Artidônio Pamplona, y Farmacéuticos Alfredo da Silva Moreira, José Malhado Filho y Isaac Werneck da Silva Santos.

Después de examen minucioso de la obra, esa Comisión resolvió aceptarla, solicitando del Gobierno su oficializa-

ción, como Código Nacional Farmacéutico, con la supresión, sin embargo, de ciertos artículos por ella considerados de uso restricto para ser oficializados, los cuales vienen enumerados en el prefacio de la primera edición.

El 4 de noviembre de 1.926, por el Decreto n° 17.509, firmado por el Presidente de la República, Dr. Arthur da Silva Bernardes, y por el Ministro de Interior y Justicia, Dr. Affonso Penna Junior, en los términos del artículo 252 del Decreto n.º 16.300, de 31 de diciembre de 1923, fue aprobada y adoptada como Código Farmacéutico Brasileño la Farmacopea Brasileña, elaborada por el Farmacéutico Rodolpho Albino Días da Silva, con las enmiendas de la comisión revisora. El Código entraría en vigor 60 días después de la publicación de la primera edición oficial, quedando su ejecución a cargo del Departamento Nacional de Salud Pública, por intermedio de la Insectoría de Fiscalización del Ejercicio de la Medicina. Ejecutó la obra, mediante competencia pública, la Compañía Editora Nacional, de São Paulo, que terminó su publicación en 1.929. Pasó a ser obligatoria la Farmacopea a partir del 15 de agosto de 1.929.

Al final, Brasil tenía su Farmacopea, obra de un sólo hombre, obra que era, en opinión de eminentes farmacólogos del mundo, uno de los más avanzados y actualizados códigos farmacéuticos de la época.

Rodolpho Albino, natural del Estado del Rio de Janeiro, nacido en la ciudad de Cantagalo, falleció prematuramente en Rio de Janeiro, a los 42 años de edad, el 7 de octubre de 1931.

Todos los códigos farmacéuticos son revistos periódicamente; y así, a fin de recopilar, coordinar y estudiar sugerencias, para proporcionar facilidades para una futura revisión, en 1.932, por propuesta hecha en una de las sesiones de la Asociación Brasileña de Farmacéuticos, fue nombrada una comisión para tal fin, con la presidencia del Prof. João Vicente de Souza Martins, que elaboró un reglamento interno, creando varias secciones. Esta comisión trabajó hasta 1.938, cuando el presidente de la Asociación Brasileña de Farmacéuticos, Prof. Virgílio Lucas, dirigió al Ministro de Educación y Salud el pedido de nombrar una comisión oficial para proceder a la revisión del nuestro Código, viendo ya que había bastante materia a estudiar y deliberar.

Esa Comisión, nombrada por la Ordenanza n° 1.21-A, del 23 de junio de 1.938, por el Ministro Gustavo Capanema, fue constituida por los siete miembros siguientes: Profs. Renato Guimarães de Souza Lopes, Oswaldo de Almeida Costa, Virgílio Lucas y Abel Elias de Oliveira; Farms. Antônio Caetano de Azevedo Coutinho y Oswaldo de Lazzarini Peckolt y médico Sebastião Duarte de Barros. Por la ordenanza n° 141, del 22 de abril de 1.939, la comisión fue aumentada con dos miembros, el Prof. Artidônio Pamplona y el Farm. José Eduardo Alves Filho.

Esa Comisión, a pesar de las dificultades encontradas, realizó alguna cosa útil, proponiendo exclusiones de drogas obsoletas e inclusiones de otras de mayor interés, conforme el informe presentado por el Farm. Oswaldo Peckolt al

Tercer Congreso Brasileño de Farmacia, reunido en Belo Horizonte, del 14 al 21 de abril de 1.939.

El Decreto n° 810, del 1 de julio de 1.942, que aprobó el Reglamento del Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina, imprimiendo nueva función a ese órgano, consideró dedicadas al mismo, bajo la presidencia del respectivo director, la Comisión de Biofarmacia y la de Revisión de la

Farmacopea; pasó entonces esta a ser constituida de un profesor de la Facultad Nacional de Farmacia o de otra a ella equiparada, un médico clínico, un biólogo del Instituto Oswaldo Cruz, un químico, un técnico de la industria farmacéutica y un farmacéutico del S.N.F.M.F.

En consecuencia, el Director General del Departamento Nacional de Salud, por la Ordenanza n° 136, del 11 de julio del mismo año, designó para esas funciones el Prof. Oswaldo de Almeida Costa, el médico Dr. Sebastião Duarte de Barros, el biólogo Dr. Gilberto Guimarães Vilela; el químico Farm. Oswaldo de Lazzarini Peckolt, el técnico Prof. Virgilio Lucas y el Farm. asistente Antônio Caetano de Azevedo Coutinho, funcionando en la presidencia el Director del Servicio, Dr. Roberval Cordeiro de Farias, y como Coordinador de los trabajos el Dr. Sebastião de Barros; posteriormente, el Dr. Gilberto Vilela fue sustituido, a pedido, por el también biólogo Dr. Tito Arcoverde de Albuquerque Cavalcanti, y el Farm. Caetano Coutinho, que se jubilaba del Servicio Público, tuvo como sustituto su colega, Farm. Flávio Frota, que pasó a ejercer funciones de secretario, de acuerdo con las disposiciones del reglamento.

La nueva Comisión, con la experiencia recogida de las comisiones anteriores y con la de su propia actividad, publicó el Primer Suplemento de la Farmacopea, puesto en vigor por la Ordenanza n° 42, de 2 de marzo de 1.943.

Siguieron los estudios, bien coordinados y con buen rendimiento, constituyendo el apareamiento del Segundo Suplemento y del Tercer Suplemento, aprobados, respectivamente, por las Resoluciones n° 24, de 14 de abril de 1.945, y n° 39, de 13 de junio de 1.950.

Esas publicaciones se presentaron muy interesantes, bajo varios aspectos, entre ellos la inclusión de drogas nacionales como sucedáneas de similares importadas, el registro de nuevas fórmulas y la sustitución, en otras, de sustancias extranjeras por nacionales, todo eso sin compromiso de las respectivas acciones terapéuticas.

El Reglamento Interno expresado en el Decreto n° 21.339, del 20 de junio de 1.946, y modificado por el Decreto n° 29.828, del 30 de julio de 1.951, teniendo por finalidad la organización y la competencia de los diversos órganos de salud pública, no alteró sustancialmente las disposiciones que habían sido establecidas anteriormente, continuando la Comisión a funcionar regularmente.

La Ordenanza n° 147, del 6 de noviembre de 1.951, aprobando las Instrucciones sugeridas por el Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina, de acuerdo con el Reglamento citado, y modificando la orientación hasta entonces

seguida, determinó el nombramiento, para la Comisión de Revisión de la Farmacopea y sus subcomisiones, de científicos de todo el país, especializados en las materias en estudio e incumbiendo de reeditar decenalmente la Farmacopea; transformó además el primitivo órgano en Comisión Ejecutiva, coordinadora y principal responsable de todos los trabajos.

Así fueron confirmados en la calidad de miembros de la Comisión Ejecutiva los antiguos componentes de la Comisión Revisora, ocurriendo posteriormente la sustitución del presidente, Dr. Roberval Cordeiro de Farias, por el Dr. Vasco Barcelosf y después por el Dr. Benoni Laurindo Ribas, que lo habían sucedido también en la Dirección del Servicio; asimismo, en los impedimentos ocasionales de los respectivos titulares, ocupó la presidencia el Dr. Luiz Salgado Lima Filho, que posteriormente pasó a ser su presidente efectivo.

Fueron entonces escogidos los miembros de las subcomisiones técnicas, recayendo la preferencia en profesionales de Rio y de los Estados, farmacéuticos, médicos, químicos y profesores, siendo después aumentado el número, en virtud de ulteriores designaciones.

Las subcomisiones, en número de 10, quedaron así organizadas: Inclusiones, Exclusiones y Posología; Farmacognosia; Química Orgánica; Química Inorgánica; Farmacia Galénica; Ensayos Biológicos, Hormonas y Vitaminas; Sueros, Vacunas, Antibióticos y Esterilización; Generalidades, Ensayos, Reactivos y Tablas; Planeamiento General; Redacción; teniendo como coordinadores, respectivamente, el Dr. Sebastião de Barros, de la primera, séptima, novena y décima; Prof. Oswaldo Costa, de la segunda y cuarta; Farm. Oswaldo Peckolt, de la tercera y octava; Prof. Virgilio Lucas, de la quinta, y Dr. Tito Cavalcanti, de la sexta.

En esa misma oportunidad fueron criadas Comisiones Regionales en los Estados de Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul y São Paulo.

En este Estado los trabajos tuvieron gran impulso, por haber sido en su Capital instalada, para fines idénticos, una Comisión de Estandarización Farmacéutica, por común acuerdo entre el Instituto Adolfo Lutz, la Universidad de S. Paulo, la Fiscalización del Ejercicio Profesional y las asociaciones estaduais representativas de la industria y del comercio de la Farmacia, integrándola las figuras de mayor evidencia de medios científicos de aquella unidad de la Federación, donde el Dr. Ariosto Büller Souto y el Farm. Júlio Sauerbronn de Toledo son presidente y secretario, respectivamente.

Cuando se reunió, en la ciudad de São Paulo, el V Congreso Brasileño de Farmacia, conjuntamente con el III Congreso Farmacéutico y Bioquímico Panamericano, del 1 al 8 de diciembre de 1954, la contribución paulista se concretizó en un anteproyecto de la Farmacopea, presentado a aquel certamen, siendo dados nuevos rumbos a los trabajos.

El Congreso, ratificando moción aprobada en el III Congreso Brasileño de Farmacia, realizado en Belo Horizonte del 14 al 21 de abril de 1.939, y el voto expreso en el II



Congreso Farmacéutico y Bioquímico Panamericano, llevado a cabo en Lima del 1 al 8 de diciembre de 1.951, recomendó la organización de un Formulario Nacional, como unidad complementaria, del cual pasarían a constar las drogas y los medicamentos de empleo usual que no constasen de la Farmacopea.

De los debates realizados resultó la deliberación de examen en conjunto, por las comisiones de Rio y de São Paulo, de todo el material de estudio hasta entonces reunido, para posibilitar el término de la revisión en corto plazo.

Encerrado el V Congreso, fue organizada nueva subcomisión técnica de Planeamiento y Revisión, así constituida: Antônio Caetano de Azeredo Coutinho, Flávio Frota, Militino Cesário Rosa, Oswaldo de Almeida Costa, Oswaldo de Lazzarini Peckolt, Tito Arcoverde de Albuquerque Cavalcanti, Virgílio Lucas y Sebastião Duarte de Barros, de Rio; Ariosto Büller Souto, Cendy de Castro Guimarães, Germínio Nazário, Henrique Tastaldi, Hércules Vieira de Campos, Quintino Mingoja, Richard Wasicky y Júlio Sauerbronn de Toledo, de São Paulo, ejerciendo las funciones de coordinador el Dr. Sebastião Duarte de Barros y continuando en la presidencia el Dr. Benoni Ribas. Meses después, los Drs. Oswaldo de Almeida Costa y Tito Arcoverde de Albuquerque Cavalcanti cedieron sus lugares a los Profesores Jayme Pecegueiro Gomes de la Cruz y Raymundo Moniz de Aragão, temporariamente sustituido por el Almirante Vicente de Paulo Castilho.

Con la vuelta del Dr. Moniz de Aragão coincidió la inclusión en el órgano paritario de cuatro elementos más: el Prof. Carlos Henrique R. Liberalli y el Farm. Vicente Ferreira Grecof, de São Paulo, y el Prof. Abel Elias de Oliveira y el Alm. Farm. Vicente de Paulo Castilho, de Rio.

En esa época, el Dr. Sebastião de Barros, que continuó integrando el grupo del Rio, dejó el cargo de coordinador, siendo sucedido por el Farm. Oswaldo de Lazzarini Peckolt y, por último, por el Farm. Flávio Frota.

De los trabajos de esta subcomisión, realizados en Rio y en São Paulo, resultó ser posible presentar, el 1º de septiembre de 1.955, al Ministro de Salud, Dr. Aramis Athayde, la 2a edición de la Farmacopea, en sus originales, siendo en la misma fecha firmado por el Presidente de la República, Dr. João Café Filho, el Decreto n° 37.843 del 1º de septiembre de 1.955 que la oficializó.

A través del Dr. Luiz Salgado Lima Filho, el Ministro de la Salud Mano Pinotti presentó al Presidente de la República, Dr. Juscelino Kubitschek, decreto con nuevas inclusiones y modificaciones y que tornó obligatoria la Farmacopea en las farmacias, laboratorios industriales farmacéuticos y establecimientos congéneres. Éste decreto tomó el n° 45.502 del 27 de febrero de 1959.

Aquí se encuentran la codificación de los fármacos y fórmulas de actualidad, la normalización de las técnicas empleadas en las diversas prácticas farmacéuticas, la estandarización de los métodos, ensayos, reactivos y tablas, necesarios al ejercicio profesional.

De la primera edición mucho se aprovechó, tan sabiamente fue ella redactada; numerosas monografías de ella retiradas pasarán a constar del *Formulario Nacional*, cuya realización ya se encuentra en fase de conclusión, esperándose su publicación en corto plazo, como segundo volumen del Código Farmacéutico Brasileño.

(\*) Rodolpho Albino Dias da Silva – Farmacopea de Brasil- Prefacio, pág. VIII, 1a edición, 1.929.

† Fallecido.

## HISTÓRICO DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 3a EDICIÓN

La importancia de las farmacopeas – así considerados los códigos oficiales, u oficialmente reconocidos, donde se establecen la identificación y los estándares de calidad de las sustancias empleadas en farmacología – crece en la proporción del desarrollo cultural de la Farmacia y de la Medicina.

Consignada su primera existencia en el siglo III de nuestra Era, fue desde mediados del siglo pasado que las farmacopeas ganaron nítidas características de necesidad nacional, manifestando el esfuerzo del ajuste de los recursos de identificación y control de las sustancias terapéuticas a la naturaleza regional de los propios fármacos, por lo que, en su gran mayoría, venían de la flora, usualmente nativa y local, de órganos animales, y de los minerales admitidos como propios para fines terapéuticos.

Caudatario de Portugal en la ciencia y en la técnica, nuestro País se sujetó, al tiempo de la Colonia, a la Farmacopea General para el Reino y Dominios, de Portugal, editada en 1.794.

Con la Independencia del Brasil, en 1.822, hubo aberturas para otras influencias culturales, y con facilidad nuestro País se perfiló a la orientación francesa, prevalente en la época para el mundo occidental. Tanto así que, en 1.851, por Decreto, fue establecida la obligatoriedad de la Farmacopea Francesa como código oficial para Brasil.

De 1.851 a 1.929 toda la legislación sanitaria brasileña sustentó la misma obligatoriedad “para la confección de los preparados oficinales, hasta que estuviera organizado el Código Farmacéutico Brasileño”.

Quince de agosto de 1.929 fue el marco de esa redención, por lo que a partir de aquella fecha entró en vigor la Farmacopea de Brasil, en todo el territorio nacional, conquista ampliamente festejada, además porque se exaltaba también el gran responsable de la misma, el extraordinario farmacéutico Rodolfo Albino Dias da Silva, que “consumió doce años enteros, en una labor silenciosa y benedictino, en la composición de las páginas iluminadas de saber que tuvieron que erigirse en breviario para los de su grey, tan armonioso a punto de incluirsele como uno de los mejores entre los coetáneos, a pesar de que debido a la competencia de artífice único, hecho difícil de ser repetido”.

Cuanto más de la historia de los códigos farmacéuticos, la 2a edición de la Farmacopea Brasileira constituye repositorio de mérito irrefutable, hasta el tiempo de aquella edición, motivo plausible para no entrar en detalles ya conocidos.

Es propio de las Farmacopeas, por mejor que sean elaboradas, su revisión periódica, natural característica derivado de la evolución de la Farmacología.

De ahí porque el Decreto Federal n° 45.502, del 27 de febrero de 1959, al aprobar la Segunda Edición de la Farmacopea Brasileira, ya fijaba su revisión cada diez años, independiente de las ediciones intermediarias de Suplementos.

Tanto así que la 13 de Junio de 1962, mediante Ordenanza n° 82 del Departamento Nacional de Salud; una primera comisión fue constituida para los trabajos de revisión, para ella nombrados los Drs. Fernando Luz Filho, Lauro Sollero, Maria Alzira Ferreira Nobrega, Laerte Manhães de Andrade, Anésio Faria e Souza, Mário Victor de Assis Pacheco, Nilson dos Reis Rodrigues, y Elza Magalhães Pécego como Secretaria. Los trabajos de esa comisión quedaron asignados a providencias preliminares, provocando que en 16.4.68, por la Ordenanza n° 28 del Departamento Nacional de Salud, una nueva comisión fuese constituida, de ella constando los Drs. Lúcio Costa, Maria Alzira Ferreira Nobrega, Lauro Sollero, Gobert de Araújo Costa, Emilio Diniz da Silva, João Haikal Heló y Anibal de la Rocha Nogueira Júnior, y Josepha Paul como Secretaria, con desarrollo de trabajo semejante al de la comisión anterior.

La Ordenanza Ministerial n° 112 de 20 de marzo de 1972 creó un grupo de trabajo, compuesto por los Drs. Evaldo de Oliveira, Moacir Nogueira, Caio Romero Cavalcante y Ten. Cel. Farm. Ej. Júlio Fernandes Silva, este grupo fijó algunas bases de trabajo, descontinuados hacia razones aleatorias y contingentes.

Finalmente, la 25 de junio de 1975, por fuerza de la Ordenanza Ministerial n° 266, fue constituida una nueva Comisión de Revisión de la Farmacopea, de ella participando los Drs. Fernando Ayres de la Cunha, Director del Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina y Farmacia, y Presidente de la Comisión, Ítalo Suassuna, Maria Alzira Ferreira Nobrega, Evaldo de Oliveira, José Aleixo Prates y Silva, Lauro Sollero, Paulo Días da Costa y, como Secretaria, Dora Alves Gonçalves Cruz.

Dispuesta, desde el inicio de los trabajos, a concluir su misión en corto plazo, la Comisión, reunida por la primera vez el 5 de agosto de 1975, decidió promover reuniones semanales en la sede del Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina y Farmacia, Rio de Janeiro.

En principio, se abstuvo de constituir subcomisiones, optando por la solicitud de colaboradores especiales para los asuntos en que la propia Comisión se juzgaba incapaz o insuficientemente segura para decidir.

Con esta orientación, las etapas fueron superadas paulatinamente, y ganando celeridad a la medida en que los problemas se delineaban más claros.

En la imposibilidad material y técnica de resolver todos los problemas, la Comisión se valió de la experiencia de otras comisiones y Órganos Técnicos, y de Farmacopeas, marcadamente en lo que respectaba a las orientaciones de la Organización Mundial de la Salud. Aceptó, también, oportunamente, el apoyo del Consejo Federal de Farmacia que, para una colaboración más integrada, montó todo un dispositivo técnico de servicio permanente, facilitando las diversas etapas del trabajo. Desde la reevaluación del listado primitivo de las monografías, buscando actualizarlas, al máximo esfuerzo de alcanzar unidad en la redacción y técnica a las colaboraciones provenientes de relatores de todos los rincones del País, además de las traducciones.

Es de mucha pertinencia resaltar el significado de que la colaboración profesional para relatar: monografías representó un movimiento de sentido nacional, acudiendo a adhesiones de todos los cuadrantes del País.

De ese esfuerzo conjunto – Ministerio de Salud (por el Servicio Nacional de Fiscalización de la Medicina y Farmacia), Comisión de Revisión de la Farmacopea (por el espíritu de equipo presente en todos las etapas de trabajo), Consejo Federal de Farmacia (que favoreció infraestructura material y humana para imprimir velocidad al trabajo) y relatores – fue posible vencer el desafío inicial de conquistar aprobación de los originales en el evento del cincuentenario de la 1a edición de la Farmacopea Brasileira.

La fijación de esa fecha, sobre ser justo homenaje, pasó a configurar un plazo imposible de ser prorrogado, otorgándole a todo el trabajo, por consecuencia, clima favorable y dinámico, exigente de objetividad.

Tenemos, al final, que de las 770 monografías constantes de la 2a edición subsistieron 280, mediante revisión de su texto, siendo que para tanto de mucho valieron años observaciones publicadas por el Prof. Dr. João Haikal Helou. Fueron incorporadas 205 nuevas monografías, naturalmente aquellas que representan nuevos agentes terapéuticos, atendidas las normativas fijadas por la Comisión y ya referidas en el Prefacio de esta edición.

Se admite que tal vez pudiesen entrar otras monografías; se admite, por igual, que algunas no entrasen más. Pero será preciso tener; presente que la Comisión adoptó criterios propios, sujetos a la realidad nosológica y a la terapéutica nacional. Estos criterios, y no las monografías podrán suscitar pertinencias o no. Naturalmente, la Comisión es única y exclusiva responsable de los mismos, sin compartir con otros los méritos o desventajas de su orientación.

De máxima relevancia, a tener en cuenta, es el hecho que, de acuerdo con los términos del acto que aprobó la 3a edición, las monografías anteriores, no expresamente canceladas en esta Farmacopea, subsisten con validez para todos los efectos legales.

Se admite, finalmente, que no se ignora la tendencia universal de integrar farmacopea y formulario en un sólo texto. Tentada desde luego a eso, la Comisión, decidió, no obs-

tante, optar por un trabajo dividido, dispuesta a elaborar, a continuación, el Formulario Nacional. Además así, esta segunda providencia nada más representará el despliegue de un trabajo que se busca unificar en la etapa subsiguiente a la elaboración del Formulario, y que se pretende, efectivamente cumplir.

#### HISTÓRICO DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA, 4ª EDICIÓN

“Son de naturaleza efímera los libros de esta orden, destinados a mostrar uno de los lados de la farmacología, ciencia que va a recorrer actualmente la fase más acelerada de su evolución”. SOUZA MARTINS, in Informe de Introducción de la 3a edición de la Farmacopea Portuguesa, 1876.

El vocablo Farmacopea proviene de la junta de dos términos griegos, a saber, φαρμακον = medicamento o veneno, y ποιός = fabricante y fabricación. Las Farmacopeas constituyen códigos farmacéuticos oficiales u oficialmente adoptados, en los cuales se establecen la identificación, los estándares de calidad y los métodos de análisis de los fármacos en uso. Existentes desde el siglo III, los primeros compendios eran de carácter regional, pues los fármacos de entonces eran provenientes de órganos de animales, de minerales y, sobretodo, de la flora local y nativa. Algunos llegaron a ser oficializados, a pesar de que en carácter regional, como, por ejemplo, el formulario de la Escuela de Salerno – *Régimen Sanitatis*, de 1066, adoptado en 1240 por Frederico II, Rey de las Dos Sicilias. Los intentos iniciados individualmente por diversos autores en el sentido de unificar la descripción e identificación de los fármacos más importantes datan del final del siglo XVII, y del siglo XVIII. Entre otras obras, merecen citación la *Farmacopea Internationalis* de Lémery (1690), las Farmacopeas de James (1747), de De Quincy (1758), de Triller (1764) y, especialmente, la *Farmacopea Universalis*, de Jourdan (1828), que juntaba datos de casi 50 Farmacopeas y compendios diferentes. Ninguno de estos trabajos, no obstante, tenía carácter oficial.

Las Farmacopeas nacionales, de carácter oficial y adopción obligatoria, comienzan a surgir al final del siglo XVIII e inicio del siglo XIX. Así, fueron publicadas las primeras ediciones de las Farmacopeas, portuguesa (1794), holandesa (1805), francesa (1818) y americana (1820).

Brasil Colonia adoptaba la *Pharmacopéia General para el Reino y Dominios de Portugal*, de 1794, cuya autoría es atribuida a Francisco Tavares, profesor de la Universidad de Coimbra.

Con la Independencia, Brasil se vuelca a la orientación cultural francesa y, en el campo de la Farmacia, el *Codex Medicamentarius* francés adquiere fuerza legal. El Reglamento de la Junta de Higiene Pública, mandado a ejecutar por el Decreto 828 del 29/09/1851, sin especificar cual la Farmacopea a ser cumplida, establece lista de libros que las farmacias debían tener, constando en ella, entre otros, la Farmacopea Portuguesa de 1794, el *Codex Francés* y el *Código Farmacéutico Lusitano*, de la autoría de Agostinho Albano de la Silveira Pinto, cuya primera edición fue pu-

blicada en 1835 y hoy considerada como la 2a edición de la *Farmacopea Portuguesa*.

Ya el Decreto 8.387 del 19/01/1882 establece textualmente: “para la preparación de los remedios oficiales se seguirá la Farmacopea francesa, hasta que esté compuesta una Farmacopea brasileña...”, situación que iría perdurar hasta 1926, cuando el Decreto 17.509 del 04/11/1926 aprobó la primera Farmacopea Brasileña, de autoría de Rodolpho Albino Días da Silva, tornada obligatoria a partir del 15 de agosto de 1929.

La primera edición de la Farmacopea Brasileña se comparaba con las Farmacopeas de la época, de los países más desarrollados, revelándose notable por la precisión de las monografías y, sobretodo, por el gran número de inclusiones de fármacos obtenidos de la flora brasileña, no existentes en ninguna otra Farmacopea.

La constante evolución de la farmacología, la introducción de nuevos fármacos en la terapéutica, el surgimiento de nuevos métodos de análisis, más modernos y precisos, y la necesidad de especificaciones actualizadas para el control de materia prima y productos farmacéuticos son factores fundamentales determinantes de la obsolescencia de los códigos farmacéuticos y de la necesidad de revisarlos y actualizarlos periódicamente. El Decreto que aprobó la primera edición de la Farmacopea Brasileña fue omiso en cuanto a las revisiones; así, la segunda edición vino casi 30 años después de la primera y representó cinco años de trabajo de diez subcomisiones especializadas. La 2a edición incorporó las adquisiciones derivadas de la propia actualización de la farmacología. No consiguió, a pesar de ello, ser más rica y precisa que la primera edición, fruto de un sólo autor. El Decreto Federal 45.502 del 27/02/1959, al aprobar la 2a edición de la Farmacopea Brasileña, fijó su revisión cada diez años. Infelizmente, problemas diversos no permitieron el cumplimiento de ese Decreto. Más de 15 años pasaron, hasta que se elaborara una nueva edición.

Así es que, el 25 de noviembre de 1976, fue oficializada, por el Decreto 78.840, la tercera edición de la Farmacopea Brasileña. El mismo Decreto fijó en cinco años el plazo para su revisión. Realizada en tiempo determinado y muy corto, tarea posible de llevar a término solamente gracias al apoyo del Consejo Federal de Farmacia, la obra despertó sensibles manifestaciones de la comunidad técnico científica, que recomiendan rápida revisión de su texto, independiente del dispositivo legal.

Así, la 4a edición surge con algún atraso. Se busca, en esta edición, sanar las deficiencias de la anterior. Se buscó, también, adoptar métodos modernos de análisis, compatibles, sin embargo, con la realidad nacional. La publicación de esta parte y la adopción de una nueva sistemática de presentación que posibilita su continua actualización a través de revisiones permanentes son las metas prioritarias que la Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña se propone alcanzar.



# 3 FARMACOPEA BRASILEÑA

## PRESIDENTES DE LAS EDICIONES ANTERIORES DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA

RODOLPHO ALBINO DÍAS DA SILVA	1a edición
LUIZ SALGADO LIMA FILHO	2a edición
FERNANDO AYRES CUNHA	3a edición
JOÃO GILVAN ROCHA	4a edición – Parte I
CELSO FIGUEIREDO BITTENCOURT	4a edición – Parte II

## COMISIÓN DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA – CFB

### PRESIDENTE

GERSON ANTÔNIO PIANETTI

### VICEPRESIDENTE

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE

### MIEMBROS

ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO  
Universidade Federal de Sergipe – UFS

ANTONIO CARLOS DA COSTA BEZERRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE  
Universidade Federal de Goiás – UFG

EDUARDO LLAVES LEAL  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud – INCQS / FIOCRUZ

ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

GERSON ANTÔNIO PIANETTI  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO  
Consejo Federal de Farmacia – CFF

JOSÉ CARLOS TAVARES  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

KÁTIA REGINA TORRES  
Ministério da Saúde – MS

LAURO DOMINGOS MORETTO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en el Estado de São Paulo – Sindusfarma

LEANDRO MACHADO ROCHA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

LUIZ ALBERTO LIRA SOARES  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ONÉSIMO ÁZARA PEREIRA  
Asociación Brasileira de la Industria Farmoquímica y de Insumos Farmacéuticos – ABIQUIFI

SILVANA TERESA LACERDA JALES  
Asociación de los Laboratorios Farmacéuticos Oficiales del Brasil – ALFOB

VLADI OLGA CONSIGLIERI  
Universidade de São Paulo – USP

### **COORDINACIÓN DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA**

#### **AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – Anvisa**

ANTONIO CARLOS DA COSTA BEZERRA – Coordinador

Especialistas en Regulación y Vigilancia Sanitaria

ANDREA REZENDE DE OLIVEIRA

JAIMARA AZEVEDO OLIVEIRA

MARIA LÚCIA SILVEIRA MALTA DE ALENCAR

SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS

#### **COMITÉS TÉCNICOS TEMÁTICOS DE LA COMISIÓN DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA – CTT**

##### **APOYO A LA POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINALES Y FITOTERÁPICOS**

JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO – Coordinador  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

ANA CECÍLIA BEZERRA CARVALHO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

ANA CLAUDIA FERNANDES AMARAL  
Instituto de Tecnología de Fármacos – Farmanguinhos /  
FIOCRUZ

ANA MARIA SOARES PEREIRA  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP

BERTA MARIA HEINZMANN  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ELFRIEDE MARIANNE BACCHI  
Universidade de São Paulo – USP

EMIDIO VASCONCELOS LEITÃO DE LA CUNHA  
Universidade Estadual de Campina Grande – UECG

LUIZ ANTÔNIO BATISTA DA COSTA  
Centro de Excelencia en Salud Integral de Paraná –  
CESIP

NILTON LUZ NETTO JÚNIOR  
Universidade Católica de Brasília – UCB

ROSANE MARIA SILVA ALVES  
Ministério da Saúde – MS

WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA  
Universidade Federal del Pará – UFPA

##### **RELACIONADOS A MEDICAMENTOS**

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO –  
Coordinadora  
Universidade de São Paulo – USP

ADRIANA BUGNO  
Instituto Adolfo Lutz – IAL

ALBA VALÉRIA DOS SANTOS  
Baxter Hospitalar Ltda

DHALIA GUTEMBERG  
Cámara Brasileira de Diagnóstico Laboratorial – CBDL

IRENE SATIKO KIKUCHI Universidade de São Paulo –  
USP

MICHELE FEITOSA SILVA  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

RENATA ARACELLI PIRES  
Baxter Hospitalar Ltda

WALFREDO DA SILVA CALMON  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

##### **DENOMINACIONES COMUNES BRASILEÑAS**

AULUS CONRADO BASILE – Coordinador  
Universidade de São Paulo – USP



CARLOS CÉZAR FLORES VIDOTTI  
Consejo Federal de Farmacia – CFF

ELFRIEDE MARIANNE BACCHI  
Universidade de São Paulo – USP

ONÉSIMO ÁZARA PEREIRA  
Asociación Brasileña de la Industria Farmoquímica y de  
Insumos Farmacéuticos – ABIQUIFI

PAULO CHANEL DEODATO DE FREITAS  
Universidade de São Paulo – USP

RICARDO CHIAPPA  
Unión Educacional del Planalto Central – UNIPLAC

ROSANA MIGUEL MESSIAS MASTELARO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS Agência Nacional  
de Vigilância Sanitária – Anvisa

### **EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA Y BIOEQUIVALENCIA DE MEDICAMENTOS**

SÍLVIA STORPIRTIS – Coordinadora  
Universidade de São Paulo – USP

CHANG CHIANN  
Universidade de São Paulo – USP

GERSON ANTÔNIO PIANETTI  
Universidade Federal Minas Gerais – UFMG

JACQUELINE DE SOUZA Universidade Federal de  
Ouro Preto – UFOP

LEONARDO DE SOUZA TEIXEIRA  
Instituto de Ciencias Farmacéuticas de Estudios y  
Investigaciones – ICF

RAQUEL LIMA Y SILVA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RODRIGO CRISTOFOLETTI  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SOLANGE MARIA COUTINHO BRANDÃO  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

### **ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS**

ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL –  
Coordinadora  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ANIL KUMAR SINGH  
Universidade de São Paulo – USP

HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

JAIR CALIXTO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

LUCIANE VARINI LAPORTA  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

MÓNICA DA LUZ CARVALHO SOARES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

NADIA MARIA VOLPATO  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

RUTH RIESINGER STRATTMANN  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

### **EXCIPIENTES Y ADYUVANTES**

PEDRO JOSÉ ROLIM NETO – Coordinador  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ÁDLEY ANTONINI NEVES DE LIMA Universidade  
Federal del Amazonas – UFAM

FABIANA CREMASCHI PALMA  
Asociación Brasileña de los Distribuidores y Importadores  
de Insumos Farmacéuticos, Cosméticos, Veterinarios,  
Alimenticios y Aditivos – ABRIFAR

FABRICIO CARNEIRO DE OLIVEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

GABRIELA GONÇALVES DA SILVA  
Asociación Brasileña de los Distribuidores y Importadores  
de Insumos Farmacéuticos, Cosméticos, Veterinarios,  
Alimenticios y Aditivos – ABRIFAR

GEISIANE MARIA ALVES PRESMICH  
Laboratorio Industrial Farmacéutico de Alagoas – LIFAL

JOSÉ LAMARTINE SOARES SOBRINHO  
Universidade Federal del Piauí – UFPI

ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA Universidade  
Federal del Pará – UFPA

### **FARMACOGNOSIA**

AMÉLIA TERESINHA HENRIQUES – Coordinadora  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CID AIMBIRÉ DE MORAES SANTOS  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

EVELIN ELFRIEDE BALBINO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JOSÉ ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI (*Ad hoc*)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LILIAN AULER MENTZ  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LUIZ ALBERTO LIRA SOARES  
Universidade Federal del Río Grande del Norte – UFRN

MARIA DE LAS GRAÇAS LINS BRANDÃO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

TATIANE PEREIRA DE SOUZA  
Universidade Federal del Amazonas – UFAM

### GASES MEDICINAIS

ALAÍDE ALINE XAVIER LEAL – Coordenadora  
Instituto de Tecnologia en Imunobiológicos – Bio  
Manguinhos FIOCRUZ

CRISTIANE RODRIGUES AUGUSTO  
Instituto Nacional de Metrología, Normatización y  
Calidad Industrial – INMETRO

DESIRÉE MICHELS CORTEZ  
Linde Gases Ltda.

HEITOR CONRADO  
Air Liquide del Brasil Ltda

JOÃO PAULO SILVÉRIO PERFECTO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

KOICHI MIZUTA  
Instituto de Investigaciones Tecnológicas del Estado de  
São Paulo – IPTSP

SÁLVIO FILGUEIRAS  
Linde Gases Ltda.

### HEMOCOMPONENTES Y HEMODERIVADOS

JÚLIO CÉSAR CARESTIATO – Coordinador  
Universidade Federal Fluminense – UFF

DENISE FERREIRA LEITE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

HELDER TEIXEIRA MELO  
Ministério da Saúde – MS

JANAÍNA DUQUE DE SOUZA  
Bio Manguinhos – FIOCRUZ

MARISA COELHO ADATI  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

MELÂNIA DE FÁTIMA CORDELINO  
Baxter Hospitalar Ltda

NEEMIAS SILVA DE ANDRADE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SEVERINO BARBOSA  
Universidade Federal del Pernambuco – UFPE

### HOMEOPATIA

LEANDRO MACHADO ROCHA – Coordinador  
Universidade Federal Fluminense – UFF

BIANCA RODRIGUES DE OLIVEIRA (*Ad hoc*)  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

CARLA HOLANDINO QUARESMA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

EZEQUIEL PAULO VIRIATO  
Laboratorio Homeopático Almeida Prado Ltda

FRANCISCO JOSÉ DE FREITAS  
Universidade Federal de Río de Janeiro – UFRJ

MARCELO CAMILO MORERA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARIA DIANA CERQUEIRA SALES  
Facultad Brasileña – UNIVIX

RICARDO CHIAPPA  
Unión Educacional del Planalto Central – UNIPLAC

RINALDO FERREIRA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

### INGREDIENTES FARMACÉUTICOS ACTIVOS

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE – Coordenadora  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ADRIANO ANTUNES SOUZA DE ARAÚJO  
Universidade Federal de Sergipe – UFS

ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

DANIEL KARL RESENDE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LÚCIA DE FÁTIMA FRANCELINO DA SILVA  
Laboratorio Central de Salud Pública de Pernambuco –  
LACEN



SAID GONÇALVES DE LA CRUZ FONSECA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

SEVERINO GRANJEIRO JÚNIOR  
Laboratório Farmacéutico del Estado de Pernambuco –  
LAFEPE

TÉRCIO PASCHKE OPPE  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

### MARCADORES PARA FITOTERÁPICOS

JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO – Coordinador  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

CECÍLIA ELENA DE FIGUEIREDO OGNIBENE  
Asociación de los Laboratorios Farmacéuticos Nacionales  
– ALANAC

FERNÃO CASTRO BRAGA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

MARIA DEL CARMO VASQUES GARCIA  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

VALQUIRIA LINCK BASSANI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

VALDIR FLORÊNCIO DE LA VEIGA JUNIOR  
Universidade Federal Amazonas – UFAM

SILVIA PAREDES FUENTES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

### MICROBIOLOGIA

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE –  
Coordinadora  
Universidade Federal de Goiás – UFG

ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

CLAUDIO KIYOSHI HIRAI  
Biolab Sanus Farmacéutica Ltda

MARTIN STEPPE  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MIRION DE FÁTIMA VIANNA LEONEL  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

ROSEMARIE APARECIDA DE ARAÚJO BONATTO  
Merck Sharp & Dohme Farmacéutica Ltda

SILÉSIA DE SOUZA AMORIM  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO  
Universidade de São Paulo – USP

### NORMATIZACIÓN DE TEXTOS Y IDENTIDAD VISUAL DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA

ANTÔNIO BASÍLIO PEREIRA – Coordinador  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

ISABELA DA COSTA CÉSAR  
Instituto de Ciencias Farmacéuticas de Estudios y  
Investigaciones – ICF

JOSÉ ANTÔNIO DE AQUINO RIBEIRO  
Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria –  
EMBRAPA

LAÍS SANTANA DANTAS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

### PRODUCTOS BIOLÓGICOS

EDUARDO LLAVES LEAL – Coordinador  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

DANIELA MARRECO CERQUEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DARCY AKEMI HOKAMA  
Instituto de Tecnología en Inmunobiológicos – Bio  
Manguinhos FIOCRUZ

HISAKO GONDO HIGASHI  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

LILIA RIBEIRO SERÓDIO  
Instituto Vital Brazil – IVB

MARA EL-CORAB MOREIRA DE OLIVEIRA  
Ministério da Saúde – MS

MARCO ANTONIO STEPHANO  
Universidade de São Paulo – USP

ORLANDO SILVA  
Serono Productos Farmacéuticos Ltda.

### PRODUCTOS MAGISTRALES Y OFICINAIS

VLADI OLGA CONSIGLIERI – Coordinadora  
Universidade de São Paulo – USP

ELISABETE PEREIRA DOS SANTOS  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA BATISTUZZO  
Facultades Oswaldo Cruz

LETÍCIA NORMA CARPENTIERI RODRIGUES  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

GUILHERME DINIZ TAVARES  
Universidade de São Paulo – USP

MÁRCIA MACIEL ANTUNES  
Farmacia de Manipulación de Cosméticos Ltda – FACIAL

PATRICIA HAUSCHILDT DE OLIVEIRA MENDES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

PAULA RENATA APARECIDA NIGRO RIVERA  
CARAZZATTO  
Asociación Nacional de Farmacéuticos Magistrales –  
ANFARMAG

ROBERTO PONTAROLO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

### **RADIOFÁRMACOS**

ELOY JULIUS GARCIA – Coordinador  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

ANA MARIA SILVEIRA BRAGHIROLI  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN

ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

LUIZ CLÁUDIO MARTINS ALEIXO  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN

MARYANGELA REZENDE MASCARENHAS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARYCEL ROSA FELISA FIGOLS DE BARBOSA  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

NEUZA TAEKO OKASAKI FUKUMORI  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

RALPH SANTOS OLIVEIRA  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN

### **SUSTANCIA QUÍMICA DE REFERENCIA**

PEDRO EDUARDO FROEHLICH – Coordinador  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

JAIMARA AZEVEDO OLIVEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARIA ALICE BOCKELMANN  
Cristália Productos Químicos Farmacéuticos Ltda

MARIA DEL CARMO VASQUES GARCIA  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

RENATA BARBOSA DE OLIVEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

VALÉRIA PEREIRA DE SOUSA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

### **COLABORADORES DE LA 5ª EDICIÓN DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA**

ADILSON SARTORATTO  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

ÁDLEY ANTONINI NEVES DE LIMA  
Universidade Federal del Amazonas – UFAM

ADRIANA BUGNO  
Instituto Adolfo Lutz – IAL

ADRIANA DA SILVA SANTOS DE OLIVEIRA  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

ADRIANA PASSOS OLIVEIRA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

ADRIANO ANTUNES SOUZA DE ARAÚJO  
Universidade Federal de Sergipe – UFS

ALÁIDE ALINE XAVIER LEAL  
Instituto de Tecnología en Inmunobiológicos – Bio-  
Manguinhos / FIOCRUZ

ALBA VALÉRIA SANTOS  
Baxter Hospitalar Ltda

ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

ALICE SIMON  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

ALINE LIMA HERMES MÜLLER  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ALLAN WEBERLING MATOS  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

AMADEU CARDOSO JUNIOR  
Universidade Federal Fluminense – UFF

AMANDA THOMAS BARDEN  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

AMARILIS SCREMIN PAULINO  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

- AMÉLIA TERESINHA HENRIQUES  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
- ANA CAROLINA ZAVAREZI  
Universidade Federal Fluminense – UFF
- ANA CECÍLIA BEZERRA CARVALHO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
- ANA CLAUDIA FERNANDES AMARAL  
Instituto de Tecnologia de Fármacos – Farmanguinhos / FIOCRUZ
- ANA CRISTINA REGIS DE BARROS CORREA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
- ANA ELISA DE OLIVEIRA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI
- ANA GABRIELA REIS SOLANO  
Universidade Federal de São João Del Rey – UFSJ
- ANA LAURA ESCARRONE  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM
- ANA LÚCIA ABOY  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
- ANA MARIA BERGOLD  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
- ANA MARIA SILVEIRA BRAGHIROLI  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN
- ANA MARIA SOARES PEREIRA  
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP
- ANDRÉ AUGUSTO GOMES FARACO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
- ANDRÉ LIMA DE OLIVEIRA COSTA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
- ANDRÉ LUIS GEMAL  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud – INCQS / FIOCRUZ
- ANDREA REZENDE DE OLIVEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
- ANDREJUS KOROLKOVAS (*In memoriam*)  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña – 4a edición
- ANDRESSA BLAINSKI  
Universidade Estadual de Maringá – UEM
- ANDRESSA DALMAS NARVAEZ  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS
- ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDAD  
Universidade Federal de Paraná – UFPR
- ANGELICA GARCIA COUTO  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI
- ANGELO JOSÉ COLOMBO  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña – 4a edición
- ANIL KUMAR SINGH  
Universidade de São Paulo – USP
- ANNA KAROLINA PASTOREK  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
- ANTÓNIA MARIA CAVALCANTI DE OLIVEIRA  
Universidade Federal Fluminense – UFF
- ANTÔNIO BASÍLIO PEREIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
- ANTÔNIO CARLOS DA COSTA BEZERRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
- ARMANDO DA SILVA CUNHA JÚNIOR  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
- ARTHUR LUIZ CORREA  
Universidade Federal Fluminense – UFF
- ATANA MPALANTINOS DA SILVA  
Universidade Federal Fluminense – UFF
- AULUS CONRADO BASILE  
Universidade de São Paulo – USP
- ÁUREA SILVEIRA CRUZ  
Instituto Adolfo Lutz – IAL
- BERTA MARIA HEINZMANN  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM
- BEATRIZ PINHEIRO BEZERRA  
Universidade Federal del Ceará – UFC
- BIANCA FERNANDES GLAUSER  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
- BIANCA RODRIGUES DE OLIVEIRA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI
- BRUNA TRINDAD DE CARVALHO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG
- BRUNO VALENTE  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
- CAIO PINHO FERNANDES  
Universidade Federal Fluminense – UFF
- CAMILA ADOLFO GONÇALVES  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

CARLA HOLANDINO QUARESMA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

CARLOS CÉZAR FLORES VIDOTTI  
Consejo Federal de Farmacia – CFF

CARLOS EDUARDO DE OLIVEIRA PEREIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

CAROLINA DOS SANTOS PASSOS  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CAROLINA LUPI DÍAS  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CÁSSIA VIRGINIA GARCIA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CECÍLIA ELENA DE FIGUEIREDO OGNIBENE  
Asociación de los Laboratorios Farmacéuticos Nacionales  
ALANAC

CÉLIA DE FREITAS GUIMARÃES PRAÇA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

CELINA ROCHA FILGUEIRAS  
Universidade Federal Fluminense – UFF

CELSO FIGUEIREDO BITTENCOURT  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

CÉSAR ALEXANDRE JUNQUEIRA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CHANG CHIANN  
Universidade de São Paulo – USP

CHARISE DALLAZEM BERTOL  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

CHRISTIANE SOUTO MORAES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

CID AIMBIRÉ DE MORAES SANTOS  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

CLARICE MITIE SANO YUI  
Medley S.A. Industria Farmacéutica

CLARISSA MARQUES MOREIRA DOS SANTOS  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

CLARISSE MADALENA BUENO ROLIM  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

CLÁUDIA MARIA OLIVEIRA SIMÕES  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

CLAUDIA SEIDL  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

CLAUDIO KIYOSHI HIRAI  
Biolab Sanus Farmacéutica Ltda

CLÉSIO SOLDATELI PAIM  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

CLÉVIA FERREIRA DUARTE GARROTE  
Universidade Federal de Goiás – UFG

CRISTIANE DA SILVA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

CRISTIANE DE BONA DA SILVA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

CRISTIANE RODRIGUES AUGUSTO  
Instituto Nacional de Metrologia, Normatización y  
Calidad Industrial – INMETRO

CRISTIANNE DA SILVA GONÇALVES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

CRISTINA DUARTE VIANNA SOARES  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

CYPRIANO CARDOSO FILHO  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

DANIEL KARL RESENDE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DANIELA MARRECO CERQUEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DANIELE DE SOUZA TEIXEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

DANILE RUBERT PEREIRA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

DARCY AKEMI HOKAMA  
Instituto de Tecnología en Inmunobiológicos – Bio  
Manguinhos FIOCRUZ

DEISE CRISTINA DA SILVA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

DENILSON DA SILVA SANTOS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DENISE FERREIRA LEITE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

DESIRÉE MICHELS CORTEZ  
Linde Gases Ltda.

DHALIA GUTEMBERG  
Câmara Brasileira de Diagnóstico Laboratorial – CBDL

DIEGO LEONEL DA COSTA VIEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

DIOGO POMPÉU DE MORAES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ECIO GEOVANI NETO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

ÉDER LISANDRO DE MORAES FLORES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

EDSON IRINEU MÜLLER  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

EDUARDO AUGUSTO MOREIRA  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

EDUARDO LLAVES LEAL  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

EDUARDO SCHMIDT DE SOUZA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ELAINE BORTOLETI DE ARAUJO  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

ELDA AZEVEDO GUERRA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ELFRIEDE MARIANNE BACCHI  
Universidade de São Paulo – USP

ELIANA NUNES  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ELIANE COUTINHO DE MEDEIROS  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

ELISABETE PEREIRA DOS SANTOS  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

ELIZABETH IGNE FERREIRA  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

ELIZABETH MARIA ROCHA LOBO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

ELIZABETH VALVERDE DOS SANTOS  
Universidade Federal Fluminense – UFF

ELOY JULIUS GARCIA  
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul – UERGS

ELZA ANDERS SAAD  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

ELZÍRIA DE AGUIAR NUNAN  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

EMANUELA ANSELMO VIEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

EMIDIO VASCONCELOS LEITÃO DE LA CUNHA  
Universidade Estadual de Paraíba – UEPB

EZEQUIEL PAULO VIRIATO  
Laboratório Homeopático Almeida Prado Ltda

ÉRICO MARLON DE MORAES FLORES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

EVELIN ELFRIEDE BALBINO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

FABIANA CREMASCHI PALMA  
Asociación Brasileña de los Distribuidores y Importadores  
de Insumos Farmacéuticos, Cosméticos, Veterinarios,  
Alimenticios y Aditivos – ABRIFAR

FABIANA ERNESTINA BARCELLOS DA SILVA  
Universidade Federal del Pampa – UNIPAMPA

FABIANE GOLDCHMIDT ANTES  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

FÁBIO ANDREI DUARTE  
Universidade Federal del Río Grande – FURG

FÁBIO SEIGI MURAKAMI  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

FABRICIO CARNEIRO DE OLIVEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

FÁVERO REISDORFER PAULA  
Universidade Federal del Pampa – UNIPAMPA

FELIPE DE LA ROSA NOBRE  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

FELIPE REBELLO LOURENÇO  
Universidade de São Paulo – USP

FERNANDA HERMSDORFF DE LAS NEVES  
Universidade Federal Fluminense – UFF

FERNANDO HENRIQUE ANDRADE NOGUEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

FERNÃO CASTRO BRAGA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

FLÁBIO DE LA ROSA PONS JÚNIOR  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

FLÁVIA DÍAS MARQUES MARINHO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

FLÁVIA NEVES ROCHA ALVES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

FRANCINETE RAMOS CAMPOS  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

FRANCISCA MARIA BARROS SOUSA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

FRANCISCO JOSÉ DE FREITAS  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

GABRIELA GONÇALVES DA SILVA  
Asociación Brasileña de los Distribuidores y Importadores  
de Insumos Farmacéuticos, Cosméticos, Veterinarios,  
Alimenticios y Aditivos – ABRIFAR

GEISIANE MARIA ALVES PRESMICH  
Laboratorio Industrial Farmacéutico de Alagoas – LIFAL

GERALDO FENERICH  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

GERSON ANTÔNIO PIANETTI  
Universidade Federal Minas Gerais – UFMG

GILBERTO DOLEJAL ZANETTI  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

GILSON ANDRADE RAMALDES  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

GIOVANA SECRETTI VENDRUSCOLO  
Universidade Comunitaria de la Región de Chapecó –  
UNOCHAPECÓ

GISELE DA SILVA BOTAS  
Universidade Federal Fluminense – UFF

GISELY CRISTINY LOPES  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

GISLAINE CARMO ROESCH  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

GISLAINE KUMINEK  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

GIZELE SCOTTI DEL CANTO  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

GLYN MARA FIGUEIRA  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

GUILHERME DINIZ TAVARES  
Universidade de São Paulo – USP

GUSTAVO RODRIGUES DE REZENDE  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

HIDELGARDO SEIBERT FRANÇA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

HISAKO GONDO HIGASHI  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –  
UNESP

IARA COUTINHO DESMARALES  
Universidade Federal Fluminense – UFF

ILIO MONTANARI JÚNIOR  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

INGRID BEZERRA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

IRENE SATIKO KIKUCHI  
Universidade de São Paulo – USP

ISABEL CRISTINA FRACCIÓN DIEFENBACH  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ISABELA DA COSTA CÉSAR  
Instituto de Ciencias Farmacéuticas de Estudios y  
Investigaciones – ICF

ISABELLA PIAZZA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

JACQUELINE DE SOUZA  
Universidade Federal de Oro Preto – UFOP

JAIMARA AZEVEDO OLIVEIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JAIR CALIXTO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

JAIR CÁSSIO FARIA  
Colaborador Independiente

JANAÍNA DUQUE DE SOUZA  
Bio Manguinhos – FIOCRUZ

JARBAS FARIAS LEAL  
Universidade Federal Fluminense – UFF

JOÃO BATISTA DA SILVA JÚNIOR  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

JOÃO CLEVERSON GASPARETTO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR



JOÃO DIMAS RIBEIRO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JOÃO FERREIRA MARTINS  
Instituto Nacional de Control de la Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

JOÃO MÁXIMO DE SIQUEIRA  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

JOÃO PAULO SILVÉRIO PERFECTO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

JONATHAS FELIPE REVOREDO LOBO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

JOSÉ ALEIXO PRATES Y SILVA  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

JOSÉ ANGELO SILVEIRA ZUANAZZI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

JOSÉ ANTÔNIO DE AQUINO RIBEIRO  
Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria –  
EMBRAPA

JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA BATISTUZZO  
Facultades Oswaldo Cruz

JOSÉ CARLOS BARBÉRIO  
Genese Productos Diagnósticos Ltda.

JOSÉ CARLOS TAVARES CARVALHO  
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

JOSÉ LAMARTINE SOARES SOBRINHO  
Universidade Federal del Piauí – UFPI

JOSÉ LOURENÇO DE FREITAS NETO  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

JOSÉ MARIA BARBOSA FILHO  
Universidade Federal de la Paraíba – UFPB

JOSÉ MURADIAN FILHO  
Pall do Brasil Ltda.

JOSEANE MARIA BEZERRA DE MENEZES  
Vigilancia Sanitaria – RN

JOSIANE DE CARVALHO VITORINO  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

JULIA APARECIDA LOURENÇO DE SOUZA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

JULIANA ASSUMPCIÓN DA SILVA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

JULIANA SEVERO FAGUNDES PEREIRA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

JULIANO DE MORALES FERREIRA SILVA  
Universidade de São Paulo – USP

JULIANO SMANIOTO BARIN  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

JÚLIO CÉSAR CARESTIATO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

KARINA ALVES DA SILVA  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

KATIA ANDREA DOMINGOS DE MORALES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

KATIA REGINA TORRES  
Ministério da Saúde – MS

KATIA SUZI DE LA SILVEIRA SILVA  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

KOICHI MIZUTA  
Instituto de Investigaciones Tecnológicas del Estado de  
São Paulo – IPTSP

LAÍS SANTANA DANTAS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LARISSA SAKIS BERNARDIS  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

LAURA JANE MOREIRA SANTIAGO  
Universidade Estadual del Norte Fluminense – UENF

LAURA TERUMI UEDA HERNANDES MELERO  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

LAUREN ROSA CROSSETTI VAUCHER  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

LAURO DOMINGOS MORETTO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

LEANDRO MACHADO ROCHA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

LEANDRO SOARES PINHEIRO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

LEILA BRASIL FERREIRA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LEILA SCHREINER DELGADO  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

LENISE DE LIMA SILVA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

LEONARDO BAHÍA TAVARES  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

LEONARDO DE SOUZA TEIXEIRA  
Instituto de Ciências Farmacéuticas de Estudos y  
Investigaciones – ICF

LEONARDO PAES CINELLI  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

LEOPOLDO CLEMENTE BARATTO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

LETÍCIA LENZ SFAIR  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LETICIA NORMA CARPENTIERI RODRIGUES  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

LETÍCIA SCHERER KOESTER  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LIDIANE BUENO DE MORAES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LÍGIA MARIA MOREIRA DE CAMPOS  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

LILIA RIBEIRO SERÓDIO  
Instituto Vital Brasil – IVB

LILIAN AULER MENTZ  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LIVIA DUARTE PEREIRA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

LORENA FRATINI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

LUANA LENZI  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

LUANA MARTINS DE LA LUZ  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LUCÉLIA MAGALHÃES DA SILVA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

LÚCIA DE FÁTIMA FRANCELINO DA SILVA  
Laboratório Central de Salud Pública de Pernambuco –  
LACEN

LUCIANA CATIA BLOCK  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

LUCIANA CRISTINA MOTA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LUCIANE VARINI LAPORTA  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

LUÍS CARLOS BRÍGIDO MOURA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

LUIS CARLOS DE ALENCAR SAMPAIO FILHO  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

LUIZ ALBERTO LIRA SOARES  
Universidade Federal del Río Grande del Norte – UFRN

LUIZ ANTÔNIO BATISTA DA COSTA  
Centro de Excelencia en Salud Integral de Paraná –  
CESIP

LUIZ ARMANDO ERTHAL  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

LUIZ CLÁUDIO MARTINS ALEIXO  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN

LUIZ FERNANDO SECIOSO CHIAVEGATTO  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

LUIZ GUSTAVO TORRES  
Naturofarma Productos Naturales Ltda.

LUIZA DE CASTRO MENEZES CANDIDO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

LUMA WOSCH  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

LUZIA DE FÁTIMA PEREIRA  
Alko del Brasil Ind y Con LTDA

MAGDA RHAYANNY ASSUNCIÓN FERREIRA  
Universidade Federal del Río Grande del Norte – UFRN

MAIQUE WEBER BIAVATTI  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

MANUELA DA COSTA SOLIZ  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARA EL CORAB MOREIRA DE OLIVEIRA  
Ministério da Saúde – MS

MARCELA ZART AREND  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARCELE GIACOMIN GONÇALVES  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MARCELO CAMILO MORERA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MÁRCIA FOSTER MESKO  
Universidade Federal de Pelotas – UFPel

MÁRCIA VIGNOLI DA SILVA  
Universidade Federal de Ciências de la Salud de Puerto  
Alegre – UFCSPA



MÁRCIO LABASTIE (In memorian)  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

MARCO ANDRÉ CARDOSO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

MARCO ANTONIO STEPHANO  
Universidade de São Paulo – USP

MARCOS ANTONIO SEGATTO SILVA  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

MARCOS ROBERTO DOS SANTOS  
Centro Universitário Franciscano – UNIFRA

MARGARETH LINDE ATHAYDE  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARGARETH MIE NAKAMURA MATSUDA  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares –  
IPEN

MARIA ALICE BOCKELMANN  
Cristália Produtos Químicos Farmacéuticos Ltda.

MARIA AUGUSTA TRAVASSOS LEMOS  
Universidade Federal Fluminense – UFF

MARIA AUXILIADORA MILANEZE GUTIERRE  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

MARIA CRISTINA DICIAULA  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

MARIA DE LAS GRAÇAS LINS BRANDÃO  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

MARIA DIANA CERQUEIRA SALES  
Facultad Brasileira – UNIVIX

MARIA DEL CARMO ESTANISLAU DEL AMARAL  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MARIA DEL CARMO VASQUES GARCIA  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

MARIA DEL ROSÁRIO SILVEIRA BRITTO  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

MARIA ELISA GIRÃO MOREIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARIA ELISABETE AMARAL DE MORAES  
Universidade Federal del Ceará – UFC

MARIA ELIZABETE DALMORA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARIA JOSÉ CARNEIRO DEL NASCIMENTO  
Empresa Brasileira de Hemoderivados y Biotecnología –  
HEMOBRAS

MARIA LÚCIA SILVEIRA MALTA DE ALENCAR  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARIA TERESINHA KREINEKER DRESH  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MARIANE GEHLEN PERIN  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MARIÂNGELA TORCHIA DEL NASCIMENTO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARIBETE HOMRICH HOLZSCHUH  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MARILI VILLA NUEVA RODRIGUES  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MARILIA DE MORAES CASTRO  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MARINA DAUMAS NEVES DUARTE  
Universidade Federal Fluminense – UFF

MARINA SCOPEL  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MARINÉS JOST Y SOUZA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MÁRIO LUIS RIBEIRO MOURA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

MÁRIO SÉRGIO PIANTAVINI  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

MARISA COELHO ADATI  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

MARISA DE MOURA SOUZA DE LA LUZ  
Laboratorio de Control de Calidad y Investigación –  
LCQPq

MARISA KEIKO UEMA  
Eurofarma Comercial y Importadora Ltda

MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MARTHA ANA GATTUSO  
Universidade Nacional de Rosario, Argentina

MARTIN STEPPE  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MARY ANN FOGGIO  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

MARYANGELA REZENDE MASCARENHAS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MARYCEL ROSA FELISA F. BARBOSA  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares – IPEN

MAURO FERREIRA WITZEL  
Blanver Farmoquímica Ltda

MAX WEBER PEREIRA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MELÂNIA DE FÁTIMA CORDELINO  
Baxter Hospitalar Ltda

MELÂNIA PALERMO MANFRON  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MERIANE PIRES CARVALHO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

MICHELE FEITOSA SILVA  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud – INCQS / FIOCRUZ

MICHELI WRASSE SANGÓI  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

MIGUEL DE LUCCA NETO  
Medley S.A. Industria Farmacéutica

MILENA BANDEIRA BARROZO  
Universidade Federal del Ceará – UFC

MIRACY MUNIZ DE ALBUQUERQUE  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

MIRION ANDERS APEL  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

MIRION DE FÁTIMA VIANNA LEONEL  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

MIRIAN PARENTE PINHEIRO  
Universidade Federal del Ceará – UFC

MÓNICA DA LUZ CARVALHO SOARES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

MONIKA TAGLIARI  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

NADIA LIMA DÍAS CABRAL  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

NADIA MARIA VOLPATO  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

NAIALY FERNANDES ARAÚJO REIS  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

NARA DEITOS BITTENCOURT  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

NEEMIAS SILVA DE ANDRADE  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

NELIO DE BASTOS MORAIS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

NELISE GONÇALVES DUARTE Y DUARTE  
Universidade Federal Fluminense – UFF

NEUZA TAEKO OKASAKI FUKUMORI  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares – IPEN

NIKOLAI SHARAPIN (In memoriam)  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileña – 4a edición

NILTON LUZ NETTO JÚNIOR  
Universidade Católica de Brasília – UCB

NIRLA RODRIGUES ROMERO  
Universidade Federal del Ceará – UFC

ONÉSIMO ÁZARA PEREIRA  
Asociación Brasileña de la Industria Farmoquímica y de Insumos Farmacéuticos – ABIQUIFI

ORLANDO FATIBELLO FILHO  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

ORLANDO SILVA  
Serono Productos Farmacéuticos Ltda

PAOLA DE AZEVEDO MELLO  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

PATRÍCIA DE ANDRADE MARTINS  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares – IPEN

PATRICIA HAUSCHILDT DE OLIVEIRA MENDES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

PAULA CRISTINA REZENDE ENÉAS  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

PAULA REGINA ALVES DE SIQUEIRA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

PAULA RENATA APARECIDA NIGRO RIVERA CARAZZATTO  
Asociación Nacional de Farmacéuticos Magistrales – ANFARMAG

PAULA ROCHA CHELLINI  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

PAULO ANTONIO DE SOUZA MOURÃO  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

PAULO CHANEL DEODATO DE FREITAS  
Universidade de São Paulo – USP

PAULO EDUARDO MAYORGA BORGES  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

PAULO RENATO DE OLIVEIRA  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

PAULO VICTOR PIRES DOS SANTOS  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

PEDRO EDUARDO FROEHLICH  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

PEDRO JOSÉ ROLIM NETO  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

PEDRO MELILO DE MAGALHÃES  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

POLIANA BERNARDES GONÇALVES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

POLIANA DE FÁTIMA HILÁRIO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

PRISCILLA STUDART  
Universidade Federal del Ceará – UFC

RAFAEL DEITOS BEGNIS  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

RAFAEL NICOLAY PEREIRA  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

RAFAELA MARIN  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

RAFAELLA GOMES BEZERRA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

RALPH SANTOS OLIVEIRA  
Instituto de Ingeniería Nuclear – IEN-CNEN

RAPHAEL DE ANDRADE LUCAS Y SILVA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RAQUEL LIMA Y SILVA  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

REBECA RIBEIRO DE MOURA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

RENATA APARECIDA DÍAS  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

RENATA ARACELLI PIRES  
Baxter Hospitalar Ltda

RENATA BARBOSA DE OLIVEIRA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

RENIERE HENRIQUE DA SILVA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

RICARDO CHIAPPA  
Unión Educacional del Planalto Central – UNIPLAC

RICARDO PEREIRA LOURO  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

RINALDO FERREIRA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

ROBERTO PONTAROLO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

ROCHELE CASSANTA ROSSI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

ROCHELE SOGARI PICOLOTO  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

RODRIGO ALVES SOARES CRUZ  
Universidade Federal Fluminense – UFF

RODRIGO CRISTOFOLETTI  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RODRIGO FERNANDES ALEXANDRE  
Ministério da Saúde – MS

RONALDO FERREIRA DA SILVA  
Universidade Federal Fluminense – UFF

ROSA NORIKO YAMAMOTO  
Universidade de São Paulo – USP

ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA  
Universidade Federal del Pará – UFPA

ROSANA MIGUEL MESSIAS MASTELARO  
Sindicato de la Industria de Productos Farmacéuticos en  
el Estado de São Paulo – Sindusfarma

ROSANE MARIA SILVA ALVES  
Ministério da Saúde – MS

ROSANGELA ANDRADE  
Linde Gases Ltda.

ROSANGELA BOLZAN  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa.

ROSE VANESSA BANDEIRA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

ROSEMARIE APARECIDA DE ARAÚJO BONATTO  
Merck Sharp & Dohme Farmacéutica Ltda

ROSILENE RODRIGUES SANTIAGO  
Universidade Federal del Río Grande del Norte – UFRN

ROSIMAR LEITENBERG DE LA SILVEIRA  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

ROSIMEIRE PEREIRA ALVES DE LA CRUZ  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

RUBENS RAPHAEL SIMÕES DE OLIVEIRA  
Instituto de Investigaciones Energéticas y Nucleares – IPEN

RUTH RIESINGER STRATTMANN  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

SAID GONÇALVES DE LA CRUZ FONSECA  
Universidade Federal del Ceará – UFC

SALVADOR ALVES PEREIRA (In memoriam)  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileira – 4a edición

SÁLVIO FILGUEIRAS  
Linde Gases Ltda.

SAMANTA CARDOSO MOURÃO  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

SAULO FERNANDES DE ANDRADE  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

SEBASTIÃO BAETA HENRIQUE  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileira – 4a edición

SERGIO LUIZ DALMORA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

SERGIO ROBERTO MORTARI  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

SEVERINO BARBOSA  
Universidade Federal del Pernambuco – UFPE

SEVERINO GRANJEIRO JÚNIOR  
Laboratorio Farmacéutico del Estado de Pernambuco – LAFEPE

SILAS GOUVEIA  
Fundación Ezequiel Días – FUNED

SILÉSIA DE SOUZA AMORIM  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SILVANA TERESA LACERDA JALES  
Asociación de los Laboratorios Oficiales Brasileños – ALFOB

SILVÂNIA VAZ DE MELO MATTOS  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SILVIA DEBENEDETTI  
Universidade Nacional Argentina

SILVIA HELENA MIOLLO BORGMANN  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

SILVIA PAREDES FUENTES  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

SÍLVIA STORPIRTIS  
Universidade de São Paulo – USP

SIMONE CRISTINA BENOVI  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

SIMONE GONÇALVES CARDOSO  
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

SOLANGE MARIA COUTINHO BRANDÃO  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud – INCQS / FIOCRUZ

SUSANA JULIA GATTUSO BITTEL  
Universidade Nacional de Rosario, Argentina

SUZANA MACHADO DE ÁVILA  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea Brasileira – 4a edición

TAILANE SANT'ANNA MOREIRA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

TALITA GESSER CESCA  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

TANIA MARI BELLÉ BRESOLIN  
Universidade del Vale del Itajaí – UNIVALI

TATIANE PEREIRA DE SOUZA  
Universidade Federal del Amazonas – UFAM

TAYOMARA DE SOUSA NASCIMENTO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

TELMA MARY KANEKO  
Universidade de São Paulo – USP

TÉRCIO PASCHKE OPPE  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO  
Universidade de São Paulo – USP

THALES MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO  
Universidade Federal de Paraná – UFPR

THALES MESQUITA DEL COUTO ARAUJO  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

THELMA DE BARROS MACHADO  
Universidade Federal Fluminense – UFF

THEREZA CRISTINA VESSONI PENNA  
Universidade de São Paulo – USP

THEREZINHA COELHO BARBOSA TOMASSINI  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

THIELE FACCIN DE BRUM  
Centro Universitario Franciscano – UNIFRA

TIAGO ASSIS MIRANDA  
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

VALDIR FLORÊNCIO DE LA VEIGA JUNIOR  
Universidade Federal Amazonas – UFAM

VALÉRIA PEREIRA DE SOUSA  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

VALQUIRIA LINCK BASSANI  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

VERA LÚCIA GARCIA REHDER  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

VIVIANE DE OLIVEIRA GARCIA  
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

VLADI OLGA CONSIGLIERI  
Universidade de São Paulo – USP

VOLKER BITTRICH  
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA  
Universidade Federal del Pará – UFPA

WALFREDO DA SILVA CALMON  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

WILSON CAMARGO  
Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud –  
INCQS / FIOCRUZ

WILSON REINHARDT FILHO  
Comisión Permanente de Revisión de la Farmacopea  
Brasileña – 4a edición

YASMIN LOURENZO FIGUEIREDO  
Vigilancia Sanitaria y Ambiental – BA

YEDO ALQUINI  
Universidade Federal de Paraná – UFPR



## 4 GENERALIDADES

### TÍTULO

El título completo de esta obra es “Farmacopea de la República Federativa de Brasil, 5ª edición”. Puede ser denominada “Farmacopea Brasileña, 5ª edición” o FB 5.

### DEFINICIONES

#### *Acción, uso y dosis*

Son las constantes del informe para registro del producto en el órgano sanitario, actualizadas mediante revisión bibliográfica nacional e internacional, cuando sea el caso.

Cuando indicadas en las monografías, las dosis representan la cantidad del medicamento usualmente prescrita, que tenga eficacia terapéutica, para pacientes adultos. El prescriptor habilitado, a su criterio y bajo su exclusiva responsabilidad, considerando la farmacocinética y farmacodinámica, podrá variar las cantidades y la frecuencia de administración de cualquier medicamento. No obstante, la prescripción de dosis muy superiores a las usuales, establecida en literatura, obliga al farmacéutico a confirmar, con el prescriptor de la receta, las dosis establecidas.

#### *Acidez y alcalinidad – ensayos rápidos*

Una solución es considerada *neutra* cuando no modifica el color de los papeles azul y rojo de tornasol, o cuando el papel indicador universal adquiere los colores de la escala neutra, o cuando 1 ml de la misma solución se colorea de verde con una gota de azul de bromotimol SI (pH 7,0).

Es considerada *ácida* cuando toma color rojo el papel azul de tornasol o 1 ml se torna amarillo por una gota de rojo de fenol SI (pH 1,0 a 6,6).

Es considerada *levemente ácida* cuando toma color levemente rojo el papel azul de tornasol o 1 ml se colorea de anaranjado por una gota de rojo de metilo SI (pH 4,0 a 6,6).

Es considerada *fuertemente ácida* cuando toma color azul el papel rojo de congo o 1 ml se torna rojo por la adición de una gota de anaranjado de metilo SI (pH 1,0 a 4,0).

Es considerada *alcalina* cuando toma color azul el papel rojo de tornasol o 1 ml toma color azul por una gota de azul de bromotimol SI (pH 7,6 a 13,0).

Es considerada *levemente alcalina* cuando toma color azul el papel rojo de tornasol o 1 ml toma color rosa por una gota de rojo de cresol SI (pH 7,6 a 8,8).

Es considerada *fuertemente alcalina* cuando toma color azul por una gota de timolftaleína SI (pH 9,3 a 10,5,) o de rojo por una gota de fenolftaleína SI (pH 10,0 a 13,0).

### *Adhesivo*

Es el sistema destinado a producir un efecto sistémico por la difusión del(de los) principio(s) activo(s) en una velocidad constante por un periodo de tiempo prolongado.

### *Agua para inyectables*

Agua para inyectables es el insumo utilizado en la preparación de medicamentos para administración parenteral, como vehículo o en la disolución o dilución de sustancias o de preparaciones.

### *Agua para uso farmacéutico*

Se considera como agua para uso farmacéutico los diversos tipos de agua empleados en la síntesis de fármacos, en la formulación y producción de medicamentos, en laboratorios de ensayos, diagnósticos y demás aplicaciones relacionadas al área de la salud, inclusive como principal componente en la limpieza de utensilios, equipos y sistemas.

### *Agua purificada*

Agua purificada es el agua potable que pasó por algún tipo de tratamiento para retirar los posibles contaminantes y atender a los requisitos de pureza establecidos en la monografía.

### *Agua ultrapurificada*

Agua ultrapurificada es el agua purificada que pasó por tratamiento adicional para retirar los posibles contaminantes y atender a los requisitos de pureza establecidos en la monografía.

### *Aguas aromáticas*

Son soluciones saturadas de aceites esenciales u otras sustancias aromáticas en agua. Poseen olor característico de las drogas con las cuales son preparadas, recibiendo, también, el nombre de ellas.

### *Baño maría y baño a vapor*

Es un baño de agua hirviendo, a no ser que la monografía especifique otra temperatura. Las expresiones *agua caliente* y *agua muy caliente* indican temperaturas aproximadas entre 60 °C y 70 °C y entre 85 °C y 95 °C respectivamente.

Baño a vapor significa exposición al vapor fluente u otra forma de calor, correspondiendo en temperatura a la del vapor fluente.



*Biodisponibilidad*

Indica la velocidad y la extensión de absorción de un principio activo en una forma de determinación de dosis, a partir de su curva concentración/tiempo en la circulación sistémica o su excreción en la orina.

*Bioequivalencia*

Consiste en la comprobación de equivalencia farmacéutica entre productos presentados bajo la misma forma farmacéutica, conteniendo idéntica composición cualitativa y cuantitativa de principio(s) activo(s), y que tengan comparable biodisponibilidad, cuando son estudiados bajo un mismo diseño experimental.

*Cápsula*

Es la forma farmacéutica sólida en que el principio activo y los excipientes están contenidos en un envoltorio soluble duro o blando, de formatos y tamaños variados, usualmente, conteniendo una dosis única del principio activo. Normalmente es formada de gelatina, pero puede, también, ser de almidón o de otras sustancias. Abreviatura: cap.

*Cápsula dura*

Es la cápsula que consiste de dos partes cilíndricas pre-fabricadas (cuerpo y tapa) que se encajan y cuyas extremidades son redondeadas. Es típicamente llenada con principios activos y excipientes en la forma sólida. Normalmente es formada de gelatina, pero puede también ser de otras sustancias. Abreviatura: cap. dura

*Cápsula dura de liberación prolongada*

Es la cápsula que consiste de dos partes cilíndricas pre-fabricadas (cuerpo y tapa) que se encajan y cuyas extremidades son redondeadas. Es típicamente llenada con principios activos y excipientes en la forma sólida. Normalmente es formada de gelatina, pero puede también ser de otras sustancias. Ver definición general de liberación prolongada. Abreviatura: cap. dura. lib. pro.

*Cápsula dura de liberación retardada*

Es la cápsula que consiste de dos secciones cilíndricas pre-fabricadas (cuerpo y tapa) que se encajan y cuyas extremidades son redondeadas. Es típicamente llenada con principios activos y excipientes en la forma sólida. Normalmente es formada de gelatina, pero puede también ser de otras sustancias. Ver definición general de liberación retardada. Abreviatura: cap. dura lib. ret.

*Cápsula blanda*

Es la cápsula constituida de un envoltorio de gelatina, de varios formatos, más maleable que el de las cápsulas duras.

Normalmente son llenadas con contenidos líquidos o semisólidos, pero pueden ser llenadas también con polvos y otros sólidos secos. Abreviatura: cap. blando

*Cápsula blanda de liberación prolongada*

Es la cápsula constituida de un envoltorio de gelatina, de varios formatos, más maleable del que el de las cápsulas duras. Normalmente son llenadas con contenidos líquidos o semisólidos, pero pueden ser llenadas también con polvos y otros sólidos secos. Ver definición general de liberación prolongada. Abreviatura: cap. blanda lib.pro.

*Cápsula blanda de liberación retardada*

Es la cápsula constituida de un envoltorio de gelatina, de varios formatos, más maleable del que el de las cápsulas duras. Normalmente son llenadas con contenidos líquidos o semisólidos, pero pueden ser llenadas también con polvos y otros sólidos secos. Ver definición general de liberación retardada. Abreviatura: cap. blando lib. ret.

*Cilindro de gas*

Es el recipiente metálico, perfectamente cerrado, de paredes resistentes, destinado a contener gas bajo presión, obturado por válvula regulable, capaz de mantener la salida del gas en un caudal determinado.

*Colirio*

Es la preparación farmacéutica líquida destinada a la aplicación sobre la mucosa ocular. Abreviatura: col.

*Complejo protrombínico humano total liofilizado*

Es una fracción de proteínas plasmáticas que contienen obligatoriamente los Factores II, VII, IX y X de la coagulación humana.

*Comprimido*

Es la forma farmacéutica sólida que contiene una dosis única de uno o más principios activos, con o sin excipientes, obtenida por la compresión de volúmenes uniformes de partículas. Puede ser de una amplia variedad de tamaños, formatos, presentar marcaciones en la superficie y ser revestido o no. Abreviatura: comp.

*Comprimido de liberación modificada*

Es el Comprimido que tiene una liberación modificada. Debe ser clasificado como de liberación modificada apenas cuando las clasificaciones "liberación retardada" y "liberación prolongada" no fuesen adecuadas. Abreviatura: comp. lib. mod.

*Comprimido de liberación prolongada*

Es el comprimido cuyos excipientes son destinados específicamente a modificar la liberación del principio activo en los fluidos digestivos. Vea definición de liberación prolongada. Abreviatura: comp. lib. pro.



*Comprimido efervescente*

Es el comprimido que contiene, en adición a los ingredientes activos, sustancias ácidas y carbonatos o bicarbonatos, los cuales liberan dióxido de carbono cuando el comprimido es disuelto en agua. Es destinado a ser disuelto o disperso en agua antes de la administración. Abreviatura: comp. efer.

*Comprimido masticable*

Es el comprimido formulado para que pueda ser masticado, produciendo un sabor residual agradable en la cavidad oral. Abreviatura: comp. mast.

*Comprimido bucal*

Es el comprimido que desintegra o disuelve, rápidamente, cuando colocado sobre la lengua. Abreviatura: comp. buc.

*Comprimido para colutorio*

Es el comprimido que debe ser disuelto en agua para la preparación del colutorio, que es un líquido destinado al enjuague bucal de acción sobre las encías y las mucosas de la boca y de la garganta. No debe ser tragado. Abreviatura: comp. colu.

*Comprimido para solución*

Es el comprimido destinado a ser disuelto en agua antes de la administración. La solución producida puede ser levemente lechosa debido a los excipientes utilizados en la fabricación de los comprimidos. Abreviatura: comp. sol.

*Comprimido para suspensión*

Es el comprimido que cuando en contacto con un líquido, rápidamente produce una dispersión homogénea (suspensión). Está destinado a ser disperso antes de la administración. Abreviatura: comp. susp.

*Comprimido revestido*

Es el comprimido que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente, poliméricas, destinadas a proteger el fármaco del aire o humedad; para fármacos con olor y sabor desagradables; para mejorar la apariencia de los comprimidos, o para alguna otra propiedad que no sea la de alterar la velocidad o extensión de la liberación del principio activo. Abreviatura: comp. rev.

*Comprimido revestido de liberación prolongada*

Es el comprimido que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente poliméricas, destinadas a modificar la velocidad o extensión de la liberación de los principios activos. Vea la definición de liberación prolongada. Abreviatura: comp. rev. lib. pro.

*Comprimido revestido de liberación retardada*

Es el comprimido que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente poliméricas, destinadas a modificar la velocidad o extensión de la liberación de los principios activos, presentando una liberación retardada del principio activo. Vea definición de liberación retardada. Abreviatura: comp. rev. lib. ret.

*Comprimido sin revestimiento*

Es el comprimido en que excipientes usados no son destinados, específicamente, a modificar la liberación del principio activo en los fluidos digestivos. Abreviatura: comp. sin rev.

*Control de calidad*

Es el conjunto de medidas destinadas a garantizar, en cualquier momento, la producción de lotes de medicamentos y demás productos, que satisfagan las normas de identidad, actividad, tenor, pureza, eficacia y inocuidad.

*Colorantes*

Son sustancias adicionales a los medicamentos, productos dietéticos, cosméticos, perfumes, productos de higiene y similares, productos de limpieza y similares, con el efecto de otorgarles color y, en determinados tipos de cosméticos, transferirlo para la superficie cutánea y anexos de la piel. Para su uso observar la legislación Federal y las resoluciones editadas por la Anvisa.

*Relacionados (relacionados)*

Producto para la salud, tal como equipo, aparato, material, artículo o sistema de uso o aplicación médica, odontológica o laboratorial, destinado a la prevención, diagnóstico, tratamiento, rehabilitación o anticoncepción y que no utiliza medio farmacológico, inmunológico o metabólico para realizar su principal función en seres humanos pudiendo, no obstante, ser auxiliado en sus funciones por tales medios.

*Cosméticos*

Son productos para uso externo; destinados a la protección, o al embellecimiento de las diferentes partes del cuerpo, tales como polvos faciales; talcos; cremas de belleza; crema para las manos y similares; máscaras faciales; lociones de belleza; soluciones lechosas; cremosas y astringentes; lociones para las manos; bases de maquillaje y aceites cosméticos; colorete; rubor; brillos labiales; lápiz labial; protectores solares; bronceadores y bronceadores artificiales; rimels; sombras; delineadores; tinturas capilares; agentes aclaradores de cabellos; preparados para ondular y para alisar cabellos; fijadores de cabellos; laca; brillantinas y similares; lociones capilares; depilatorios y epilatorios; preparados para uñas y otros.

*Crema*

Es la forma farmacéutica semisólida que consiste de una emulsión, formada por una fase lipofílica y una fase hidrofílica. Contiene uno o más principios activos disueltos o dispersos en una base apropiada y es utilizada, normalmente, para aplicación externa en la piel o en las membranas mucosas.

*Crioprecipitados del plasma fresco humano*

Son constituidos por las fracciones insolubles a frío conteniendo principalmente los Factores I (140 a 250 mg ) y VIII (70 a 120 UI) de la coagulación humana por unidad recogida de sangre humana. Otros factores de la coagulación también son encontrados en menores concentraciones junto al crioprecipitado como el Factor de Von Willebrand (40 a 70%) y el Factor XIII (20 a 30%).

*Denominación Común Brasileña (DCB)*

Es la denominación del fármaco o principio farmacológicamente activo, aprobada en el órgano federal responsable de la vigilancia sanitaria.

*Denominación Común Internacional (DCI)*

Es la denominación del fármaco o principio farmacológicamente activo, recomendada en la Organización Mundial de Salud.

*Densidad de masa y densidad relativa*

Densidad de masa (p) de una sustancia es la razón de su masa por su volumen a 20 °C.

La densidad relativa usualmente adoptada (d<sub>20</sub>) es definida como la relación entre la masa de una sustancia al aire a 20 °C y la masa de igual volumen de agua en la misma temperatura.

*Desinfectantes*

Son productos destinados a destruir, indiscriminada o selectivamente, microorganismos, cuando aplicados en objetos inanimados o ambientes.

*Detergentes*

Son productos destinados a disolver grasas; a la higiene de recipientes y vajillas y a aplicaciones de uso doméstico.

*Donantes de sangre*

Son individuos saludables y cuidadosamente seleccionados que, después de exámenes médicos, pruebas sanguíneas laboratoriales y estudio de su historia médica, están ausentes de agentes infecciosos transmisibles pueden ser aceptados y utilizados para recolección de su sangre total o de sus fracciones celulares o plasmáticas para fines profilácticos, curativos o de fraccionamiento.

*Grageas*

Son comprimidos revestidos con capas constituidas por mezclas de sustancias diversas, como resinas, naturales o sintéticas, gomas, gelatinas, materiales inactivos e insolubles, azúcares, plastificantes, polioles, ceras, colorantes autorizados y, a veces, aromatizantes y principios activos. Abreviatura: *grag*.

*Elixir*

Es la preparación farmacéutica, líquida, límpida, hidroalcohólica, de sabor dulce, agradable, presentando tenor alcohólico en la banda de 20% a 50%.

Los elixires son preparados por disolución simple y deben ser envasados en frascos de color ámbar y mantenidos en lugar fresco y al abrigo de la luz.

*Embalaje*

Es el envoltorio, recipiente o cualquier forma de envasado, removible o no, destinada a cubrir, empaquetar, envasar, proteger o mantener, específicamente o no, los medicamentos, las drogas, los insumos farmacéuticos y relacionados, los cosméticos, los desinfectantes y otros productos. Las condiciones de envasado son descritas en las monografías individuales utilizando los términos relacionados a continuación.

*Embalaje primario*

Es el que está en contacto directo con su contenido durante todo el tiempo. Se considera material de embalaje primario: ampolla, tubo, sobre, estuche, frasquito, frasco de vidrio o de plástico, frasco-ampolla, cartucho, lata, pote, bolsa de papel y otros.

No debe haber cualquier interacción entre el material de embalaje primario y su contenido capaz de alterar la concentración, la calidad o la pureza del material envasado.

*Embalaje secundario*

Es el que posibilita total protección del material envasado en las condiciones usuales de transporte, almacenamiento y distribución. Se considera embalaje secundario: cajas de cartón, cartuchos de cartulina, madera o material plástico o estuche de cartulina y otros.

*Emplasto*

Es la forma farmacéutica semisólida para aplicación externa. Consiste de una base adhesiva que contiene uno o más principios activos distribuidos en una capa uniforme en un soporte apropiado hecho de material sintético o natural. Destinada a mantener el principio activo en contacto con la piel actuando como protector o como agente queratolítico. Abreviatura: *emp*.

*Emulsión*

Es la forma farmacéutica líquida de uno o más principios activos que consiste de un sistema de dos fases que envuelven por lo menos dos líquidos inmiscibles y en la cual un líquido está disperso en forma de pequeñas gotas (fase interna o dispersa) a través de otro líquido (fase externa o continua). Normalmente es estabilizada por medio de uno o más agentes emulsionantes. Abreviatura: emu.

*Emulsión aerosol*

Es la emulsión embalada bajo presión que contiene un gas propelente e ingredientes terapéuticamente activos que son liberados después de la activación de un sistema apropiado de válvulas. Abreviatura: emu. aer.

*Emulsión gotas*

Es la emulsión destinada a la administración en forma de gotas. Abreviatura: emu. go.

*Emulsión inyectable*

Es la emulsión estéril. Abreviatura: emu. iny.

*Emulsión para infusión*

Es la emulsión estéril con agua como la fase continua, normalmente, isotónica con la sangre y utilizada principalmente para la administración en gran volumen. Abreviatura: emu. inf.

*Emulsión spray*

Es la emulsión administrada en forma de líquido finamente dividido por un chorro de aire o vapor. Abreviatura: emu. spray

*Ensayos biológicos*

Son procedimientos destinados a evaluar la potencia de principios activos contenidos en las materias primas y preparaciones farmacopeicas, utilizando reactivos biológicos tales como microorganismos, animales, fluidos y órganos aislados de animales.

*Espíritu*

Es la forma farmacéutica líquida alcohólica o hidroalcohólica, conteniendo principios aromáticos o medicamentosos y clasificados en simples y compuestos. Abreviatura: esp.

Los espíritus son obtenidos por la disolución de sustancias aromáticas en etanol, generalmente en la proporción de 5% (p/v).

*Esterilidad*

Esterilidad es la ausencia de microorganismos viables.

*Extracto*

Es la preparación de consistencia líquida, sólida o intermedia, obtenida a partir de material animal o vegetal. El material utilizado en la preparación de extractos puede sufrir tratamiento preliminar, tales como, inactivación de enzimas, trituración o desengrasado. Abreviatura: ext.

El extracto es preparado por percolación, maceración u otro método adecuado y validado, utilizando como solvente alcohol etílico, agua u otro solvente adecuado. Después de la extracción, materiales indeseables pueden ser eliminados.

*Extracto fluido*

Es la preparación líquida obtenida de drogas vegetales o animales por extracción con líquido apropiado o por disolución del extracto seco correspondiente, en que, excepto cuando indicado de manera diferente, una parte del extracto, en masa o volumen corresponde a una parte, en masa, de la droga, seca utilizada en su preparación. si necesario, los extractos fluidos pueden ser estandarizados en términos de concentración del solvente; tenor de constituyentes, o de residuo seco. si necesario pueden ser añadidos conservantes inhibidores del crecimiento microbiano. Deben presentar tenor de principios activos y residuos secos prescritos en las respectivas monografías. Abreviatura: ext. flu.

*Extracto blando*

Es la preparación de consistencia pastosa obtenida por evaporación parcial del solvente utilizado en su preparación. Son utilizados como solvente, únicamente, alcohol etílico, agua, o mezclas alcohol etílico/agua en proporción adecuada. Presentan, como mínimo, 70% de residuo seco (p/p). si necesario pueden ser añadidos conservantes inhibidores del crecimiento microbiano. Abreviatura: ext. blando

*Extracto seco*

Es la preparación sólida; obtenida por evaporación del solvente utilizado en su preparación. Presenta, como mínimo, 95% de residuo seco, calculado como porcentaje de masa. Pueden ser añadidos materiales inertes adecuados. Abreviatura: ext. seco

Los extractos secos estandarizados tienen el tenor de sus constituyentes ajustado por la adición de materiales inertes adecuados o por la adición de extractos secos obtenidos con el mismo fármaco utilizado en la preparación.

*Fabricación*

Son todas las operaciones que se hacen necesarias para la obtención de los productos para la salud.

*Banda de destilación*

Banda de destilación es el intervalo de temperatura corregida para la presión de 101,3 kPa (760 mm de Hg), dentro

de la cual el líquido, o fracción específica del líquido, se destila por completo.

#### *Banda de fusión*

Banda de fusión de una sustancia es el intervalo de temperatura comprendido entre el inicio (en el cual la sustancia comienza a fluidificarse) y el término de la fusión (es evidenciado por la desaparición de la fase sólida).

#### *Fármaco*

*Vea* Insumo farmacéutico activo. Farmacopeico

La expresión farmacopeico sustituye las expresiones: oficial y oficinal, utilizadas en ediciones anteriores, equivaliéndose a esas expresiones para todos los efectos.

Factor VII de la coagulación sanguínea humana, liofilizado

Es la fracción proteica del plasma que contiene el Factor VII (un derivado glicoproteico de cadena simple), pudiendo igualmente contener pequeñas cantidades de su forma activada (el derivado de 2 cadenas o Factor VIIa).

Factor VIII de la coagulación sanguínea de origen humana, liofilizado

Es la fracción proteica del plasma que contiene una glicoproteína llamada Factor VIII de la coagulación y, en función del método de purificación, cantidades variables del Factor de Von Willebrand. Es preparado a partir de una mezcla de plasma humano para fraccionamiento obtenido de donantes sanos.

#### *Fibrinógeno humano, liofilizado*

Es la fracción soluble del plasma humano, obtenida a partir del *Plasma humano para fraccionamiento*, que por adición de la trombina, se transforma en fibrina. La preparación puede contener aditivos (sales, tampones o estabilizantes) y cuando reconstituida (adición del diluyente) debe contener como mínimo, 10 g/L de fibrinógeno.

#### *Forma farmacéutica*

Es el estado final de presentación de los principios activos farmacéuticos después de una o más operaciones farmacéuticas ejecutadas con la adición o no de excipientes apropiados a fin de facilitar su utilización y obtener el efecto terapéutico deseado, con características apropiadas a una determinada vía de administración.

#### *Gel*

Es la forma farmacéutica semisólida de uno o más principios activos que contiene un agente gelificante para suministrar firmeza a una solución o dispersión coloidal (un sistema en el cual partículas de dimensión coloidal – típicamente entre 1 nm y 1 µm – son distribuidas uniformemente a través del líquido). Un gel puede contener partículas suspendidas.

#### *Gel hidrofóbico*

Es el gel que consiste, usualmente, de parafina líquida con polietileno o aceites grasos con sílice coloidal o jabones de aluminio o zinc.

#### *Gel lipofílico*

Es el gel resultante de la preparación obtenida por la incorporación de agentes gelificantes – tragacanto, almidón, derivados de celulosa, polímeros carboxivinílicos y silicatos dobles de magnesio y aluminio al agua, glicerol o propilenglicol.

#### *Glóbulo*

Es la forma farmacéutica sólida que se presenta bajo la forma de pequeñas esferas constituidas de sacarosa o de mezcla de sacarosa y lactosa. Están impregnadas por la potencia deseada y con alcohol arriba de 70%.

#### *Goma de mascar*

Es la forma farmacéutica sólida de dosis única que contiene uno o más principios activos, que consiste de material plástico insoluble, dulce y sabroso. Cuando es masticado, libera el principio activo.

#### *Granulado*

Es la forma farmacéutica sólida que contiene una dosis única de uno o más principios activos, con o sin excipientes. Consiste de agregados sólidos y secos de volúmenes uniformes de partículas de polvo resistentes a la manipulación. Abreviatura: granu.

#### *Granulado efervescente*

Es el granulado que contiene, en adición a los ingredientes activos, sustancias ácidas y carbonatos o bicarbonatos, los cuales liberan dióxido de carbono cuando el granulado es disuelto en agua. Está destinado a ser disuelto o disperso en agua antes de la administración. Abreviatura: granu. efer.

#### *Granulado para solución*

Es el granulado destinado a ser disuelto en agua antes de la administración. La solución producida puede ser lechosa debido a los excipientes utilizados en la fabricación de los granulados. Abreviatura: granu. sol.

#### *Granulado para suspensión*

Es el granulado que en contacto con un líquido, rápidamente, produce una dispersión homogénea (suspensión). Es destinado a ser disperso antes de la administración. Abreviatura: granu. susp.

#### *Granulado revestido*

Es el granulado que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente poliméricas, destinadas a prote-

ger el fármaco del aire o humedad, para fármacos con olor y sabor desagradables, para mejorar la apariencia de los granulados o para alguna otra propiedad que no sea la de alterar la velocidad o extensión de la liberación del principio activo. Abreviatura: granu. rev.

#### *Granulado revestido de liberación prolongada*

Es el granulado que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente poliméricas, destinadas a modificar la velocidad o extensión de la liberación de los principios activos. Ver definición de liberación prolongada. Abreviatura: gran. rev. lib. pro.

#### *Granulado revestido de liberación retardada*

Es el granulado que posee una o más capas finas de revestimiento, normalmente poliméricas, destinadas a modificar la velocidad o extensión de la liberación de los principios activos, presentando una liberación retardada del principio activo. Ver definición general de liberación retardada. Abreviatura: granu. rev. lib. ret.

#### *Inmunoglobulina humana contra la hepatitis A*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra la hepatitis B*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, Inmunoglobulina humana contra la hepatitis B principalmente la inmunoglobulina G.

Inmunoglobulina humana contra la hepatitis B para uso intravenoso

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra la rabia*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra la rubeola*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra la varicela*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra la varicela para uso intravenoso*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra el antígeno D*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra el sarampión*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G.

#### *Inmunoglobulina humana contra el tétanos*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada que contiene inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G. Es obtenida a partir del plasma conteniendo anticuerpos específicos contra la toxina del *Clostridium tetani*.

#### *Inmunoglobulina humana normal*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada conteniendo principalmente IgG. Otras proteínas, también, pueden estar presentes.

#### *Inmunoglobulina humana normal para administración por vía intravenosa*

Es una preparación estéril; líquida, o liofilizada conteniendo inmunoglobulinas, principalmente la inmunoglobulina G (IgG). Pueden estar presentes otras proteínas. Contiene anticuerpos IgG de individuos normales.

#### *Indicador biológico*

Es una preparación caracterizada de microorganismo específico que posee resistencia definida y estable a un determinado proceso de esterilización.

#### *Índice de refracción*

El índice de refracción (n) de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad en el interior de la sustancia.

Para fines prácticos se mide la refracción con referencia al aire y a la sustancia y no con referencia al vacío y a la sustancia.

Se puede definir el índice de refracción como la relación entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción, esto es,  $n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$ .

#### *Inyectable*

Es la preparación estéril destinada a la administración parenteral. Se presenta como solución, suspensión, o emulsión. Abreviatura: iny.



*Insecticidas*

Son productos para usos externos, destinados a la prevención y al control de los insectos, en habitaciones, recintos y lugares de uso público y sus cercanías.

*Insulina*

Insulina es una proteína que afecta el metabolismo de la glucosa. Ella es obtenida del páncreas de bovinos y porcinos saludables, o ambos, utilizados como alimento por los humanos.

*Insulina humana*

Insulina humana es una proteína correspondiente a un principio activo elaborado en el páncreas humano que afecta el metabolismo de los carbohidratos (particularmente glucosa), lípidos, y proteínas.

*Insulina humana isófana suspensión*

Insulina humana isófana suspensión es una suspensión estéril de cristales de insulina humana zinc y sulfato protamina en agua tamponada para la inyección, combinados de una manera tal que la fase sólida de la suspensión es compuesta por cristales de insulina humana, protamina, y zinc.

*Insulina humana isófana suspensión e inyección insulina humana*

Insulina humana isófana suspensión e insulina humana inyección es una suspensión estéril tamponada de insulina humana, completada con sulfato de protamina, en una solución de insulina humana.

*Insulina humana zinc suspensión*

Es una suspensión estéril de insulina humana en agua tamponada para la inyección, modificada por la adición de una sal de zinc adecuada de modo que la fase sólida de la suspensión es constituida por una mezcla de insulina cristalina y amorfa en una razón de cerca de 7 partes de cristales y de 3 partes de material amorfo.

*Insulina humana zinc suspensión extendida*

Es una suspensión estéril de insulina humana en agua tamponada para la inyección, modificada por la adición de una sal de zinc adecuada para que la fase sólida de la suspensión sea predominantemente cristalina.

*Insulina inyectable*

Insulina inyectable es una solución isotónica y estéril de insulina.

*Insulina lispro*

Es idéntica en estructura a la insulina humana, excepto que ella tiene de lisina y prolina en las posiciones 28 y 29, respectivamente, de la cadena B, mientras esta secuencia es

invertida en insulina humana. Insulina lispro es producida por síntesis microbiana a través de un proceso de ADN recombinante.

*Insumo farmacéutico activo*

Es una sustancia química activa, fármaco, droga, o materia prima que tenga propiedades farmacológicas con finalidad medicamentosa utilizada para diagnóstico, alivio, o tratamiento, empleada para modificar o explorar sistemas fisiológicos o estados patológicos en beneficio de la persona en la cual se administra.

Cuando se destina al empleo en medicamentos, deben atender a las exigencias previstas en las monografías individuales.

*Aisladores*

Son equipos que emplean tecnología usada para doble propuesta, de proteger el producto de la contaminación del ambiente y personas durante envase y cierre y de proteger personas de productos tóxicos o nocivos que son producidos.

*Liberación convencional*

Es el tipo de liberación de formas farmacéuticas que no son modificadas intencionalmente por un diseño de formulación especial y/o método de fabricación.

*Liberación paramétrica*

Es definida como la liberación de carga o lotes de productos sometidos a la esterilización terminal, por medio del cumplimiento de parámetros críticos del proceso de esterilización, sin la necesidad de realización de la prueba de esterilidad.

*Liberación prolongada*

Es el tipo de liberación modificada de formas farmacéuticas que posibilita por lo menos una reducción en la frecuencia de dosis cuando se compara con el medicamento presentado en la forma de liberación convencional. Es obtenida por medio de un diseño de formulación especial y/o método de fabricación.

*Liberación retardada*

Es el tipo de liberación modificada de formas farmacéuticas que presenta una liberación retardada del principio activo. La liberación retardada es obtenida por medio de un diseño de formulación especial y/o método de fabricación. Las preparaciones gastroresistentes son consideradas formas de liberación retardada, pues son destinadas a resistir al fluido gástrico y liberar el principio activo en el fluido intestinal.

*Loción*

Es la preparación líquida acuosa o hidroalcohólica, con viscosidad variable, para aplicación en la piel, incluyendo el cuero cabelludo. Puede ser solución, emulsión o suspensión conteniendo uno o más principios activos o adyuvantes.

*Lote o partida*

Es la cantidad de un medicamento, u otro producto, que se produce en un ciclo de fabricación y cuya característica esencial es la homogeneidad.

*Material de embalaje*

Se comprende por material de embalaje el recipiente; envoltorio; o cualquier otra forma de protección, removible o no, usado para envasar; proteger; mantener; cubrir; o empaquetar, específicamente, o no, materias primas; reactivos y medicamentos. Abreviatura: mat. emb.

*Materias primas*

Sustancias activas o inactivas que se emplean en la fabricación de medicamentos y de otros productos, tanto las que permanecen inalteradas como las posibles de sufrir modificaciones.

*Media fill (prueba de llenado de medios)*

Es una prueba para simulación de las operaciones asépticas en que el producto es sustituido por un medio de cultivo y sirve para asegurar que los procesos utilizados sean capaces de producir productos estériles.

*Medicamento*

Es el producto farmacéutico, técnicamente, obtenido, o elaborado, que contiene uno o más fármacos y otras sustancias, con finalidad profiláctica; curativa; paliativa; o para fines de diagnóstico.

*Medicamento de referencia*

Es el producto innovador registrado en el órgano federal Brasileño, responsable de la vigilancia sanitaria y comercializado en el país, cuya eficacia, seguridad y calidad fueron comprobadas, científicamente, en el órgano federal competente, por ocasión del registro.

*Medicamento genérico*

Es el medicamento similar a un producto de referencia o innovador, que pretende ser con ese intercambiable, generalmente producido después de la expiración o renuncia de la protección de la patente o de otros derechos de exclusividad, comprobada su eficacia, seguridad y calidad, y designado por la DCB o, en su ausencia, por la DCI.

*Medicamento intercambiable*

Es el medicamento equivalente terapéutico de un medicamento de referencia, comprobados, esencialmente, los mismos efectos de eficacia y seguridad.

*Medicamento magistral*

Es todo medicamento cuya prescripción pormenoriza la composición, la forma farmacéutica y la posología. Es preparado en la farmacia, por un profesional farmacéutico habilitado o bajo su supervisión directa.

*Medicamento presurizado*

Es el medicamento envasado en frascos mantenidos sobre presión, conteniendo un gas propelente e ingredientes, terapéuticamente activo que es liberado después de la activación de sistema apropiado de válvulas.

*Medicamento similar*

Es aquel que contiene el mismo o los mismos principios activos, presenta la misma concentración, forma farmacéutica, vía de administración, posología e indicación terapéutica, y que es equivalente al medicamento registrado en el órgano federal, responsable de la vigilancia sanitaria, pudiendo diferir solamente en características relativas al tamaño y forma del producto, plazo de validez, embalaje, etiquetado, excipientes y vehículo, debiendo siempre ser identificado por nombre comercial o marca.

*Media vida biológica*

Es el tiempo necesario para que un organismo retire, por eliminación biológica, mitad de la cantidad de una sustancia administrada.

*Media vida efectiva*

Es el tiempo necesario para que un radionucléido en un organismo disminuya su actividad por la mitad como un resultado combinado de la eliminación biológica y de la decadencia radioactiva. La media vida efectiva es importante para el cálculo de la dosis óptima del radiofármaco a ser administrada y en el monitoreo de la cantidad de exposición a la radiación.

*Métodos inmunoquímicos*

Son métodos que se basan en una conexión selectiva, reversible y no covalente entre antígenos y anticuerpos.

*Mezclas de plasma humano excedente tratado por inactivación viral*

Preparación congelada o liofilizada, estéril, apirogénica, obtenida a partir de plasma humano excedente proveniente de donantes del mismo grupo sanguíneo ABO y Rh(D<sub>u</sub>). La preparación es descongelada o reconstituida antes de su uso para obtener una solución inyectable. El plasma huma-



no utilizado debe satisfacer a las exigencias de la monografía Plasma humano para fraccionamiento.

#### *Nivel de garantía de esterilidad*

Es el grado de garantía que el proceso en cuestión esteriliza una población de ítems, siendo expresado como la probabilidad de un ítem no estéril en aquella población.

#### *Nombre químico*

Es el nombre de la sustancia farmacopeica, de acuerdo con la nomenclatura preconizada por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

#### *Número del lote*

Designación impresa en la etiqueta de un medicamento y de otros productos que permita identificar el lote o la partida a la que pertenecen y, en caso de necesidad, localizar y rever todas las operaciones de fabricación e inspección practicadas durante la producción.

#### *Nutrimientos*

Son sustancias constituyentes de los alimentos de valor nutricional, incluyendo proteínas, grasas, hidratos de carbono, agua, elementos minerales y vitaminas.

#### *Osmolalidad*

Es una forma práctica que da una medida total de la contribución de varios solutos en una solución por la presión osmótica de la solución. La unidad de osmolalidad es osmol por kilogramo (osmol/kg), pero el submúltiplo miliosmol por kilogramo (mosmol/kg) es normalmente usado.

#### *Óvulo*

Es la forma farmacéutica sólida, de dosis única, que contiene uno o más principios activos dispersos o disueltos en una base adecuada que tiene varios formatos, usualmente, ovoide. Se funden en la temperatura del cuerpo.

#### *Estándares de referencia de la Farmacopea Brasileña*

De acuerdo con definición de la OMS, estándares de referencia farmacopeicos (PRef) son productos de uniformidad reconocida, destinados al uso en ensayos donde una o más de sus propiedades será(n) comparada(s) con la(s) de la sustancia en examen. Poseen un grado de pureza adecuado al uso al cual se destinan.

El PRef es establecido y distribuido por autoridades farmacopeicas, cuyo valor atribuido a una o más de sus propiedades es aceptado sin necesitar comparación con otro estándar, destinado al uso en ensayos específicos descritos en las monografías farmacopeicas. Incluyen sustancias químicas de referencia, productos biológicos, extractos y polvos vegetales, radiofármacos, entre otros. La expresión relacionada más usada es: Sustancia Química de Referencia Farmacopeica.

#### *Pasta*

Es la pomada que contiene gran cantidad de sólidos en dispersión (por lo menos 25%). Deberán atender las especificaciones establecidas para pomadas.

#### *Pastilla*

Es la forma farmacéutica sólida que contiene uno o más principios activos, usualmente, en una base dulce y con sabor. Es utilizada para disolución, o desintegración lenta en la boca. Puede ser preparada por modelado, o por compresión. Abreviatura: pas.

#### *Pastilla dura*

Pastilla rígida para ser disuelta lentamente. Abreviatura: pas. dura

#### *Pastilla gomosa*

Pastilla flexible y suave de mezclas que contiene polímeros sintéticos o naturales. Abreviatura: pas. go.

#### *Perfume*

Es el producto de composición aromática obtenida a base de sustancias naturales o sintéticas, que, en concentraciones y vehículos apropiados, tengan como principal finalidad la aromatización de personas o ambientes, incluidos los extractos, las aguas perfumadas, los perfumes cremosos, preparados para baño y los aromatizantes de ambientes, presentados en forma líquida, gelatinosa, pastosa o sólida.

#### *Plasma fresco congelado*

Es la parte líquida remanente de una unidad de sangre total obtenida después de centrifugación y separación de sus fracciones celulares que deberá ser totalmente congelado hasta 4 horas después de la recolección de la sangre total que le dio origen, asegurando el mantenimiento de la integridad y concentraciones de los factores lábiles de la coagulación.

#### *Plasma humano para fraccionamiento*

Es la parte líquida remanente de la sangre total después de separación de las fracciones celulares sanguíneas mediante el uso de sistemas cerrados apropiados de recolección o centrifugación, que contienen los factores lábiles de la coagulación. Contiene solución anticoagulante, conservadora y preservadora, siendo almacenado a una temperatura de  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  o inferior. Se destina a la preparación de hemoderivados de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos.

#### *Polvo*

Es la forma farmacéutica sólida conteniendo uno o más principios activos secos y con tamaño de partícula reducido, con o sin excipientes.

*Polvo aerosol*

Es el polvo embalado bajo presión conteniendo un gas propelente e ingredientes terapéuticamente activos que son liberados después de la activación de un sistema apropiado de válvulas. Abreviatura: polvo aer.

*Polvo efervescente*

Es el polvo conteniendo, en adición a los ingredientes activos, sustancias ácidas y carbonatos o bicarbonatos, los cuales liberan dióxido de carbono cuando el polvo es disuelto en agua. Es destinado a ser disuelto o disperso en agua antes de la administración. Abreviatura: polvo efef.

*Polvo liofilizado para solución inyectable*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una solución. Preparado por liofilización, un proceso que envuelve la eliminación de agua de los productos por el congelamiento a presiones extremadamente bajas. Abreviatura: polvo liof. sol. iny.

*Polvo liofilizado para suspensión inyectable*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una suspensión. Preparado por liofilización, un proceso que envuelve la eliminación de agua de los productos por el congelamiento a presiones extremadamente bajas. Abreviatura: polvo liof. sus. iny.

*Polvo liofilizado para suspensión inyectable de liberación prolongada*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una suspensión. Preparado por liofilización, un proceso que envuelve la eliminación de agua de los productos por el congelamiento a presiones extremadamente bajas. Vea definición general de liberación prolongada. Abreviatura: polvo. liof. sus. iny. lib. pro.

*Polvo para colutorio*

Es el polvo que debe ser disuelto en agua antes del uso para el preparo del colutorio, que es un líquido destinado al enjuague bucal para actuar sobre las encías y las mucosas de la boca y de la garganta. No debe ser tragado. Abreviatura: polvo colu.

*Polvo para solución*

Es el polvo destinado a ser reconstituido para formar una solución. Abreviatura: polvo sol.

*Polvo para solución inyectable*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una solución. Abreviatura: polvo sol. iny.

*Polvo para solución para infusión*

Es el polvo estéril destinado a la reconstitución para formar una solución para uso por infusión. Esa solución es, normalmente, isotónica con la sangre y utilizada principalmente para administración en gran volumen. Abreviatura: polvo sol. inf.

*Polvo para suspensión*

Es el polvo destinado a ser reconstituido para formar una suspensión. Abreviatura: polvo sus.

*Polvo para suspensión inyectable*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una suspensión. Abreviatura: polvo sus. iny.

*Polvo para suspensión inyectable de liberación prolongada*

Es el polvo estéril destinado a la adición subsiguiente de líquido para formar una suspensión. Vea definición de liberación prolongada. Abreviatura: polvo sus. iny. lib.pro.

*Pomada*

Es la forma farmacéutica semisólida, para aplicación en la piel o en membranas mucosas, que consiste de la solución o dispersión de uno o más principios activos en bajas proporciones en una base adecuada usualmente no acuosa. Abreviatura: pom.

*Plazo de validez*

Es el tiempo durante el cual el producto podrá ser usado, caracterizado como período de vida útil y fundamentada en los estudios de estabilidad específicos. Abreviatura: val.

El plazo de validez deberá ser indicado en los embalajes primarios y secundarios. Cuando indicar mes y año, se entiende como vencimiento del plazo el último día de ese mes. Las condiciones especificadas, por el fabricante, de almacenamiento y transporte deben ser mantenidas.

*Preparación tópica semisólida*

Es la preparación prevista para aplicación en la piel o en ciertas mucosas para acción local o penetración percutánea de medicamentos, o además por su acción emoliente o protectora.

*Proceso aséptico*

Es aquel proyectado para prevenir la contaminación de los componentes estériles por microorganismos viables o además en la fase intermedia de la producción.

*Producto de higiene*

Es el producto para uso externo; antiséptico o no; destinado al aseo o a la desinfección corporal, comprendiendo el jabón, shampoo, dentífrico, enjuague bucal, antitranspirante, desodorante, producto para barbear y después de barbear, estíptico y otros. Abreviatura: pro. hig.

*Producto dietético*

Es el producto técnicamente elaborado para atender a las necesidades dietéticas de personas en condiciones fisiológicas especiales. Abreviatura: pro. diet.

*Producto semielaborado*

Es toda sustancia o mezcla de sustancias todavía bajo el proceso de fabricación.

*Pureza*

Grado en que un fármaco, materia prima contiene otros materiales extraños.

*Raticida*

Es la preparación destinada al combate de ratas, ratones y otros roedores, en domicilios, embarcaciones, recintos y lugares de uso público, conteniendo sustancias activas, aisladas o en asociación, que no ofrezcan riesgo a la vida o a la salud del hombre y de los animales útiles de sangre caliente, cuando aplicados en conformidad con las recomendaciones contenidas en su presentación.

*Reacciones químicas de identificación*

Son reacciones usadas en el auxilio de la caracterización de una sustancia. A pesar de que específicas, sólo serán suficientes para establecer o confirmar la identidad de la sustancia cuando consideradas en conjunto con otras pruebas y especificaciones constantes en la monografía.

A no ser que la monografía especifique diferentemente, las reacciones químicas son hechas en tubos de ensayo de aproximadamente 15 mm de diámetro interno. Se utilizan 5 ml del líquido o solución a examinar, adicionando tres gotas de reactivo o de cada reactivo. El examen del contenido del tubo de ensayo debe ser hecho sobre toda la camada líquida, observando de cima para abajo, en el sentido del eje longitudinal de los tubos, después de cinco minutos de reposo.

Usualmente, es presentado en la monografía el orden de preferencia de las pruebas de identificación. Cuando no consta el orden, todas las pruebas de identificación deben ser realizadas.

*Reactivos*

Son sustancias utilizadas en pruebas, reacciones, ensayos y dosificaciones farmacopeicas, como tales o en soluciones.

*Recipiente bien cerrado*

Es aquel que protege su contenido de pérdidas y contaminación por sólidos extraños, en las condiciones usuales de manipulación, almacenamiento, distribución y transporte.

*Recipiente hermético*

Es aquel impermeable al aire, o cualquier otro gas, en las condiciones usuales de manipulación, almacenamiento, distribución y transporte.

*Recipiente opaco*

Es aquel que impide la visualización del contenido, cubriendo todos los colores. Constituye barrera de protección a la luminosidad.

*Recipiente para dosis única*

Es el recipiente hermético que contiene determinada cantidad del medicamento destinada a ser administrada de una sola vez y que después de abierto, no podrá ser cerrado con garantía de esterilidad.

*Recipiente para dosis múltiples*

Es el recipiente hermético que posibilita la retirada de porciones sucesivas de su contenido, sin modificar la concentración, la pureza y la esterilidad de la porción remanente.

*Recipiente perfectamente cerrado*

Es aquel que protege su contenido de pérdidas y de contaminación por sólidos, líquidos y vapores extraños, eflorescencia, deliquesencia, o evaporación en las condiciones usuales de manipulación, almacenamiento, distribución, y transporte.

*Recipiente translúcido*

Es aquel que posibilita la visualización parcial del contenido, cubriendo todos los colores excepto el ámbar.

*Recipiente transparente*

Es aquel que posibilita la visualización total del contenido, cubriendo todos los colores excepto el ámbar.

*Registro*

Es la inscripción, en libro propio después del despacho asignado del dirigente del órgano del Ministerio de Salud, bajo número de orden, de los productos, con la indicación del nombre, fabricante, de la procedencia, finalidad y de los otros elementos que los caractericen.

*Resistencia hidrolítica o alcalinidad*

Es el ensayo que cuantifica la intensidad de la reacción química entre el agua y los elementos alcalinos existentes

en el vidrio, especialmente sodio y potasio. Esa resistencia determina la clasificación del tipo de vidrio.

#### *Rótulo*

Es la identificación impresa o litografiada, así como los textos pintados o grabados a fuego, a presión o autoadhesiva, aplicados directamente sobre recipientes; envoltorios; cartuchos; o cualquier otro protector de embalaje, externo o interno, no pudiendo ser retirado o alterado durante el uso del producto y durante su transporte, o su almacenamiento.

La confección de los rótulos deberá obedecer a las normas vigentes del órgano federal de Vigilancia Sanitaria.

#### *Sala limpia*

Sala en la cual la concentración de partículas en suspensión en el aire es controlada. Es construida y utilizada de manera para minimizar la introducción, generación y retención de partículas dentro de la sala, en la cual los otros parámetros relevantes como, por ejemplo, temperatura, humedad y presión, son controlados conforme necesario.

#### *Saneante sanitario*

Es la sustancia o preparación destinada a la higienización; desinfección o desinfección domiciliar; de ambientes colectivos, particulares o públicos, en lugares de uso común y en el tratamiento del agua.

#### *Sangre humana*

Es un tejido vivo, circulante, conjuntivo, de naturaleza celular, plasmática y o proteica, que se encuentra contenido dentro del aparato cardiovascular, desempeñando múltiples y complejas funciones que aseguren al organismo humano el mantenimiento de la vida.

#### *Sangre humana de transfusión*

Es la sangre total humano *in vitro* proveniente de donantes saludables recolectado en sistemas de envase para recolección, almacenamiento y procesamiento del sangre humana conteniendo solución anticoagulante conservadora y preservadora.

#### *Sistema cerrado*

Sistema de administración de soluciones parenterales que, durante toda la preparación y administración, no permite el contacto de la solución con el medio ambiente.

Sistemas de envase para recolección, almacenamiento y procesamiento de la sangre humana o sistemas cerrados de recolección de sangre humana

Son recipientes conocidos o denominados por bolsas plásticas conteniendo o no una solución anticoagulante, conservadora y preservadora, destinados a recolección, almacenamiento, fraccionamiento y administración de la sangre humana o de sus derivados. Son atóxicos, estériles, apiro-

génicos y descartables, pudiendo ser fabricados a partir de uno o varios polímeros, y conforme los casos, de ciertos aditivos y son validados por sus respectivos métodos analíticos.

#### *Solución – forma farmacéutica*

Es la forma farmacéutica líquida; límpida y homogénea, que contiene uno o más principios activos disueltos en un solvente adecuado o en una mezcla de solventes miscibles. Abreviatura: sol.

#### *Solución colorimétrica*

Es la solución utilizada en la preparación de estándares colorimétricos para fines de comparación. Son designadas por "SC".

#### *Solución de albúmina humana*

Solución de albúmina humana es una solución proteica, estéril y apirogénica obtenida del plasma humano que está de acuerdo con las exigencias de la monografía *Plasma Humano para Fraccionamiento*.

#### *Solución molar*

Es la solución que contiene un molar del soluto por kilogramo de solvente.

#### *Solución molar*

Es la solución que contiene una molécula-gramo del soluto en 1000 ml de la solución. Los múltiplos y submúltiplos de la solución molar, también, son designados por números enteros o fracciones decimales como: 2 M; M; 0,5 M; 0,1 M; etc.

#### *Solución normal*

Es la solución que contiene un equivalente gramo del soluto en 1000 ml de la solución. Los múltiplos y submúltiplos de la solución normal, también, son designados por números enteros o fracciones decimales como 2 N, N; 0,5 N, 0,1 N, etc.

#### *Solución volumétrica*

Es la solución de reactivos, de concentración conocida, destinada al uso en determinaciones cuantitativas. En la FB 5 las concentraciones de las soluciones volumétricas están expresadas en molaridad. Son designadas por "SV".

#### *Soluciones anticoagulantes conservadoras y preservadoras de la sangre humana*

Son soluciones destinadas a la recolección de sangre humana objetivando no sólo tornarla incoagulable, pero también asegurar el mantenimiento y la integridad morfofuncionales y proteicas de sus constituyentes celulares y plasmáticos.

*Soluciones indicadoras*

Son soluciones de indicadores en solventes específicos y concentraciones definidas. Son designadas por "SI".

*Soluciones reactivas*

Son soluciones de reactivos en solventes específicos y concentraciones definidas. Son designadas por "SR".

*Sueros hiperinmunes para uso humano*

Los sueros hiperinmunes son preparaciones conteniendo inmunoglobulinas purificadas, de origen animal, que neutralizan específicamente toxinas bacterianas, bacterias, virus o componentes tóxicos del veneno de una o más especies de animales ponzoñosos.

*Sustancia adyuvante*

Es la sustancia con finalidad específica adicionada a las preparaciones inyectables. Esa sustancia debe ser seleccionada teniendo en vista el aumento de la estabilidad del producto; no interferencia en la eficacia terapéutica ni en la determinación de dosis del principio activo; tampoco causar toxicidad en la cantidad administrada al paciente. La sustancia adyuvante puede ser solubilizante; antioxidante; agente quelante; tampón; agente antibacteriano; agente antifúngico; agente antiespumante y otros, cuando especificado en la monografía individual. Abreviatura: subs. ady.

La presencia de sustancia adyuvante debe ser, claramente, indicada en los rótulos de los embalajes primarios y secundarios, en que el producto es entregado para el consumo. Si no hubiese contraindicación expresa, el aire de los recipientes puede ser sustituido por dióxido de carbono o nitrógeno. No está permitida la adición de sustancia colorante.

Están relacionados a continuación los límites máximos para algunos adyuvantes, a menos que la monografía especifique de otra forma:

- para agentes que contienen mercurio o compuestos tensoactivos catiónicos – 0,01%;
- para agentes del tipo clorobutanol, cresol y fenol 0,5%;
- para dióxido de azufre, o cantidad equivalente de sulfito, bisulfito o metabisulfito de potasio o sodio – 0,2%.

*Sustancia química caracterizada*

SQR utilizada en la inexistencia de una SQR Farmacopeica. Esa SQR debe ser caracterizada por medio de ensayos adecuados y los valores obtenidos deben ser debidamente documentados.

*Sustancia Química de Referencia de la Farmacopea Brasileña (SQR.FB)*

Está establecida y dispuesta por la Dirección de la Farmacopea Brasileña, siguiendo los principios de la OMS, y oficializada por la Anvisa, siendo su uso obligatorio en todo territorio nacional. En la ausencia de una SQR. FB es

permitido el uso de SQR establecida por otras farmacopeas reconocidas, conforme legislación vigente.

Los estándares para Espectrofotometría de Absorción Atómica son identificados por medio de la denominación del metal, seguida de la sigla SRA (Solución Reactivo para Absorción Atómica).

*Sustancia química de trabajo*

Es establecida por comparación con una SQR Farmacopeica, por medio de ensayos farmacopeicos, o debidamente validados, y registrados por el propio laboratorio que irá a utilizarla. En esa situación, deberán ser mantenidos los registros analíticos y realizados controles periódicos, empleándose una SQR Farmacopeica.

*Sustancias insaponificables*

Sustancias insaponificables son aquellas remanentes a la reacción de saponificación, no volátiles a 100 – 105 °C y que fueron acarreadas en el proceso de extracción de la sustancia a ser ensayada.

*Supositorio*

Es la forma farmacéutica sólida de varios tamaños y formatos adaptados para introducción en el orificio rectal, vaginal o uretral del cuerpo humano, conteniendo uno o más principios activos disueltos en una base adecuada. Ellos, usualmente, se funden, derriten o disuelven en la temperatura del cuerpo Abreviatura: supo.

*Suspensión*

Es la forma farmacéutica líquida que contiene partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido, en el cual las partículas no son solubles. Abreviatura: sus.

*Suspensión aerosol*

Es la suspensión embalada bajo presión conteniendo un gas propelente e ingredientes terapéuticamente activos que son liberados después de la activación de un sistema apropiado de válvulas. Abreviatura: sus. aer.

*Suspensión de liberación prolongada*

Es la forma farmacéutica líquida que contiene partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido, en el cual las partículas no son solubles. Vea definición de liberación prolongada. Abreviatura: sus. lib. pro.

*Suspensión de liberación retardada*

Es la forma farmacéutica líquida que contiene partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido, en el cual las partículas no son solubles. Vea definición de liberación retardada. Abreviatura: sus. lib. ret.



*Suspensión gotas*

Es la suspensión destinada a la administración en la forma de gotas. Abreviatura: sus. go.

*Suspensión inyectable*

Es la suspensión estéril. Abreviatura: sus. iny.

*Suspensión inyectable de liberación prolongada*

Es la suspensión estéril. Vea definición de liberación prolongada. Abreviatura: sus. iny. lib. pro.

*Suspensión spray*

Es la suspensión administrada en forma de líquido finamente dividido por un chorro de aire o vapor. Abreviatura: sus. spray.

*Tableta*

Es la forma farmacéutica sólida preparada a partir de una masa hecha con solución hidroalcohólica, el principio activo y lactosa, o de la propia trituración humedecida en solución hidroalcohólica. Es moldeada en tableteros y es frágil y quebradiza.

*Tampón*

Es la preparación a base de sales que son capaces de soportar variaciones en la actividad de iones hidrógeno.

*Temperatura o punto de congelamiento*

Temperatura o punto de congelamiento de líquido o de sólido fundido es la más alta temperatura en la cual él se solidifica.

Para sustancias puras que se funden sin descomposición, el punto de congelamiento del líquido es igual a su punto de fusión.

*Temperatura o punto de ebullición*

Temperatura o punto de ebullición de un líquido es la temperatura corregida en la cual el líquido hierve bajo presión de vapor de 101,3 kPa (760 mm de Hg).

*Temperatura o punto de fusión*

Temperatura o punto de fusión de una sustancia es la temperatura en la cual esta se encuentra completamente fundida.

*Tintura*

Es la preparación alcohólica o hidroalcohólica resultante de la extracción de drogas vegetales o animales o de la dilución de los respectivos extractos. Está clasificada en simple y compuesta, conforme sea preparada con una o más materias primas. Abreviatura: tin.

A menos que esté indicado de manera diferente en la monografía individual, 10 ml de tintura simple corresponden a 1 g de droga seca.

*Vacunas*

Productos biológicos que contienen una o más sustancias antigénicas que, cuando inoculadas, son capaces de inducir inmunidad específica activa y proteger contra enfermedad causada por el agente infeccioso que originó el antígeno.

*Valor D (tiempo de reducción decimal)*

Es el tiempo, en minutos, necesario para reducir la población microbiana en 90% o un ciclo logarítmico.

*Valor F*

Es una medida de la eficacia esterilizante, esto es, el número de minutos de esterilización térmica por vapor a la determinada temperatura suministrada a un recipiente o unidad de producto, en un dado valor Z.

*Valor Z*

Es la elevación de temperatura, en grados, necesaria para reducir el *Valor D* en 90% o producir la reducción de un ciclo logarítmico en la curva de resistencia térmica.

*Vías de administración*

Es el local del organismo por medio del cual el medicamento es administrado.

*Viscosidad*

Es la expresión de la resistencia de líquidos al drenaje, o sea, al desplazamiento de parte de sus moléculas sobre moléculas vecinas. La viscosidad de los líquidos viene del rozamiento interno, eso es, de las fuerzas de cohesión entre moléculas relativamente juntas. Con el aumento de la temperatura, aumenta la energía cinética media de las moléculas, disminuye (en promedio) el intervalo de tiempo que las moléculas pasan unas junto de las otras, menos efectivas se tornan las fuerzas intermoleculares y menor la viscosidad.

La unidad dinámica, Sistema CGS, de viscosidad es el *poise*. El Sistema CGS de unidades es un sistema de unidades de medidas físicas, o sistema dimensional, de tipología LMT (longitud, masa, tiempo), cuyas unidades base son el centímetro para la longitud, el gramo para la masa y el segundo para el tiempo.

*Jarabe*

Es la forma farmacéutica acuosa caracterizada por la alta viscosidad, que presenta no menos que 45% (p/p) de sacarosa u otros azúcares en su composición. Los jarabes generalmente contienen agentes saborizantes. Abreviatura: jbe.

Cuando no se destina al consumo inmediato, debe ser adicionado conservantes antimicrobianos autorizados.

## INFORMACIONES GENERALES

*Agua*

El agua mencionada en las pruebas, reacciones y ensayos es agua purificada. Para preparaciones inyectables, se debe utilizar *agua para inyectables*, descrita en monografía individual. Cuando esté prescrito el uso de *agua exenta de dióxido de carbono*, utilizar agua purificada hervida durante, como mínimo, cinco minutos y protegida del aire atmosférico durante el enfriamiento y almacenamiento.

*Aparatos volumétricos*

Los aparatos volumétricos son empleados en las medidas de volumen en las pruebas, en los ensayos y en las dosificaciones farmacopeicas, y deben estar calibrados a la temperatura de 25 °C. Caso el aparato volumétrico no tenga sido calibrado a 25 °C, las medidas de volumen deben ser realizadas en la temperatura en el indicada.

En las mediciones de volumen, el nivel inferior del menisco del líquido contenido en los aparatos volumétricos debe tangenciar la parte superior de la línea de referencia, con la línea de visión en el mismo plano. En los casos de líquidos fuertemente coloridos, u opacos se utiliza como referencia el borde superior del menisco, en el plano horizontal de visión.

Los aparatos volumétricos para transferencia de líquidos (pipetas; o buretas), en virtud de haber sido medidos con agua, sólo podrán suministrar exactamente el volumen indicado cuando los líquidos a ser medidos tengan, aproximadamente, la viscosidad, la tensión superficial y la densidad del agua.

*Conservación*

Las sustancias farmacopeicas deben ser conservadas bajo condiciones tales que eviten su contaminación o deterioro. Las condiciones de conservación de sustancias farmacopeicas figuran en las respectivas monografías.

Proteger de la luz significa que la sustancia debe ser conservada en recipiente opaco o capaz de impedir la acción de la luz.

Proteger del polvo significa que la sustancia debe ser mantenida en frasco enroscado y usar capa protectora.

En la monografía pueden estar definidas las condiciones de temperatura en que la sustancia debe ser conservada, utilizándose términos descritos a continuación.

*En congelador* – En temperatura entre -20 °C y 0 °C.

*En refrigerador* – En temperatura entre 2 °C y 8 °C.

*Local fresco* – Ambiente cuya temperatura permanece entre 8 °C y 15 °C.

*Local frío* – Ambiente cuya temperatura no excede 8 °C.

*Temperatura ambiente* – Temperatura, normalmente, encontrada en un ambiente de trabajo, entre 15 °C y 30 °C.

*Local caliente* – Ambiente cuya temperatura permanece entre 30 °C y 40 °C.

*Calor excesivo* – Indica temperaturas arriba de 40 °C.

Cuando sea necesario conservar un fármaco en local fresco, se puede conservar en refrigerador, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual.

Cuando en la monografía no estén especificadas condiciones de conservación, ellas incluyen protección contra la humedad, congelamiento y calor excesivo.

*Descripción de sustancia*

Las informaciones referentes a la descripción de una sustancia son genéricas y se destinan a la evaluación preliminar de su integridad. La descripción, por sí, no es indicativa de la pureza, debiendo ser asociada a otras pruebas farmacopeicas para asegurar que la sustancia esté de acuerdo con la monografía.

*Desecación hasta peso constante*

Esa expresión significa que el secado debe proseguir hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,5 mg por gramo de la sustancia en examen, siendo que la segunda pesada debe ser efectuada después de una hora de secado adicional en las condiciones especificadas.

*Desecador*

Se comprende por desecador un recipiente que pueda ser perfectamente cerrado, de formato y dimensiones adecuadas que posibilitan mantener atmósfera de bajo tenor de humedad por medio de agentes desecantes en el introducidos, tales como: gel de sílice; cloruro de calcio anhidro; pentóxido de fósforo; ácido sulfúrico; entre otros.

Desecador a la presión reducida es lo que posibilita mantener atmósfera de baja humedad a la presión reducida de no más que 6,7 kPa (aproximadamente 50 mm de mercurio), o a la presión indicada en la monografía.

*Determinación de dosis y determinación de la potencia*

Cuando el resultado de un ensayo o de una determinación de dosis está expresado en relación a la sustancia seca; en relación a la sustancia; o cualquier otra base específica, la determinación de la pérdida por secado, del tenor de agua o de otra propiedad designada es efectuada según el método descrito en el respectivo ensayo en la monografía de la sustancia en causa, o según lo descrito en la etiqueta.

*Ensayos de identificación*

Los ensayos de identificación posibilitan verificar, con un nivel de certeza aceptable, que la identidad del material bajo examen está de acuerdo con el rótulo de su embalaje. A pesar de que específicos, ellos no son, necesariamente,



suficientes para establecer prueba absoluta de identidad. No obstante, el no cumplimiento de los requerimientos de un ensayo de identificación puede significar error de etiquetado del material. Otras pruebas y especificaciones en la monografía contribuyen para la confirmación de la identidad del artículo bajo examen.

Algunos ensayos de identificación deben ser considerados conclusivos como; infrarrojo; espectrofotometría con absorción específica y cromatografía a líquido de alta eficiencia acoplada a espectrofotometría. Esos ensayos deben ser realizados en complemento al ensayo del contraión, cuando aplicable.

#### *Estructura de las monografías*

Las monografías de materias primas son identificadas por sus denominaciones comunes Brasileñas (DCB), grabadas en caja alta y centralizadas. Además de eso, son incluidos, también:

- siempre que posible, la denominación en latín propuesta por el INN – International Non-proprietary Names – Nombres genéricos internacionales de la Organización Mundial de la Salud;
- la fórmula estructural de la sustancia;
- fórmula molecular seguida de la masa molar;
- Denominación Común Brasileña y su respectivo número;
- nombre químico, según la ACS – American Chemical Society;
- registro CAS – Chemical Abstracts Service;
- texto de la monografía.

Las monografías de las preparaciones farmacéuticas son identificadas por el nombre de la materia prima correspondiente, seguido del nombre de la forma farmacéutica.

#### *Expresión de concentraciones*

Las concentraciones en porcentaje son expresadas como las siguientes.

*Por ciento p/p (peso en peso) o % p/p* – Expresa el número de g de un componente en 100 g de mezcla.

*Por ciento p/v (peso en volumen) o % p/v* – Expresa el número de g de un componente en 100 ml de solución.

*Por ciento v/v (volumen en volumen) o % v/v* – Expresa el número de ml de un componente en 100 ml de solución.

*Por ciento v/p (volumen en peso) o % v/p* – Expresa el número de ml de un componente en 100 g de mezcla.

La expresión por ciento, usada sin otra atribución, significa: mezcla de sólidos y semisólidos, por ciento p/p; para soluciones o suspensiones de sólidos en líquidos, por ciento p/v; para soluciones de líquidos, por ciento v/v; para soluciones de gases en líquidos, por ciento p/v; para expresar tenor de aceites esenciales en drogas vegetales, por ciento v/p.

#### *Impurezas*

Las pruebas descritas en las monografías limitan las impurezas a cantidades que aseguren calidad al fármaco. El hecho de que los ensayos no incluyan una impureza poco frecuente no significa que ella pueda ser tolerada.

#### *Incineración hasta peso constante*

Esa expresión significa que la incineración debe proseguir a  $800 \pm 25$  °C, o a otra temperatura indicada en la monografía, hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,5 mg por gramo de la sustancia en examen, siendo que la segunda pesada debe ser efectuada después de quince minutos de incineración adicional.

#### *Interpretación de la precisión de los datos numéricos y límites de tolerancia*

La precisión deseada en las pruebas; reacciones y ensayos farmacopeicos está indicada por el número de decimales que se presenta en el texto. Por ejemplo, el valor numérico 20 indica valores no menores que 19,5 y no mayores que 20,5; el valor numérico 2,0 indica valores no menores que 1,95 y no mayores que 2,05; el valor numérico 0,20 indica valores no menores que 0,195 y no mayor que 0,205.

Los límites de tolerancia, expresados, numéricamente, por un valor máximo y mínimo, indican la pureza de una sustancia farmacopeica. Esos valores pueden ser expresados en porcentaje o números absolutos.

La banda de la variación debe ser estrictamente observada, no siendo tolerados valores fuera de los límites máximo y mínimo.

#### *Material de embalaje primario y secundario*

Se comprende por material de embalaje el recipiente; envoltorio o cualquier otra forma de protección; removible o no; usado para envasar; proteger; mantener; cubrir o empaquetar, específicamente o no, materias primas; reactivos y medicamentos.

Material de embalaje primario es lo que está en contacto directo con su contenido durante todo el tiempo. Se considera material de embalaje primario: ampolla; tubo; sobre; estuche; frasquito; frasco de vidrio o de plástico; frasco-ampolla; cartucho; lata; pote; bolsa de papel y otros.

Embalaje secundario es el que se destina a la total protección del material envasado en las condiciones usuales de transporte, almacenamiento y distribución. Se considera embalaje secundario: cajas de cartón; cartuchos de cartulina; madera o material plástico o estuche de cartulina y otros. No debe haber cualquier interacción entre el material de embalaje primario y su contenido capaz de alterar la concentración; la calidad; o la pureza del material envasado. Las condiciones de envasado son descritas en las monografías individuales, utilizándose los términos relacionados a continuación.

*Recipiente bien cerrado* – Es aquel que protege su contenido de pérdidas y contaminación por sólidos extraños, en las condiciones usuales de manipulación; de almacenamiento; de distribución y de transporte.

*Recipiente perfectamente cerrado* – Es aquel que protege su contenido de pérdidas y de contaminación por sólidos, líquidos y vapores extraños, eflorescencia, deliquesencia, o evaporación en las condiciones usuales de manipulación; almacenamiento; distribución y transporte.

*Recipiente hermético* – Es aquel impermeable al aire, o cualquier otro gas, en las condiciones usuales de manipulación; almacenamiento; distribución y transporte,

*Cilindro de gas* – Es el recipiente metálico, perfectamente cerrado, de paredes resistentes, destinado a contener gas bajo presión, obturado por válvula regulable, capaz de mantener la salida del gas en caudal determinado.

*Recipiente para dosis única* – Es el recipiente hermético que contiene determinada cantidad del medicamento destinada a ser administrada de una sola vez y que después de abierto, no podrá ser cerrado con garantía de esterilidad.

*Recipiente para dosis múltiples* – Es el recipiente hermético que permite la retirada de porciones sucesivas de su contenido, sin modificar la concentración; la pureza y la esterilidad de la porción remanente.

#### *Medidas de presión*

La expresión pascal (Pa), usada para medidas de presión como la arterial; la atmosférica o la interna de un aparato, se refiere al uso de manómetros o barómetros calibrados con relación a la presión ejercida por la fuerza de 1 Newton uniformemente distribuida sobre una superficie plana de 1 m<sup>2</sup> de área perpendicular a la dirección de la fuerza; 1 pascal equivale a 7,5 x 10<sup>-3</sup> mm de mercurio.

#### *Olor*

Las expresiones: *inodora*; *prácticamente inodora*; *leve olor característico*; o sus variaciones, son usadas examinándose la muestra después de expuesta al aire por quince minutos, cuando se trate de embalajes de hasta 25 g abiertos recientemente. En el caso de embalajes mayores, transferir muestras de aproximadamente 25 g para cápsula de 100 ml de capacidad.

La caracterización del olor es apenas descriptiva y no puede ser considerada como estándar de pureza, excepto en los casos en que un olor particular, no permitido, sea indicado en la monografía individual.

#### *Preparación de soluciones*

Todas las soluciones utilizadas en pruebas, ensayos y reacciones son preparadas con agua purificada, a menos que sea indicado de manera diferente en la monografía individual.

La expresión *recientemente preparada*, referente al preparado de soluciones utilizadas en pruebas, ensayos y reac-

ciones, indica que la solución debe ser preparada, como máximo, 24 horas antes de la realización del ensayo.

#### *Presión reducida*

La expresión *presión reducida* significa presión menor o igual a 6,7 kPa (aproximadamente 50 mm de mercurio), a menos que indicado de manera diferente en la monografía. Cuando en la monografía esté indicada *deseccación bajo presión reducida sobre agente desecante*, la operación debe ser hecha bajo presión reducida en desecador u otro aparato adecuado.

#### *Procesos de fabricación*

Cualquiera que sea el método utilizado, el producto final debe corresponder a las especificaciones incluidas en la Farmacopea Brasileña, 5ª edición.

En la fabricación de productos inyectables; comprimidos; cápsulas; o de otras preparaciones farmacopeicas, es permitido el uso de sustancias adyuvantes, descritas en las monografías y adicionadas con finalidad específica. Ellas deben ser inocuas y no deben tener influencia adversa sobre la eficacia terapéutica de la sustancia activa contenida en la preparación, ni interferir en los ensayos y determinaciones.

#### *Prueba en blanco*

Las expresiones: *ejecutar blanco paralelo*; *hacer prueba en blanco*; o *efectuar ensayo en blanco*, significa repetir la determinación en condiciones idénticas y con cantidades idénticas de reactivos, omitiéndose, apenas, la sustancia en examen.

#### *Recipientes para inyectables*

Los recipientes para preparaciones inyectables deben ser fabricados con materiales que no provoquen interacción con el contenido y posean transparencia suficiente para permitir inspección visual. Las tapas, cuando usadas, tampoco pueden influir en la composición o en la conservación del medicamento, ofreciendo perfecto sellado, inclusive después de perforadas varias veces.

Los recipientes para preparaciones inyectables son clasificados en:

- recipientes para dosis única;
- recipientes para dosis múltiple;
- recipientes para perfusión.

Los recipientes para dosis única: ampollas y cartuchos de uso odontológico, son frascos de vidrio o de material plástico adecuado; cerrados por la fusión del vidrio o con la utilización de opérculos fijos o móviles. El contenido sólo debe ser utilizado en una única dosis, no pudiendo ser reaprovechado.

Los recipientes para dosis múltiple son frascos de vidrio de paredes resistentes que, después de ser llenados con preparaciones líquidas o con sólidos para ser disueltos o suspendidos, son sellados con tapa de otro material. El contenido

de esos frascos puede ser retirado para administración en una única o en varias dosis.

Los recipientes para perfusión son frascos con más de 50 ml de capacidad, pudiendo alcanzar 1000 ml, sellados con tapa de otro material o no, fabricados de vidrio o de plástico. Los medicamentos envasados en esos tipos de recipientes deben ser administrados en una única vez, con la utilización de equipos estériles, y no pueden contener agentes bactericidas o antifúngicos. El uso de otros tipos de adyuvantes debe ser considerado cuidadosamente.

#### Solubilidad

La solubilidad indicada no debe ser tomada en el sentido estricto de constante física, sin embargo, complementa y corrobora con los demás ensayos, pudiendo tener un valor definitivo caso la sustancia no presente la solubilidad mínima exigida, principalmente, en el solvente agua.

Las indicaciones sobre la solubilidad se refieren a las determinaciones hechas a la temperatura de 25 °C. La expresión *solvente* se refiere al agua, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual.

La expresión *partes* se refiere a la disolución de 1 g de un sólido en el número de mililitros del solvente establecido en el número de partes.

Las solubilidades aproximadas constantes en las monografías son designadas por términos descriptivos cuyos significados están relacionados en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Términos descriptivos de solubilidad y sus significados**

<i>Solvente</i>	<i>Término descriptivo</i>
Muy soluble	Menos de 1 parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Ligeramente soluble	De 10 a 30 partes
Poco soluble	De 30 a 100 partes
Muy poco soluble	De 100 a 1000 partes
Prácticamente insoluble o insoluble	De 1000 a 10 000 partes
	Más de 10 000 partes

#### Temperatura

Todas las temperaturas constantes en la FB 5. están expresadas en la escala Celsius, y las medidas son hechas a 25 °C, excepto para medida de densidad y a menos que esté indicado de manera diferente en la monografía individual.

#### Unidades de medida

Son adoptadas en esa Farmacopea las unidades constantes del Sistema Internacional de Unidades (SI), conforme relacionado en el **Anexo B**.

#### Vehículos acuosos

Se usa, generalmente, *agua para inyectables* como vehículo para inyectables acuosos. Soluciones de *cloruro de sodio* o *solución de Ringer* u otras soluciones adecuadas,

preparadas con *agua para inyectables*, pueden ser usadas en parte o totalmente al diferencia de solamente *agua para inyectables*, a menos que la monografía lo especifique de otra forma.

#### Vehículos no acuosos

Vehículos no acuosos utilizados parcial o totalmente en la obtención de preparaciones inyectables pueden ser miscibles o inmiscibles con agua. Entre los vehículos miscibles con agua, los más usados son los alcoholes superiores y los polímeros del óxido de etileno. Entre los inmiscibles con agua, los más usados son los aceites fijos de origen vegetal y los mono y diglicéridos de ácidos grasos.

Los aceites fijos son inodoros o casi inodoros y su olor y sabor no deben recordar los de rancio. Deben satisfacer a las exigencias especificadas en las monografías y presentar las características descritas a continuación.

- prueba de enfriamiento – transferir cantidad de óleo fijo, previamente desecado a 105 °C por dos horas y enfriado a la temperatura ambiente en desecador conteniendo gel de sílice, para recipiente de vidrio incoloro cilíndrico, con diámetro interno de aproximadamente 25 mm. Cerrar el recipiente y sumergir durante cuatro horas en agua mantenida a 10 °C. El líquido debe permanecer suficientemente límpido, para que pueda fácilmente ser vista una línea negra de 0,5 mm de espesor, cuando mantenida verticalmente atrás del cilindro y contra fondo blanco;
- índice de saponificación – entre 185 y 200 (**5.5.29.8**);
- índice de yodo – entre 79 y 128 (**5.5.29.10**);
- sustancias insaponificables – dejar en baño maría 10 ml del óleo con 15 ml de hidróxido de sodio (1:16) y 30 ml de alcohol etílico, agitando ocasionalmente hasta que la mezcla se torne clara. Transferir la mezcla para cápsula de porcelana, evaporar el alcohol etílico en baño maría y mezclar el residuo con 100 ml de agua. Debe resultar solución;
- ácidos grasos libres – los ácidos grasos libres en 10 g del óleo deben consumir, como máximo, 2 ml de hidróxido de sodio 0,02 M.

Los mono o diglicéridos sintéticos de ácidos grasos deben obedecer a las siguientes exigencias:

- son líquidos y permanecen límpidos cuando enfriados a 10 °C;
- índice de yodo – no superior a 140 (**5.5.29.10**).

Los vehículos no acuosos deben ser seleccionados con especial cuidado, pues no pueden ser irritantes, tóxicos o sensibilizantes y no deben interferir en la eficacia terapéutica de la preparación. En casos excepcionales, nombres muy difundidos, sin embargo diferentes de los adoptados por la Denominación Común Brasileña para Fármacos pueden ser citados como “otra denominación”.



# 5 MÉTODOS GENERALES

## 5.1 MÉTODOS GENERALES APLICADOS A MEDICAMENTOS

### 5.1.1 DETERMINACIÓN DE PESO

La prueba se aplica a formas farmacéuticas sólidas en dosis unitaria (comprimidos no revestidos, comprimidos revestidos, pastillas, cápsulas duras y blandas y supositorios), formas farmacéuticas sólidas envasadas en recipientes para dosis unitaria (polvos estériles, polvos liofilizados, polvos para inyectables y polvos para reconstitución de uso oral) y las formas farmacéuticas sólidas y semisólidas envasadas en recipientes para dosis múltiples (granulados, polvos, geles, cremas, pomadas y polvos para reconstitución).

Los pesajes son hechos en balanzas de sensibilidad adecuada.

#### PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS EN DOSIS UNITARIA

Para productos en dosis unitaria, la prueba permite verificar si las unidades de un mismo lote presentan uniformidad de peso. Para realizar la prueba, es necesario determinar, previamente, el peso promedio de unidades del lote.

##### *Comprimidos no revestidos o revestidos con película*

Pesar, individualmente, 20 comprimidos y determinar el peso promedio. Se puede tolerar no más que dos unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

##### *Comprimidos con revestimiento azucarado (grageas)*

Pesar, individualmente, 20 grageas y determinar el peso promedio. Se puede tolerar no más que cinco unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

##### *Cápsulas duras*

Pesar, individualmente, 20 unidades, retirar el contenido de cada una, limpiar adecuadamente y pesar nuevamente. Determinar el peso del contenido de cada cápsula por la diferencia de peso entre la cápsula llena y la vacía. Con los

valores obtenidos, determinar el peso promedio del contenido. Se puede tolerar no más que dos unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio del contenido, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

##### *Cápsulas blandas*

Proceder como descrito para *Cápsulas duras*. Para determinar el peso medio del contenido, cortar las cápsulas previamente pesadas y lavarlas con éter etílico u otro solvente adecuado. Dejar los envoltorios expuestos al aire, en temperatura ambiente, hasta completa evaporación del solvente. Pesar nuevamente.

##### *Supositorios y óvulos*

Pesar, individualmente, 20 supositorios u óvulos y determinar el peso promedio. Se puede tolerar no más que dos unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

##### *Polvos estériles, polvos liofilizados y polvos para inyectables*

Realizar la prueba con 20 unidades. Retirar los lacres metálicos, en el caso de frascos-ampolla. Retirar rótulos que puedan sufrir daños durante la prueba. Secar, si es necesario, la superficie externa de los recipientes. Pesar, individualmente, las 20 unidades, con las respectivas tapas. Retirar el contenido y lavar los respectivos recipientes utilizando agua y enseguida etanol. Secar en estufa a 105 °C, por 1 hora, o en temperaturas inferiores a esa, dependiendo de la naturaleza del material, hasta peso constante. Enfriar a la temperatura ambiente, recolocar la tapa y pesar nuevamente. La diferencia entre los dos pesajes representa el peso del contenido. Determinar el peso promedio del contenido de las 20 unidades. Se puede tolerar no más que dos unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

##### *Polvos para reconstitución (uso oral)*

Proceder conforme descrito para *Polvos estériles, polvos liofilizados y polvos para inyectables*. Se puede tolerar no más que dos unidades fuera de los límites especificados en la **Tabla 1**, en relación al peso promedio, sin embargo, ninguna podrá estar arriba o abajo del doble de los porcentuales indicados.

**Tabla 2 - Criterios de evaluación de la determinación de peso para formas farmacéuticas en dosis unitaria.**

<i>Formas farmacéuticas en dosis unitaria</i>	<i>Peso medio</i>	<i>Límites de variación</i>
Comprimidos no revestidos o revestidos con película, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguales, comprimidos vaginales y pastillas	80 mg o menos	± 10,0%
	más que 80 mg y menos que 250 mg	± 7,5%
	250 mg o más	± 5,0%
Comprimidos con revestimiento azucarado (grageas)	25 mg o menos	± 15,0%
	más que 25 mg y hasta 150 mg	± 10,0%
	más que 150 mg y menos que 300 mg	± 7,5%
	300 mg o más	± 5,0%
Cápsulas duras y blandas, cápsulas vaginales	menos que 300 mg	± 10,0%
	300 mg o más	± 7,5%
Supositorios y óvulos	independiente del peso promedio	± 5,0 %
Polvos estériles, polvos liofilizados y polvos para inyectables	más que 40 mg*	± 10,0%
Polvos para reconstitución (uso oral)	menos que 300 mg	± 10,0%
	300 mg o más	± 7,5%

(\*) Si el peso promedio es de 40 mg o menos, someter a la prueba de *Uniformidad de dosis unitarias (5.1.6)*.

5

#### PROCEDIMIENTO PARA PRODUCTOS EN DOSIS MÚLTIPLES

Para productos acondicionados en recipientes para dosis múltiples, la prueba permite verificar la homogeneidad en el envase.

##### *Polvos para reconstitución (uso oral y parenteral)*

Pesar, individualmente, 10 unidades. Retirar el contenido y lavar los respectivos recipientes utilizando solvente adecuado. Secar, enfriar a la temperatura ambiente y pesar nuevamente. La diferencia entre los dos pesajes representa el peso del contenido.

Determinar el peso promedio del contenido de las 10 unidades. Los valores individuales no difieren de ±10% en relación al peso promedio.

##### *Granulados, polvos, geles, cremas y pomadas*

**Nota:** para realizar la prueba, es necesario conocer la cantidad nominal del envase.

Pesar, individualmente, 10 unidades. Retirar el contenido y lavar los respectivos recipientes utilizando solvente adecuado. Secar, enfriar a la temperatura ambiente y pesar nuevamente. La diferencia entre las dos pesajes representa el peso del contenido.

Determinar el peso promedio del contenido de las 10 unidades. El peso promedio de los contenidos no es inferior al peso declarado y el peso individual de ninguna de las unidades probadas es inferior al porcentaje indicado en la **Tabla 2**, en relación al peso declarado.

Caso no sea cumplida esa exigencia, determinar el peso individual del contenido de 20 unidades adicionales. El peso promedio del contenido de las 30 unidades no es inferior al peso declarado, y el peso individual de no más que una unidad en 30 es inferior al porcentaje indicado en la **Tabla 2**, en relación al peso declarado.

**Tabla 3 - Tabla 2 – Criterios de evaluación de la determinación de peso para formas farmacéuticas en dosis múltiples.**

<i>Formas farmacéuticas en dosis múltiples</i>	<i>Peso declarado</i>	<i>Porcentaje mínimo en relación al peso declarado</i>
Granulados, polvos, geles, cremas y pomadas	hasta 60 g	90,0%
	arriba de 60 g y hasta 150 g	92,5%
	arriba de 150,0 g	95,0%



## 5.1.2 DETERMINACIÓN DE VOLUMEN

La prueba de determinación de volumen es requerida para productos líquidos en recipientes para dosis múltiples y productos líquidos en recipientes para dosis única. La prueba se aplica tanto a preparaciones líquidas como a preparaciones líquidas obtenidas a partir de polvos para reconstitución. La prueba no es requerida para productos líquidos en recipientes para dosis única cuando, en la monografía individual, conste requerimiento para *Uniformidad de dosis unitarias* (5.1.6).

### PROCEDIMIENTO

*Productos líquidos en recipientes para dosis múltiples (excepto inyectables)*

Separar 10 unidades. Retirar los lacres metálicos, cuando sea el caso. Retirar rótulos que puedan sufrir daños durante la prueba. Pesar, individualmente, cada recipiente con las respectivas tapas. Homogeneizar, retirar y reunir los contenidos y reservar para la determinación de la densidad de masa. Lavar los recipientes y las tapas con agua y, en seguida, con etanol. Secar en estufa a 105 °C, por una hora, o en temperatura compatible con el material del recipiente, hasta peso constante. Enfriar a la temperatura ambiente, recolocar la tapa y otras partes correspondientes y pesar nuevamente. La diferencia entre los dos pesajes representa el peso del contenido. Determinar los volúmenes individuales correspondientes ( $V$ ), en ml, utilizando la expresión:

$$V = \frac{m}{p}$$

en que

$m$  = peso del contenido, en g;

$p$  = densidad de masa del producto, en g/ml, determinada a 20 °C, conforme descrito en *Determinación de la densidad de masa y densidad relativa* (5.2.5).

A partir de los valores obtenidos, calcular el volumen promedio de las unidades probadas. El volumen promedio no es inferior al volumen declarado y el volumen individual de ninguna de las unidades probadas es inferior a 95,0% del volumen declarado.

*Productos líquidos en recipientes para dosis múltiples obtenidos a partir de polvos para reconstitución (excepto inyectables)*

Separar 10 unidades. Reconstituir cada unidad conforme indicado en el rótulo. Proceder conforme descrito en *Productos líquidos en recipientes para dosis múltiples (excepto inyectables)*.

A partir de los valores obtenidos, calcular el volumen promedio de las unidades probadas. El volumen promedio no es inferior al volumen declarado y el volumen individual de ninguna de las unidades probadas es inferior a 95,0% o superior a 110,0% del volumen declarado.

*Productos líquidos en recipientes para dosis única (excepto inyectables)*

Separar 10 unidades. Verter, separadamente, el contenido de cada unidad en probetas secas calibradas de capacidad que no exceda 2,5 veces el volumen a ser medido, tomando precauciones para evitar la formación de burbujas. Dejar el líquido drenar por 5 segundos, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual. Efectuar la medición.

A partir de los valores obtenidos, calcular el volumen promedio de las unidades probadas. El volumen promedio no es inferior al volumen declarado, y el volumen individual de ninguna de las unidades probadas es inferior a 95,0% o superior a 110,0% del volumen declarado.

*Productos líquidos inyectables*

La prueba se aplica a productos líquidos inyectables acondicionados en recipientes como ampollas, frascos- ampolla, bolsas plásticas, frascos plásticos, carpules o jeringas pre-cargadas. Los recipientes son llenados con pequeño exceso volumen, de acuerdo con las características del producto, para permitir la administración del volumen declarado. Los excesos mínimos de volumen recomendados en la **Tabla 1** generalmente son suficientes para permitir la retirada y la administración del volumen declarado.

**Tabla 1 - Exceso de volumen recomendado para productos líquidos inyectables.**

Volumen declarado (ml)	Exceso mínimo de volumen recomendado	
	móviles / mL	viscosos / mL
0,5	0,10	0,12
1,0	0,10	0,15
2,0	0,15	0,25
3,0	0,20	0,35
4,0	0,25	0,45
5,0	0,30	0,50
10,0	0,50	0,70
20,0	0,60	0,90
30,0	0,80	1,20
50,0 o más	2%	3%

Suspensiones y emulsiones deben ser agitadas antes de la retirada del contenido y antes de la determinación de la densidad. Preparaciones oleosas o muy viscosas pueden ser calentadas, si es necesario, según las indicaciones del rótulo o a 37 °C, y agitadas vigorosamente antes de la retirada del contenido. Los contenidos son entonces enfriados entre 20 °C y 25 °C antes de la medición del volumen.

Para inyectables en recipientes para dosis única, probar 6 unidades si el volumen declarado es igual o superior a 10 ml, 10 unidades si el volumen declarado es superior a 3 ml e inferior a 10 ml, o 12 unidades si el volumen declarado es igual o inferior a 3 ml. Retirar el contenido total de cada unidad con auxilio de jeringa de capacidad que no exceda 3 veces el volumen a ser medido, provista de aguja número 21

con no menos que 2,5 cm de largo. Eliminar burbujas eventualmente existentes en la aguja y en la jeringa y transferir el contenido de la jeringa, sin vaciar la aguja, para probeta seca calibrada de capacidad que no exceda 2,5 veces el volumen a ser medido. Alternativamente, el contenido de la jeringa puede ser transferido para vaso de precipitados seco tarado, siendo el volumen calculado por el peso del líquido, en gramos, dividido por su densidad. Para recipientes con volumen declarado de 2 ml o menos, los contenidos de los recipientes pueden ser reunidos para obtener el volumen necesario para la medición, debiéndose utilizar jeringas y agujas secas separadas para cada recipiente. El contenido de recipientes con volumen declarado de 10 ml o más puede ser determinado vaciándose el contenido de cada recipiente directamente en probetas calibradas o vasos de precipitados tarados.

El volumen de cada recipiente examinado no es inferior al volumen declarado. En el caso de recipientes con volumen declarado de 2 ml o menos, el volumen de los contenidos reunidos no es inferior a la suma de los volúmenes declarados de los recipientes utilizados en la prueba.

Para inyectables en recipientes para dosis múltiples rotulados para contener un número específico de dosis de un determinado volumen, seleccionar una unidad y proceder conforme descrito para inyectables en recipientes para dosis única, utilizando número de jeringas y agujas separadas equivalente al número de dosis especificadas en el rótulo. El volumen dispensado por cada jeringa no es inferior al volumen declarado por dosis.

Para inyectables en cartuchos o jeringas pre-cargadas, probar una unidad si el volumen declarado es igual o superior a 10 ml, 3 unidades si el volumen declarado es superior a 3 ml e inferior a 10 ml o 5 unidades si el volumen declarado es igual o inferior a 3 ml. Ajustar a los recipientes los accesorios necesarios para su utilización (aguja, émbolo, cuerpo de jeringa), cuando sea el caso, y transferir el contenido de cada recipiente, sin vaciar la aguja, para vaso de precipitados seco tarado, empujando el émbolo lenta y regularmente. Calcular el volumen, en mililitros, dividiendo el peso del líquido, en gramos, por su densidad. El volumen de cada recipiente no es inferior al volumen declarado.

Para preparaciones inyectables de gran volumen (infusiones parenterales), seleccionar dos unidades y transferir el contenido de cada recipiente para probetas secas calibradas de capacidad que no exceda 2,5 veces el volumen a ser medido. El volumen de cada recipiente no es inferior al volumen declarado.

### 5.1.3 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA MECÁNICA EN COMPRIMIDOS

Los pruebas de resistencia mecánica, tales como dureza y friabilidad, son considerados oficiales dentro del contexto legal de esta Farmacopea, constituyéndose en elementos útiles en la evaluación de la calidad integral de los comprimidos. Estas pruebas quieren demostrar la resistencia de los comprimidos a la ruptura provocada por caídas o fricción.

#### 5.1.3.1 PRUEBA DE DUREZA

La prueba de dureza permite determinar la resistencia del comprimido al aplastamiento o a la ruptura bajo presión radial. La dureza de un comprimido es proporcional a la fuerza de compresión e inversamente proporcional a su porosidad. La prueba se aplica, principalmente, a comprimidos no revestidos.

La prueba consiste en someter el comprimido a la acción de un aparato que mida la fuerza, aplicada diametralmente, necesaria para aplastarlo. La fuerza es medida en newtons (N).

##### APARATOS

Pueden ser utilizados diferentes tipos de aparatos, los cuales difieren básicamente cuanto al mecanismo empleado para ejercer la presión. La fuerza puede ser ejercida manualmente o mecánicamente. A medida que la presión aumenta, un émbolo, una placa o un pistón aplica determinada fuerza sobre el comprimido, apoyado en base fija. El aparato es calibrado con precisión de 1 N.

##### PROCEDIMIENTO

La prueba es realizada con 10 comprimidos, eliminando cualquier residuo superficial antes de cada determinación. Los comprimidos son probados, individualmente, obedeciendo siempre a la misma orientación (considerar la forma, presencia de ranura y grabación). Expresar el resultado como el promedio de los valores obtenidos en las determinaciones. El resultado de la prueba es informativo.

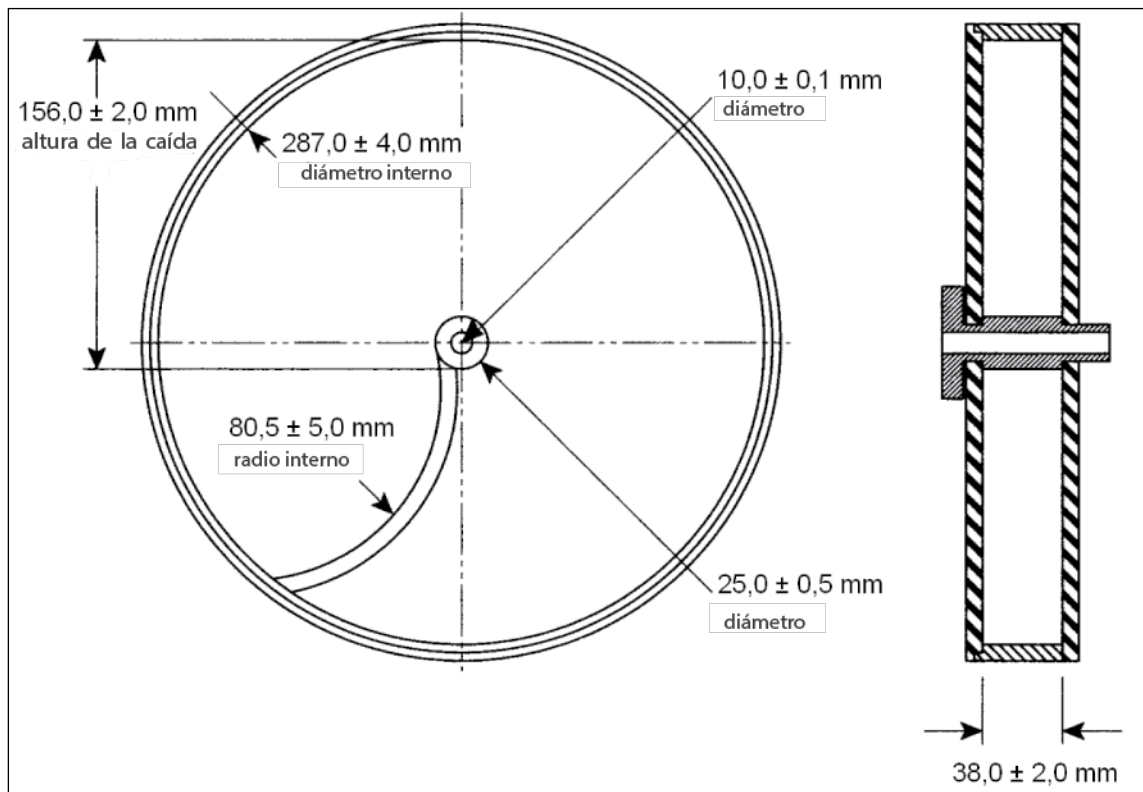
#### 5.1.3.2 PRUEBA DE FRIABILIDAD

La prueba de friabilidad permite determinar la resistencia de los comprimidos a la abrasión, cuando sometidos a la acción mecánica de aparatos específicos. La prueba se aplica, únicamente, a comprimidos no revestidos.

La prueba consiste en pesar con exactitud un número determinado de comprimidos, someterlos a la acción del aparato y retirarlos después de efectuadas 100 rotaciones. Después de retirar cualquier residuo de polvo de los comprimidos, ellos son nuevamente pesados. La diferencia entre el peso inicial y el final representa la friabilidad, medida en función de la porcentaje de polvo perdido.

##### APARATOS

El aparato (**Figura 1**) consiste de un cilindro rotativo, con  $287,0 \pm 4,0$  mm de diámetro y  $38,0 \pm 2,0$  mm de profundidad, constituido de polímero sintético transparente con caras internas pulidas de baja actividad estática, el cual gira en torno de su eje a una velocidad de  $25 \pm 1$  rotaciones por minuto. Una de las partes del cilindro es removible. Los comprimidos son recogidos cada vuelta del cilindro por una proyección curva con rayo interno de  $80,5 \pm 5,0$  mm que se extiende del centro a la pared externa del cilindro, y llevados a una altura de  $156,0 \pm 2,0$  mm, de donde caen repetidamente



**Figura 1** - Aparato para prueba de friabilidad (friabilómetro).

## PROCEDIMIENTO

Para comprimidos con peso promedio igual o inferior a 0,65 g, utilizar 20 comprimidos. Para comprimidos con peso promedio superior a 0,65 g, utilizar 10 comprimidos. Pesar, con exactitud, los comprimidos, introducirlos en el aparato. Ajustar la velocidad para 25 rotaciones por minuto y el tiempo de prueba para 4 minutos. Transcurrido el plazo, retirar cualquier residuo de polvo de la superficie de los comprimidos y pesar nuevamente. Ningún comprimido puede presentarse, al final de la prueba, quebrado, trisado, rajado o partido. Son considerados aceptables los comprimidos con pérdida igual o inferior a 1,5% de su peso o el porcentaje establecido en la monografía. Si el resultado es dudoso o si la pérdida es superior al límite especificado, repetir la prueba dos veces más, considerándose, en la evaluación, el resultado promedio de las tres determinaciones.

## 5.1.4 PRUEBAS DE DESINTEGRACIÓN

### 5.1.4.1 PRUEBA DE DESINTEGRACIÓN PARA COMPRIMIDOS Y CÁPSULAS

La prueba de desintegración permite verificar si comprimidos y cápsulas se desintegran dentro del límite de tiempo especificado, cuando seis unidades del lote son sometidas a la acción de un aparato específico bajo condiciones experimentales descritas.

La prueba se aplica a comprimidos no revestidos, revestidos con película o con revestimiento azucarado (grageas),

comprimidos con revestimiento entérico, comprimidos sublinguales, comprimidos solubles, comprimidos descartables, cápsulas duras y cápsulas blandas. Puede ser aplicado a comprimidos masticables, en ese caso las condiciones y criterios de evaluación constarán en la monografía individual. La prueba no se aplica a pastillas y comprimidos o cápsulas de liberación controlada (prolongada).

La desintegración es definida, para los fines de esta prueba, como el estado en el cual ningún residuo de las unidades probadas (cápsulas o comprimidos) permanece en la tela metálica del aparato de desintegración, salvo fragmentos insolubles de revestimiento de comprimidos o envoltorios de cápsulas. Se consideran, también, como desintegradas las unidades que durante la prueba se transforman en masa pastosa, siempre que no presenten núcleo palpable.

## APARATOS

Consiste de sistema de cestas y tubos (**Figura 1**), de recipiente apropiado para el líquido de inmersión (un vaso de precipitados con capacidad de 1 litro), de termostato para mantener el líquido a  $37 \pm 1$  °C y de mecanismo para mover verticalmente la cesta y los tubos en el líquido de inmersión, con frecuencia constante y recorrido específico. El volumen del líquido de inmersión deberá ser suficiente para que, al alcanzar el punto más alto del recorrido, la parte inferior de la cesta se quede, en el mínimo, a 25 mm abajo de la superficie del líquido, y que en el punto más bajo se quede, en el mínimo, a 25 mm del fondo del vaso de precipitados. Los movimientos ascendente y descendente deberán tener la misma velocidad y el cambio del sentido del movimiento debe ser suave.

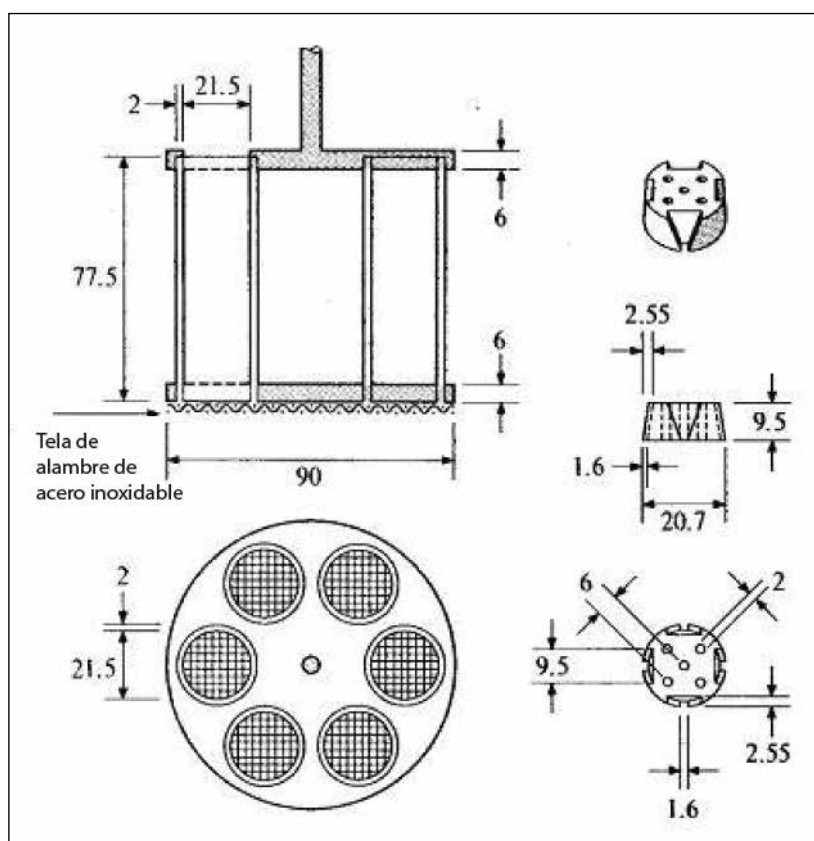
La cesta consiste en seis tubos de vidrio o acrílico transparente, abiertos en ambos lados. Las dimensiones de los tubos son: largo  $77,5 \pm 2,5$  mm, diámetro interno entre 20,7 mm y 23,0 mm y espesor de las paredes aproximadamente 2 mm.

Los tubos son mantenidos verticalmente, adaptándose en cada extremidad de la cesta un disco de material transparente adecuado, con diámetro entre 88,0 mm y 92,0 mm y espesor entre 5,0 mm y 8,5 mm, poseyendo seis orificios en los cuales son introducidos los tubos. Los seis orificios equidistan del centro de cada disco, estando igualmente separados. En la cara externa del disco inferior se encuentra una tela de alambre (diámetro de  $0,635 \pm 0,030$  mm) de acero inoxidable, con abertura entre 1,8 mm y 2,2 mm, presa por medio de tres tornillos.

Para la prueba de desintegración de cápsulas, una tela de alambre de acero inoxidable, semejante a aquella adaptada al disco inferior de la cesta, u otro dispositivo adecuado puede ser adaptado a la cara externa del disco superior para evitar que las cápsulas escapen de los tubos durante

la prueba. Las partes que constituyen la cesta son montadas y mantenidas firmemente unidas mediante eje metálico central, con diámetro de cerca de 5 mm. La extremidad superior del eje central debe tener dispositivo para fijar la cesta al mecanismo que produce el movimiento vertical del sistema.

Cuando indicado, debe ser adicionado en cada tubo de la cesta un disco cilíndrico de material transparente adecuado, con densidad relativa entre 1,18 y 1,20, diámetro de  $20,70 \pm 0,15$  mm, y espesor de  $9,50 \pm 0,15$  mm. Cada disco posee cinco orificios, cada uno con 2 mm de diámetro, estando un orificio en el eje del cilindro y los otros cuatro equidistantes, dispuestos sobre un círculo de 6 mm de radio relativo al centro del disco. La superficie lateral del disco posee cuatro abolladuras equidistantes, con profundidad de  $2,6 \pm 0,1$  mm, en forma de V, las cuales, en el lado superior del disco, miden  $9,4 \pm 0,2$  mm de largura, y en el lado inferior, 1,6 mm. Todas las superficies del disco son lisas. El diseño y montaje de la cesta pueden variar desde que las especificaciones para los tubos y abertura de las telas sean mantenidas.



**Figura 1 - Aparato para prueba de desintegración de comprimidos y cápsulas (dimensiones en mm)**

## PROCEDIMIENTO

### *Comprimidos no revestidos*

Utilizar seis comprimidos en la prueba. Colocar un comprimido en cada uno de los seis tubos de la cesta, añadir un disco cada tubo y accionar el aparato, utilizando agua mantenida a  $37 \pm 1$  °C como líquido de inmersión, a menos que otro líquido sea especificado en la monografía del medicamento.

Al final del intervalo de tiempo especificado, parar el movimiento de la cesta y observar el material en cada uno de los tubos. Todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados. Si los comprimidos no se desintegran debido a la adherencia a los discos, repetir la prueba con seis otros comprimidos, omitiendo los discos. Al final de la prueba, todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados. El límite de tiempo establecido como criterio general para la desintegración de comprimidos no re-



vestidos es de 30 minutos, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual.

*Comprimidos con revestimiento azucarado (grageas) o revestidos con película*

Utilizar seis comprimidos en la prueba. Colocar un comprimido en cada uno de los seis tubos de la cesta. Colocar un disco en cada tubo y accionar el aparato, utilizando agua mantenida a  $37 \pm 1$  °C, como líquido de inmersión. Al final del intervalo de tiempo especificado, parar el movimiento de la cesta y observar el material en cada uno de los tubos. Si los comprimidos no están completamente desintegrados, probar otros seis comprimidos, sustituyendo el agua por ácido clorhídrico 0,1 M, mantenido a  $37 \pm 1$  °C, como líquido de inmersión. Al final del intervalo de tiempo especificado, parar el movimiento de la cesta y observar el material en cada uno de los tubos. Todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados. Si los comprimidos no se desintegraron debido a la adherencia a los discos, repetir la prueba con seis otros comprimidos, omitiendo los discos. Al final de la prueba, todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados. El límite de tiempo establecido como criterio general para la desintegración de comprimidos revestidos con película es de 30 minutos, y para comprimidos con revestimiento azucarado (grageas) es de 60 minutos, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual.

*Comprimidos o cápsulas con revestimiento entérico (gastrorresistentes)*

Utilizar seis unidades en la prueba. Colocar una unidad en cada uno de los seis tubos de la cesta. Accionar el aparato, sin añadir los discos, utilizando ácido clorhídrico 0,1 M mantenido a  $37 \pm 1$  °C como líquido de inmersión, por 60 minutos o el tiempo especificado en la monografía individual. Parar el movimiento de la cesta y observar los comprimidos o cápsulas. Ninguna unidad puede presentar cualquier señal de desintegración, trizadura o ablandamiento, que posibilite el desborde de su contenido. Colocar un disco en cada tubo y accionar el aparato, utilizando solución tampón fosfato pH 6,8 mantenido a  $37 \pm 1$  °C como líquido de inmersión. Pasados 45 minutos o el tiempo especificado en la monografía, parar el movimiento de la cesta y observar el material en cada uno de los tubos. Todos los comprimidos o cápsulas deben estar completamente desintegrados, pudiendo restar apenas fragmentos de revestimiento insolubles. Si los comprimidos o cápsulas no se desintegran debido a la adherencia a los discos, repetir la prueba con seis otras unidades, omitiendo los discos. Al final de la prueba, todos los comprimidos o cápsulas deben estar completamente desintegrados. La prueba no se aplica a cápsulas no revestidas que contienen preparación de liberación entérica.

*Comprimidos sublinguales*

Realizar la prueba conforme descrito para *Comprimidos no revestidos*, omitiendo el uso de discos. Después de 5 minutos, todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados.

*Comprimidos solubles y comprimidos dispersables*

Realizar la prueba conforme descrito para *Comprimidos no revestidos*, utilizando agua mantenida entre 15 °C y 25 °C, como líquido de inmersión. Después de 3 minutos, todos los comprimidos deben estar completamente desintegrados.

*Cápsulas gelatinosas (duras)*

Realizar la prueba conforme descrito para *Comprimidos no revestidos*, omitiendo el uso de los discos. Utilizar una tela con abertura de 1,8 mm a 2,2 mm, de alambre de acero inoxidable adaptada a la tapa de la cesta, conforme descrito en el ítem *Aparatos*. Observar las cápsulas después de 45 minutos o conforme especificado en la monografía del medicamento. Todas las cápsulas deben estar completamente desintegradas, o restando, en la tela, apenas fragmentos insolubles de consistencia blanda.

*Cápsulas blandas*

Realizar la prueba conforme descrito para *Comprimidos no revestidos*, utilizando los discos. Observar las cápsulas después de 30 minutos o conforme especificado en la monografía del medicamento. Todas las cápsulas deben estar completamente desintegradas, o restando, en la tela, apenas fragmentos insolubles de consistencia blanda. Si las cápsulas no se desintegran debido a la adherencia a los discos, repetir la prueba con otras seis unidades, omitiendo los discos. Al final de la prueba, todas las cápsulas deben estar completamente desintegradas.

### 5.1.4.2 PRUEBA DE DESINTEGRACIÓN DE SUPOSITÓRIOS, ÓVULOS Y COMPRIMIDOS VAGINALES

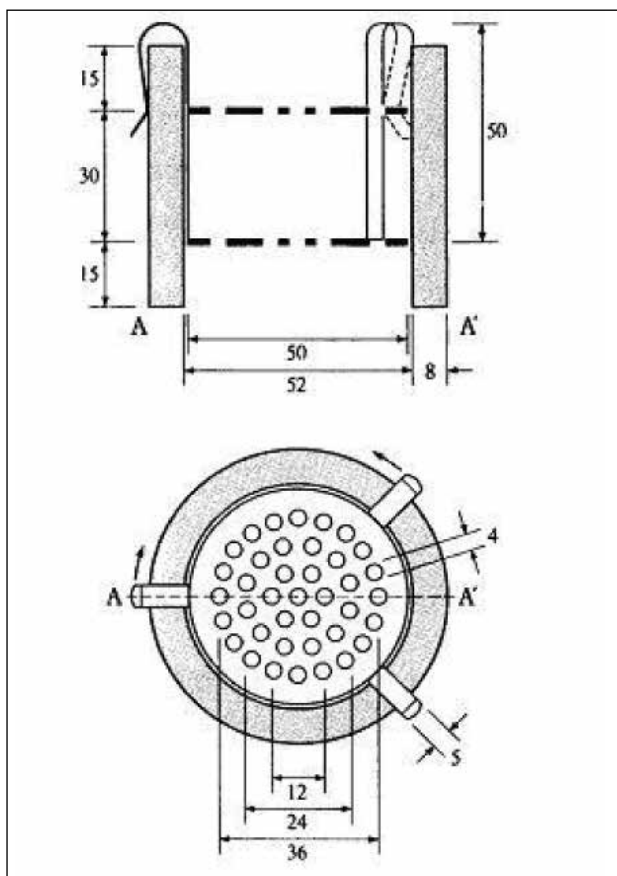
Esta prueba permite verificar la mayor o menor capacidad de esas formas farmacéuticas de ablandarse o desagregarse en medio líquido, en el espacio de tiempo prescrito.

Se considera desintegración completa cuando el supositorio o óvulo presente:

- disolución completa;
- separación completa de sus componentes, acumulándose sustancias grasas fundidas en la superficie del líquido, depositándose los polvos insolubles en el fondo del recipiente y disolviéndose los componentes solubles de la muestra, siendo que la distribución de los componentes ocurre de uno o más modos descritos arriba;
- ablandamiento de la muestra que puede ser acompañado por el cambio de su forma sin que ocurra separación completa de sus componentes; el ablandamiento debe ser tal que, al presionar la muestra ablandada con bastón de vidrio, no se perciba existencia de camada más dura en su superficie;
- ruptura de la cápsula gelatinosa de óvulos, permitiendo liberación de sus componentes;µm
- ausencia de residuo sobre el disco perforado o, cuando hubiese, tenga la consistencia de masa blanda que no ofrezca resistencia a la presión de bastón de vidrio.

## APARATOS

El aparato (**Figura 1**) consiste de cilindro de vidrio o plástico, transparente, con paredes de espesor apropiado, en cuyo interior se encuentra preso, por tres ganchos de metal, un dispositivo metálico que consiste de dos discos perforados de acero inoxidable, conteniendo cada uno 39 orificios de 4 mm de diámetro. El diámetro de cada disco es tal que permite su introducción en el cilindro transparente, quedando los discos alejados por, aproximadamente, 30 cm. La determinación es llevada a cabo con el uso tres aparatos, conteniendo cada uno una única muestra. Cada aparato es introducido en el interior de vaso de precipitados de, por lo menos, 4 litros de capacidad, conteniendo agua a la temperatura de 36 °C a 37 °C, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual. El vaso de precipitados es provisto de agitador que opere en velocidad lenta y dispositivo que permita invertir el cilindro sin retirarlo del agua.



**Figura 1 - Aparelho para teste de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais (dimensões em mm).**

## PROCEDIMIENTO

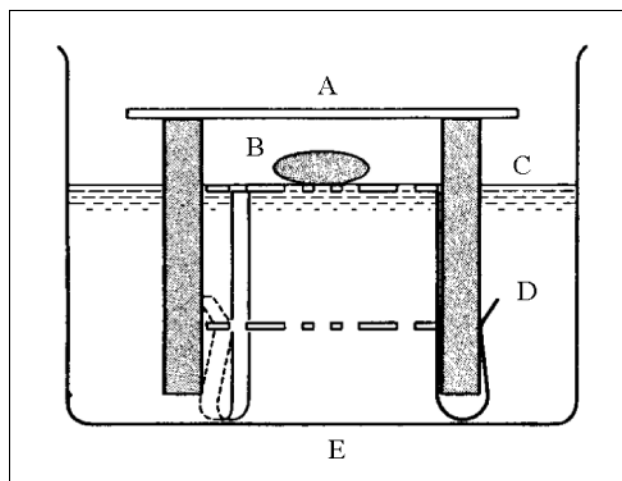
*Supositorios y óvulos*

Utilizar tres supositorios u óvulos. Colocar cada uno de ellos sobre el disco inferior del dispositivo, introducir y fijar el disco en el interior del cilindro. Invertir el aparato

cada 10 minutos. Examinar las muestras después de transcurrido el tiempo prescrito en la monografía. La prueba es considerada satisfactoria si todas las muestras se presentan desintegradas. El límite de tiempo establecido como criterio general para la desintegración es de 30 minutos para supositorios, óvulos y comprimidos vaginales con base hidrofóbica, y de 60 minutos para supositorios con base hidrofílica, a menos que indicado de manera diferente en la monografía individual.

*Comprimidos vaginales*

Utilizar el aparato descrito en *Desintegración de supositorios y óvulos*, montado conforme **Figura 2**. Introducir el cilindro en vaso de precipitados de diámetro adecuado conteniendo agua entre 36 °C y 37 °C que debe cubrir uniformemente las perforaciones del disco. Utilizar tres aparatos, colocando en cada uno de ellos un comprimido vaginal sobre el disco superior. Cubrir el aparato con una placa de vidrio para asegurar la humedad adecuada. Examinar el estado de cada muestra después de transcurrido el tiempo prescrito en la monografía. La prueba es considerada satisfactoria si todas las muestras se presentan desintegradas.



**Figura 2 - Aparato para prueba de desintegración de supositorios, óvulos y comprimidos vaginales.**

A, placa de vidrio; B, comprimido vaginal; C, superficie del agua; D, agua; E, fondo del recipiente.

## 5.1.5 PRUEBA DE DISOLUCIÓN

La prueba de disolución posibilita determinar la cantidad de sustancia activa disuelta en el medio de disolución cuando el producto es sometido a la acción de aparatos específicos, bajo condiciones experimentales descritas. El resultado está expresado en porcentaje de la cantidad declarada en el rótulo. La prueba se destina a demostrar si el producto atiende a las exigencias constantes en la monografía del medicamento en comprimidos; cápsulas y otros casos en que la prueba sea requerida.



## APARATOS PARA LOS MÉTODOS 1 Y 2

El aparato de disolución consiste de un sistema de tres componentes, descritos a continuación.

Recipientes abiertos de forma cilíndrica y fondo hemisférico (cubas), hechos en vidrio boro silicato, plástico u otro material transparente e inerte, a los cuales puede ser adaptada tapa de material inerte, con aberturas adecuadas para el agitador, recogida de muestras e inserción de termómetro. Las cubas pueden presentar las siguientes dimensiones y capacidades:  $185 \pm 25$  mm de altura y  $102 \pm 4$  mm de diámetro interno para una capacidad nominal de un litro;  $290 \pm 10$  mm de altura y  $102 \pm 4$  mm de diámetro interno para una capacidad nominal de dos litros;  $290 \pm 10$  mm de altura y  $150 \pm 5$  mm de diámetro interno para una capacidad nominal de cuatro litros.

Barras en acero inoxidable para proveer agitación del medio, que pueden presentar bajo dos formas: cestas (*Método 1*) o palas (*Método 2*) (**Figuras 1 y 2**). La barra debe ser centralizada de tal forma que, al ser accionada, su eje de rotación no se aleje más de 2 mm en relación al eje vertical del recipiente conteniendo el medio de disolución.

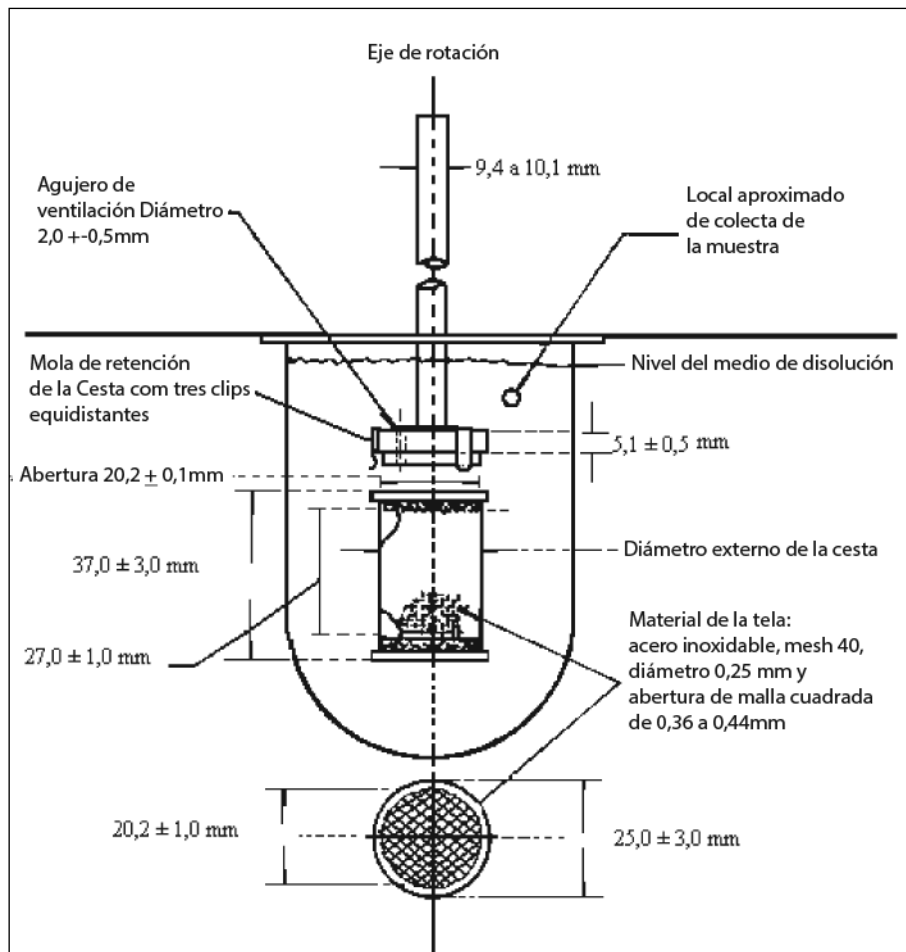
Un motor que posibilita ajustar la velocidad de rotación de la barra a aquella especificada en la monografía indi-

vidual, manteniéndola en los límites de  $\pm 4\%$ . La rotación no debe producir efectos indeseables en la hidrodinámica del sistema.

Las cubas son inmersas en baño de agua termostatzado, de material transparente y tamaño adecuado, en que la temperatura sea mantenida a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante la ejecución de la prueba. El aparato debe estar exento de cualquier fuente de vibración, inclusive externa, que pueda influir en la hidrodinámica del sistema. De preferencia, el aparato debe posibilitar la visualización de las muestras y de los agitadores durante la prueba.

*Método 1: Cestas*

Cuando especificado en la monografía, se utiliza como agitador una barra de acero inoxidable, en cuya extremidad se adapta una cesta del mismo material (**Figura 1**). La tela estándar utilizada en la confección de la cesta posee diámetro de hilo de 0,25 mm y abertura de malla cuadrada de  $0,40 \pm 0,04$  mm (mesh 40), salvo especificación contraria en la monografía individual. La muestra debe ser colocada dentro de la cesta seca, antes del inicio de la prueba. Durante su ejecución, una distancia de  $25 \pm 2$  mm debe ser mantenida entre la parte inferior de la cesta y el fondo interno del recipiente que contiene el medio de disolución.



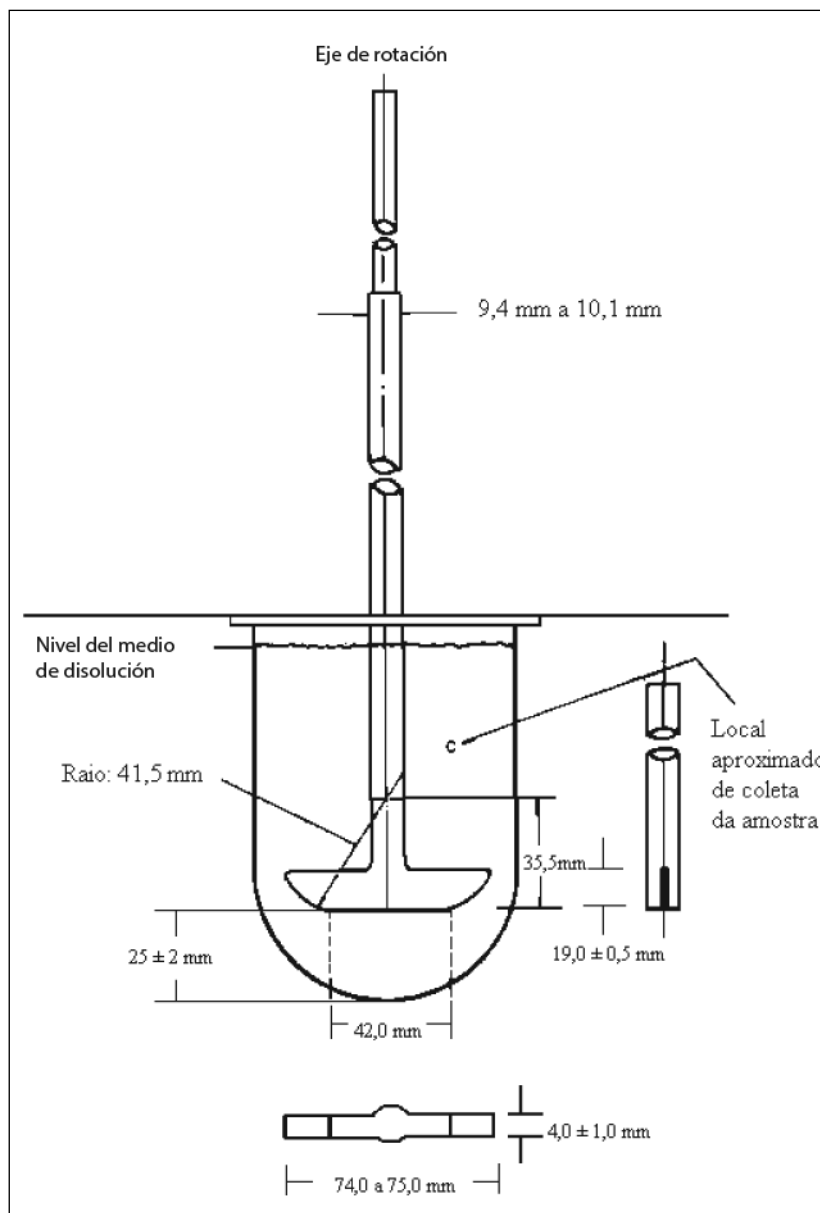
**Figura 1 - Método 1 (Cestas).** La cesta y la cuba no están en la misma proporción

*Método 2: Palas*

Cuando especificado en la monografía, se utiliza como agitador una barra de acero inoxidable, revestida o no de material inerte, cuya extremidad presenta la forma de pala (**Figura 2**), capaz de girar suavemente y sin desvió de eje durante el tiempo y velocidad especificados en la monografía correspondiente. La muestra debe ser adicionada, siempre que posible, antes del inicio de la prueba. Durante su ejecución, una distancia de  $25 \pm 2$  mm debe ser mantenida

entre el extremo inferior de las palas y el fondo interno del recipiente que contiene el medio de disolución.

Es importante que las muestras no floten en el medio de disolución. Se puede recurrir a un dispositivo apropiado, confeccionado en hilo de acero espiralado en pocas vueltas y en diámetro suficiente para aprisionar la cápsula o el comprimido sin deformarlos ni reducir el área de contacto con el medio.



**Figura 2 - Método 2 (Pás).** La pala y la cuba no están en la misma proporción.

## APARATOS PARA EL MÉTODO 3

*Método 3: Cilindros Alternados*

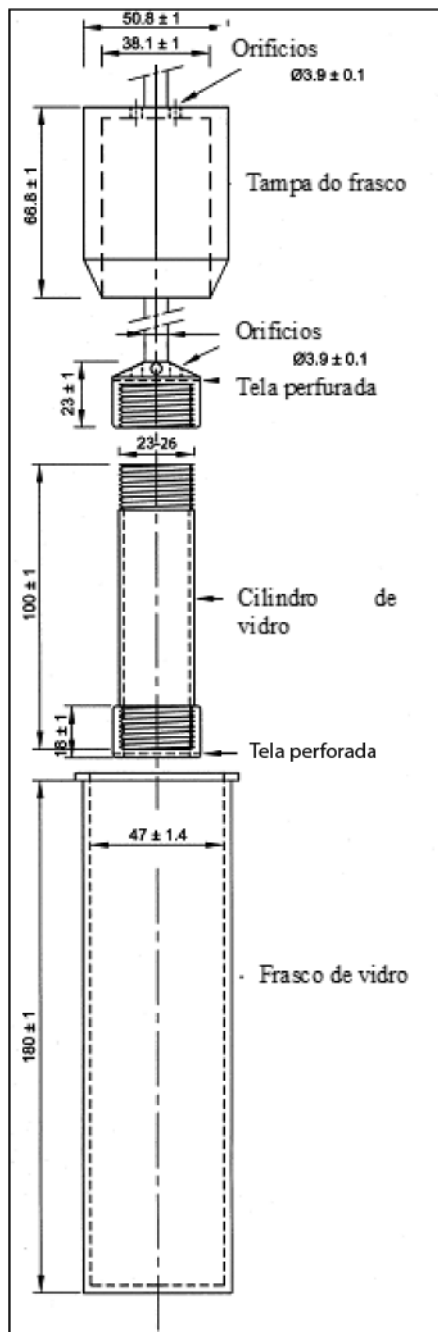
El aparato de disolución para el *Método 3* consiste de una serie de frascos cilíndricos de fondo plano; una serie de cilindros de vidrio con sistema de cierre de material inerte (acero inoxidable u otro material adecuado) y telas confeccionadas de material no adsorbente y no reactivo, destinadas a ser acopladas en las partes: superior e inferior de los cilindros. Un motor y un dispositivo de encaje de los

cilindros deben posibilitar movimiento alternado vertical, ascendente y descendente, de los cilindros en los frascos y, también, propiciar desplazamiento horizontal del cilindro para otro frasco dispuesto en una fila diferente.

Los frascos permanecen parcialmente inmersos en un baño de agua, de dimensiones adecuadas, que posibilita la termoequilibrio a  $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$  durante el período de ensayo. El aparato debe estar exento de cualquier vibración, interna o externa, que pueda influir en el movimiento suave ascendente y descendente de los cilindros. El aparato debe

poseer dispositivo de ajuste de la velocidad de movimiento alternado, de acuerdo con el preconizado en la monografía individual, con variación máxima de  $\pm 5\%$ .

Preferentemente, el aparato debe posibilitar la visualización de los cilindros y de las muestras en análisis en su interior. Los frascos poseen tapa adecuada, la cual debe permanecer fija durante la realización del ensayo. Los componentes del conjunto poseen las dimensiones presentadas en la **Figura 3**, a menos que haya alguna especificación diferente en la monografía.



**Figura 3** - Método 3 (Cilindros alternados). Las dimensiones indicadas son en milímetros.

## MEDIO DE DISOLUCIÓN

Se utiliza el medio de disolución especificado en la monografía del producto, previamente desgasificado por procedimiento conveniente, cuando necesario, para evitar la for-

mación de burbujas que puedan interferir en la velocidad de disolución a ser medida. Cuando el medio de disolución sea solución tampón, el pH debe ser ajustado a  $\pm 0,05$  unidades del valor del pH especificado en la monografía del producto.

## TIEMPO DE DISOLUCIÓN

Cuando un único tiempo sea especificado en la monografía del producto, él representa el tiempo máximo dentro del cual debe ser disuelta la cantidad mínima, en porcentaje, de sustancia activa en ella establecida. Cuando más de un tiempo sea especificado en la monografía, deben ser tomadas alícuotas, adecuadamente medidas, al final de cada tiempo indicado.

## PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LOS MÉTODOS 1 Y 2

Montar y verificar los aparatos conforme especificaciones mencionadas anteriormente, a fin de reducir, al mínimo, factores que alteren significativamente la hidrodinámica del sistema (desvío de eje, vibración, etc.). Añadir el volumen medido del *Medio de disolución* especificado en la monografía del producto, convenientemente desgasificado, caso necesario, al recipiente del aparato de disolución. Mantener la temperatura del medio a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , retirando el termómetro antes de iniciar la agitación. En el caso del *Método 1*, colocar la muestra dentro de la cesta seca. En el caso del *Método 2*, colocar la muestra dentro del recipiente de disolución, como descrito anteriormente. En ambos casos, al observar formación de burbujas en la superficie de las muestras, cuando está en contacto con el medio de disolución, verificar su influencia en el resultado. Iniciar inmediatamente la agitación, conforme velocidad prefijada. En intervalo(s) de tiempo especificado(s) en la monografía del producto, retirar alícuota para análisis de la región intermedia entre la superficie del medio de disolución y la parte superior del cesto o palas, a no menos que 1 cm de la pared interna del recipiente (**Figuras 1 y 2**). Durante la retirada de la alícuota, mantener la agitación. Filtrar inmediatamente las muestras, caso no esté utilizando filtros acoplados al sistema de muestreo. Los filtros empleados deben ser inertes, no adsorber porción significativa del fármaco y poseer porosidad adecuada. De acuerdo con lo especificado en la monografía del producto, el volumen de muestra retirado puede o no ser repuesto. Si es necesaria la reposición, el mismo medio de disolución calentado a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  debe ser utilizado. En el caso de que la reposición del medio de disolución no sea realizada, corregir el volumen en los cálculos. Después de filtración y dilución (cuando necesario) de la alícuota, la cuantificación del fármaco es efectuada mediante la técnica indicada en la monografía del producto. Repetir la prueba con dosis unitarias adicionales, conforme necesario, considerando los *Criterios de aceptación*.

*Disolución de cápsulas:* caso se obtenga resultado insatisfactorio, repetir la prueba de la siguiente forma: cuando el medio de disolución sea agua o tampón con pH inferior a 6,8, utilizar el mismo medio de disolución especificado con adición de pepsina purificada con actividad de, como

máximo, 750 000 unidades/ 1000 ml. Para medio de disolución con pH igual o superior a 6,8, añadir pancreatina de, como máximo, 1750 unidades de proteasa/ 1000 ml.

#### PROCEDIMIENTO PARA FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN RETARDADA

Emplear el *Método A* o el *Método B* o el método indicado en la monografía individual.

##### *Método A*

*Etapa ácida:* utilizar 750 ml de HCl 0,1 M como *Medio de disolución* en las cubas cuando empleando los *Métodos 1 y 2*. Montar el aparato de disolución conforme descrito en *Aparatos para los Métodos 1 y 2* y añadir una unidad de ensayo en cada cuba o cesta, conforme el caso. Proceder a la prueba con la velocidad especificada en la monografía por 2 horas. Al final de este tiempo, retirar una alícuota del *Medio de disolución* e, inmediatamente, ejecutar la etapa tampón pH 6,8. Determinar la cantidad de fármaco disuelto en la alícuota muestreada, empleando método analítico adecuado.

*Etapa tampón pH 6,8:* ejecutar la preparación de la etapa tampón y ajuste del pH en 5 minutos. Con el aparato de disolución operando en la velocidad especificada para el producto, añadir al *Medio de disolución* de la *Etapa ácida* 250 ml de solución de fosfato de sodio tribásico 0,20 M previamente climatizado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ajustar, si necesario, el pH para  $6,8 \pm 0,05$  con HCl 2 M o NaOH 2 M. Continuar operando el aparato de disolución por 45 minutos, o el tiempo especificado en la monografía. Al final de este tiempo, retirar alícuota del *Medio de disolución* de la etapa tampón pH 6,8 y determinar la cantidad de fármaco disuelto, empleando método analítico adecuado.

##### *Método B*

*Etapa ácida:* utilizar 1000 ml de HCl 0,1 M como *Medio de disolución* en las cubas y montar el aparato de disolución conforme descrito en *Aparatos para los Métodos 1 y 2*. Añadir una unidad de ensayo en cada cuba o cesta, conforme el caso. Proceder a la prueba con la velocidad especificada en la monografía por 2 horas. Al final de ese tiempo, retirar una alícuota del *Medio de disolución* e, inmediatamente, ejecutar la etapa tampón pH 6,8. Determinar la cantidad de fármaco disuelto en la alícuota muestreada, empleando método analítico adecuado.

*Etapa tampón pH 6,8:* emplear tampón fosfato pH 6,8 previamente climatizado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Drenar el medio de disolución de la etapa ácida de las cubas y añadir 1000 ml de medio de disolución tampón fosfato pH 6,8. Como alternativa se puede retirar cada cuba con el medio de la etapa ácida del aparato de disolución y sustituir por otra cuba con el medio de la etapa tampón pH 6,8, transfiriendo cuidadosamente la unidad de ensayo del medicamento a prueba. Continuar operando el aparato de disolución por 45 minutos, o el tiempo especificado en la monografía. Al final de ese tiempo, retirar alícuota del medio de disolución de la etapa tampón pH 6,8 y determinar la cantidad de

fármaco disuelto, empleando método analítico adecuado. El tampón pH 6,8 puede ser preparado por la mezcla de 3 volúmenes de HCl 0,1 M y 1 volumen de solución de fosfato de sodio tribásico 0,20 M, ajustando, si es necesario, el pH para  $6,8 \pm 0,05$  con HCl 2 M o NaOH 2 M.

#### PROCEDIMIENTO PARA EL MÉTODO 3

*Formas farmacéuticas de liberación inmediata:* empleando el Método 3, añadir el volumen del *Medio de disolución* especificado en la monografía del producto en cada frasco del aparato, disponer los frascos en el baño del instrumental para climatizar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  y retirar los termómetros antes de iniciar la prueba. Colocar una unidad de determinación de dosis de la muestra en cada uno de los seis cilindros alternados, evitando la formación de burbujas de aire en la superficie del material, e, inmediatamente, iniciar la operación del aparato de acuerdo con lo especificado en la monografía individual del producto. Durante el movimiento ascendente y descendente de los cilindros, la amplitud en altura debe situarse entre 9,9 y 10,1 cm. En el(los) intervalo(s) de tiempo especificado(s) en la monografía individual, levantar los cilindros y muestrear una alícuota del *Medio de disolución* de cada frasco, de la región intermedia entre la superficie del líquido y el fondo del frasco. Después de filtración y dilución (cuando necesario) de la alícuota, realizar análisis cuantitativo del fármaco disuelto de acuerdo con el preconizado en la monografía individual del producto. si necesario, repetir la prueba con unidades adicionales del medicamento. Reponer el volumen de medio muestreado con igual volumen de *Medio de disolución* fresco mantenido a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  o, en situaciones donde comprobadamente no sea necesaria la reposición del medio, efectuar la corrección de la alteración del volumen durante los cálculos. Mantener los frascos cubiertos con sus respectivas tapas durante la ejecución de la prueba y verificar periódicamente la temperatura del medio. Para el medio y el tiempo de disolución seguir las orientaciones generales indicadas en *Medio de disolución* y *Tiempo de disolución*.

*Formas farmacéuticas de liberación prolongada:* empleando el Método 3, ejecutar el procedimiento conforme descrito en *Formas farmacéuticas de liberación inmediata* y seguir las orientaciones generales indicadas en *Medio de disolución* y *Tiempo de disolución*. Los tiempos están expresados en horas y normalmente son indicados por lo menos 3 intervalos de tiempo.

*Formas farmacéuticas de liberación retardada:* empleando el Método 3, tomar como base el procedimiento indicado en Método B para Formas farmacéuticas de liberación retardada, empleando una fila de frascos para la etapa ácida y la fila sucesiva de frascos para la etapa con solución tampón pH 6,8, adicionando el volumen de medio especificado en la monografía (usualmente 300 ml). Los tiempos de recolección son los especificados en la monografía o los generales indicados en Método B para Formas farmacéuticas de liberación retardada.

## CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN INMEDIATA

El producto cumple la prueba si los resultados atienden las exigencias descritas en la **Tabla 1**, salvo especificación contraria en la monografía individual.

**Tabla 1 - Tabla 1 – Criterios de aceptación para la prueba de disolución de formas farmacéuticas de liberación inmediata**

Etapas	Nº de muestras probadas	criterios de aceptación
E1	06	Cada unidad presenta resultado mayor o igual a $Q + 5\%$
E2	06	Promedio de 12 unidades ( $E_1 + E_2$ ) es igual o mayor que $Q$ y ninguna unidad presenta resultado inferior a $Q - 15\%$ .
E3	12	Promedio de 24 unidades ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) es igual o mayor que $Q$ , no más que dos unidades presentan resultados inferiores a $Q - 15\%$ y ninguna unidad presenta resultado inferior a $Q - 25\%$ .

El término  $Q$  corresponde a la cantidad disuelta de fármaco, especificada en la monografía individual, expresada como porcentaje de la cantidad declarada. Los valores 5%, 15% y 25% también representan porcentajes de la cantidad declarada.

En circunstancias especiales, el porcentaje máximo de disolución debe ser establecido experimentalmente. En esos casos, asegurar un valor de  $Q_{\infty}$  (cantidad disuelta en tiempo infinito) verificando que dos dosificaciones consecutivas no difieren entre sí más de 2% después de 10 minutos.

#### *Etapa E<sub>1</sub>*

En la *Etapa E<sub>1</sub>*, son probadas seis unidades. Si cada unidad, individualmente, presenta resultado igual o mayor del que  $Q + 5\%$ , el producto está en conformidad con lo especificado, no siendo necesario efectuar la *Etapa E<sub>2</sub>*.

#### *Etapa E<sub>2</sub>*

En el caso que el criterio para la *Etapa E<sub>1</sub>* no sea atendido, repetir la prueba con seis unidades más. Si el promedio de las doce unidades probadas (*Etapas E<sub>1</sub>* y *E<sub>2</sub>*) es mayor o igual a  $Q$  y, si ninguna de las unidades probadas presentase resultado inferior a  $Q - 15\%$ , el producto está en conformidad con lo especificado, no siendo necesario efectuar la *Etapa E<sub>3</sub>*.

#### *Etapa E<sub>3</sub>*

En el caso que el criterio para el *Etapa E<sub>2</sub>* tampoco sea atendido, repetir la prueba con 12 unidades más. Si el promedio de las 24 unidades probadas (*Etapas E<sub>1</sub>*, *E<sub>2</sub>* y *E<sub>3</sub>*) es mayor o igual a  $Q$ , como máximo dos unidades presentan resultados inferiores a  $Q - 15\%$  y ninguna unidad presentase resultado inferior a  $Q - 25\%$ , el producto está en conformidad con lo especificado. Caso el criterio para la *Etapa E<sub>3</sub>* tampoco sea atendido, el producto es considerado insatisfactorio.

### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN PROLONGADA

El producto cumple la prueba si los resultados atienden las exigencias presentadas en la **Tabla 2**, salvo especificación contraria en la monografía individual. Los términos  $Q_1$  y  $Q_2$  corresponden a la cantidad mínima y máxima de fármaco disuelto en cada intervalo de tiempo especificado en la monografía, expresados como porcentaje de la cantidad declarada. En el último tiempo la especificación puede ser presentada apenas con un valor de  $Q$  mínimo. Los términos  $L_1$ ,  $L_2$  y  $L_3$  se refieren a las tres posibles etapas de evaluación de la liberación ( $L$ ).

**Tabla 2 - Criterios de aceptación para la prueba de disolución (liberación) realizada para formas farmacéuticas de liberación prolongada**

<i>Etapas</i>	<i>Nº de unidades probadas</i>	<i>Criterios de aceptación</i>
<i>L</i> <i>1</i>	6	Cada resultado individual se encaja en el intervalo establecido (Q1 y Q2) para cada determinado tiempo y ningún resultado individual es inferior al Q del último tiempo.
<i>L</i> <i>2</i>	6	El promedio de 12 unidades ( $E_1 + E_2$ ) se encaja en el intervalo establecido (Q1 y Q2) para cada determinado tiempo y no es inferior al Q del último tiempo. Ninguna unidad individual presenta resultado que supera los límites de Q1 y Q2 en 10% de la cantidad declarada, para cada determinado tiempo, y ningún resultado individual da un valor inferior al Q del último tiempo que supera en 10% a cantidad declarada.
<i>L</i> <sub>3</sub>	12	El promedio de 24 unidades ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) se encaja en el intervalo establecido (Q1 y Q2) para cada determinado tiempo y no es inferior al Q del último tiempo. No más que 2 unidades de las 24 probadas presentan resultados que superan los límites de Q1 y Q2 en 10% de la cantidad declarada, para cada determinado tiempo, y no más que 2 unidades de las 24 probadas presentan resultados con valor inferior al Q del último tiempo que superen en 10% la cantidad declarada. Ninguna unidad individual presenta resultado que supera los límites de Q1 y Q2 en 20% de la cantidad declarada, para cada determinado tiempo, y ningún resultado individual da un valor inferior al Q del último tiempo que supera en 20% la cantidad declarada.

5

**CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA FORMAS FARMACÉUTICAS DE LIBERACIÓN RETARDADA**

El producto cumple la prueba si los resultados atienden las exigencias presentadas en la **Tabla 3** en la etapa ácida (Métodos A o B) y, también, las exigencias indicadas en la **Tabla 4** en la etapa tampón *pH* 6,8 (Métodos A o B), salvo especificación contraria en la monografía individual. Emplear

el valor de Q indicado en la monografía del producto y, cuando no especificado, emplear 75% como valor de Q en la etapa tampón *pH* 6,8. Los términos  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  refieren a las tres posibles etapas de evaluación en la etapa ácida (A) y los términos  $B_1$ ,  $B_2$  y  $B_3$  se refieren a las tres posibles etapas de evaluación en la etapa tampón *pH* 6,8 (B).

**Tabla 3 - Criterios de aceptación para la etapa ácida de la prueba de disolución (Métodos A o B) realizada para Formas farmacéuticas de liberación retardada.**

<i>Etapas</i>	<i>Nº de unidades probadas</i>	<i>Criterios de aceptación</i>
A1	6	Ninguna unidad individual presenta cantidad disuelta superior a 10% de lo declarado.
A2	6	El promedio de 12 unidades no es superior a 10% de lo declarado y ninguna unidad individual presenta cantidad disuelta superior a 25% de lo declarado.
A3	12	El promedio de 24 unidades no es superior a 10% de lo declarado y ninguna unidad individual presenta cantidad disuelta superior a 25% de lo declarado.



**Tabla 4 - Criterios de aceptación para la etapa tampón pH 6,8 de la prueba de disolución (Métodos A o B) realizada para Formas farmacéuticas de liberación retardada.**

<i>Etapas</i>	<i>Nº de unidades probadas</i>	<i>Criterios de aceptación</i>
B1	6	Cada unidad presenta resultado mayor o igual a $Q + 5\%$
B2	6	Promedio de 12 unidades ( $B_1 + B_2$ ) es igual o mayor que $Q$ y ninguna unidad presenta resultado inferior a $Q - 15\%$ .
B3	12	Promedio de 24 unidades ( $B_1 + B_2 + B_3$ ) es igual o mayor que $Q$ , no más que dos unidades presentan resultados inferiores a $Q - 15\%$ y ninguna unidad presenta resultado inferior a $Q - 25\%$ .

## 5.1.6 UNIFORMIDAD DE DOSIS UNITARIAS

Para asegurar la administración de dosis correctas, cada unidad del lote de un medicamento debe contener cantidad del componente activo próximo de la cantidad declarada. La prueba de uniformidad de dosis unitarias permite evaluar la cantidad de componente activo en unidades individuales del lote y verificar si esta cantidad es uniforme en las unidades probadas. Las especificaciones de esta prueba se aplican a las

formas farmacéuticas con un único fármaco o con más de un componente activo. A menos que indicado de manera diferente en la monografía individual, la prueba se aplica, individualmente, cada componente activo del producto.

La uniformidad de las dosis unitarias de formas farmacéuticas puede ser evaluada por dos métodos: *Variación de peso* y *Uniformidad de Contenido*. La aplicación de cada método considerando la forma farmacéutica, dosis y proporción del fármaco es presentada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Aplicación del método de Uniformidad de Contenido (UC) o de Variación de peso (VP) de acuerdo con la forma farmacéutica, dosis y proporción del fármaco.**

<i>Forma Farmacéutica</i>	<i>Tipo</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Dosis y proporción del fármaco</i>	
			<i>&gt; 25 mg y &gt; 25%</i>	<i>&lt; 25 mg o &lt; 25%</i>
Comprimidos	no revestidos		VP	UC
	revestidos	Película	VP	UC
		Otros	UC	UC
Cápsulas	duras		VP	UC
	moles	suspensiones, emulsiones o geles	UC	UC
		soluciones	VP	VP
Sólidos envasados en recipientes para dosis única	componente único		VP	VP
	múltiplos componentes	solución liofilizada en el recipiente final	VP	VP
		otros		UC
Soluciones envasadas en recipientes para dosis única			VP	VP
Otros			UC	UC

El método de *Uniformidad de Contenido* para preparaciones en dosis unitarias se basa en la determinación de dosis del contenido individual del componente activo de un número de dosis unitarias para determinar si el contenido individual está dentro de los límites especificados. El método de *Uniformidad de Contenido* puede ser aplicado en todos los casos.

El método de *Variación de peso* puede ser aplicado a las siguientes formas farmacéuticas:

1. soluciones envasadas en recipientes para dosis única y en cápsulas blandas;
2. sólidos (incluyendo polvos, gránulos y sólidos estériles) acondicionados en recipientes para dosis única que no contienen otras sustancias adicionadas, sean ellas activas o inactivas;
3. sólidos (incluyendo sólidos estériles) envasados en recipientes para dosis única, conteniendo o no sustancias activas o inactivas adicionadas, que tengan sido preparados a partir de soluciones homogéneas liofilizadas en los recipientes finales, y sean rotulados para indicar este modo de preparación;

4. cápsulas duras, comprimidos no revestidos o revestidos con película, conteniendo 25 mg o más de la sustancia activa comprendiendo 25% o más, en peso, de la dosis unitaria o, en el caso de cápsulas duras, el contenido de la cápsula, excepto que la uniformidad de otras sustancias activas presentes en menores proporciones debe ser demostrada por el método de *Uniformidad de Contenido*.

El método de *Uniformidad de Contenido* es exigido para todas las formas farmacéuticas que no atienden a las condiciones especificadas para aplicación del método de Variación de peso.

#### UNIFORMIDAD DE CONTENIDO

Para determinar la uniformidad de dosis unitarias por el método de uniformidad de contenido separar, como mínimo, 30 unidades y proceder conforme descrito para las formas farmacéuticas indicadas. Cuando la cantidad de componente activo de una dosis unitaria sea diferente de lo especificado en la determinación de dosis, hacer los ajustes de dilución de las soluciones y/o el volumen de las alícuotas para obtener la concentración del componente activo en la solución final semejante a la de la determinación de dosis. En el caso de determinación de dosis por titulación, utilizar titulante con concentración diferente, si necesario, para consumo de volumen adecuado de titulante. Considerar cualquier modificación de las diluciones para efectuar los cálculos.

Cuando hubiere procedimiento especial para la prueba de uniformidad de contenido en la monografía individual, hacer la corrección necesaria de los resultados obtenidos conforme descrito a continuación.

1. Pesar cantidad de unidades del producto suficiente para efectuar la determinación de dosis y el procedimiento especial de la prueba de uniformidad de contenido presentados en la monografía individual. Reducir los comprimidos a polvo fino (o mezclar los contenidos de las cápsulas, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles o sólidos en recipientes para dosis única) para obtener mezcla homogénea. Se no es posible obtener mezcla homogénea de esta forma, usar solventes apropiados u otros procedimientos para obtener solución conteniendo el fármaco. Emplear alícuotas apropiadas de esta solución para los ensayos especificados.
2. Analizar, separadamente, porciones de la muestra, medidas con precisión, conforme el procedimiento indicado para la determinación de dosis ( $D$ ) y el procedimiento especial indicado para uniformidad de contenido ( $E$ ), descritos en la monografía individual.
3. Calcular la cantidad de fármaco por peso medio utilizando los resultados obtenidos por el procedimiento de determinación de dosis ( $D$ ) y por el procedimiento especial ( $E$ ).
4. Calcular el factor de corrección ( $F$ ) según la ecuación:

$$F = D/E$$

en que

$D$  = cantidad del componente activo por peso medio de la forma farmacéutica obtenida por el procedimiento de determinación de dosis;

$E$  = cantidad del componente activo por peso medio de la forma farmacéutica obtenida por el procedimiento especial. Si  $(100|D - E|)/D$  fuese superior a 10, no es válido el uso de  $F$ .

1. Si  $F$  está entre 0,970 y 1,030, no hay necesidad de corrección.
2. La corrección será aplicada cuando el valor de  $F$  esté entre 0,900 y 0,970 y entre 1,030 y 1,100 y debe ser efectuada calculándose la cantidad del fármaco en cada unidad, multiplicándose las cantidades obtenidas en el procedimiento especial por el factor de corrección  $F$ .

#### Formas farmacéuticas sólidas

Analizar, individualmente, 10 unidades conforme indicado en la monografía individual para la determinación de dosis, a menos que un procedimiento especial para uniformidad de contenido sea descrito en la monografía. Calcular el *Valor de Aceptación (VA)*.

#### Formas farmacéuticas líquidas

Analizar, individualmente, 10 unidades conforme indicado en la monografía individual para la determinación de dosis, a menos que un procedimiento especial para uniformidad de contenido sea descrito en la monografía. Conducir la prueba, individualmente, en cantidad homogénea del material que es retirada de cada recipiente en condiciones normales de uso. Expresar el resultado como cantidad dispensada por unidad. Calcular el *Valor de Aceptación (VA)*.

#### Valor de Aceptación para Uniformidad de Contenido

Calcular el Valor de Aceptación ( $VA$ ) según la ecuación:

$$VA = |M - \bar{X}| + ks$$

Cuyos términos están definidos en la **Tabla 2**.

#### VARIACIÓN DE PESO

Para determinar la uniformidad de dosis unitarias por el método de variación de peso separar, como mínimo, 30 unidades y proceder conforme descrito para las formas farmacéuticas indicadas. La cantidad de fármaco por unidad es estimada a partir del resultado de la determinación de dosis y de los pesos individuales, asumiéndose distribución homogénea del componente activo. Las cantidades individuales estimadas ( $x$ ) son calculadas según la ecuación:

$$x_i = p_i x A/P$$

en que

$p_i$  = pesos individuales de las unidades o de los contenidos de las unidades probadas;

$A$  = cantidad de componente activo, expresada en porcentaje de la cantidad declarada, determinada en la determinación de dosis;

$P$  = peso medio de las unidades utilizadas en la determinación de dosis.

#### *Comprimidos no revestidos o revestidos con película*

Pesar, exactamente e individualmente, 10 comprimidos. A partir del resultado de la determinación de dosis y del peso individual de cada comprimido, estimar la cantidad de componente activo en cada unidad y expresar los resultados individuales en porcentaje de la cantidad declarada. Calcular el *Valor de Aceptación (VA)*.

#### *Cápsulas duras*

Pesar, exactamente e individualmente, 10 cápsulas, preservando la identidad de cada una. Retirar, cuidadosamente, el contenido y pesar las cápsulas vacías. Calcular el peso del contenido de cada cápsula y, a partir del resultado de la determinación de dosis, estimar la cantidad de componente activo en cada cápsula. Expresar los resultados individuales en porcentaje de la cantidad declarada. Calcular el *Valor de Aceptación (VA)*.

#### *Cápsulas blandas*

Pesar, exactamente e individualmente, 10 cápsulas, preservando la identidad de cada una. Cortar las cápsulas con lámina y retirar el contenido, lavando los envoltorios con solvente adecuado. Dejar los envoltorios a temperatura ambiente, por 30 minutos, para completa evaporación del solvente, tomando precauciones para evitar adición o pérdida de humedad. Pesar las cápsulas vacías y calcular el peso del contenido de cada cápsula. Estimar la cantidad de componente activo en cada cápsula a partir del resultado de la determinación de dosis y del peso del contenido de cada cápsula. Calcular el *Valor de Aceptación (VA)*.

#### *Formas farmacéuticas sólidas (excepto comprimidos y cápsulas)*

Proceder como indicado en *Cápsulas duras*. Calcular el Valor de Aceptación.

#### *Formas farmacéuticas líquidas*

Pesar, exactamente e individualmente, la cantidad de líquido que es retirada de cada uno de 10 recipientes en condiciones normales de uso. Si necesario, calcular el volumen equivalente del contenido retirado después de la determinación de la densidad. Estimar la cantidad de componente activo en cada recipiente a partir del resultado de la determinación de dosis y del peso del contenido retirado de los recipientes individuales. Calcular el *Valor de Aceptación*.

#### *Valor de Aceptación para Variación de Peso*

Calcular el *Valor de Aceptación* conforme descrito en *Valor de Aceptación para Uniformidad de Contenido*, excepto que las cantidades individuales de componente activo en las unidades son sustituidas por las cantidades individuales estimadas.

#### CRITERIOS

Aplicar los criterios a continuación, tanto para *Uniformidad de Contenido* como para *Variación de peso*, a menos que esté indicado de manera diferente en la monografía individual.

#### *Formas farmacéuticas sólidas y líquidas*

El producto cumple la prueba de uniformidad de dosis unitarias si el *Valor de Aceptación* calculado para las 10 primeras unidades probadas no es mayor que  $L1$ . Si el *Valor de Aceptación* es mayor que  $L1$ , probar 20 unidades más y calcular el *Valor de Aceptación*. El producto cumple la prueba de uniformidad de dosis unitarias si el *Valor de Aceptación* final calculado para las 30 unidades probadas no es mayor que  $L1$  y la cantidad de componente activo de ninguna unidad individual es menor que  $(1 - L2 \times 0,01)M$  o mayor que  $(1 + L2 \times 0,01)M$ . A menos que indicado de manera diferente en la monografía individual,  $L1$  es 15,0 y  $L2$  es 25,0.

Tabla 2 - Términos y expresiones para el cálculo del Valor de Aceptación (VA).

Variable	Definición	Condiciones	Valores
$\bar{X}$	Promedio de los contenidos individuales ( $x_1, x_2, \dots, x_n$ ), expresado como porcentaje de la cantidad declarada.		
$x_1, x_2, \dots, x_n$	Contenidos individuales de las unidades probadas, expresos como porcentaje de la cantidad declarada.		
n	Número de unidades probadas		
k	de aceptabilidad	Se $n = 10$ , entonces $k =$ Se $n = 30$ , entonces $k =$	2,4 2,0
s	Desvío estándar de la muestra		$\left[ \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{1/2}$
M a ser utilizado cuando $T \leq 101,5$ (caso 1)	Valor de referência	Se $98,5\% \leq \bar{X} \leq 101,5\%$ , entonces  Se $\bar{X} < 98,5\%$ , entonces  Se $\bar{X} > 101,5\%$ , entonces	$M = 98,5\%$ $(VA = 98,5 - \bar{X} + ks)$  $M = 101,5\%$ $(VA = \bar{X} - 101,5 + ks)$
M a ser utilizado cuando $T > 101,5$ (caso 2)	Valor de referencia	Se $98,5 \leq \bar{X} \leq T$ , entonces  Se $\bar{X} < 98,5\%$ , entonces  Se $\bar{X} > T$ , entonces	$M = \bar{X}$ $(VA = ks)$ $M = 98,5\%$ $(VA = 98,5 - \bar{X} + ks)$ $M = T$ $(VA = \bar{X} - T + ks)$
VA	Valor de Aceptación		Fórmula general:  Los cálculos son especificados arriba para los diferentes casos
L1	Valor máximo permitido para el valor de aceptación		$L1 = 15,0$ a menos que especificado de forma diferente en la monografía individual
L2	Desvío máximo permitido para cada unidad probada en relación al valor de M utilizado en los cálculos del valor de aceptación.	Ningún resultado individual es menor que $(1 - L2 \times 0,01)M$ o mayor que $(1 + L2 \times 0,01)M$	$L2 = 25,0$ a menos que especificado de forma diferente en la monografía individual
T	Promedio de los límites especificados en la monografía individual para la cantidad o potencia declarada, expresada en porcentaje.	T es igual a 100% a menos que otro valor haya sido aprobado por razones de estabilidad; en estos casos, T es mayor que 100%.	

## 5.1.7 CONTAMINACIÓN POR PARTÍCULAS

### 5.1.7.1 PARTÍCULAS SUBVISIBLES

La contaminación de inyectables por partículas es la presencia de materiales insolubles, extraños y móviles que no sean burbujas de aire.

Las especificaciones exigidas para las preparaciones farmacéuticas se encuentran descritas en las monografías específicas.

La contaminación, por partículas, de las preparaciones para uso parenteral y de las preparaciones para perfusión es constituida de partículas extrañas no solubles y móviles, además de las burbujas de gas que se encuentran, involuntariamente, en esas preparaciones. Para la determinación de la contaminación por partículas se especifican a continuación 2 métodos: *método 1* (ensayo de conteo de partículas por bloqueo de la luz) y *método 2* (ensayo de conteo de partículas por microscopía óptica). Para la determinación de partículas no visibles en las preparaciones inyectables y en las preparaciones para perfusión utilice de preferencia el *método 1*. En determinadas preparaciones, no obstante, puede ser necesario realizar ensayos de conteo de partículas por bloqueo de la luz en primer lugar y sólo después por microscopía óptica para poder concluir con conformidad de los resultados obtenidos.

La investigación de las partículas no visibles efectuada aplicando uno de estos métodos, o los dos, no es posible para todas las preparaciones inyectables. Cuando el *método 1* no es aplicable, por ejemplo en el caso de las preparaciones poco limpiadas o muy viscosas, el ensayo es realizado por el *método 2* (es el caso de las emulsiones, de las soluciones coloidales y de las preparaciones de liposomas). Del mismo modo, un ensayo de conteo de partículas por microscopía óptica puede igualmente ser exigido en el caso de productos que formen burbujas de aire o de gas cuando pasan a través del detector. Si la viscosidad de la preparación es tal que el examen por uno u otro de los métodos es imposible, puede efectuarse una dilución cuantitativa con un diluyente apropiado para reducir la viscosidad hasta el grado considerado suficiente para permitir el ensayo.

Los resultados obtenidos cuando se examina una unidad o un grupo de unidades no puede ser extrapolado con confiabilidad a otras unidades que no fueron analizadas. Por consecuencia, conviene establecer planes de muestreo estadísticamente válidos si se quiere llegar a conclusiones válidas, a partir de los datos recolectados, para determinar el grado de contaminación particular de un gran grupo de unidades.

El agua utilizada en los ensayos es libre de partículas. Agua libre de partículas puede ser obtenida por filtración en membrana de porosidad de 0,22  $\mu\text{m}$

### MÉTODO 1 – CONTEO DE PARTÍCULAS POR BLOQUEO DE LA LUZ

#### *Equipo*

Utilizar contador de partículas con funcionamiento basado en el principio de bloqueo de luz que posibilite la determinación del tamaño de las partículas y su número conforme sus dimensiones.

#### *Calibración*

Calibrar el equipo con el auxilio de partículas esféricas estándares de tamaño comprendido entre 10 a 25  $\mu\text{m}$ . Esas partículas estándares están dispersas en agua libre de partículas. Evitar la agregación de las partículas durante la dispersión.

#### *Precauciones*

Realizar la prueba en condiciones de contaminación limitada, preferencialmente, en campana de flujo laminar. Lavar los elementos de vidrio y el equipo de filtración utilizado, con excepción de las membranas filtrantes, con solución detergente tibio y enjuagar con agua hasta que todo el detergente sea retirado. Inmediatamente antes del uso, enjuagar el equipo de la parte superior a la inferior, interna y externamente con agua libre de partículas.

Observar que no se introduzcan burbujas de aire en la muestra a ser analizada, especialmente cuando alícuotas de muestra están siendo transferidas para el accesorio de lectura.

Para verificar su adecuación al ambiente, de los elementos de vidrio y del agua utilizada, efectuar el conteo de partículas en cinco muestras de 5 ml de agua libre de partículas, de acuerdo con el método descrito en este capítulo. En el caso de que el número de partículas mayores que 10  $\mu\text{m}$  exceda a 25, para el volumen total de 25 ml, el ambiente no presenta condiciones para realizar la prueba.

#### *Procedimiento*

Homogeneizar la muestra por medio de 25 cambios consecutivos lentos y suaves del recipiente. Eliminar las burbujas dejando la muestra en reposo por 2 minutos. Transferir cuatro porciones no menores que 5 ml, y determinar el número de partículas con tamaño igual o mayor que 10 y 25  $\mu\text{m}$ . Desconsiderar el resultado obtenido con la primera alícuota, y calcular el número promedio de partículas para la muestra bajo examen.

#### *Evaluación*

Emplear la prueba A, prueba B o prueba C, así como, el número de muestras, conforme indicado en la monografía específica, de la forma farmacéutica.

**Prueba A** – Soluciones para inyectables en recipientes, con volumen declarado, mayor que 100 ml. La muestra cumple la prueba si el número medio de partículas, con tamaño

igual o mayor que 10  $\mu\text{m}$ , presentes en las unidades probadas no excede 25 partículas por ml y el número de partículas con tamaño iguales o mayores que 25  $\mu\text{m}$  no excede a 3 por ml.

**Prueba B** – Soluciones para inyectables en recipientes, con volumen declarado, igual o menor que 100 ml. La muestra cumple la prueba si el número medio de partículas, con tamaño igual o mayor que 10  $\mu\text{m}$ , presentes en las unidades probadas no excede 6 000 partículas por recipiente y el número de partículas con tamaño iguales o mayores que 25  $\mu\text{m}$  no excede a 600 partículas por recipiente.

**Prueba C** – Polvos para inyectables en recipientes, con volumen declarado, igual o menor que 100 ml. La muestra reconstituida con agua o diluyente apropiado libre de partículas cumple la prueba si el número medio de partículas, con tamaño iguales o mayores que 10  $\mu\text{m}$ , presentes en las unidades probadas no excede 10 000 partículas por recipiente y el número de partículas con tamaño igual o mayores que 25  $\mu\text{m}$  no excede a 1000 partículas por recipiente.

## MÉTODO 2 – CONTEO DE PARTÍCULAS POR MICROSCOPIA

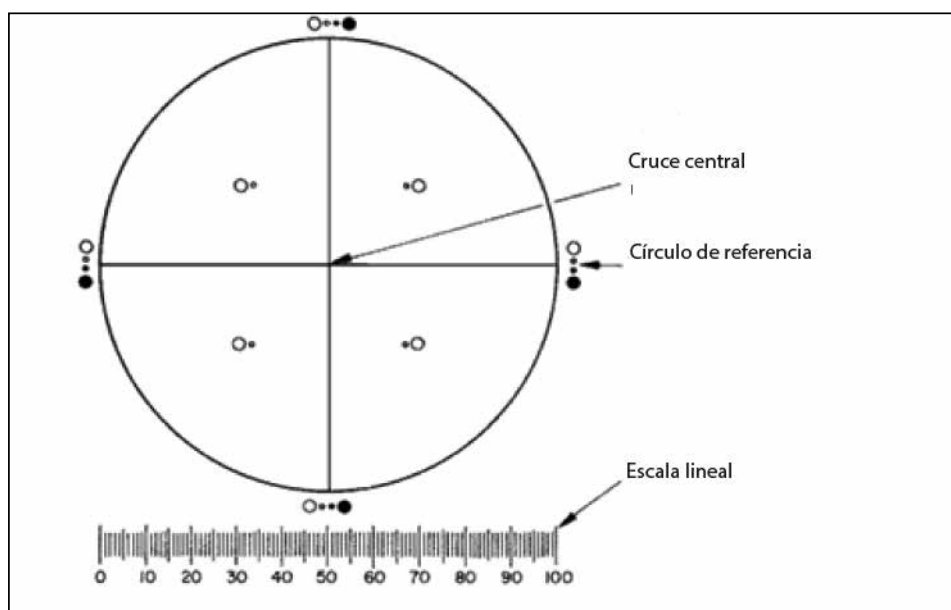
### Equipo

Utilice un microscopio binocular apropiado, un dispositivo de filtración para retener la contaminación particular y una

membrana filtrante. El microscopio equipado con un micrómetro ocular calibrado, con un micrómetro de objeto, una platina de movimientos cruzados capaz de mantener y de atravesar toda la superficie de filtración de la membrana filtrante, dos iluminadores apropiados que permiten iluminación episcópica e iluminación oblicua, ajustado para ampliación de  $100 \pm 10$  veces.

El micrómetro ocular es un retículo circular y comprende un gran círculo dividido en cuadrantes, por líneas cruzadas, círculos de referencia negros y transparentes de diámetro de 10  $\mu\text{m}$  y de 25  $\mu\text{m}$  con un aumento de 100 y una escala lineal graduada de 10 en 10  $\mu\text{m}$  (**Figura 1**).

El gran círculo es denominado campo de visión del retículo. Son necesarios dos iluminadores, un iluminador episcópico para fondo claro, interno del microscopio, y un iluminador auxiliar externo regulable, ajustable para permitir una iluminación oblicua reflejada según un ángulo de 10-20°. El dispositivo de filtración destinado a retener la contaminación particular comprende un soporte de filtro de vidrio u otro material conveniente, una fuente de vacío y una membrana filtrante adecuada. La membrana filtrante, de dimensiones apropiadas, es de color negra o gris oscura; está cubierta o no con una rejilla y el tamaño de los poros es inferior o igual a 1,0  $\mu\text{m}$ .



**Figura 1** - Retículo circular.

### Calibración

Es calibrado con un micrómetro de objetivo certificado por una organización internacional o nacional de normalización. Es aceptable un error relativo de  $\pm 2\%$  para la escala lineal del retículo.

### Precauciones generales

Realizar la prueba en condiciones de contaminación limitada, preferencialmente, en campana de flujo laminar. Lavar

los elementos de vidrio y el equipo de filtración utilizado, con excepción de las membranas filtrantes, con solución detergente tibio y enjuagar con agua hasta que todo el detergente sea retirado. Inmediatamente antes del uso, lave los dos lados de la membrana filtrante enjuagando el equipo de la parte superior a la inferior, interna y externamente con agua libre de partículas.

Para verificar la adecuabilidad del ambiente, de los elementos de vidrio y del agua utilizada, efectuar el conteo de partículas en 50 ml de agua libre de partículas, de acuerdo con el



método descrito en este capítulo. En el caso que el número de partículas de 10  $\mu\text{m}$  o mayores exceda a 20, o si más de 5 partículas de 25  $\mu\text{m}$  o mayores estuviesen presentes, el ambiente no presenta condiciones para realizar la prueba.

#### Procedimiento

Homogeneizar la muestra por medio de 25 cambios consecutivos lentos y suaves del recipiente. Si necesario, retire con cuidado el dispositivo de cierre. Lave las superficies exteriores de la abertura del frasco con un chorro de agua exenta de partículas y retire el cierre evitando cualquier contaminación del contenido.

En el caso de las preparaciones parenterales de gran volumen, efectúe el ensayo en unidades separadas. En el caso de preparaciones parenterales de gran volumen o de pequeño volumen igual o superior a 25 ml, pueden ser suficientes para el ensayo menos de 10 embalajes de acuerdo con un plan de muestreo apropiado. En cuanto a las preparaciones parenterales de pequeño volumen, cuyo volumen sea inferior a 25 ml reúna el contenido de 10 unidades o más en un recipiente limpio para obtener un volumen mínimo de 25 ml; en casos justificados y autorizados, la solución problema puede ser preparada mezclando el contenido de un número apropiado de frascos y completando 25 ml con agua exenta de partículas R o un solvente apropiado exento de contaminación particular, cuando el agua exenta de partículas R no sea apropiada. Las preparaciones parenterales de pequeño volumen cuyo volumen sea superior o igual a 25 ml pueden ser examinadas individualmente.

En el caso de los polvos para uso parenteral, reconstituya la preparación con agua exenta de partículas o un solvente apropiado exento de contaminación particular, cuando el agua exenta de partículas no sea apropiada.

Humedecer el interior del soporte del filtro provisto de la membrana filtrante con algunos mililitros de agua exenta de partículas. Pase para el filtro la totalidad de la muestra (mezcla de las tomas de ensayo o la unidad en ensayo) y aplique el vacío. Si es necesario, junte, poco a poco, porciones de la solución hasta que el volumen total sea filtrado. Después de la última adición, comience el lavado de las paredes internas del soporte del filtro utilizando un chorro de agua exenta de partículas. Mantenga el vacío hasta que la superficie de la membrana filtrante quede exenta de líquido.

Coloque el filtro en una placa de Petri y seque al aire dejando la placa ligeramente abierta. Cuando el filtro esté seco, coloque la placa de Petri en la platina del microscopio, efectúe la barradura de toda la membrana filtrante sobre la luz reflejada del iluminador y cuente el número de partículas de tamaño superior o igual a 10  $\mu\text{m}$  y el número de partículas de tamaño superior o igual a 25  $\mu\text{m}$ . Es igualmente posible efectuar conteo parcial y determinar por cálculo el número total de partículas retenidas en el filtro. Calcule el número medio de partículas presentes en la muestra. Para determinar el tamaño de las partículas con auxilio del retículo circular, proceda a la transformación de la imagen de cada partícula en un círculo y después compárela con los círculos de referencia del retículo de 10  $\mu\text{m}$  y de 25  $\mu\text{m}$ .

Así, las partículas mantienen su posición inicial en el interior del campo de visión del retículo y no se superponen a los círculos de referencia para fines de comparación. El diámetro interior de los círculos de referencia transparentes del retículo es utilizado para determinar el tamaño de las partículas blancas o transparentes mientras que el tamaño de las partículas oscuras es determinado con el diámetro exterior de los círculos de referencia negros y opacos del retículo. Cuando se realice un ensayo de conteo de partículas en microscopio no busque medir o enumerar materias amorfas, semilíquidas o morfológicamente indistintas que se asemejan a una mancha o zona desteñida de la membrana filtrante. Estos materiales pueden presentar un brillo suave o nulo y asumir aspecto gelatinoso o la apariencia de una película. La interpretación de la evaluación puede ser facilitada realizando un ensayo de conteo de las partículas por retención de la luz sobre una muestra de la solución.

#### Evaluación

Emplear los criterios abajo, de acuerdo con el volumen de las muestras o conforme indicado en la monografía específica, de la forma farmacéutica.

En las preparaciones envasadas en recipientes de contenido nominal superior a 100 ml, la preparación satisface al ensayo si el número medio de partículas presentes en las unidades examinadas no es superior a 12 por mililitro para las partículas de tamaño superior o igual a 10  $\mu\text{m}$  y no excede de 2 partículas por mililitro para las de tamaño superior o igual a 25  $\mu\text{m}$ .

En las preparaciones envasadas en recipientes de contenido nominal igual o inferior a 100 ml, la preparación satisface al ensayo si el número medio de partículas presentes en las unidades examinadas no es superior a 3000 por recipiente para las partículas de tamaño superior o igual a 10  $\mu\text{m}$  y a 300 por recipiente para las partículas de tamaño superior o igual a 25  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.7.2 PARTÍCULAS VISIBLES

La contaminación por partículas de las preparaciones inyectables y de las preparaciones inyectables para perfusión es constituida por partículas extrañas, no disueltas y móviles, además de las burbujas de gas, y que se encuentran involuntariamente en estas soluciones. La finalidad del ensayo es suministrar un método simple de evaluación visual de la calidad de las soluciones en lo que respecta a las partículas visibles. Pueden utilizarse otros métodos validados.

#### Aparatos

El aparato (**Figura 1**) es compuesto por un puesto de observación, comprendiendo: un panel negro opaco, de dimensiones apropiadas, colocado en posición vertical, un panel blanco antirreflejo de dimensiones apropiadas, colocado en posición vertical al lado del panel negro, una rampa de iluminación ajustable, con una fuente de luz blanca protegida y un difusor apropiado (un sistema de iluminación conteniendo 2 lámparas fluorescentes de 13 W, con largo de onda de 525 nm cada una, es apropiado).

La intensidad de la iluminación en el punto de observación es mantenida entre 2000 y 3750 lux siendo aconsejable una intensidad más elevada para recipientes de vidrio colorido o de plástico.

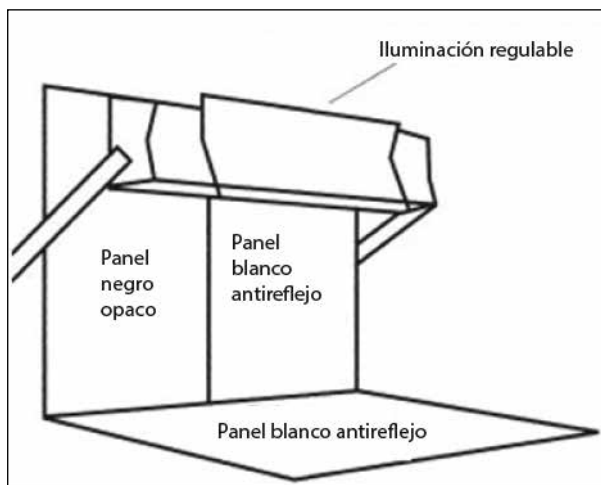


Figura 1 - Aparato para partículas visibles.

5

#### Procedimiento

Retire eventualmente los rótulos, lave y seque el exterior del recipiente. Agite suavemente e invierta cada recipiente con precaución, evitando la formación de burbujas de aire y obsérvelo durante cerca de 5 segundos contra el panel blanco. Repita este procedimiento, observando el recipiente contra el panel negro. Anote la presencia de cualquier partícula.

### 5.1.8 PRUEBA DE GOTEO

La prueba de goteo se destina a determinar la relación del número de gotas por mililitro y la cantidad de fármaco por gota en formas farmacéuticas líquidas envasadas en recipientes con dispositivo dosificador integrado. Para realizar la prueba es necesario conocer el número declarado de gotas por mililitro, o la cantidad declarada de fármaco en masa por gota.

#### PROCEDIMIENTO

##### Determinación del número de gotas por mililitro

El goteo debe ser realizado con el frasco invertido en la posición vertical o conforme el ángulo de goteo declarado por el fabricante, permitiendo el flujo por gravedad, a una tasa constante, sin cualquier tipo de presión adicional. Una leve presión puede ser aplicada en frascos de polietileno.

Separar 30 unidades. Proceder a la prueba utilizando 10 unidades, en ambiente con temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C. Para cada unidad determinar la masa relativa al número de gotas correspondiente a 1 mililitro, conforme declarado por el fabricante. Si esta relación no está declarada, utilizar 20 gotas para la prueba.

Calcular el número de gotas por mililitro para cada unidad probada ( $N_t$ ) según la ecuación:

$$N_t = \frac{(N_1 \times p)}{m_i}$$

en que

$N_1$  = número de gotas utilizado en la prueba, que puede ser el número de gotas declaradas por mililitro ( $N_d$ ) o 20 gotas;  
 $p$  = densidad de masa del producto, en g/ml, determinada a 20 °C, conforme descrito en *Determinación de densidad de masa y densidad relativa (5.2.5)*;  
 $m_i$  = masa, en g, correspondiente al número de gotas utilizado en la prueba.

##### Determinación de la cantidad de fármaco por gota

Calcular la cantidad del fármaco, en mg/gota, para cada unidad probada ( $q_t$ ), según la ecuación:

$$q_t = \frac{Q}{N_t}$$

En que

$Q$  = cantidad de fármaco, en mg/ml, determinada en la determinación de dosis;

$N_t$  = número de gotas por mililitro calculado para cada unidad probada.

Calcular el porcentaje con relación a la cantidad declarada, para cada unidad probada ( $\%Q_t$  o  $\%q_t$ ), empleando una de las ecuaciones abajo:

$$\%Q_t = \frac{q_t}{Q_d/N_d} \times 100 \quad \text{o} \quad \%q_t = \frac{q_t}{q_d} \times 100$$

en que

$q_t$  = cantidad del fármaco, en mg/gota, calculada para cada unidad probada;

$Q_d$  = cantidad declarada del fármaco, en mg/ml;

$N_d$  = número declarado de gotas por mililitro;

$q_d$  = cantidad declarada del fármaco en mg/gota.

Calcular el promedio de los porcentajes individuales obtenidos ( $\%Q$ ) y el desvío estándar relativo ( $DPR$ ) según las ecuaciones:

$$\overline{\%Q} = \frac{\sum \%Q_t}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\%Q_t - \overline{\%Q})^2}{n - 1}}$$

$$DPR = \frac{100 \times s}{\%Q}$$

en que

$\%Q_t$  = porcentaje con relación a la cantidad declarada calculada para cada unidad probada;

$s$  = desvío estándar;

$n$  = número de unidades probadas.

## CRITERIOS

El producto cumple los requisitos de la prueba si los porcentuales individuales, para cada una de las 10 unidades probadas, están situadas entre 85,0% y 115,0% de la cantidad declarada y el desvío estándar relativo (*DPR*) no es mayor que 6,0%.

Si una unidad está fuera de la banda de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada, o si el *DPR* fuese mayor que 6,0%, o si ambas condiciones fueron observadas, probar 20 unidades más.

El producto cumple la prueba si como máximo una unidad está fuera de la banda de 85,0% a 115,0% de la cantidad declarada, ninguna unidad está fuera de la banda de 75,0% a 125,0% y el *DPR* de las 30 unidades probadas no es mayor que 7,8%.

## 5.2 MÉTODOS FÍSICOS Y FÍSICO-QUÍMICOS

### 5.2.1 DETERMINACIÓN DE LA MASA

Para ser efectuada la medición de la masa, las balanzas deben presentar capacidad y sensibilidad de acuerdo con el grado de precisión requerido y certificado de calibración actualizado.

Tratándose de actividades que exigen pesajes exactos, en la determinación de masas iguales o mayores que 50 mg utilizar balanza analítica de 100 a 200 g de capacidad y 0,1 mg de sensibilidad. Para cantidades inferiores a 50 mg utilizar balanza analítica de 20 g de capacidad y 0,01 mg de sensibilidad.

#### APARATOS

Las balanzas analíticas a ser utilizadas en este ensayo deben ser de plato único, preferencialmente electrónicas.

Las balanzas deben poseer dispositivo adecuado que posibilite la verificación de la carga aplicada, siempre que sean calibradas periódicamente por medio de masas de referencia evaluadas.

Las balanzas analíticas deben presentar las siguientes características:

- armario o caja de protección, con aberturas apropiadas para posibilitar operaciones en su interior y excluir corrientes de aire;
- estar instalada sobre base de material compacto y resistente (mármol, granito, metal o caucho, por ejemplo);
- indicador de nivel (gravimétrico o hidráulico) y dispositivo que posibilite su nivelación;
- estar instalada sobre sistema amortiguador (magnético, neumático o hidráulico, por ejemplo) para restablecer rápidamente el equilibrio;

- sistema que posibilite la lectura de la masa (por intermedio de mostradores y/o proyección óptica de escala etc.).

Deben, también, soportar su carga total sin sufrir tensiones inadecuadas que puedan comprometer su sensibilidad en pesajes sucesivos en esas condiciones.

La balanza no debe estar sobrecargada.

#### *Localización de la balanza analítica*

La balanza analítica debe asentarse nivelada sobre mesa o estantería firme y pesada, protegida por amortiguadores de choque, como bases de corcho o láminas de caucho, o además sobre superficie de concreto, apoyada a pilares que estén fijos en el piso o conectados a los elementos de la construcción del edificio a fin de impedir vibraciones. Debe estar en local aislado, que ofrezca seguridad y estabilidad a la medida, en ambiente de atmósfera relativamente seca, protegida del ataque de gases y vapores ácidos, a la distancia de fuentes de calor (luz solar directa, hornos, estufas, muflas etc.) y de corrientes de aire.

#### *Conservación y limpieza*

El plato y demás partes de la balanza, inclusive su caja de protección, deben permanecer limpios, exentos de polvo y sustancias que accidentalmente caigan en el plato de la balanza o en el piso de la caja. Tales materiales deben ser retirados inmediatamente.

Los cuerpos a ser pesados no deben ser colocados directamente sobre el plato. Para tanto, se utilizan papeles o recipientes adecuados a la masa, como vasos de precipitados, vidrios de relojes, crisoles, cápsulas de porcelana y pesafiltros con o sin tapa.

Las partes móviles de la balanza y los pesos no deben ser tocados con las manos. Se usa, para este fin, pinza apropiada, que debe ser guardada en la caja de pesos.

Agentes desecantes, tales como gel de sílice o cloruro de calcio, pueden ser colocados en el interior de la caja de protección, para mantenimiento de atmósfera relativamente seca.

Cuando la balanza no esté en uso, sus puertas deberán permanecer cerradas y trabadas.

La sensibilidad de la balanza analítica debe ser, periódicamente, inspeccionada y evaluada por técnico habilitado.

#### *Utilización de la balanza analítica*

El material a ser pesado debe estar en equilibrio térmico con el aire del interior de la caja de protección de la balanza a fin de evitar errores debido a las corrientes de convección, además de la condensación de la humedad sobre los cuerpos fríos.

La balanza debe estar nivelada en la ocasión de su uso. La posición de equilibrio con o sin carga debe ser confirmada varias veces con 10% de la carga total y con la carga total. La diferencia de equilibrio, encontrada en dos determinaciones sucesivas, hechas con pesos iguales, no debe exceder a 0,1 mg para balanzas analíticas (máximo 200 g) y 0,01 mg para balanzas analíticas (máximo 20 g).

Tanto los pesos cuanto el material a ser pesado deben ser depositados en el centro del plato. Durante las operaciones de pesaje, las puertas de la caja de protección deben estar cerradas.

## 5.2.2 DETERMINACIÓN DEL PUNTO O INTERVALO DE FUSIÓN

Temperatura o punto de fusión de una sustancia es la temperatura corregida en la cual esta se encuentra completamente fundida.

Intervalo de fusión de una sustancia es aquella comprendida entre la temperatura corregida en la cual la sustancia comienza a fluidificarse o a formar gotas en la pared del tubo capilar y la temperatura corregida en la cual está completamente fundida, lo que está evidenciado por la desaparición de la fase sólida.

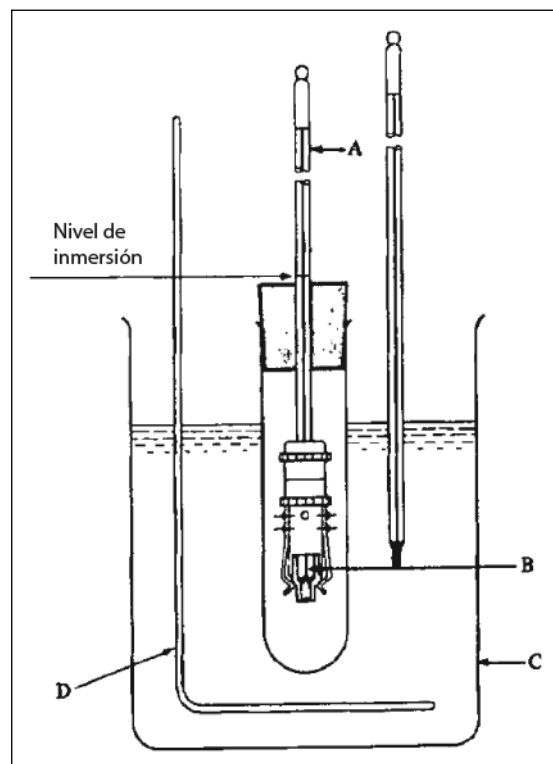
Existen, básicamente, cuatro métodos para determinación del punto o intervalo de fusión.

### MÉTODO I – MÉTODO DEL CAPILAR

Generalmente aplicado para sustancias fácilmente transformadas en polvo.

#### Aparatos

Consiste del aparato presentado en la **Figura 1**.



**Figura 1** - Aparato para determinación del punto o intervalo de fusión por el método del capilar.

El vaso de precipitados debe tener capacidad de 150 ml y contener líquido apropiado para el baño de inmersión de acuerdo con la temperatura deseada. Esos líquidos pueden ser: parafina líquida de alto punto de ebullición, silicona fluida de alto punto de ebullición, ácido sulfúrico concentrado, etilenglicol o agua.

El agitador debe mezclar el líquido rápidamente, manteniendo homogénea la temperatura del medio. El termómetro, calibrado hasta su marca de inmersión, debe cubrir una banda de -10 a 360 °C, con divisiones de 1 °C y colocado a 2 cm del fondo del vaso de precipitados.

El capilar de vidrio borosilicato debe ser cerrado en una de las extremidades y tener aproximadamente 8 a 9 cm de largo, 0,8 a 1,2 mm de diámetro interno y paredes con 0,10 a 0,30 mm de espesor. Para observar el tubo capilar se debe emplear lente de aumento. Como fuente de calor, utilizar una boca de gas o chapa eléctrica

#### Procedimiento

Pulverizar la sustancia en análisis y desecar en estufa a vacío sobre gel de sílice, pentóxido de fósforo u otro agente desecante durante 24 horas.

Introducir porción del polvo en el tubo capilar seco y compactarlo, golpeando el capilar sobre superficie dura para formar columna de aproximadamente 3 a 4 mm de altura.

Calentar el baño rápidamente, bajo agitación constante. Cuando la temperatura alcance 10 °C abajo de la supuesta banda de fusión, regular la velocidad de aumento de la

temperatura para 1 a 2 °C por minuto, dependiendo de la estabilidad de la sustancia bajo ensayo.

Cuando el baño esté 10 °C abajo de la banda de fusión, introducir el capilar en el baño, de forma que su parte inferior esté bien próxima del medio del bulbo del termómetro.

Las temperaturas obtenidas son corregidas mediante adaptación de termómetro auxiliar al dispositivo anterior, de forma que su bulbo se apoyen en el termómetro del baño, en la zona media de la columna emergente de mercurio, cuando la sustancia funde, leyéndose en esta altura la temperatura  $t$  marcada en el termómetro auxiliar.

El cálculo de la corrección a ser adicionada cada una de las temperaturas, que definen el punto de fusión, es efectuado a través de la expresión

$$0,00015 N(T-t)$$

en que

$N$  = número de grados correspondientes a la columna emergente,

$T$  = temperatura leída en el termómetro estándar,

$t$  = temperatura lida en el termómetro auxiliar.

El equipo debe ser calibrado a través del empleo de estándares de punto de fusión entre aquellos reconocidos internacionalmente u otros.

#### MÉTODO II – MÉTODO DEL CAPILAR ABIERTO

Generalmente aplicado para sustancias que no son fácilmente transformadas en polvo.

##### *Aparatos*

Se debe emplear aparato semejante al descrito en el *Método del Capilar*, con las siguientes modificaciones:

- el baño de calentamiento debe ser con agua;
- el termómetro debe ser graduado en 0,2 °C, cubriendo banda de -10 a 100 °C; y
- el tubo capilar, semejante a aquel empleado en el *Método del Capilar*, debe ser abierto en ambas extremidades.

##### *Procedimiento*

Fundir la sustancia rápidamente a temperatura no superior a 10 °C arriba del punto de fusión completo. Agitar y, si necesario, filtrar a través de filtro de papel seco.

Insertar la sustancia fundida en la extremidad del capilar hasta formar columna de 8 a 12 mm de altura. Enfriar el capilar conteniendo la muestra a la temperatura de 15 °C, manteniéndola, en el mínimo, por 16 horas. Sujetar el tubo capilar en el termómetro de forma tal que la columna de sustancia se localice en la parte media del bulbo de mercurio. Colocar el sistema en baño de agua a 15 °C, a la profundidad de 3 cm de la superficie del agua. Calentar

con agitación constante para que la temperatura aumente 2 °C por minuto.

La temperatura en la cual la sustancia comienza a ascender en el capilar es el punto de fusión.

#### MÉTODO III – MÉTODO DE LA GOTA

Generalmente aplicado para determinación del punto de fusión de sustancias grasas de consistencia pastosa.

##### *Aparatos*

Se debe emplear aparatos semejante al del *Método I*, con las siguientes diferencias:

- termómetro con lectura hasta 100 °C graduado en 1 °C
- no utiliza capilar
- el líquido de inmersión es agua.

##### *Procedimiento*

Fundir la muestra, agitando hasta alcanzar una temperatura de 90 a 92 °C e inmediatamente dejar la muestra fundida enfriar hasta una temperatura de 8 a 10 °C arriba del punto de fusión esperado. Enfriar el bulbo de un termómetro hasta 5 °C, secar y, mientras esté frío, sumergirlo en la muestra fundida hasta la altura de la mitad del bulbo, aproximadamente. Retirarlo inmediatamente y mantenerlo en posición vertical hasta que la superficie de la muestra depositada sobre el bulbo solidifique, manteniéndolo en baño de agua durante aproximadamente 5 minutos a una temperatura no mayor que 16 °C. Adaptar el termómetro con la muestra dentro de un tubo de ensayo por medio de un tapón de caucho o corcho, de modo que su extremo inferior quede cerca de 15 mm arriba del fondo del tubo de ensayo. Suspender el tubo de ensayo en un baño de agua a una temperatura de 16 °C y elevar la temperatura del baño hasta 30 °C a una velocidad de 2 °C por minuto y después a una velocidad de 1 °C por minuto, hasta que la primera gota se desprenda del termómetro. La temperatura en la cual esto ocurre representa el punto de fusión.

Para cada determinación emplear una porción recién fundida de la muestra. Si la variación de tres determinaciones es menor que 1 °C, calcular el promedio. Si la variación fuese mayor que 1 °C realizar dos determinaciones más y determinar el promedio de las cinco lecturas.

#### MÉTODO IV – MÉTODO DEL BLOQUE METÁLICO CALENTADO

De aplicación generalizada en la determinación del punto o intervalo de fusión de sustancias.

##### *Aparatos*

Consiste de bloque metálico de elevada conductividad térmica, resistente a las sustancias bajo análisis y de superficie plana y pulida, como bronce, acero inoxidable y similares.



El bloque debe contener cavidad cilíndrica interna, paralela a su superficie superior y a cerca de 3 mm de esta, con dimensiones adecuadas para acomodar termómetro calibrado.

El bloque debe ser uniformemente calentado a través de resistencia eléctrica o llama microajustable. El aparato debe ser calibrado constantemente con sustancias apropiadas y de comprobado grado de pureza.

#### Procedimiento

Calentar el bloque rápidamente hasta temperatura de 10 °C abajo del punto de fusión previsto y, entonces, ajustar el calentamiento para incrementos de temperatura de la orden de °C por minuto.

En intervalos regulares, colocar algunas partículas de la muestra, previamente pulverizada y seca, sobre la superficie metálica, en la región inmediatamente arriba del bulbo del termómetro. Limpiar la superficie después de cada ensayo. Anotar la temperatura ( $t_1$ ) en la cual la sustancia se funde inmediatamente después del contacto con el metal. Interrumpir el calentamiento. Durante el enfriamiento, colocar nuevamente algunas partículas de la muestra, a intervalos regulares, en el mismo local del bloque, limpiando la superficie después de cada ensayo. Anotar la temperatura ( $t_2$ ) en la cual la sustancia solidifica instantáneamente al contacto con el metal.

El punto de fusión instantáneo de la muestra es calculado mediante la siguiente expresión:

$$\frac{t_1 + t_2}{2}$$

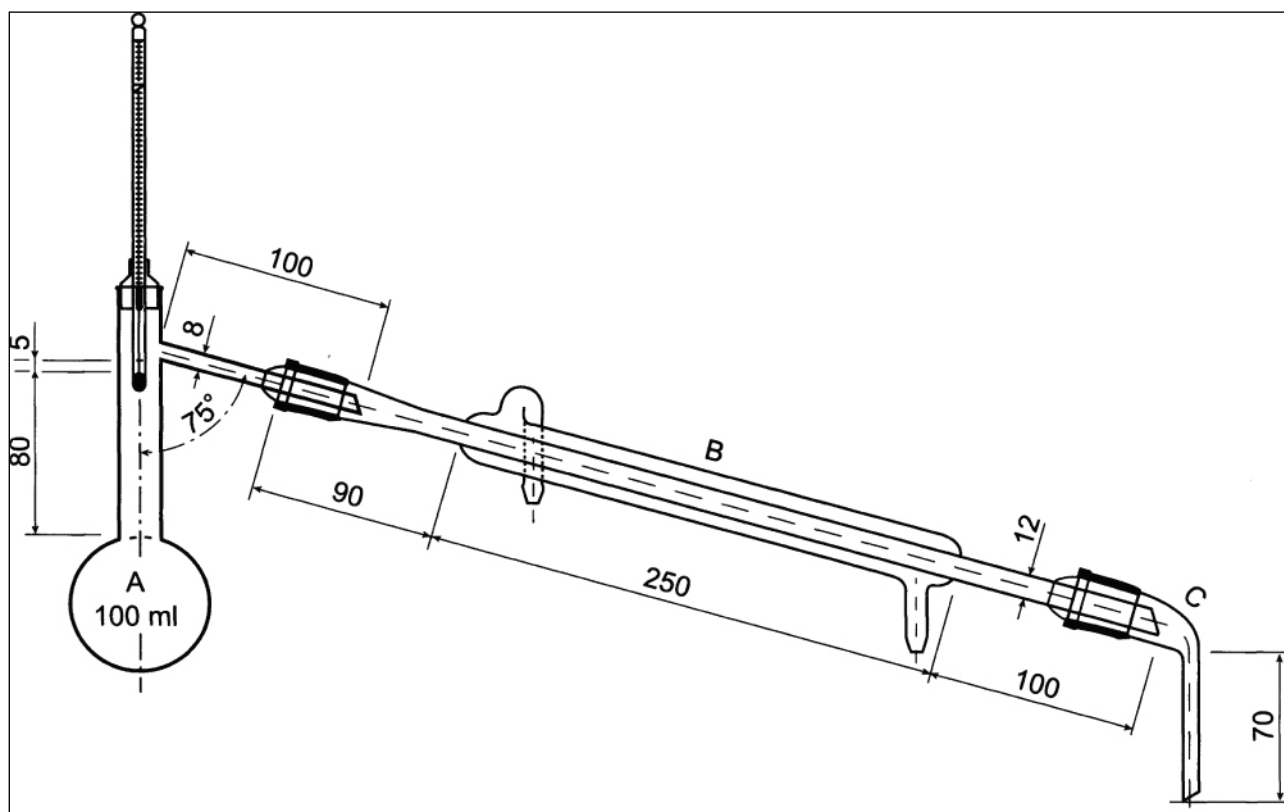


Figura 1 - Aparato para determinación de la banda de destilación (dimensiones en mm). A, balón de destilación; B, condensador; C, adaptador.

### 5.2.3 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE EBULLICIÓN Y BANDA DE DESTILACIÓN

Temperatura o punto de ebullición de un líquido es la temperatura corregida en la cual el líquido hierve bajo presión de vapor de 101,3 kPa (760 mm de Hg).

Banda de destilación es el intervalo de temperatura corregida para la presión de 101,3 kPa (760 mm de Hg), en el cual el líquido, o fracción específica del líquido, destila totalmente.

#### APARATOS

Usar aparato como el sugerido en la **Figura 1** en que A es un balón de destilación con capacidad de 100 ml conectado al condensador B. En la extremidad inferior de B se acopla el adaptador C. Una probeta de 50 ml graduada en 0,2 ml es utilizada como colector. El termómetro debe ser adaptado al balón de forma que el sensor de temperatura se encuentre en el centro del cuello y a cerca de 5 mm abajo del nivel del tubo lateral. El calentamiento (a gas, eléctrico o a través de baño) debe ser seleccionado de acuerdo con la naturaleza de la sustancia.



## PROCEDIMIENTO

Añadir al balón cerca de 50 ml de la muestra para no drenar para el tubo lateral. Añadir perlas de vidrio u otro material poroso adecuado. Adaptar el termómetro al balón y calentar, lentamente, protegiendo el sistema contra corriente de aire.

Registrar la temperatura en la cual fueron colectadas las cinco primeras gotas del destilado. Ajustar el calentamiento para obtener el destilado a un caudal de 3 a 4 ml por minuto. Anotar la temperatura en la cual la última gota se evapora del balón de destilación o cuando la fracción especificada sea colectada. Mantener el destilado a la misma temperatura en la cual el líquido fue originalmente medido y anotar el volumen del destilado.

Comparar los valores obtenidos del punto de ebullición, banda de destilación y volumen del destilado con las respectivas especificaciones de las monografías.

Corregir las lecturas en función de la presión atmosférica utilizando la fórmula:

$$t_1 = t_2 + k(101,3 - b)$$

Donde:

$t_1$  = temperatura corregida;

$t_2$  = temperatura observada a presión atmosférica  $b$ ;

$k$  = factor de conversión (**Tabla 1**), a menos que ese factor no sea considerado;

$b$  = presión atmosférica, expresada en kilopascal, durante la destilación.

**Tabla 1 - Factores de corrección para diferentes temperaturas de destilación.**

Temperatura de destilación	Factor de corrección K
Hasta 100 °C	0,30
Arriba de 100 °C y hasta 140 °C	0,34
Arriba de 140 °C y hasta 190 °C	0,38
Arriba de 190 °C y hasta 240 °C	0,41
Arriba de 240 °C	0,45

**Nota 1:** cuando el líquido es puro, la mayor parte destila a temperatura constante (en una banda de 0,5 °C). Esa temperatura es el punto de ebullición del líquido.

**Nota 2:** líquidos que destilan abajo de 80 °C deben ser enfriados a 10-15 °C antes de medirse el volumen y la probeta que recibe el destilado debe estar inmersa en baño de hielo.

**Nota 3:** cuando el punto de ebullición es superior a 140/150 °C, se puede sustituir el condensador de agua por condensador de aire.

## 5.2.4 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE CONGELAMIENTO

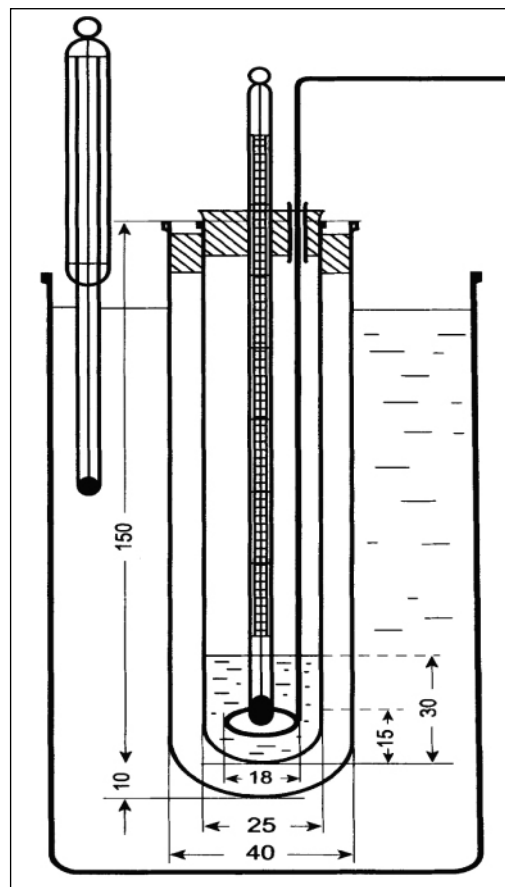
*Temperatura o punto de congelamiento* de líquido o de sólido fundido es la más alta temperatura en la cual ocurre solidificación.

Para sustancias puras que se funden sin descomposición, el punto de congelamiento del líquido es igual al punto de fusión.

### APARATOS

El aparato (**Figura 1**) consiste en tubo de ensayo de aproximadamente 25 mm de diámetro interno y 150 mm de largo suspendido por intermedio de un tapón adecuado dentro de un segundo tubo mayor de 40 mm de diámetro interno y 160 mm de largo formando una camisa de aire que evita cambio brusco de temperatura. Ese sistema es fijo por agarrar en el centro del vaso de precipitados con capacidad de 1000 ml conteniendo agua o solución refrigerante.

El tubo interior es fechado con tapón para contener barra agitadora y termómetro con divisiones de 0,2 °C. El sensor de temperatura del termómetro debe estar fijo a aproximadamente 15 mm del fondo del tubo. El agitador es un bastón de vidrio adaptado con anillo en su extremidad inferior (**Figura 1**).



**Figura 1 - aparato para determinación del punto o intervalo de fusión por el método del capilar.**

## PROCEDIMIENTO

Transferir la muestra en cantidad suficiente para alcanzar 30 mm en el tubo interno. Transferir para el vaso de precipitados la mezcla refrigerante adecuada a 5 °C abajo del punto de congelamiento esperado. Cuando la muestra esté enfriada a cerca de 5 °C arriba del punto de congelamiento, mover verticalmente el agitador entre la superficie y el fondo por, aproximadamente, 20 ciclos por minuto y registrar la temperatura del termómetro de 30 en 30 segundos. Interrumpir la agitación cuando la temperatura permanezca constante o presente leve aumento. Registrar la temperatura de 30 en 30 segundos como mínimo 3 minutos después de que la temperatura comience a disminuir nuevamente.

Registrar el máximo en la curva de la temperatura-tiempo que ocurre después de que la temperatura permanece constante, o presente leve aumento, y antes de que la temperatura comience a disminuir nuevamente. El punto de congelamiento es atribuido al promedio de no menos que tres puntos máximos consecutivos que estén dentro de una banda de 0,4 °C.

**Nota 1:** si la sustancia es sólida a temperatura ambiente, fundir la sustancia y calentar hasta como máximo 20 °C arriba de la temperatura de congelamiento esperada antes de transferir para el tubo interno.

**Nota 2:** si la sustancia es líquida a temperatura ambiente utilizar baño a 15 °C abajo de la temperatura de congelamiento esperada.

## 5.2.5 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DE MASA Y DENSIDAD RELATIVA

Densidad de masa ( $\rho$ ) de una sustancia es la razón de su masa por su volumen a 20 °C. La densidad de masa de la sustancia ( $\rho_t$ ) en una determinada temperatura ( $t$ ) es calculada a partir de su densidad relativa ( $d_l$ ) por la fórmula:

$$\rho_t = d_{(\text{agua})}^t \times d_t^t + 0,0012$$

Cuando la temperatura, por ejemplo, 20 °C la fórmula es expresada por:

$$\rho_{20} = 0,99820 \times d_{20}^{20} + 0,0012$$

Tabla 2 - Tabla 1 - Densidad del agua de 0 a 40 °C.

Temp. (°C)	Densidade (g/mL)	Temp. (°C)	Densidade (g/mL)	Temp. (°C)	Densidade (g/mL)	Temp. (°C)	Densidade (g/mL)
0	0,99984	10	0,99970	20	0,99820	30	0,99565
1	0,99990	11	0,99961	21	0,99799	31	0,99534
2	0,99994	12	0,99950	22	0,99777	32	0,99503
3	0,99996	13	0,99938	23	0,99754	33	0,99470
4	0,99997	14	0,99924	24	0,99730	34	0,99437
5	0,99996	15	0,99910	25	0,99704	35	0,99403
6	0,99994	16	0,99894	26	0,99678	36	0,99368
7	0,99990	17	0,99877	27	0,99651	37	0,99333
8	0,99985	18	0,99860	28	0,99623	38	0,99297
9	0,99978	19	0,99841	29	0,99594	39	0,99259
10	0,99970	20	0,99820	30	0,99565	40	0,99222

Densidad relativa de una sustancia es la razón de su masa por la masa de igual volumen de agua, ambas a 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ) o por masa de igual volumen de agua a 4 °C ( $d_4^{20}$ ):

$$d_4^{20} = 0,998234 \times d_{20}^{20}$$

## PROCEDIMIENTO

La densidad relativa de la sustancia puede ser determinada a través de picnómetro, balanza hidrostática o densímetro. El uso de esos dos últimos es condicionado al tipo de aparatos disponible.

## MÉTODO DEL PICNÓMETRO

Utilizar picnómetro limpio y seco, con capacidad de, como mínimo, 5 ml que tenga sido previamente calibrado. La calibración consiste en la determinación de la masa del picnómetro vacío y de la masa de su contenido con agua, recientemente destilada y hervida, a 20 °C.

Transferir la muestra para el picnómetro. Ajustar la temperatura para 20 °C, retirar exceso de la sustancia, si necesario, y pesar. Obtener el peso de la muestra a través de la diferencia de masa del picnómetro lleno y vacío. Calcular la densidad relativa ( $d_{20}$ ) determinando la razón entre la masa de la muestra líquida y la masa del agua, ambas a 20°C. Utilizar la densidad relativa para calcular la densidad de masa ( $\rho$ ).

## 5.2.6 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Índice de refracción ( $n$ ) de una sustancia es la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad en la sustancia.

Cuando un rayo de luz monocromática pasa de un medio transparente para otro de densidad óptica diferente ese es reflejado o refractado, excepto cuando incide perpendicularmente la interfaz. La relación entre el seno del ángulo de incidencia ( $sen i$ ) y el seno del ángulo de refracción ( $sen r$ )

es constante. Esa relación equivale al índice de refracción ( $n$ ).

$$n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}$$

Para fines prácticos se mide la refracción con referencia al aire y a la sustancia y no con referencia al vacío y a la sustancia, por lo tanto las diferencias entre los valores obtenidos con ambas medidas no son significativos para fines farmacopeicos.

En sustancias isotrópicas, el índice de refracción es característica constante en determinado largo de onda, temperatura y presión. Por esta razón, ese índice es útil no sólo para identificar la sustancia, sino, también, para detectar la presencia de impurezas. Es empleado para caracterizar principalmente grasas, aceites grasos, ceras, azúcares y solventes orgánicos, así como para identificar ciertos fármacos. Es igualmente usado para determinar la pureza de aceites volátiles.

Generalmente se determina el índice de refracción en función de la luz de sodio en el largo de onda 589,3 nm (raya D) y a  $20 \pm 0,5$  °C. De ahí expresarse el valor del índice de refracción como  $n_D^{20}$ .

## REFRACTÓMETROS

Los refractómetros utilizados normalmente en análisis farmacopeica usan luz blanca, pero son calibrados para suministrar el índice de refracción en términos de largo de onda correspondiente al de la luz de la raya D de sodio.

El refractómetro Abbe mide la banda de valores de índice de refracción de las sustancias farmacéuticas. Otros refractómetros de mayor o igual precisión pueden ser empleados.

Visto que el índice de refracción varía significativamente con la temperatura, durante la lectura se debe ajustar y mantener a 20 °C.

La calibración del aparato es realizada con estándar suministrado por el fabricante. Para control de la temperatura y limpieza del equipo se debe determinar el índice de refracción del agua destilada cuyos valores son 1,3330 a 20 °C y 1,3325 a 25 °C.

## 5.2.7 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

Viscosidad es la expresión de la resistencia de líquidos al drenaje, o sea, al desplazamiento de parte de sus moléculas sobre moléculas vecinas. La viscosidad de los líquidos vienen del rozamiento interno, esto es, de las fuerzas de cohesión entre moléculas relativamente juntas. Con el aumento de la temperatura, aumenta la energía cinética promedio de las moléculas, disminuye (en promedio) el intervalo de tiempo que las moléculas pasan unas junto a las otras, menos efectivas se tornan las fuerzas intermoleculares y menor la viscosidad.

La unidad dinámica, Sistema CGS, de viscosidad es el *poise*. El Sistema CGS de unidades es un sistema de unidades de medidas físicas, o sistema dimensional, de tipología LMT (longitud, masa tiempo), cuyas unidades base son el centímetro para la longitud, el gramo para la masa y el segundo para el tiempo.

La unidad dinámica análoga en el Sistema Internacional de Unidades (SI) es el pascal segundo. El poise es frecuentemente utilizado con el prefijo *centi*; un centipoise (cP) es un milipascal segundo (mPa·s) en unidades SI.

Sistema CGS – *poise* (P)

$$1 \text{ P} = 1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$$

Por definición, *poise* es la fuerza, en dinas, necesaria al desplazamiento de camada plana de líquido, con área de 1 cm<sup>2</sup>, sobre otra camada idéntica, paralela y distanciada de la primera en 1 cm, a la velocidad de 1 cm/s. El *poise* es, por lo tanto, demasiado grande para la mayoría de las aplicaciones, por lo que se recurre de ahí al *centipoise*, cP, correspondiente a un centésimo de *poise*. A veces es conveniente que se utilice la viscosidad cinemática, que consiste en la relación entre la viscosidad dinámica y la densidad. En ese caso, en el sistema CGS, la unidad es el *stoke*. A ejemplo de lo que ocurre con viscosidad absoluta (medida en *poise*), es más conveniente expresar viscosidad cinemática en *centistokes* (100 *centistokes* = 1 *stoke*) para caracterizar la mayoría de los líquidos usuales en Farmacia y Química.

Sistema Internacional de Unidades – *pascal segundo* (Pa·s)

$$1 \text{ Pa} \cdot \text{s} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 10 \text{ P}$$

*Pascal segundo* equivale a 10 *poise*, pero, normalmente, es más utilizado milipascal segundo (mPa·s)

En la **Tabla 1** está registrada la viscosidad de algunos líquidos.

**Tabla 1 - Viscosidad de algunos líquidos.**

Líquido	Viscosidad (P) <sup>a</sup> Unidades CGS	Viscosidad N s m Unidades SI	Viscosidad cP = mPa.s
Agua	0,0101 (298 K)	0,00101	0,890
Acetona	0,00316	0,000316	0,306
Etanol	0,01200	0,001200	1,074
Glicerina	14,9	1,49	934

<sup>a</sup> 1 poise (P) = 1 dina. s. cm<sup>-2</sup> = 0,1 N s m<sup>-2</sup>. cP = centi-poise = mPa.s = mili Pascal por Seg.

La determinación de la viscosidad – ensayo para el cual la especificación de la temperatura es imprescindible debido a su influencia decisiva sobre el resultado (en general, la viscosidad es inversamente proporcional a la temperatura) – es efectuada con base en propiedades diversas. El método más frecuente se basa en el tiempo de drenaje de líquidos a través de capilares (viscosímetros de Ostwald, Ubbelohde, Baumé y Engler) debido a la simplicidad y al precio accesible de los aparatos.

Viscosímetros que tienen como principio de funcionamiento la determinación del tiempo de caída libre de esferas a través de tubos conteniendo el líquido bajo ensayo (Hoppler) o la velocidad de rotación de ejes metálicos inmersos en el líquido (Brookfield, entre otros) son igualmente empleados.

Diversas metodologías que pueden ser empleadas:

- resistencia de líquidos al drenaje, tiempo de caudal de un líquido a través de un capilar (viscosímetro de Oswald, Ubbelohde, Baumé y Engler);
- medida del tiempo de caída de una esfera a través de tubos conteniendo el líquido bajo ensayo (Hoppler);
- midiendo la resistencia al movimiento de rotación de ejes metálicos cuando inmersos en el líquido (reómetro de Brookfield).

A pesar de que sea posible la determinación de viscosidad absoluta, con base en las dimensiones exactas del viscosímetro empleado, es más frecuente la práctica de la calibración previa del aparato con líquido de viscosidad conocida, permitiendo, por comparación, evaluación relativa de la viscosidad del líquido bajo ensayo. Así, empleándose viscosímetro de Ostwald o similar, se determinan los tiempos de drenaje  $t_1$  y  $t_2$  de volúmenes iguales de los líquidos de referencia y muestra, de densidad  $d_1$  y  $d_2$ , respectivamente. Siendo  $\eta_2$  la viscosidad del líquido de referencia, la viscosidad absoluta (cP) del líquido muestra, puede ser calculada por la ecuación:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2}$$

o mejor

$$\eta_1 = \eta_2 \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2}$$

El cociente  $\eta_2/t_2 d_2$  posee valor constante,  $k$ , para cada líquido de referencia, en el mismo viscosímetro. Así, conocido ese valor (generalmente, encontrado en el manual del aparato), se simplifica la ecuación:

$$\eta = k.t.d.$$

El valor de  $k$  puede, también, ser determinado, experimentalmente, midiéndose el tiempo de drenaje de líquido estándar, puro, y aplicándose la ecuación:

$$k = \frac{\eta}{t.d.}$$

Empleándose agua como estándar, usual para determinación de líquidos de baja viscosidad, se adoptan los valores de viscosidad registrados en la **Tabla 2**, conforme la temperatura del ensayo:

**Tabla 2 - Valores de viscosidad, de acuerdo con la temperatura del ensayo**

Temperatura (°C)	$\eta$ (cP)
15	1,140
16	1,110
17	1,082
18	1,055
19	1,029
20	1,004
21	0,980
22	0,957
23	0,936
24	0,915
25	0,895

Para líquidos mucho viscosos (glicerina y aceites en general), se puede determinar la viscosidad relativa por el método de la velocidad de la queda de bolas a través del líquido, usando el viscosímetro de Hoppler. Ese método, también, es apropiado para determinar la viscosidad absoluta de líquidos, aplicándose la ecuación:

$$\eta = t(d_s - d_l)K$$

Donde:

$t$  = tiempo de caída de la bola (seg).

$K$  = cte específica de la bola ( $\text{mPcm}^3$ ), provista por el fabricante.

$d_s$  = densidad de la bola ( $\text{g/cm}^3$ ).

$d_l$  = densidad del líquido ( $\text{g/cm}^3$ ).

La densidad del líquido ( $d_l$ ), para una cierta temperatura, puede ser obtenida en libros de referencia (como *hand-books*), o determinada experimentalmente.

La viscosidad relativa en el método de Hoppler puede ser determinada aplicándose la ecuación:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{(d_s - d_l)t_1}{(d_s - d_l)t_2}$$

donde  $n$ ,  $d$  y  $t$  son, respectivamente, el coeficiente de viscosidad dinámica, la masa específica y el tiempo de drenaje de igual volumen de los líquidos 1 y 2.

#### VISCOSÍMETRO DE OSTWALD

El principio operacional del viscosímetro de Stokes se basa en la determinación de la velocidad de caída libre de una esfera a través del fluido del cual se desea obtener la viscosidad.

El viscosímetro de Ostwald es el más simple y popular entre los aparatos disponibles. Consta de tubo doblado en U (**Figura 1**), con uno de los ramos provisto de ampolla terminada en capilar. Hay dos trazos de referencia, uno inmediatamente arriba de la ampolla y el otro sobre el capilar. El otro ramo es suficientemente ancho para permitir su llenado con el líquido en ensayo hasta la altura de cerca de 5 mm abajo del trazo de referencia inferior. Para posibilitar mayor variedad de viscosidades, posibles de deter-

minación, se emplean colecciones de viscosímetros, con diferentes calibres. El aparato indicado para determinada evaluación es lo que posibilita drenaje de la muestra en periodo no inferior a 60 segundos.

Para la determinación propiamente dicha, transferir para el viscosímetro escogido, lavado y seco, cantidad suficiente de líquido para alcanzar nivel de 5 mm abajo del trazo de referencia inferior. Fijar el aparato en termostato (20 °C), después de aguardar que el líquido en el interior del aparato adquiera la temperatura controlada, aspirar el líquido por el tubo capilar/ampolla (por medio de tubo de caucho fijado en la extremidad) hasta que el nivel del líquido exceda ligeramente el trazo de referencia superior. Soltar entonces el tubo y, en el instante en que el menisco alcance el trazo de referencia superior, accionar cronómetro de precisión, retribándolo cuando el menisco pase por el trazo de referencia inferior. Registrar el tiempo transcurrido y repetir el ensayo diversas veces con intervalos de algunos minutos hasta que tiempos sucesivos no difieran en más de 0,5 segundos. Determinar la densidad del líquido bajo ensayo (5.2.5), corrigiendo el valor para la densidad relativa al agua, a 20 °C, y calcular la viscosidad del líquido muestra por la fórmula indicada, empleando la constante k suministrada o determinada por procedimiento similar.

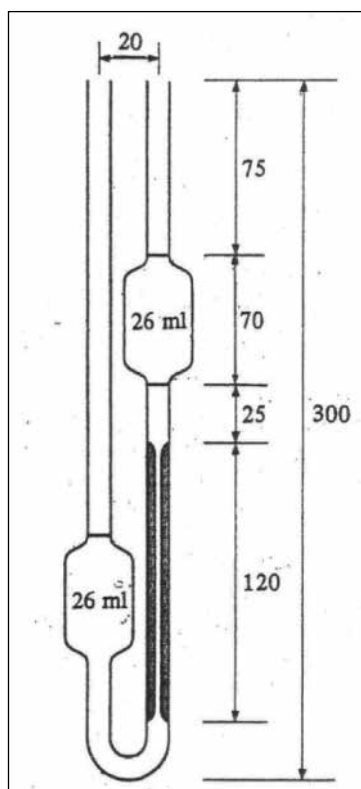


Figura 1 - Viscosímetro de Ostwald (dimensiones en mm).

#### VISCOSÍMETRO DE HOPPLER

El sistema de medida Hoppler, mide el tiempo que una esfera sólida precisa para recorrer una distancia entre dos puntos de referencia dentro de un tubo inclinado con muestra. Los resultados obtenidos son considerados como viscosidad dinámica en la medida estandarizada en el Sistema Internacional (mPa.s). Determina la viscosidad de líquidos Newtonianos y gases (con una bola especial para gases),

con precisión. Entre sus aplicaciones figuran la investigación, el control de procesos y el control de calidad, utilizando principalmente para sustancias de baja viscosidad, entre 0,6 y 100 000 mPa.s.

El Viscosímetro de Hoppler es compuesto por un tubo de vidrio con dos marcas (A y B) separadas por 10 mm entre sí en la columna, las cuales definen la distancia de medición. Una bola (de vidrio, aleación de níquel y hierro o acero), con diámetro compatible con el calibre del tubo de vidrio es instalada en el tope de su contenido líquido. El tubo está envuelto por un cilindro de vidrio lleno con agua en circulación, bajo temperatura controlada. Todo el conjunto se encuentra dispuesto en posición ligeramente inclinada (10% en vertical), pudiendo ser girado 180° en torno de un eje perpendicular a ambos los tubos, para posibilitar la repetición de las determinaciones y el retorno de la bola a la posición inicial. La técnica consiste, en cronometrar el tiempo (de caída) que una esfera (con densidad y diámetro variables con la respectiva constitución estructural) lleva para recorrer el espacio entre aquellas dos marcas (A y B) existentes en las extremidades del tubo de vidrio. Cuanto mayor sea la viscosidad mayor será el tiempo que a bola llevará para recorrer aquel espacio. El tipo de esfera a ser utilizada es escogida en función del valor presumible de la viscosidad del líquido en observación. En el caso de la sangre son utilizadas esferas de vidrio. Los resultados de la viscosidad, de los líquidos newtonianos son expresos en unidades absolutas estándares internacionales (milipascal. segundo, mPa.s).

Para la determinación propiamente dicha, enjuagar el viscosímetro, escogido, lavado y seco, con el líquido que sea usado para determinar la viscosidad. Ajustar la plomada del aparato. Escoger la esfera adecuada para cada líquido (agua = esfera de vidrio). Llenar completamente el tubo interno del viscosímetro con agua. Anotar el tiempo de caída de la esfera entre las marcas A y B en el viscosímetro. Hacer dos determinaciones más para obtener el mejor promedio.

#### VISCOSÍMETRO BROOKFIELD

La viscosidad de una forma farmacéutica puede ser determinada por un viscosímetro de Brookfield, que mide la viscosidad por la fuerza necesaria para girar el spindle en el líquido que está siendo probado.

Para utilizar ese aparato, se debe proceder de la siguiente forma:

- añadir la muestra a ser analizada en el recipiente colector del aparato, hasta la marca deseada;
- programar el aparato, eligiendo un número de spindle y una rotación a ser probados, de acuerdo con metodología específica;
- sumergir el spindle en la muestra a ser analizada;
- accionar el aparato y, después de estabilización del valor, que aparecerá en el display del aparato, anotar ese valor que será expresado en centipoise (cP);

caso no haya estabilización del valor, probar nuevamente, utilizando otro número de spindle u otra rotación.



## VISCOSIMETRO DE GRAVEDAD – MODELO COPAFORD

Seleccionar el orificio adecuado. La directriz para la selección del orificio debe ser la obtención de un tiempo de drenaje del líquido a prueba al redor de 60 segundos. Se debe tener un tiempo de drenaje entre 20 y 100, segundos, para la muestra a 25 °C.

La muestra debe ser, perfectamente, homogeneizada. En el momento del ensayo, el viscosímetro y el material a ser probado deben estar a  $25 \pm 0,1$  °C. Cerrar el orificio con lámina de vidrio plana y llenar el vaso con muestra hasta el nivel más elevado. Verter la muestra, lentamente, evitando la formación de burbujas. Nivelar la muestra en el vaso utilizando placa de vidrio plana. Retirar la lámina del orificio. La muestra quedará retenida dentro del vaso. Retire la placa de vidrio plana y accione el cronómetro cuando la muestra comience a drenar por el orificio. Cuando ocurra la primera interrupción del flujo de drenaje, parar el cronómetro y anotar el tiempo transcurrido en segundos. Realizar el ensayo, en el mínimo, en triplicado. La viscosidad será la media de los valores obtenidos, expresada en mm<sup>2</sup>/s o Centistokes, siendo permitido un desvío estándar máximo 3%. La conversión de segundos para mm<sup>2</sup>/s o Centistokes está dada de acuerdo con el manual del equipo utilizado.

### 5.2.8 DETERMINACIÓN DEL PODER ROTATORIO Y DEL PODER ROTATORIO ESPECÍFICO

Muchas sustancias farmacéuticas son ópticamente activas, luego desvían la luz plano-polarizada de modo que la luz transmitida es desviada en un determinado ángulo con relación al incidente.

Sustancias con la misma estructura conteniendo uno o más centros quirales las cuales son imágenes especulares no superponibles una de la otra son denominadas enantiómeros.

Uno de los enantiómeros desvía la luz plano-polarizada para la derecha (+) y es llamado de dextrógiro, o d; el anti-poda desvía para la izquierda (-) y es conocido como levógiro o l. El ángulo de ese desvío es igual en módulo para los enantiómeros, sin embargo con señales opuestas.

Las propiedades físico-químicas de los enantiómeros como densidad, índice de refracción, momento dipolo-dipolo, puntos de ebullición y fusión son idénticas ya que el ambiente químico en el cual está insertado cada átomo es igual para los enantiómeros.

La polarimetría, eso es, la medición del poder rotatorio de una sustancia con polarímetro es uno de los métodos más prácticos para distinguir los enantiómeros y, por tanto, es un importante criterio de identificación, caracterización y de determinación de pureza enantiomérica de los fármacos.

El poder rotatorio varía con la temperatura, el largo de onda de la luz incidente, el solvente utilizado, la naturaleza de la sustancia y su concentración. Si la solución contiene dos sustancias ópticamente activas y estas no reaccionasen entre sí, el ángulo de desvío será la suma algebraica de los ángulos de desvío de ambas.

#### Polarímetro

Históricamente, la polarimetría fue realizada utilizando un instrumento en que el poder rotatorio es estimado por la visualización de la intensidad de campos divididos. Por esa razón, la línea-D de la lámpara de sodio en el largo de onda visible a 589 nm fue el más frecuentemente utilizado. El poder rotatorio específico determinado en la línea D está expresado, la mayoría de las veces, por el símbolo:

$$[\alpha] \frac{25}{D} \text{ ou } [\alpha] \frac{20}{D}$$

El uso de largos de onda más bajos como los disponibles con las líneas de lámpara de mercurio aislados por medio de filtros de transmitancia máxima a cerca de 578, 546, 436, 405 y 365 nm en un polarímetro fotoeléctrico mostraron mayor sensibilidad; consecuentemente hubo una reducción en la concentración de la sustancia en ensayo. En general, el poder rotatorio observado en 436 nm es aproximadamente el doble y en 365 nm es cerca de tres veces mayor que en 589 nm.

#### Poder rotatorio y poder rotatorio específico

La ecuación general usada en polarimetría es:

$$[\alpha] \frac{t}{\lambda} = \frac{100a}{lc}$$

En que  $[\alpha]$  es el poder rotatorio específico en el largo de onda  $\lambda$  y en la temperatura  $t$ ,  $a$  es el poder rotatorio observado en grados (°),  $l$  es el camino óptico en decímetros y  $c$  es la concentración de la sustancia en g por 100 ml. Así,  $[\alpha]$  es 100 veces  $a$  para una solución conteniendo 1 g en 100 ml en una célula con un camino óptico de 1,0 decímetro bajo condiciones definidas del largo de onda de la luz incidente y de la temperatura.

#### Procedimiento

El poder rotatorio específico de un fármaco es un valor de referencia y debe ser calculado a partir del poder rotatorio observado para la solución de la muestra o para el líquido conforme especificado en la monografía. Las medidas del poder rotatorio son realizadas a 589 nm a 20 °C excepto cuando especificado. Siempre que un polarímetro fotoeléctrico es usado, una única medida corregida por el blanco es realizada. Para un polarímetro visual es empleada la media de por lo menos cinco determinaciones corregidas por el blanco. En ambos casos, el solvente utilizado para el preparado de la solución de la muestra debe ser utilizado como blanco o el tubo vacío en el caso de líquidos. La temperatura experimental debe ser mantenida en  $\pm 0,5$  °C en relación al valor especificado. Usar el mismo tubo del polarímetro en la misma orientación angular para la



muestra y el blanco. Posicionar el tubo para que la luz pase por él en la misma dirección cada vez.

El poder rotatorio de las soluciones debe ser determinado dentro de 30 minutos después de la preparación. En los casos en los cuales ocurren racemización o mutarrotación todas las condiciones deben ser estandarizadas desde el tiempo de preparado de la solución y el de medida en el polarímetro.

El poder rotatorio y el poder rotatorio específico se refieren a la sustancia seca, anhidra o exenta de solvente en todas las monografías en que se proveen los valores de la humedad, pérdida por desecación o contenido de solvente.

## 5.2.9 DETERMINACIÓN DE LA PÉRDIDA POR DESECACIÓN

Este ensayo se destina a determinar la cantidad de sustancia volátil de cualquier naturaleza eliminada en las condiciones especificadas en la monografía. En el caso de ser el agua la única sustancia volátil, basta determinar su tenor según uno de los métodos descritos en *Determinación de agua* (5.2.20).

Para los demás casos, el procedimiento adoptado es el descrito abajo, siendo el método a ser adoptado especificado en las monografías.

### PROCEDIMIENTO

#### *Método Gravimétrico*

Reducir la sustancia a polvo fino, caso se presente en la forma de cristales voluminosos. Pesar, exactamente, cerca de 1 a 2 g y transferir para pesafiltro chato previamente desecado durante 30 minutos en las mismas condiciones a ser empleadas en la determinación. Después de enfriamiento en desecador, pesar el pesafiltro, tapado, conteniendo la muestra. Agitar el pesafiltro suavemente para distribuir la muestra de la manera más uniforme posible, a una altura ideal de 5 mm. Colocar el pesafiltro en la estufa, retirar la tapa, dejándola también en la estufa. Secar la muestra (generalmente a 105 °C) y por un determinado plazo (generalmente 2 horas) especificado en la monografía. Enfriar hasta temperatura ambiente en desecador. Pesar. Repetir la operación hasta peso constante.

*Observación:* En el caso de la sustancia fundir a una temperatura más baja que la especificada para la determinación, mantener el pesafiltro con su contenido por 1 a 2 horas a la temperatura de 5 a 10 °C abajo del punto de fusión, antes de secarla a la temperatura especificada. Cuando la sustancia se descompone a temperatura de 105 °C, ella debe ser desecada en una temperatura más baja. En ambos casos, se puede realizar el secado a presión reducida, en desecador.

El porcentaje de pérdida por desecación está dado por la ecuación

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

en que

Pa = peso de la muestra,

Pu = peso del pesafiltro conteniendo la muestra antes de la desecación,

Ps = peso del pesafiltro conteniendo la muestra después de la desecación.

#### *Balanza por infrarrojo o utilizando lámpara halógena*

El procedimiento debe ser realizado como a continuación.

- retirar la humedad del equipo;
- pesar cerca de 1g de la sustancia a ser analizada y distribuir el material uniformemente en el colector de aluminio contenido dentro del aparato;
- definir el tiempo y temperatura de secado según descrito en la monografía de la respectiva sustancia. La mayoría de las veces, se utiliza un (1) minuto a 105 °C.
- accionar el aparato y anotar el valor de la humedad, en porcentual, que aparecerá en el *display* del aparato.

#### *Termogravimetría*

Proceder conforme descrito en *Análisis Térmico* (5.2.27).

## 5.2.10 DETERMINACIÓN DE CENIZAS SULFATADAS (RESIDUO POR INCINERACIÓN)

Cenizas sulfatadas comprenden el residuo no volátil a la incineración en la presencia de ácido sulfúrico, conforme la técnica especificada. En general, el ensayo espera determinar el tenor de constituyentes o impurezas inorgánicas contenidos en sustancias orgánicas. También se destina a la determinación de componentes inorgánicos en mezclas y de la cantidad de impurezas contenidas en sustancias inorgánicas termolábiles.

### PROCEDIMIENTO

Pesar exactamente de 1 a 2 g (o la cantidad especificada en la monografía) de sustancia pulverizada, transferir para crisol (como ejemplo: platino, porcelana, sílice, cuarzo) previamente calcinado, enfriado en desecador y tarado, y añadir cerca de 1 ml de ácido sulfúrico. Calentar suavemente hasta carbonización en temperatura no superior a 600 °C ± 50 °C. Enfriar y añadir lentamente cerca de 1 ml de ácido sulfúrico para humedecer el residuo, carbonizar e incinerar con calentamiento gradual hasta 600 °C ± 50 °C. Enfriar, pesar nuevamente e incinerar por 30 minutos más. Repita este procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesajes sucesivos no sea mayor que 0,5 mg. Un equipo calibrado, por ejemplo mufla, debe ser utilizado para el control de la temperatura. Calcular el porcentaje de cenizas sulfatadas con relación a la sustancia en ensayo, utilizando el siguiente cálculo:

$$\text{Cenizas sulfatadas (\%)} = \frac{P - P_0}{P} \times 100$$

en que:

$P_1$  = Peso del crisol después de la calcinación y enfriamiento (tara del crisol);

$P_2$  = Peso del crisol con muestra después de la calcinación y enfriamiento en desecador;

$P_3$  = Peso de la muestra inicial

100 = Factor de porcentaje.

## 5.2.11 DETERMINACIÓN DE LA GRANULOMETRÍA DE LOS POLVOS

El grado de división o la granulometría de polvos está expresado por la referencia a la abertura nominal de la malla del tamiz utilizado. Los tamices empleados son de acero inoxidable, latón, no siendo permitido el revestimiento de los hilos.

En la descripción de los polvos son utilizados los términos abajo:

*Polvo grueso* – aquel cuyas partículas pasan en su totalidad por el tamiz con abertura nominal de malla de 1,70 mm y, como máximo, 40% por el tamiz con abertura nominal de malla de 355  $\mu\text{m}$ .

*Polvo moderadamente grueso* – aquel cuyas partículas pasan en su totalidad por el tamiz con abertura nominal de malla de 710  $\mu\text{m}$  y, como máximo, 40% por el tamiz con abertura nominal de malla de 250  $\mu\text{m}$ .

*Polvo semifino* – aquel cuyas partículas pasan en su totalidad por el tamiz de abertura nominal de malla de 355  $\mu\text{m}$  y, como máximo, 40% por el tamiz con abertura nominal de malla de 180  $\mu\text{m}$ .

*Polvo fino* – aquel cuyas partículas pasan en su totalidad por el tamiz con abertura nominal de malla de 180  $\mu\text{m}$ .

*Polvo finísimo* – aquel cuyas partículas pasan en su totalidad por el tamiz con abertura nominal de malla de 125  $\mu\text{m}$ .

La determinación de la granulometría de polvos es hecha por el proceso descrito abajo, con el auxilio de tamices, cuyas características están estandarizadas en la tabla anexa.

### PROCEDIMIENTO

La granulometría es determinada con el auxilio de tamices operados por dispositivo mecánico. Este tipo de dispositivo reproduce los movimientos horizontales y verticales de la operación manual, a través de la acción mecánica uniforme. Para utilizar este dispositivo, proceda de la siguiente forma:

Separar, por lo menos, 4 tamices que estén descritos en la **Tabla 1**, de acuerdo con las características de la muestra. Montar el conjunto con el tamiz de mayor abertura sobre el de abertura menor. Colocar el conjunto sobre el receptor de tamices.

Pesar cerca de 25 g de la muestra (dependiendo de la naturaleza del material, densidad del polvo o gránulo y del diámetro de los tamices a ser utilizados). Transferir la muestra

para el tamiz superior, distribuyendo uniformemente el polvo. Tapar el conjunto.

Accionar el aparato, por cerca de 15 minutos, con vibración adecuada. Después del término de este tiempo, utilizando un pincel adecuado, retirar toda la muestra retenida en la superficie superior de cada malla para un papel impermeable, y pesar el polvo. Pesar también el polvo retenido en el colector.

Calcular el porcentual retenido en cada tamiz, utilizando el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Retida pelo tamiz} = \frac{P_1}{P_2} \cdot 100$$

donde:

$P_1$  = Peso de la muestra retenida en cada tamiz (en gramos);

$P_2$  = Suma de los pesos retenidos en cada tamiz y en el colector (en gramos);

100 = Factor de porcentaje.

**Tabla 1 - Abertura de malla de los tamices.**

Número del tamiz (ABNT/ASTM)	Orificio del tamiz
2	9,5 mm
3,5	5,6 mm
4	4,75 mm
8	2,36 mm
10	2 mm
20	850 $\mu\text{m}$
30	600 $\mu\text{m}$
40	425 $\mu\text{m}$
50	300 $\mu\text{m}$
60	250 $\mu\text{m}$
70	212 $\mu\text{m}$
80	180 $\mu\text{m}$
100	150 $\mu\text{m}$
120	125 $\mu\text{m}$
200	75 $\mu\text{m}$
230	63 $\mu\text{m}$
270	53 $\mu\text{m}$
325	45 $\mu\text{m}$
400	38 $\mu\text{m}$
500	25 $\mu\text{m}$
635	20 $\mu\text{m}$

\* El número del tamiz corresponde a la clasificación de la Asociación Brasileña de Normas Técnicas – ABNT (1984), ISO 33101:2000.

## 5.2.12 COLOR DE LÍQUIDOS

La evaluación del color de líquidos es ejecutada por comparación de la solución bajo análisis – preparada conforme instrucciones de la monografía – y soluciones estándar de color (SC). Tales soluciones encuentran empleo como referencia para algunos fármacos y en pruebas de carbonización con ácido sulfúrico especificado en diversas monografías.

El proceso comparativo, salvo especificación contraria, debe ser ejecutado en tubos de ensayo de vidrio transparente y fondo chato, con diámetro de 16 mm, del tipo empleado en ensayo límite de impurezas. Los tubos deben ser los más uniformes posibles.

Para la evaluación, utilizar volúmenes de 10 ml tanto para la preparación muestra como para la preparación estándar, asegurando altura aproximada de 50 mm para los líquidos en los tubos. Observar los tubos transversalmente contra fondo blanco, bajo luz difusa. Es importante comparar las soluciones en las mismas condiciones, inclusive de temperatura (25 °C).

La preparación muestra es preparada para presentar coloración semejante a la de la preparación de referencia especificada.

### ESTÁNDARES BÁSICOS

Las soluciones de referencia de color (SC) son obtenidas a partir de tres soluciones básicas, a ser preparadas y almacenadas en frascos herméticos. De esas – con base en la **Tabla 1**, conteniendo indicaciones de volúmenes para la preparación de 20 soluciones estándar de color (SC) designadas con las letras del alfabeto, de A a T – preparar la solución o soluciones especificadas para la comparación. Transferir los volúmenes indicados (dejar el agua por último) y homogeneizar, directamente, en los tubos de comparación.

#### *Solución base de cloruro de cobalto II*

Preparar solución de 25 ml de ácido clorhídrico y 975 ml de agua. Disolver 65 g de cloruro de cobalto (II) en aproximadamente 900 ml de esa solución y completar el volumen para 1000 ml con el mismo solvente. Transferir, usando pipeta, 5 ml de esa solución para frasco de yodo de 250 ml, juntar 5 ml de peróxido de hidrógeno SR y 15 ml de hidróxido de sodio 5 M. Hervir durante diez minutos, enfriar y añadir 2 g de yoduro de potasio y 20 ml de ácido sulfúrico 0,26 M. Titular con tiosulfato de sodio 0,1 M SV, juntando 3 ml de almidón SI como indicador. Corregir el volumen de titulante consumido por determinación en blanco. Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV equivale a 23,79 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el volumen de la solución adicionando cantidad suficiente de solución de ácido clorhídrico y agua para obtener solución conteniendo exactamente 59,5 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por ml de solución.

#### *Solución base de sulfato cúprico*

Preparar solución de 25 ml de ácido clorhídrico y 975 ml de agua. Disolver 65 g de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 900 ml de esa solución y completar el volumen para 1000 ml con la misma solución. Transferir, usando pipeta, 10 ml de esa solución para frasco de yodo de 250 ml, juntar 40 ml de agua, 4 ml de ácido acético glacial, 3 g de yoduro de potasio y 5 ml de ácido clorhídrico. Titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 M SV, juntando 3 ml de almidón SI como indicador. Corregir el volumen de titulante consumido por determinación en blanco. Cada ml

de tiosulfato de sodio 0,1 M SV equivale a 24,97 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el volumen de la solución adicionando cantidad suficiente de mezcla de ácido clorhídrico y agua para obtener solución conteniendo exactamente 62,4 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  por ml de solución.

#### *Solución base de cloruro férrico*

Preparar solución de 25 ml de ácido clorhídrico y 975 ml de agua. Disolver cerca de 55 g de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en aproximadamente 900 ml de esa solución y completar el volumen para 1000 ml con la misma solución. Transferir, utilizando pipeta, 10 ml de esa solución para frasco de yodo de 250 ml, añadir 15 ml de agua, 3 g de yoduro de potasio y 5 ml de ácido clorhídrico. Dejar en reposo durante 15 minutos. Completar el volumen de la solución para 100 ml con agua y titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 M SV, juntando 3 ml de almidón SI como indicador. Corregir el volumen de titulante consumido por determinación en blanco. Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV equivale a 27,03 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar el volumen de la solución adicionando cantidad suficiente de solución de ácido clorhídrico y agua para obtener solución conteniendo exactamente 45,0 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por ml de solución.

**Tabla 2 - Tabla 1 – Composición de las soluciones-estándar de color (SC).**

SC	Partes de			
	Solución base de cloruro de cobalto II, en ml	Solución base de cloruro férrico, en ml	Solución base de sulfato cúprico, en ml	Agua, para completar 10 ml.
A	0,1	0,4	0,1	4,4
B	0,3	0,9	0,3	8,5
C	0,1	0,6	0,1	4,2
D	0,3	0,6	0,4	3,7
Y	0,4	1,2	0,3	3,1
F	0,3	1,2	0,0	3,5
G	0,5	1,2	0,2	3,1
H	0,2	1,5	0,0	3,3
I	0,4	2,2	0,1	2,3
J	0,4	3,5	0,1	1,0
K	0,5	4,5	0,0	0,0
L	0,8	3,8	0,1	0,3
M	0,1	2,0	0,1	2,8
N	0,0	4,9	0,1	0,0
El	0,1	4,8	0,1	0,0
P	0,2	0,4	0,1	4,3
Q	0,2	0,3	0,1	4,4
R	0,3	0,4	0,2	4,1
S	0,2	0,1	0,0	4,7
T	0,5	0,5	0,4	3,6

## 5.2.13 ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

### 5.2.13.1 ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

La espectrometría de absorción atómica es utilizada para la determinación de diversos elementos de la tabla periódica y consiste, básicamente, de cuatro técnicas: absorción atómica con llama, generación de hidruros, generación de vapor frío y horno de grafito. Las técnicas que utilizan llama y horno de grafito como atomizadores permiten la determinación de cerca de 70 elementos siendo la mayoría metales. La técnica de generación de hidruros permite la determinación de arsénico, antimonio, selenio, bismuto, telurio, plomo, indio, estaño, germanio y talio; ya la generación de vapor frío es utilizada, básicamente, para la determinación de mercurio.

Para la determinación de la concentración del analito por absorción atómica, la radiación de una fuente de largo de onda específico de acuerdo con el elemento analizado incide bajo el vapor atómico conteniendo átomos libres de ese elemento en el estado fundamental. La atenuación de la radiación es proporcional a la concentración del analito según la ley de Lambert-Beer.

La instrumentación para absorción atómica consiste, básicamente, de fuente de radiación, atomizador, monocromador, detector y sistema de procesamiento de datos. Como fuentes de luz se utilizan lámparas de cátodo hueco y lámparas de descarga sin electrodo que emiten radiación intensa de mismo largo de onda que la adsorbida por el elemento a ser determinado. El atomizador puede ser constituido de una llama o un horno de grafito. El monocromador es responsable de la separación del largo de onda deseado. La radiación incide en el monocromador por una ranura estrecha; en seguida, es separada en sus diferentes largos de onda en una red de difracción y, posteriormente, dirigida al detector. El detector, generalmente, es un fotomultiplicador, que transforma la energía luminosa en corriente eléctrica, la cual es amplificada y, posteriormente, interpretada por un sistema de lectura.

#### PROCEDIMIENTO

Para operar los espectrómetros de absorción atómica, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. Las determinaciones son hechas por comparación con soluciones de referencia conteniendo concentraciones conocidas del analito. Las determinaciones pueden ser efectuadas por el *Método de calibración directa (Método I)* o por el *Método de adición estándar (Método II)*. Se recomienda el *Método I*, salvo cuando especificado.

*Método de calibración directa (Método I):* preparar como mínimo cuatro soluciones de referencia del elemento a ser determinado utilizando la banda de concentración recomendada por el fabricante del equipo para el analito. Todos los reactivos empleados en el preparado de la muestra deben ser igualmente incluidos, en las mismas concentraciones,

en el preparado de las soluciones de referencia. Después de la calibración del equipo con solvente, introducir en el atomizador tres veces cada una de las soluciones de referencia y, después de la lectura, registrar el resultado. Lavar el sistema de introducción de la muestra con agua después de cada operación. Trazar la curva analítica para el promedio de las absorbancias de las tres lecturas para cada solución referencia con la respectiva concentración. Preparar la muestra conforme indicado en la monografía ajustando su concentración para que esta se sitúe en la banda de concentración de las soluciones de referencia para el analito. Introducir la muestra en el atomizador, registrar la lectura y lavar el sistema de introducción de la muestra con agua. Repetir esa secuencia dos veces. Determinar la concentración del elemento por la curva analítica utilizando el promedio de las tres lecturas.

*Método de adición estándar (Método II):* añadir a, como mínimo, cuatro balones volumétricos volúmenes iguales de la solución de la sustancia a ser determinada preparada conforme indicado en la monografía. A los balones, excepto en uno, añadir volúmenes determinados de la solución de referencia especificada para obtener una serie de soluciones conteniendo cantidades crecientes del analito. Completar el volumen de cada balón con agua. Después de calibrar el espectrómetro con agua, registrar tres veces las lecturas de cada solución. Trazar la curva analítica para el promedio de las absorbancias de las tres lecturas para cada solución frente a la respectiva cantidad del analito adicionada a la solución. Registrar la cantidad del analito en módulo en la muestra por extrapolación de la curva analítica en el eje de las abscisas.

#### 5.2.13.1.1 Espectrometría de absorción atómica con llama

El sistema consiste de una cámara de pre-mezcla en la cual el combustible y el oxidante son mezclados y del quemador que recibe la mezcla combustible-oxidante. La solución es introducida a través de un nebulizador neumático, en el cual es generado un fino aerosol que es conducido hasta la llama. La cantidad de energía que puede ser suministrada por la llama para la disociación y atomización de la muestra es proporcional a la temperatura. Si una llama de baja temperatura es utilizada, la solución puede no ser convertida en átomos neutros. Por otro lado, si una llama con temperatura muy elevada es empleada podrá ocurrir la formación de gran cantidad de iones que no absorben radiación de la fuente. A través de la modificación de la proporción de oxidante y combustible utilizados para cada tipo de llama, es posible alterar significativamente su temperatura. Las llamas más popularmente utilizadas son las producidas por aire acetileno (2100 – 2400 °C) y acetileno óxido nitroso (2650 – 2850 °C). La mezcla aire acetileno es utilizada para elementos con temperaturas de atomización inferiores como Na, K, Mg, Cd, Zn, Cu, Mn, Co, etc. La llama generada por acetileno óxido nitroso es aplicada a elementos refractarios como Al, V, Ti, Si, U, entre otros.



## INTERFERENCIAS

*Interferencias físicas:* la utilización de la preparación muestra con propiedades físicas como viscosidad y tensión superficial diferentes de la preparación estándar puede resultar en diferencias con relación a la aspiración y nebulización llevando a lecturas incorrectas. Se debe siempre que posible utilizar las preparaciones con las mismas propiedades físicas y constituyentes de matriz.

*Interferencia de ionización:* ocurre, normalmente, para elementos alcalinos y alcalinos terrosos que son fácilmente ionizables. Cuanto mayor el grado de ionización menor la absorbancia. Para minimizar interferencias de ionización, es posible utilizar llamas con temperaturas más bajas o usar “supresores de ionización” que son elementos como el cesio que se ionizan más fácilmente que el analito aumentando, así, el número de átomos en el estado fundamental.

*Interferencias químicas:* la formación de compuestos térmicamente estables en la llama como los óxidos de algunos elementos (Ca, Ti, Cr, V, Al, etc) reduce la población de átomos en el estado fundamental. Eso puede ser resuelto por el aumento de la temperatura de la llama lo que resulta en la disociación de estos compuestos. Otra posibilidad es la utilización de un “agente supresor” o “libertador” que posee mayor afinidad por el oxígeno en relación al analito evitando la formación de los óxidos. La solución conteniendo cloruro de cesio y cloruro de lantano, “Solución de Schinkel”, es la más comúnmente empleada.

*Interferencias espectrales:* ocurren por medio de la absorción o esparcimiento de la radiación seleccionada para el analito. Las interferencias espectrales causadas por átomos son poco comunes y pueden ser resueltas alterando la línea espectral utilizada. Las interferencias causadas por especies moleculares son más graves pero, normalmente, son contornadas a través de la corrección de fondo.

### 5.2.13.1.2 Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros

La espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros es una técnica utilizada para la determinación de elementos formadores de hidruros volátiles más comúnmente para As, Se, Sb, Bi, Ge, Sn, Pb y Te. El proceso es constituido de tres etapas principales: generación, transporte y atomización de los hidruros. El sistema puede ser construido en discontinuo o en flujo. La generación de los hidruros consiste de la reacción del analito, normalmente en medio ácido, con un reductor ( $\text{NaBH}_4$ ). El transporte de los hidruros del frasco de reacción hasta la celda de cuarzo está hecho a través de un gas inerte de arrastre tal como argón o nitrógeno. Para elementos que absorben en largo de onda inferior a 200 nm, antes de la etapa de generación de los hidruros, se debe efectuar una purga para eliminación de los gases atmosféricos a fin de evitar que esos gases absorban la radiación de la fuente. La atomización está hecha en una celda de cuarzo calentada eléctricamente o con un quemador típico de sistemas de atomización con llama; la temperatura interna

de la celda es de 850 a 1000 °C. La señal obtenida, normalmente, es del tipo transitoria; cerca de 20 segundos son necesarios para total integración de la señal para casi todos los elementos.

## INTERFERENCIAS

*Influencia del Estado de Oxidación:* los analitos poseen, normalmente, más de un estado de oxidación. Arsénico y antimonio, por ejemplo, poseen estados de oxidación III y V y selenio y telurio poseen estados de oxidación IV y VI, respectivamente. Los estados de oxidación superiores, en general, son inertes para la conversión a hidruros volátiles; es necesaria, por tanto, la pre-reducción antes de la determinación en esos casos.

*Elementos Formadores de Hidruros:* interferencias mutuas pueden ocurrir entre los elementos formadores de hidruros, como por ejemplo, entre arsénico y selenio. En esos casos, la cinética de volatilización y atomización es decisiva en el proceso.

*Elementos de Transición:* algunos iones metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , si están presentes en elevadas concentraciones, son reducidos formando precipitados que pueden adsorber los hidruros volátiles.

### 5.2.13.1.3 Espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío

La espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío es utilizada para la determinación de mercurio. El equipo y los reactivos son los mismos utilizados en el sistema de generación de hidruros, sin embargo la celda de cuarzo no precisa ser calentada, pues el mercurio es reducido a mercurio metálico que es volátil a temperatura ambiente. Sin embargo, vapor de agua puede ser transportado por el gas de arrastre e interferir en la determinación. Para solucionar ese problema, se utiliza una lámpara de infrarrojo para calentar la celda de cuarzo, previniendo la condensación de vapor de agua. En ese caso, normalmente no es necesario efectuar la purga, pues el largo de onda utilizado para la determinación de Hg es 253,7 nm en el cual es rara la absorción de radiación por gases de la atmósfera.

### 5.2.13.1.4 Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito

La espectrometría de absorción atómica con horno de grafito es una técnica amplia que posee elevada sensibilidad. El horno consiste de un tubo de grafito de 3 a 5 cm de largo y de 3 a 8 mm de diámetro revestido con grafito pirolítico. La cantidad de muestra inyectada en el horno varía de 5  $\mu\text{L}$  a 50  $\mu\text{L}$  y es generalmente introducida por un sistema automatizado. El horno es calentado eléctricamente a través del paso de corriente eléctrica de modo longitudinal o transversal. Flujos de gases inertes como argón son mantenidos externamente e internamente para evitar la combustión del horno. Además de eso, el flujo interno expulsa el aire atmosférico del horno y también los vapores generados durante las etapas de secado y pirólisis. Un horno

de grafito presenta durabilidad de, aproximadamente, 300 ciclos dependiendo del modelo.

El análisis con el horno de grafito puede ser dividido en las siguientes etapas: secado de la muestra, pirólisis, atomización y limpieza. El paso de una etapa para otra está marcado por el aumento de la temperatura, por tanto un programa especial de calentamiento debe ser planeado. Primeramente es realizado el secado de la muestra; en esa etapa los solventes y ácidos residuales son evaporados. Después del secado, la temperatura es elevada para eliminación de la matriz (etapa de pirólisis). En seguida, el aumento de la temperatura lleva a la atomización del analito para posterior cuantificación. Finalmente es realizada la limpieza del horno en alta temperatura (p. ej. 2600 °C) durante pocos segundos. La temperatura y la duración de cada etapa de calentamiento pueden ser controladas; eso es esencial para el desarrollo de metodologías analíticas.

Curvas de atomización y pirólisis son usadas para optimización de las temperaturas para tales procesos. La curva de pirólisis permite determinar la temperatura máxima en que no ocurre pérdida del analito. La curva de atomización permite determinar la temperatura mínima de atomización del analito con adecuada sensibilidad. Se recomienda que las curvas de pirólisis y atomización sean hechas siempre que una muestra desconocida sea analizada.

El proceso de atomización en un horno de grafito es complejo y depende de varios factores como el material del horno y de la plataforma, la atmósfera dentro del tubo, la velocidad de calentamiento, la temperatura y la naturaleza de las sustancias. Para la obtención de mejores resultados se recomienda el uso de la plataforma de L'Vov en el interior del tubo y calentamiento transversal. La señal obtenida es del tipo transitoria; son necesarios, como máximo, 12 segundos para la integración de la señal.

#### INTERFERENCIAS

*Interferencias espectrales:* interferencias causadas por sobreposiciones de líneas entre átomos son poco comunes. La atenuación del haz de radiación por especies generadas durante el proceso de atomización derivados de la matriz es más frecuente. Para solucionar tal problema se debe eliminar eficientemente la matriz. El uso de un modificador de matriz y de un corrector de fondo son esenciales para la confiabilidad de los resultados.

*Formación de sustancias volátiles:* en muestras con elevados contenidos de halógenos (especialmente Cl) existe la posibilidad de formación de sustancias volátiles del analito que podrán ser perdidas en temperaturas bajas ocasionando un error en el análisis. En ese caso, el uso de un modificador químico capaz de formar complejos térmicamente estables con el analito minimiza la formación de sustancias volátiles. Además de eso, cuando el modificador químico es combinado con la plataforma de L'vov, los efectos de interferencia de matriz son bastante reducidos. Es importante resaltar que un determinado modificador químico puede ser muy eficaz para algunos elementos, sin embargo ineficiente para otros.

### 5.2.13.2 ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA

Espectrometría de emisión atómica es el método que permite determinar la concentración de un elemento en una muestra por la medida de la intensidad de una de las líneas de emisión del elemento. La determinación es hecha en el largo de onda correspondiente a esa línea de emisión. Las fuentes de emisión en espectrometría de emisión atómica deben poseer energía para generar átomos neutros y para excitar los elementos de interés.

#### 5.2.13.2.1 Fotometría de llama

La Fotometría de llama es una técnica que presenta buena sensibilidad siendo utilizada, principalmente, para la determinación de metales alcalinos. El equipo consiste de una llama normalmente producida por mezcla aire-gas licuado de petróleo, un monocromador y un detector. El solvente de elección para el preparado de la solución muestra y soluciones de referencia debe ser, preferentemente, acuoso. Los solventes orgánicos pueden ser usados, siempre que no interfiera en la estabilidad de la llama.

#### INTERFERENCIAS

Las interferencias que ocurren en la Fotometría de llama son muy semejantes a las observadas en la *Espectrometría de absorción atómica (5.2.13.1)*. Sin embargo, pueden ocurrir interferencias espectrales causadas por la emisión de bandas de rotación vibración molecular, tales como OH (310-330 nm), NH (en torno de 340 nm), N<sub>2</sub><sup>+</sup> (en torno de 390 nm), C<sub>2</sub> (en torno de 450 nm), etc.

#### SOLVENTES

El solvente debe ser seleccionado con cautela. Si hubiere diferencia significativa de tensión superficial o viscosidad entre muestra y solución de referencia ocurrirán variaciones en las tasas de aspiración y nebulización y, en consecuencia, diferencias significativas en las señales producidas. Así, el solvente empleado en el preparado de las muestras y de las referencias debe ser el más similar posible.

#### PROCEDIMIENTO

El equipo debe ser operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante y en el largo de onda especificado. Ajustar el cero con el solvente. En seguida, inyectar la solución de referencia más concentrada y ajustar la sensibilidad deseada. Las determinaciones son hechas por comparación con soluciones de referencia conteniendo concentraciones conocidas del analito. Las determinaciones pueden ser realizadas por el *Método de calibración directa (Método I)* o por el *Método de adición estándar (Método II)* conforme descrito en *Espectrometría de absorción atómica (5.2.13.1)*.



### 5.2.13.2.2 Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado

La espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado es una técnica bastante amplia que posee elevada sensibilidad y con característica multielementar. De manera general, en la espectrometría con plasma inductivamente acoplado, el aerosol de la muestra es introducido en una fuente de plasma, donde es evaporado y disociado en átomos e iones libres que son excitados. El plasma consiste de un gas parcialmente ionizado de elevada temperatura (6000 a 10 000 °C), eléctricamente neutro y con buena conductividad eléctrica. Debido a la alta temperatura del plasma es generada una radiación policromática derivada de la emisión de varios elementos e iones presentes en la muestra. Por tanto, es necesario el uso de un monocromador con elevada capacidad de resolución para separación de los largos de onda característicos para cada elemento. La detección de la radiación generada por largos de onda específicos puede ser aplicada para análisis cualitativo y las intensidades de estos largos de onda pueden ser usadas para análisis cuantitativo.

#### INSTRUMENTACIÓN

Los instrumentos utilizados en la espectrometría con plasma inductivamente acoplado consisten básicamente del generador y del procesador de señal. El generador es formado por fuente plasma y sistema de introducción de muestra (bomba propulsora y nebulizador). El procesador de señal es comprendido por sistemas ópticos y electrónicos y unidad de adquisición de datos.

*Fuentes de plasma:* la más común es el plasma inductivamente acoplado. El plasma es generado en una antorcha que consiste en tres tubos concéntricos generalmente de cuarzo. Flujos de gas generalmente argón son mantenidos en los tres compartimientos formados por los tubos concéntricos. En el compartimiento externo, el gas es utilizado para la formación del plasma. El compartimiento intermedio carga el gas auxiliar que es responsable de mantener el plasma alejado del compartimiento interno y prevenir deposición de carbono y sales provenientes de la muestra en ese compartimiento. El flujo de argón interno carga el aerosol de la muestra para el centro del plasma. Cuando una determinada potencia (entre 700 y 1500 W) es aplicada por el generador de radiofrecuencia en la bobina de inducción una corriente alternada es generada en la bobina en una frecuencia de 27 o 40 MHz. Esa oscilación en la bobina resulta en un intenso campo electromagnético en la extremidad de la antorcha. Con el argón fluyendo por la antorcha una descarga eléctrica de alto voltaje es aplicada en el gas generando electrones e iones argón. Los electrones son acelerados por el campo magnético y chocan con más átomos de argón generando más iones y electrones. La ionización del argón continúa en una reacción en cadena generando el plasma que consiste de átomos de argón, electrones y iones argón.

Sistema de detección para espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado: *todos los elementos presentes en el plasma emiten radiación al mismo*

*tiempo, luego es necesario el uso de un sistema de detección multielementar. Los espectrómetros pueden ser simultáneos o secuenciales. Para la espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado, tanto los espectrómetros secuenciales como los simultáneos son ampliamente utilizados. A configuración más común para espectrómetros secuenciales es la Czerny-Turner. Ya los espectrómetros simultáneos son encontrados, básicamente, con las configuraciones Echelle y Paschen-Runge.*

#### INTERFERENCIAS

La sobreposición de las líneas de emisión es una de las principales interferencias para espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado. Este tipo de interferencia puede ser eliminada con el uso de espectrómetros de alta resolución y procedimientos de corrección de fondo. Muchas interferencias espectrales son observadas en la banda de 200 a 400 nm, en la cual más de 200 000 líneas de emisión atómica y bandas moleculares son observadas.

Las interferencias físicas son semejantes a aquellas en *Espectrometría de absorción atómica con llama (5.2.13.1.1)*.

#### SOLVENTES

El solvente ideal para la espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado interfiere lo menos posible en los procesos de emisión. El tipo de solvente debe ser seleccionado con cautela. Si hubiere diferencia significativa de tensión superficial o viscosidad entre muestra y solución de referencia, ocurrirán variaciones en las velocidades de aspiración y nebulización y, en consecuencia, diferencias significativas en las señales producidas. Así, los solventes empleados en el preparado de las muestras y de las soluciones de referencia deben ser lo más similar posible.

#### PROCEDIMIENTO

El equipo debe ser operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante y en el largo de onda adecuado para cada elemento. Las determinaciones son hechas por comparación con soluciones de referencia conteniendo concentraciones conocidas de los analitos. Las determinaciones pueden ser hechas por el *Método de calibración directa (Método I)* o por el *Método de adición estándar (Método II)* conforme descrito en *Espectrometría de absorción atómica (5.2.13.1)*.

### 5.2.13.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA INDUCTIVAMENTE ACOPLADO

La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado es utilizada para la determinación de diversos elementos con elevada sensibilidad, en la banda de ppt, y con capacidad multielementar.

## INSTRUMENTACIÓN

Así como en la espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (5.2.13.2.2), la espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado consiste de dos unidades principales: el generador de señal y el procesador de señal. La diferencia fundamental es que en la espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado el procesador de señal es comprendido por una interfaz, un separador de masa y una unidad de adquisición de datos. La interfaz es responsable del muestreo y el transporte eficiente de los iones del plasma a presión atmosférica (760 Torr) hasta el separador de masa (10-6 Torr) es hecha por la reducción de presión a través de la aplicación de vacío. La interfaz consiste en dos conos metálicos con orificios muy pequeños (de 1 mm de diámetro). Después de la generación de los iones en el plasma, ellos pasan por el primer cono (cono de muestreo) y, luego después de, por el segundo cono (*skimmer*). Después del paso de los iones por el *skimmer*, debido a la expansión, hay necesidad de que los mismos sean centrados para garantizar su llegada hasta el analizador de masas. Los iones son enfocados por la acción de una lente iónica o conjunto de lentes iónicas, que consiste de un cilindro (o una serie de cilindros o placas perforadas) metálico hueco sometido a una diferencia de potencial (normalmente en la banda de 2 a 15 V de corriente continua). Gran parte de los espectrómetros de masas con plasma inductivamente acoplado comercializados actualmente utiliza el cuadrupolo como separador de masas. El cuadrupolo consiste en cuatro barras metálicas cilíndricas o hiperbólicas de mismo largo y diámetro. Por la aplicación combinada de corriente continua (cc) y de corriente alternada (ca) a los electrodos (cuadrupolo), solamente los iones con una determinada razón masa/carga ( $m/z$ ) son conducidos a través del cuadrupolo. Los demás iones chocan con los electrodos o son retirados del interior del cuadrupolo. De esta forma, los iones son secuencialmente separados por el cuadrupolo. Varios tipos de detectores pueden ser utilizados para recoger los iones en la salida del cuadrupolo y convertir en señal eléctrico, pero los más populares son los de dinodos discretos, vaso de Faraday (*Faraday Cup*) y *Chanatron*.

## INTERFERENCIAS

Así como en otras técnicas espectrométricas, la espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado posee interferencias espectrales y no espectrales. Las interferencias espectrales son dependientes de la especie presente y pueden ser divididas en cuatro tipos principales: poliatómicas, isobáricas, iones de carga doble y iones de óxidos refractarios. Este tipo de interferencia puede ser corregida por la simulación de la composición de la matriz, por la elección de otro isótopo (cuando posible) o por el uso de celda de reacción y/o colisión. En algunos casos, las interferencias espectrales pueden ser corregidas con el uso de un programa de computadora apropiado.

Las interferencias no espectrales pueden surgir por varios motivos: deposición sobre los conos de la interfaz, presencia de otro elemento fácilmente ionizable, efecto espacio carga, entre otros. Sin embargo, la mayoría de las inter-

ferencias no-espectrales puede ser corregida por el uso de estándar interno. En este caso, el estándar interno debe poseer razón masa/carga y potencial de ionización semejante al analito. Escandio y Rodio, por ejemplo, son ampliamente utilizados como estándar interno para elementos con baja y alta razón masa/carga, respectivamente.

## SOLVENTES

El solvente ideal para la espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado debe interferir lo menos posible en los procesos de ionización. El tipo de solvente debe ser seleccionado con cautela. Se hubiere diferencia significativa de tensión superficial o viscosidad entre muestra y solución de referencia, ocurrirán variaciones en las velocidades de aspiración y nebulización y, en consecuencia, diferencias significativas en las señales producidas. Así, los solventes empleados en el preparado de las muestras y de las soluciones de referencia deben ser lo más similar posible.

## PROCEDIMIENTO

El equipo debe ser operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante y con el isótopo adecuado para cada elemento. Ajustar el cero con el solvente inyectado en el equipo. Las determinaciones son hechas por comparación con soluciones de referencia, conteniendo concentraciones conocidas de los analitos. Las determinaciones pueden ser hechas por el Método de Calibración Directa (*Método I*), por el Método de Adición Estándar (*Método II*) o por el Método de Estándar Interno (*Método III*).

*Método de Calibración Directa (Método I).* Preparar al menos cuatro soluciones de referencia de los analitos, cubriendo la banda de concentraciones recomendada por el fabricante del equipo para los elementos en análisis. Todos los reactivos empleados en el preparado de la solución muestra deben ser igualmente incluidos, en las mismas concentraciones, a las soluciones de referencia. Después de la calibración del equipo con solvente, inyectar, tres veces, cada una de las soluciones de referencia y, después de la estabilización de la lectura, registrar el resultado, lavando el sistema con el solvente después de cada inyección. Trazar la curva analítica, trazando el promedio de las lecturas de cada grupo de tres, con la respectiva concentración. Preparar la solución de la sustancia a ser determinada conforme indicado en la monografía, ajustando su concentración para que esta quede dentro de la banda de las concentraciones de las soluciones de referencia. Introducir la muestra en el equipo, registrar la lectura y lavar el sistema con solvente. Repetir esta secuencia dos veces y, adoptando el promedio de tres mediciones, determinar la concentración del analito por la curva analítica.

*Método de Adición Estándar (Método II).* Añadir a cada uno de, al menos, cuatro balones volumétricos similares, volúmenes iguales de solución de la sustancia a ser determinada, preparada conforme indicado en la monografía. Juntar todos los balones, con excepción de uno, volúmenes medidos de la solución de referencia especificada, para obtener una serie de soluciones conteniendo cantidades

crecientes de los analitos. Diluir convenientemente el volumen de cada balón con agua. Después de calibrar el espectrómetro con agua, como indicado arriba, registrar tres veces las lecturas de cada solución.

*Método de Estándar Interno (Método III).* Preparar al menos cuatro soluciones de referencia de los analitos, cubriendo la banda de concentraciones recomendada por el fabricante del equipo para los analitos. Todos los reactivos empleados en el preparado de la solución muestra deben ser igualmente incluidos, en las mismas concentraciones, a las soluciones de referencia. El estándar interno debe ser adicionado en todas las soluciones (solvente, soluciones de referencia y muestras), con concentración fija y en el mismo orden de grandeza de los analitos. Después de la calibración del equipo con solvente, inyectar, tres veces, cada una de las soluciones de referencia y, después de la estabilización de la lectura, registrar el resultado, lavando el sistema con el solvente después de cada inyección. Trazar la curva analítica, trazando un gráfico de la razón entre el promedio de las intensidades de las lecturas de cada grupo de tres y la intensidad del estándar interno, con la respectiva concentración. Preparar la solución de la sustancia a ser determinada conforme indicado en la monografía, ajustando su concentración para que esta quede dentro de la banda de las concentraciones de las soluciones de referencia. Inyectar la muestra en el equipo, registrar la lectura y lavar el sistema con solvente. Repetir esta secuencia dos veces y, adoptando el promedio de tres mediciones, determinar la concentración del analito por la curva analítica.

## 5.2.14 ESPECTROFOTOMETRÍA EN EL ULTRAVIOLETA, VISIBLE E INFRARROJO

Las técnicas espectrofotométricas están fundamentadas en la absorción de la energía electromagnética por moléculas que depende tanto de la concentración como de la estructura de las mismas. De acuerdo con el intervalo de frecuencia de la energía electromagnética aplicada, la espectrofotometría de absorción puede ser dividida en ultravioleta, visible e infrarroja, pudiendo ser utilizada como técnica de identificación y cuantificación de sustancias.

### RADIACIÓN ELECTROMAGNÉTICA

La radiación electromagnética es una forma de energía que se propaga como ondas y, generalmente, puede ser subdividida en regiones de largo de onda característico. Además, puede ser considerada, también, como un flujo de partículas denominadas fotones (o cuantos). Cada fotón contiene determinada energía cuya magnitud es proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional al largo de onda. El largo de onda ( $\lambda$ ) es, generalmente, especificado en nanómetros, nm (10<sup>-9</sup> m), y en algunos casos en micrómetros,  $\mu$ m (10<sup>-6</sup> m). En el caso del infrarrojo la radiación electromagnética puede ser, también, descrita en términos de número de onda y expresada en cm<sup>-1</sup>. Las bandas de largo de onda de energía electromagnética de interés para la espectrofotometría son las descritas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Bandas de largo de onda de interés para la espectrofotometría.**

Región	Banda de largo de onda
Ultravioleta (UV)	190-380 nm
Visible (VIS)	380-780 nm
Infrarrojo próximo (NIR)	780-2500 nm (12800-4000 cm <sup>-1</sup> )
Infrarrojo medio (MIR)	4-25 $\mu$ m (2500-400 cm <sup>-1</sup> )
Infrarrojo distante	25-300 $\mu$ m (400-33 cm <sup>-1</sup> )

### INTERACCIÓN ENERGÍA-MATERIA

La energía total de la molécula envuelve la energía derivada de la vibración (energía vibracional, debida al movimiento relativo de átomos o grupos de átomos constituyentes de la molécula); de la rotación (energía rotacional, debida a la rotación de la molécula en torno de un eje) y, normalmente, de la energía electrónica, generada por la configuración de electrones en la molécula.

Las moléculas al absorber energía sufren una transición para un estado de mayor energía o estado excitado. El paso al estado excitado no es de naturaleza continua realizándose, generalmente, en etapas llamadas de transiciones. En la región del ultravioleta y visible las transiciones son electrónicas y ocurren en porciones de la molécula llamadas de cromóforos. Estas transiciones comprenden promociones de electrones de orbitales moleculares ocupados, generalmente,  $\sigma$  y  $\pi$  aleantes y no aleantes, para los orbitales de energía inmediatamente superiores, antialeantes  $\pi^*$  y  $\sigma^*$ .

En la región del infrarrojo medio (MIR) ocurren solamente transiciones de energía vibracional por ser la radiación en esta región insuficientemente energética para promover transiciones electrónicas. Las vibraciones inducidas por radiación infrarroja comprenden estiramientos y tensionamientos de aleaciones interatómicas y modificaciones de ángulos de aleaciones.

Los espectros en el infrarrojo próximo (NIR) son caracterizados por la absorción de la radiación por sobretonos y combinación de modos vibracionales fundamentales de aleaciones como C-H, N-H, O-H y S-H. Las bandas de un espectro NIR, son, generalmente, más débiles que las bandas del espectro MIR. Informaciones químicas y físicas, de característica cualitativa y cuantitativa, pueden ser obtenidas a partir del espectro NIR. Sin embargo, la comparación directa entre el espectro de la muestra y de la sustancia química de referencia no es recomendada.

La espectrofotometría NIR es ampliamente utilizada para análisis físicos y químicos, como por ejemplo: cuantificación e identificación de principios activos y excipientes, identificación de formas cristalinas y polimorfás, determinación del tamaño de partícula, estándar de desintegración y control de proceso.

### MODOS DE ADQUISICIÓN DE LOS ESPECTROS

Los espectros pueden ser obtenidos utilizándose diferentes modos de adquisición. En el caso de la espectrofotometría UV/VIS el principal modo es la transmisión. En el caso

de la espectrofotometría NIR y MIR los espectros pueden ser adquiridos utilizando el modo transmisión y reflexión. Esta última se subdivide en reflexión difusa y reflexión total atenuada. Hay además la posibilidad de la combinación de los modos de transmisión y reflexión, llamada de transreflexión.

*Transmisión:* es la medida de la disminución de la intensidad de la radiación en determinados largos de onda cuando la radiación pasa a través de la muestra. La muestra está dispuesta en el haz óptico entre la fuente y el detector. La transmisión (T) puede ser calculada por la fórmula abajo:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

$I_0$  = intensidad de la radiación incidente

I = intensidad de la radiación transmitida.

Los espectros en transmisión pueden ser convertidos para absorbancia:

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right)$$

*Reflexión difusa:* es la medida de la razón de la intensidad de la luz reflejada por la muestra y la luz reflejada por una superficie reflexiva de referencia. La radiación no adsorbida es reflejada en dirección al detector.

*Reflexión total atenuada:* la radiación infrarroja se propaga en el interior de un elemento de reflexión interna (alto índice de refracción) a través de reflexiones en las paredes de este elemento. La muestra es colocada en contacto con la pared de este elemento de reflexión donde interactúa con la radiación infrarroja (onda evanescente).

*Transreflexión:* este modo es la combinación de los modos de transmisión y reflexión. En la medida por transreflexión un espejo o una superficie reflexiva es usado para reflejar la radiación transmitida a través de la muestra, incidiendo una segunda vez en la misma para, entonces, doblar el camino óptico. La radiación no adsorbida y reflejada en dirección al detector.

#### INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN EL ULTRAVIOLETA (UV) Y VISIBLE (VIS)

Espectrofotómetros utilizados en la región del ultravioleta y visible son dotados, fundamentalmente, de fuente de radiación; selector de largo de onda; celdas de absorción (cubetas), para inserción de soluciones de muestras en el haz de luz monocromática; detector de radiación y una unidad de lectura y de procesamiento de señal.

Las lámparas más empleadas como fuente de radiación en la espectrofotometría en la región del ultravioleta y visible son de deuterio y tungsteno, que proporcionan radiación comprendida entre 160 a 380 nm y 320 a 2500 nm, respectivamente. Los instrumentos para las regiones del UV/VIS son, generalmente, equipados con uno o más dispositivos para restringir la radiación que está siendo medida dentro de una banda estrecha que es adsorbida o emitida por el

analito. La mayoría de los equipos utiliza un monocromador o filtro para aislar la banda de largo de onda deseada de forma que solamente la banda de interés sea detectada y medida. Los monocromadores, generalmente, poseen una red de difracción, mientras que los filtros pueden ser de interferencia o de absorción. Los fotómetros o colorímetros son instrumentos más simples que utilizan un filtro para selección del largo de onda y son utilizados, generalmente, en la región del visible. Los espectrofotómetros, a su vez, utilizan monocromadores para selección del largo de onda y son utilizados en las regiones del UV/VIS.

Los compartimientos utilizados para recibir la muestra son denominados de cubetas que deben presentar ventanas que sean transparentes en la región espectral de interés. Para la región del UV son necesarias cubetas de cuarzo mientras que, para la región del VIS, se puede emplear cubetas de vidrio o acrílico.

Los principales tipos de detectores son los fototubos, los arreglos de fotodiodos y los dispositivos de transferencia de carga. Los fototubos son los detectores más simples y su respuesta está basada en el efecto fotoeléctrico. El detector de arreglo de diodos permite que todos los largos de onda puedan ser monitoreados simultáneamente. Los dispositivos de transferencia de carga han sido empleados en número creciente en instrumentos espectroscópicos.

Los espectrofotómetros pueden ser encontrados en la configuración de haz único, haz doble y multicanal. Los instrumentos de haz doble presentan la ventaja de compensar cualquier fluctuación en la potencia radiante de la fuente, cuando comparados con los instrumentos de haz simples. Ya los instrumentos multicanal son más recientes, utilizan detectores del tipo arreglo de diodo y dispositivos de transferencia de carga y permiten la obtención del espectro total de una muestra en menos de un segundo. En estos instrumentos el sistema dispersivo es un espectrógrafo de red colocado después de la célula de la muestra.

Espectrofotómetros pueden disponer de registradores gráficos que permiten la obtención de espectros de absorción. Tal recurso es importante para fines de caracterización de la sustancia a partir de la obtención de los largos de onda donde se obtienen las mayores absorbancias ( $\lambda_{\text{máximo}}$ ).

Actualmente, la mayor parte de los espectrofotómetros presenta conexión a una microcomputadora y programa apropiado, que permiten la obtención de los espectros de absorción de las sustancias en medio digital.

#### INSTRUMENTACIÓN UTILIZADA EN EL INFRARROJO MEDIO (MIR) E INFRARROJO PRÓXIMO (NIR)

Los espectrofotómetros utilizados para adquisición de espectros en el infrarrojo medio y próximo consisten de una fuente de luz, monocromador o interferómetro y detector, y permiten la obtención de espectros en la región comprendida entre 750 a 2500 nm (13300 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ).



Actualmente, los espectrofotómetros en el infrarrojo medio (4000 a 400 cm<sup>-1</sup>) utilizan el interferómetro en lugar de usar el monocromador y la radiación policromática incide bajo la muestra y los espectros son obtenidos en el dominio de la frecuencia con auxilio de la transformada de Fourier.

Células de transmisión, accesorios para reflexión difusa y reflexión total atenuada son los accesorios más comunes para la adquisición de los espectros.

La espectrofotometría en el infrarrojo próximo (NIR) es una técnica que permite la obtención de espectros en la región comprendida entre 13300 a 4000 cm<sup>-1</sup> (750 a 2500 nm). Los espectrofotómetros en la región del NIR son constituidos de fuente de radiación apropiada, monocromador o interferómetro y detector. Cubetas convencionales, fibras ópticas, células de transmisión y accesorios para reflexión difusa son los accesorios más comunes para adquisición de los espectros.

#### IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA

La identificación de diversas sustancias farmacéuticas puede ser hecha utilizando las regiones ultravioleta, visible, infrarrojo medio e infrarrojo próximo. De manera general, la espectrofotometría en las regiones UV/VIS requiere soluciones con concentración de 10 µg ml<sup>-1</sup> de la sustancia mientras que para el MIR y NIR son necesarias concentraciones en la orden de 100 mg ml<sup>-1</sup>. A pesar de más sensible los espectros obtenidos en las regiones del UV/VIS presentan menor especificidad cuando comparados con los espectros en la región del MIR. En el caso del MIR las medidas realizadas utilizando los modos de reflexión (difusa y total atenuada) proporcionan información espectral equivalente a aquella obtenida por el modo de transmisión. Cuando posible debe ser hecha la comparación del espectro obtenido frente al espectro de la sustancia química de referencia.

##### *Ultravioleta (UV) y visible (VIS)*

Diversas monografías incluyen espectros de absorción en el ultravioleta como prueba de identificación. En estos casos, habrá especificación de la extensión de la barredura, solvente, concentración de la solución y espesor de la cubeta. Algunos fármacos requieren el uso de estándares de referencia. Las lecturas de estándar y muestra son efectuadas simultáneamente y en condiciones idénticas cuanto a largo de onda, tamaño de cubeta, etc.

Para la caracterización utilizando la espectrofotometría UV/ VIS, el fármaco es disuelto utilizando solvente apropiado. Muchos solventes son apropiados incluyendo agua, alcoholes, éteres y soluciones ácidas y alcalinas diluidas. Se debe observar para que los solventes no absorban en la región espectral que está siendo utilizada.

##### *Infrarrojo medio (MIR)*

La espectrofotometría en el MIR es un ensayo de identificación por excelencia siendo capaz de diferenciar sustancias con diferencias estructurales. De las tres regiones del infrarrojo (próximo, medio y distante) la región compren-

didada entre 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> (infrarrojo medio) es la más empleada para fines de identificación.

Los espectros de transmisión de muestras sólidas son obtenidos a partir de su dispersión en aceite mineral o mediante la preparación de pastillas de haluros de potasio y sodio. Dispersiones de la muestra son preparadas triturándose cerca de 5 mg de la sustancia en una gota de aceite mineral de grado espectroscópico. La pasta obtenida es esparcida entre dos ventanas de bromuro de potasio o cloruro de sodio. Para el preparado de las pastillas cerca de 1 mg de la muestra es triturada con aproximadamente 300 mg de bromuro de potasio de grado espectroscópico.

Para muestras sólidas en polvo opacas la transmisión de la radiación infrarroja, el espectro puede ser, también, adquirido mediante la utilización de accesorio para reflexión difusa. En este accesorio la radiación infrarroja incide directamente en la muestra en polvo. Parte de la radiación es adsorbida y enseguida reflejada de forma difusa en dirección al detector. En este caso la muestra en la forma de polvo es mezclada con bromuro de potasio, aproximadamente, 5% (p/p) y dispuesta en el accesorio de reflexión difusa.

Por fin, el espectro de muestras sólidas en polvo y pastosas, puede ser obtenido utilizando accesorio para reflexión total atenuada. La muestra en la forma de polvo está dispuesta bajo el cristal de alto índice de refracción donde entra en contacto con la radiación infrarroja no exigiendo preparado previo de la muestra.

#### UTILIZACIÓN CUANTITATIVA DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA

##### *Espectrofotometría en el UV/VIS*

El análisis espectrofotométrico cuantitativo por absorción tiene como principio la relación directa existente entre la cantidad de luz adsorbida y la concentración de la sustancia, también conocida como ley de Beer.

Cuando la concentración (c) está expresada en mol. L<sup>-1</sup> y el camino óptico (b) en centímetro, la ecuación se torna:

$$A = e b c$$

en que

A = absorbancia, logaritmo del inverso de la transmitancia ( $A = -\log T$ )

e = absortividad molar.

T = transmitancia

Sabiéndose que la transmitancia es el cociente entre la intensidad de la radiación transmitida por la solución ( $I_0$ ) y a intensidad de la radiación incidente (I), se tiene:

$$\log_{10} (I_0/I) = A = e b c$$

La intensidad de la absorción de la luz ultravioleta por sustancias cromóforas está, en general, expresada como absortividad molar, en las condiciones de máxima absorción.

Si la masa molar de la sustancia no es conocida, es posible expresar la intensidad de absorción por la ecuación de la absorptividad específica –  $A(1\%, 1\text{ cm})$ :

$$A(1\%, 1\text{ cm}) = A / b c$$

en que  $A(1\%, 1\text{ cm})$  corresponde a la absorbancia de la solución a 1% (p/v) de la sustancia cuando el camino óptico es 1 cm.

Para evitar posibles desvíos en la ley de Beer se debe procurar trabajar con soluciones diluidas (de la orden de 0,01 M), evitando asociaciones entre las moléculas, y con radiaciones monocromáticas.

#### *Espectrofotometría en el Infrarrojo próximo*

La cuantificación a través de la espectrofotometría en el NIR puede ser realizada utilizando datos obtenidos de un método de referencia o a partir de un conjunto de calibración con muestras de composición conocida. Los espectros pueden ser obtenidos utilizando los modos de transmisión y reflexión con el auxilio de accesorios adecuados. En un primer momento los datos espectrales son tratados a través de transformaciones matemáticas con el objetivo de reducir fuentes de variaciones indeseadas antes de la etapa de calibración. El proceso de calibración consiste en la construcción de un modelo matemático que relaciona la respuesta del espectrofotómetro a una propiedad de la muestra. Existe una serie de algoritmos quimiométricos que pueden ser utilizados en la calibración. Generalmente, estos algoritmos están disponibles en softwares y dispuestos junto con el espectrofotómetro. Los principales algoritmos de calibración son: regresión lineal múltiple (del inglés, *multiple linear regression* – MLR), mínimos cuadrados parciales (del inglés, *partial least squares* – PLS) y regresión de componentes principales (del inglés, *principal component regression* – PCR).

La validación de una metodología que emplea la espectrofotometría NIR es semejante a aquella requerida para cualquier procedimiento analítico y, generalmente, es establecida a partir de herramientas quimiométricas. Los principales parámetros a ser evaluados son: especificidad, linealidad, banda de trabajo, exactitud, precisión y robustez.

La extensión de la especificidad es dependiente del procedimiento utilizado. La demostración de la especificidad de los métodos NIR puede ser hecha a través de las siguientes formas: (i) los largos de onda utilizados en los modelos de calibración deben corresponder a bandas del analito de interés; (ii) para calibración utilizando PLS los coeficientes deben ser trazados y las regiones de mayor coeficiente comparadas con el espectro del analito; (iii) variaciones en la matriz de la muestra no deben afectar de forma significativa a cuantificación del analito.

La validación de la linealidad del método NIR envuelve la demostración de la respuesta lineal de la técnica para muestras distribuidas a través de una banda definida de calibración. El coeficiente de correlación,  $r$ , no es una herramienta adecuada para verificación de linealidad, pero es la medida de la variación de los datos que es adecuadamente

modelada por la ecuación. La mejor manera de demostrar la linealidad de los métodos NIR es a través de la evaluación estadística de los valores de la inclinación e intercepto obtenidos para el conjunto de validación.

La banda de trabajo de los valores de referencia del analito del conjunto de validación define la banda de trabajo del método NIR. Controles deben ser establecidos para garantizar que los resultados fuera de la banda de trabajo no sean aceptados. La validación de un método NIR debe generar un valor anómalo cuando una muestra conteniendo analito fuera de la banda de trabajo sea analizada.

La exactitud de un método NIR está demostrada por la correlación de los resultados NIR con los datos de la técnica de referencia. Además de eso, la exactitud puede ser verificada a partir de la proximidad del error estándar de predicción (SEP) con el error del método de referencia. El error del método de referencia debe ser conocido con base en los valores históricos. Diferentes métodos estadísticos pueden ser utilizados para verificar diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos por el método NIR y el método de referencia.

La precisión de un método NIR expresa la concordancia entre una serie de medidas obtenidas bajo condiciones pre-determinadas. Hay dos niveles de precisión que pueden ser considerados: la repetitividad y la precisión intermediaria. La precisión de un método NIR es típicamente expresada como coeficiente de variación.

La robustez del método NIR puede ser verificada a través de cambios de parámetros del método como: condiciones ambientales, temperatura de la muestra, características de la muestra y cambios instrumentales.

## 5.2.15 ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

Algunas sustancias pueden ser analizadas con mayor sensibilidad y especificidad por medio de métodos fluorimétricos del que por otras técnicas espectrofotométricas. La espectrofotometría de fluorescencia, o espectrofluorimetría, comprende la medida de la fluorescencia emitida cuando estas sustancias – dichas fluorescentes – son expuestas a la radiación ultravioleta, visible u otras también de naturaleza electromagnética. Tales radiaciones promueven la excitación de electrones de la molécula para niveles energéticos más elevados. Después de corta permanencia en el estado excitado – cerca de  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  segundos – los electrones retornan al estado fundamental por medio de proceso no radioactivo, denominado desactivación por colisión, aliado a proceso radioactivo llamado luminescencia (fluorescencia o fosforescencia), al contrario de lo que ocurre con la mayoría de las sustancias en que el retorno al estado menos energético no comprende emisión de luz. En la desactivación por colisión, la energía se pierde como calor en los choques entre las moléculas. En el proceso radiante, el exceso de energía es remitido con intensidad máxima en largo de onda mayor (en cerca de 20 a 30 nm) que el de la radiación excitatoria adsorbida, debido a la pérdida



energética que acontece en el proceso. Siendo de naturaleza fluorescente, la radiación emitida por la sustancia cesa cuando la fuente de energía es retirada y esta característica la distingue de la fosforescencia, que prosigue por algún tiempo después del término de la excitación.

La intensidad de la luz emitida por una solución fluorescente es, en determinadas condiciones, proporcional a la concentración del soluto y, en consecuencia, utilizada para fines analíticos. La medida de la intensidad de fluorescencia no puede ser usada directamente para la determinación de la concentración del analito. Por eso, la determinación está hecha a través de la comparación de la intensidad de fluorescencia obtenida para una solución muestra con soluciones estándar, cuyas concentraciones son conocidas. El fundamento de la espectro fluorescencia consiste, pues, en excitar la sustancia con radiación en el largo de onda de máxima absorción y medir comparativamente la intensidad de la luz fluorescente emitida frente a un estándar.

## DEFINICIONES

*Intensidad de fluorescencia:* Expresión empírica de la actividad fluorescente, en unidades arbitrarias proporcionales a la respuesta del detector.

*Espectro de excitación de fluorescencia:* Representación gráfica del espectro de activación, presentando la intensidad de la radiación emitida por sustancia activada (ordenada) y el largo de onda de la radiación incidente excitatoria (abscisa).

*Espectro de emisión de fluorescencia:* Representación gráfica de la distribución espectral de la radiación emitida por sustancia activada, presentando la intensidad de la radiación emitida como ordenada y el largo de onda como abscisa.

## EQUIPO

La determinación de la intensidad de fluorescencia puede ser efectuada en simple fluorímetro de filtro (fluorímetro), en espectrofotómetros de absorción adaptados o en espectrofotómetro de fluorescencia (espectrofluorímetro).

El fluorímetro de filtro comprende fuente de luz, filtro primario, cámara de muestra, filtro secundario y sistema de detección. En los fluorímetros de este tipo, el detector se encuentra dispuesto a 90° con relación a la luz incidente. Tal disposición en ángulo recto permite que la luz incidente atraviese la solución de la muestra sin interferir con la señal fluorescente captada por el detector. Tal mecanismo no impide que parte de la luz difusa alcance el detector debido a las propiedades difusoras inherentes a las soluciones o en función de la presencia de partículas sólidas suspendidas. Esta dispersión residual es controlada con empleo de filtros. El filtro primario selecciona la radiación de largo de onda apropiado a la excitación de la muestra mientras el filtro secundario selecciona la radiación fluorescente de largo de onda mayor, bloqueando el acceso de la radiación dispersa al detector.

En su mayoría, los detectores de fluorímetros de filtro son equipados con válvulas fotomultiplicadoras, habiendo, sin embargo, diferencias entre tipos de equipos cuanto a la región espectral de máxima sensibilidad. Amplificada la corriente eléctrica generada en el fotomultiplicador, se obtiene lectura correspondiente en instrumento analógico o digital.

Espectrofotómetros de fluorescencia, por su vez, se diferencian de fluorímetros por no disponer de filtros y si de monocromadores de prisma o de rejilla de difracción, proporcionando mayor selectividad de largo de onda y flexibilidad.

Tanto fluorímetros como espectrofotómetros de fluorescencia permiten empleo de diversas fuentes de luz. Lámparas de mercurio o tungsteno, a pesar de que comunes, son sustituidas con ventaja por la lámpara de arco de xenón a la alta presión, pues esta proporciona, al contrario de las demás, espectro continuo desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. De cualquier forma, la radiación es muy intensa y no debe jamás ser observada con los ojos desprotegidos, bajo riesgo de lesiones permanentes.

Los monocromadores, a su vez, disponen de ajuste de ancho de hendidura. Ranuras estrechas proporcionan mayor resolución y menor ruido espectral mientras ranuras anchas aseguran mayor intensidad de luz en detrimento de estas características. El ancho de hendidura a ser adoptada es función de la diferencia entre los largos de onda de la luz incidente y emitida, así como del nivel de sensibilidad necesario al análisis.

La cámara de muestra generalmente permite uso de tubos redondos y cubetas cuadradas, semejantes a las empleadas en espectrofotometría de absorción, salvo por la necesidad de que las cuatro paredes verticales estén pulidas. Volúmenes de muestra de la orden de 2 a 3 ml son adecuados a pesar de que algunos instrumentos puedan estar dotados de cubetas pequeñas, con capacidad para 0,1 a 0,3 ml o también de soportes para capilares que requieren volúmenes también menores.

### *Calibración del equipo*

Fluorímetros y espectrofluorímetros deben ser calibrados con sustancias fluoróforas, estables, para asegurar resultados reproducibles. Las variaciones son, en general, debidas a alteraciones en la intensidad de las lámparas o en la sensibilidad del tubo fotomultiplicador. El fluoróforo puede ser la muestra pura de la sustancia a ser analizada o cualquier otra sustancia fluorescente de fácil purificación, cuyos largos de onda de absorción y fluorescencia sean semejantes a los de la sustancia en análisis. Por ejemplo, quinina en ácido sulfúrico 0,05 M es un estándar adecuado para fluorescencia azul. Por otro lado, fluoresceína en hidróxido de sodio 0,1 M es apropiada para fluorescencia verde y rodamina es fluoróforo de elección en la fluorescencia roja. La escala de largos de onda del espectrofotómetro de fluorescencia también requiere calibración periódica.

## PREPARADO DE LAS SOLUCIONES

La elección del solvente utilizado en la preparación de soluciones fluorescentes requiere precauciones. Naturalidad, pureza y pH del solvente son parámetros relevantes en la intensidad y distribución espectral de la fluorescencia. En consecuencia, es recomendable atenerse al volumen especificado en métodos establecidos. Muchas sustancias presentan fluorescencia en solventes orgánicos, pero son prácticamente no fluorescentes cuando disueltas en agua. Así, cabe la experimentación en diversos solventes para determinar la propiedad fluorescente de una sustancia.

Para fines cuantitativos, es fundamental que la intensidad de la fluorescencia guarde relación lineal con la concentración de la muestra dentro de límites compatibles con la técnica. Si la solución es muy concentrada, parte significativa de la luz incidente será adsorbida en la periferia de la cubeta y menor será la cantidad de radiación a alcanzar la región central. Esto significa que la propia sustancia actuará como "filtro interno". Sin embargo, tal fenómeno es raro, considerándose que la espectrofotometría de fluorescencia es una técnica de elevada sensibilidad, permitiendo el empleo de soluciones de concentraciones de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M.

Debido a los límites de concentración usualmente estrechos en los cuales la fluorescencia es proporcional a la concentración de la sustancia, se tiene como regla la obediencia a la relación  $(c-d)/(a-b) = 0,40$  a  $2,50$ . En este caso,  $a$  es la intensidad de fluorescencia de la solución de referencia,  $b$  es la intensidad del blanco correspondiente,  $c$  es la intensidad de la solución- muestra y  $d$  es la intensidad del blanco correspondiente.

Las determinaciones de fluorescencia son sensibles a la presencia de partículas sólidas en las soluciones. Tales impurezas reducen la intensidad del haz incidente, produciendo falsas lecturas elevadas debido a reflexiones múltiples en la cubeta. Es, por tanto, necesario eliminar estos sólidos por centrifugación o filtración antes de la lectura, llevando en consideración, sin embargo, que algunos papeles de filtro pueden contener impurezas fluorescentes.

La presencia de oxígeno disuelto en el solvente ejerce efecto atenuador sobre la intensidad de la fluorescencia y cabe eliminarlo usando, por ejemplo, paso de corriente de nitrógeno, helio o cualquier gas inerte en la solución, previamente a la lectura.

El control de temperatura también es importante. En algunas sustancias, la emisión de fluorescencia puede disminuir de 1 a 2% por cada aumento de temperatura de 1 °C. En vista de eso, cuando sea necesaria máxima precisión, es recomendado el empleo de cubetas termostatazadas. No obstante, para análisis de rutina, no hay necesidad de este recurso mientras que las determinaciones sean hechas con rapidez suficiente para evitar calentamiento debido a la exposición de la solución a la luz intensa.

Algunas sustancias fluorescentes son sensibles a la luz y, cuando expuestas a la radiación luminosa intensa del espectrofotómetro de fluorescencia, pueden descomponerse

en productos más o menos fluorescentes. Tal efecto puede ser detectado observándose la respuesta del detector en relación al tiempo y atenuado con la reducción de la intensidad luminosa incidente por la utilización de filtros

## 5.2.16 TURBIDIMETRÍA Y NEFELOMETRÍA

Turbidimetría y nefelometría – variantes de espectrofotometría – se destinan a la evaluación cuantitativa de sustancias en función de la turbidez de sus suspensiones, proporcional a su poder de difracción sobre luz incidente (efecto Tyndall).

En la turbidimetría, también conocida por opacimetría, se mide la intensidad de la luz transmitida en el mismo sentido de dirección de la luz incidente. A pesar de que existan turbidímetros, destinados específicamente a la medida de turbidez, colorímetros y espectrofotómetros convencionales son satisfactorios a la medida de la luz transmitida desde que ajustados para largo de onda apropiado.

La nefelometría (o difusimetría), a su vez, comprende la medida de la intensidad de luz difundida (reflejada) por las partículas en suspensión, en ángulo recto al haz de luz incidente. Una vez más, además de nefelómetros, es posible el empleo de colorímetros y espectrofotómetros en la medida nefelométrica. Para tanto, cabe modificarlos para permitir la captación perpendicular al ángulo de la luz incidente, por transferencia de la fuente de luz, o por alteración de posición del detector. Fluorímetros, a ejemplo de nefelómetros, se destinan a la medida de luz dispersa (posicionamiento del detector en ángulo de 90° con relación a la luz incidente) siendo, por tanto, compatibles con la nefelometría.

### Turbidez

Turbidez (S) en analogía a la transmitancia (T), definida en *Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta, visible e infrarrojo* (5.2.14) es la expresión oficial de dispersión de la luz producida por partículas suspendidas. Y determinable por turbidimetría o nefelometría, correspondiendo a la ecuación

$$s = \frac{P_0}{P} k \frac{bd^3}{d^4 + \lambda^4}$$

en que

$P_0$  = intensidad de radiación incidente;  
 $P$  = intensidad de radiación transmitida;  
 $b$  = espesor de la muestra (cubeta);  
 $C$  = concentración de la muestra;  
 $d$  = diámetro medio de las partículas;  
 $\lambda$  = largo de onda;  
 $k$  = constante de proporcionalidad, dependiente de la naturaleza de la suspensión y del método de medida.

Una suspensión evaluada en dado instrumento, bajo luz monocromática, presenta turbidez que corresponde al producto de la concentración  $C$  por una constante de proporcionalidad  $k$ , que combina los demás parámetros de la

ecuación arriba. Se tiene, por tanto,  $S = kC$ , expresión de la ley de Lambert-Beer, permitiendo que procedimientos turbidimétricos y nefelométricos sean análogos a los adoptados en espectrofotometría. Es, sin embargo, relevante observar que la proporcionalidad sólo es verdadera para suspensiones muy diluidas, pues reflexiones secundarias provocan excesivo desvío de linealidad cuando el número de partículas en suspensión ultrapasa determinado límite.

Otra fuente de error en medidas turbidimétricas y nefelométricas es la decantación de las partículas en suspensión. Tal hecho puede ser minimizado con el aumento de la viscosidad, con la incorporación de coloide protector – gelatina, goma arábiga o almidón – al medio líquido de la suspensión.

## PROCEDIMIENTO

El procedimiento básico para el empleo de técnicas turbidimétricas o nefelométricas obedece a los principios de las técnicas espectrofotométricas, comprendiendo la preparación de las soluciones de referencia con suspensiones de concentración conocida. En la práctica, está permitido el trazado contra valores de transmitancia en vez de turbidez.

Las etapas del procedimiento comprenden, en resumen: (1) ajustar el instrumento en el largo de onda especificado en la monografía (para colorímetros, a falta de especificación, emplear filtro que proporcione luz en la banda azul); (2) llenar la cubeta con la suspensión más concentrada y ajustar la lectura de transmitancia para 100% (transmitancia ofrece más linealidad que absorbancia); (3) medir la transmitancia de las demás suspensiones-estándar y trazar recta de calibración (con empleo del método de los mínimos cuadrados) y (4) medir la transmitancia de la muestra determinando su concentración por la recta de calibración.

### *Comparación visual*

Medidas de turbidez pueden ser ejecutadas por comparación visual, técnica por la cual la suspensión de muestra es confrontada con suspensión o suspensiones estándar. Para ello, emplear tubos de ensayo idénticos, de fondo plano con 70 ml de capacidad y cerca de 23 mm de diámetro interno. Los tubos deben ser comparados horizontalmente sobre fondo oscuro, con incidencia de luz lateral.

## 5.2.17 CROMATOGRAFÍA

### 5.2.17.1 CROMATOGRAFÍA EN CAMADA DELGADA

Consiste en el sistema cromatográfico en que la separación de los componentes de una mezcla ocurre a través de la migración diferencial sobre una fase estacionaria compuesta por una fina camada de adsorbente aplicado sobre un soporte plano, el cual puede ser constituido de diversos materiales tales como vidrio, aluminio o poliéster. La fase móvil a su vez está constituida por diversas mezclas de solventes y permanece en el interior de un recipiente o cuba de material transparente e inerte, generalmente vidrio, permaneciendo sellada donde se deposita la cromatoplaque en posición vertical bajo una atmósfera saturada de la fase móvil.

## EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS:

Los equipos utilizados para la cromatografía en camada delgada consisten en: placa, cuba o cámara de elución, fase estacionaria, fase móvil, sistema revelador. Las placas generalmente son de vidrio, aluminio o material plástico. Los tamaños varían conforme explicado a continuación: 20 cm x 20 cm; 10 cm x 20 cm; 10 cm x 10 cm; 5 cm x 10 cm.

### *Fase estacionaria (adsorbentes)*

**Sílice** – Es el adsorbente más ampliamente utilizado en la CCD. Es un adsorbente amorfo, poroso. Es usado también en la cromatografía en columna, no obstante la sílice utilizada en CCD es más fina. La sílice es preparada por espon-tánea polimerización y deshidratación del ácido silícico. Las sustancias son adsorbidas por la sílice vía puente de hidrógeno e interacción dipolo-dipolo. Una sílice de condición satisfactoria es aquella con 11 a 12% de agua en peso. Un nivel de 11 a 12% de humedad es alcanzado cuando la sílice está en equilibrio con el aire, a una humedad relativa de 50% y una temperatura de 20 °C.

Las sílicas comerciales poseen tamaños de poros variables entre 40 a 150 Angstrom. Los tamaños de partículas varían de 5 a 40  $\mu\text{m}$ , con promedio de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , dependiendo del fabricante.

Reduciendo el tamaño de la partícula, se aumenta la eficiencia de la sílice. Partículas de tamaño de 5 a 6  $\mu\text{m}$  son utilizadas para preparar CCDAE (Cromatografía en camada delgada de alta eficiencia). Los tamaños de poros afectan la selectividad y, por tanto, pueden ser utilizados para las tasas de migración y resolución de los componentes de las muestras.

Los tamaños de poros de sílice más comunes comercialmente son 40, 60, 80 y 100 Angstrom. Siendo la sílice 60 Angstrom, la más versátil y ampliamente utilizada. Las sílicas son utilizadas para la separación de compuestos lipofílicos como aldehídos, cetonas, fenoles, ácidos grasos, aminoácidos, alcaloides, terpenoides y esteroides, usando el mecanismo de adsorción.

**Alúmina** – Después de la sílice, es el adsorbente más utilizado. Las propiedades físicas de la alúmina son similares a las de la sílice en términos de tamaño de partícula, diámetro medio del poro y superficie. Están disponibles comercialmente alúmina ácida (pH 4,0 – 4,5), neutra (7,0 – 8,0) y básica (9,0 – 10,0). Así como la sílice, la alúmina separa los componentes de las muestras por polaridad, puentes de hidrógeno o fuerzas dipolo. La selectividad de la alúmina en la CCD de adsorción es similar al gel de sílice, por tanto la alúmina es un adsorbente mejor que la sílice para separación de sustancias ácidas lipofílicas. La alúmina de carácter ácido atrae fuertemente compuestos básicos, mientras la alúmina de carácter básico atrae más fuertemente compuestos ácidos. La alúmina retiene compuestos aromáticos más fuertemente que el gel de sílice. Tiene el inconveniente de promover la catálisis de algunas reacciones de sustancias lábiles. Es empleada en la separación de vitaminas liposolubles, alcaloides, ciertos antibióticos, hidrocarburos policíclicos.

**Kieselguhr** – Es a Tierra de Diatomeas térmicamente tratada de granulación de 5 a 40  $\mu\text{m}$ . Su principal constituyente es  $\text{SiO}_2$ . Una variedad de otros compuestos inorgánicos también están presentes. Los tamaños de los poros son muy variables, sus características la tornan adecuada para la separación de azúcares, aminoácidos y otras sustancias polares similares.

**Celulosa** – La celulosa es un polisacárido altamente polimerizado por monómeros de celobiosa. La presencia de gran número de grupos hidroxilo libre permite la conexión de hidrógeno con líquidos de bajo peso molecular como agua y alcoholes. Celulosa es, por tanto, adecuada para la separación de sustancias hidrofílicas, tales como carbohidratos y aminoácidos.

**Poliamida** – En contraste con la celulosa, la poliamida es una resina sintética. Dos tipos de poliamida son utilizadas: poliamida 6 y poliamida 11. La poliamida 6 viene de la aminopolicaprolactama, mientras a poliamida 11 es preparada a partir del ácido poliaminoundecanoico. Poliamidas son utilizadas para la separación de compuestos polares que son capaces de interactuar con el grupo amida por aleaciones de hidrógeno debido a su estructura molecular. Entre ellas están aminoácidos y derivados, benzodiazepínicos, ácidos carboxílicos, ciclodextrinas, ácidos grasos, flavonoides, conservantes, plaguicidas.

**Silicato de magnesio** – ideal para separación de azúcares, antraquinonas, flavonas, glucósidos, esteroides, lípidos, residuos de plaguicidas, vitaminas, carbazol, acetato de hidrocortisona.

#### *Reveladores y métodos de detección*

Después del desarrollo de la cromatografía y la evaporación de los solventes, se pasa al método de revelación de las manchas. Este por su vez, puede ser físico o químico. Los métodos físicos comprenden: luz ultravioleta (lámparas con emisión de radiación entre 254 a 366 nm), en el caso de sustancias que se tornan fluorescentes, cuando excitadas por luz UV o visible. Los métodos químicos comprenden utilización de reactivos cromógenos. Hay una amplia lista de reveladores apropiados para cada grupo de compuestos.

#### *Identificación*

La posición final de cada mancha es designada por el Rf. Después de la revelación de la cromatoplaque, se mide la distancia alcanzada por cada mancha a partir del origen. Esa distancia es una fracción de la distancia total recorrida por el solvente en la fase estacionaria.

$$R_f = \frac{\text{(distancia alcanzada por la mancha a partir del origen)}}{\text{(distancia recorrida por el solvente desde el origen)}}$$

### 5.2.17.2 CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Utiliza para la separación e identificación de las sustancias o componentes de la mezcla la migración diferencial sobre la superficie de un papel de filtro de calidad especial (fase

estacionaria). La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes.

En el papel cromatográfico, el adsorbente es una camada de papel de textura y espesor adecuados. La separación cromatográfica procede a través de la acción de la fase móvil líquida semejante al proceso de la adsorción en cromatografía en columna. Debido al contenido de agua intrínseco del papel, o inhibición selectiva del componente hidrofílico de la fase líquida por las fibras de papel, que puede ser considerado como fase estacionaria, un mecanismo de partición puede contribuir significativamente para la separación.

El cromatograma es desarrollado por el paso lento de la fase móvil sobre la camada. El desarrollo puede ser ascendente, en el caso de solvente acarreado para arriba a través de fuerzas capilares, o descendente, en el caso en que el flujo del solvente es auxiliado por fuerza de la gravedad.

La forma más simple de la cromatografía en papel es la cromatografía ascendente que utiliza una tira de papel de ancho y largura variables, en función de la cuba cromatográfica a ser utilizada.

Este método es muy útil para separar sustancias muy polares, como azúcares y aminoácidos. Posee el inconveniente de poder aplicarse poca cantidad de sustancia por vez. Se debe procurar trabajar en las condiciones más próximas posibles, de calidad y cantidad, entre estándar y muestra, usándose el mismo papel, fase móvil, temperatura, etc.

#### EQUIPO Y PROCEDIMIENTOS

Consiste en cámara o cuba cromatográfica de vidrio, provista de bordes y tapa esmerilados y de dimensiones adecuadas para contener el papel cromatográfico, que puede ser adaptado para cromatografía ascendente o descendente. Es importante que no deje escapar los vapores de la fase móvil.

Utilizar papel de filtro especial para cromatografía, cortado en el sentido de las fibras en tiras de largo variable y ancho no inferior a 2,5 cm. Existen varios tipos de papel para cromatografía con finalidades diferentes para separación de sustancias hidrófilas o hidrofóbica, orgánicas o inorgánicas, anfóteras o con muchas hidróxilas, entre otras.

Para cromatografía descendente, utilizar cuba con tapa provista de orificio central, cerrado por tapón de vidrio u otro material inerte. En la parte superior de la cuba, hay una cubeta suspendida, que contiene dispositivo para sujetar el papel (generalmente barra o bastón de vidrio). De cada lado de la cubeta hay guías de vidrio, que sustentan el papel, para no tocar en las paredes de la cuba cromatográfica. El ancho del papel cromatográfico no puede ser superior al de la cubeta suspendida y la altura debe ser aproximadamente igual a la altura de la cámara cromatográfica.

Para cromatografía ascendente, en la parte superior de la cuba hay dispositivo que permite sustentar el papel cromatográfico y que puede bajar sin abrir la cámara cromatográfica. Se manipula el papel con cuidado y por las puntas,



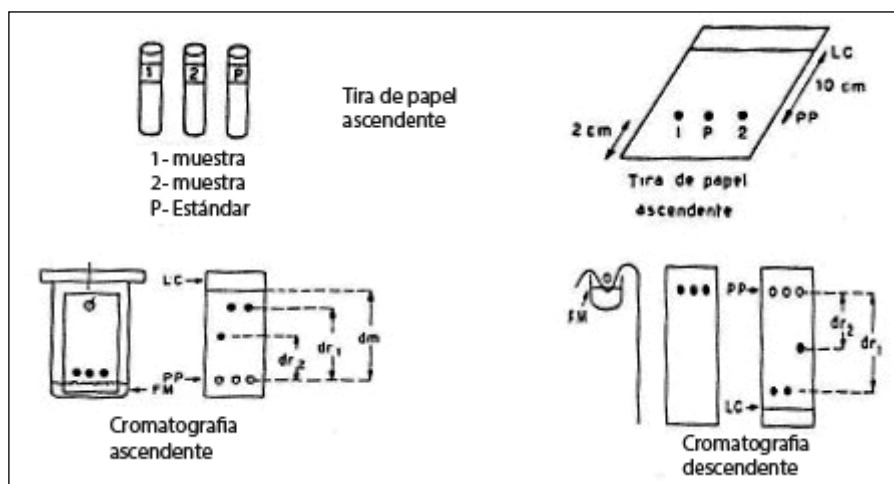
y se cortan tiras en tamaños que puedan ser contenidos en las cubas. Es importante cortar el papel siguiendo el eje de las fibras, pues la celulosa está orientada en este sentido, lo que facilitará el paso de la fase móvil. La tira de papel no debe tocar las paredes de la cuba.

Al añadir el papel en la cuba (no se debe demorar a colocar el papel para no haber pérdida de saturación), cuidar para que la muestra no entre en contacto directo con el eluyente, dejando que ascienda o descienda por la superficie del papel, apenas por capilaridad.

Cuando la técnica utilizada sea la de cromatografía ascendente, trazar línea fina con lápiz a 3 cm del borde inferior del papel; si la cromatografía es descendente, trazar línea a la distancia, tal que la misma quede pocos centímetros abajo de la varilla que sujeta el papel en la cubeta del eluyente. Se debe marcar también la línea de llegada de la fase móvil (o frente del solvente), generalmente con una distancia de 10 cm del punto de partida.

Aplicar las soluciones en la forma de manchas circulares (se utilizan tubos capilares o micropipetas), conteniendo de 1 a 20  $\mu\text{g}$  de la muestra, siendo que cada mancha debe producir una anchura entre 6 a 10 mm sobre la línea trazada con lápiz. Dependiendo del ancho del papel, puede colocarse apenas una alícuota del estándar o de la muestra, centralizándose esta aplicación en la línea de partida. En el caso de la posibilidad de colocarse más de una alícuota en el punto de partida, se dejan 2 cm de distancia de los bordes laterales y un intervalo entre los puntos de aplicación de 3 cm. Si cada mancha producida es mayor que 6 a 10 mm, aplicar la muestra en porciones, dejándose evaporar el solvente antes de aplicar la porción siguiente.

El nivel de la fase móvil debe quedar abajo del punto de partida de la sustancia, debiendo, siempre, haber un buen sellado de la cuba cromatográfica para que no se pierda el vapor de esta fase. Al final de la corrida, esperar secar el papel y someterlo a algún proceso de revelación.



**Figura 1 - Diferentes tipos de cromatografía en papel de acuerdo con las técnicas de desarrollo.**

FM: Fase Móvil; PP: Punto de Partida; LC: Línea de Llegada;  $dr_1$  y  $dr_2$ : distancias recorridas por las sustancias;  $dm$ : distancia de migración de la fase móvil

### CROMATOGRAFÍA DESCENDENTE

En la cromatografía descendente, la fase móvil posee un flujo orientado para abajo y cuenta con la acción de la gravedad.

Introducir en la cámara una camada de eluyente especificado en la monografía, tapar y dejar en reposo por 24 horas. Aplicar la muestra en el papel, colocándolo adecuadamente sobre las guías de manera que la extremidad superior permanezca dentro de la cubeta suspendida y sujetarlo con la varilla de vidrio. Cerrar la cuba y dejar en reposo por 1 hora y media. En seguida, a través del orificio en la tapa introducir el eluyente en la cubeta. Desarrollar el cromatograma hasta la distancia o tiempo prescritos, protegiendo el papel de la incidencia de luz directa. Retirar el papel, marcar el recorrido de la fase móvil, secar y visualizar de la manera prescrita en la monografía.

### CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE

El flujo ascendente de la fase móvil sobre el papel cromatográfico es permitido por la acción de la capilaridad.

Colocar en el fondo de la cámara recipiente conteniendo el eluyente, cerrar la cuba y dejarla en reposo por 24 horas. Aplicar la muestra en el papel introduciéndolo en la cuba y dejar en reposo por 1 hora y media. Sin abrir la cámara, bajar el papel para colocar su extremidad inferior en contacto con el eluyente y desarrollar el cromatograma hasta la distancia o tiempo prescritos. Retirar el papel, marcar el recorrido del eluyente, secar y visualizar de la manera prescrita en la monografía.

### 5.2.17.3 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Cromatografía preparativa en columna es un método de separación que desempeña un papel importante en la puri-



ficación de compuestos de valor en la investigación, en la operación de planta piloto y producción de productos farmacéuticos. Es un método que puede ser utilizado, de manera rápida y económica, para la obtención de sustancias con pureza elevada. En la práctica, adsorbentes estandarizados son utilizados, pues proporcionan un alto grado de confiabilidad del método, la transferencia directa de escala de análisis y un procesamiento optimizado. Los tipos de cromatografía en columna pueden ser: por adsorción (líquido-sólido), por partición (líquido-líquido) o por cambio iónico.

## EQUIPO

Los aparatos utilizados para procedimientos en columnas cromatográficas consisten de un tubo cromatográfico cilíndrico, en posición vertical, de vidrio (u otro material inerte y transparente especificado en monografía individual) de largo y diámetros variables en cuya parte inferior hay estrangulamiento (de paso reducido) y grifo para regulación del caudal de los varios tipos de solventes o sistemas de elución utilizados. En algunas columnas, la parte inferior presenta en su base, un disco de vidrio poroso cuya finalidad es evitar a salida de la fase fija (gel de sílice). Las columnas tienen dimensiones variables, sin embargo, en análisis farmacéutico, las bandas más comúnmente utilizadas son de 10 a 30 mm de diámetro a lo largo del tubo y de 3 a 6 mm en su parte inferior, donde el grifo se encuentra acoplado. El largo del tubo es usualmente de 150 a 400 mm. En la parte superior de la columna podrá haber una dilatación de forma esférica, destinada a contener un mayor volumen de solvente seguido de una conexión esmerilada, cilíndrica tamponada por un tapón cilíndrico de plástico, de vidrio, acero inoxidable, aluminio (u otro material especificado en monografía individual) firmemente fijada a la vena. La vena de la barra es sustancialmente menor que el diámetro de la columna y posee, como mínimo, 5 cm más en relación al efectivo largo de la columna. El tapón tiene un diámetro menor en aproximadamente 1 mm en relación al diámetro interno de la columna.

## PROCEDIMIENTO

### *Cromatografía en columna por adsorción*

Iniciar el preparado de la columna, si necesario, tamponando la parte inferior, próxima al grifo, con un pedazo de algodón o lana de vidrio en la base del tubo a fin de impedir el paso del material adsorbente y la entrada de aire (evitando formación de burbujas). Llenar entonces uniformemente el tubo (conforme altura especificada) con ese material adsorbente (tal como alúmina activada o gel de sílice, sílice diatomeas o sílice calcinada) previamente suspendida en la fase móvil (sistema de solventes), realizando retirada del exceso de eluyente. Después de sedimentación del material adsorbente, aplicar la mezcla de sustancias previamente solubilizada en una pequeña cantidad de solvente en el tope de la columna hasta que penetre en el material adsorbente. Una cierta cantidad de solvente puede ser adicionada al tope para ayudar en la adsorción de las sustancias en el material adsorbente, dejándose, en seguida, sedimentar por acción de la gravedad o por la aplicación de presión positiva de aire quedando la mezcla adsorbida en una estrecha banda horizontal en el tope

de la columna. La tasa de movimiento de una determinada sustancia es determinada o afectada por diversas variables, incluyendo la baja o alta absortividad del material adsorbente, el tamaño de partícula y el área superficial (superficie de contacto), la naturaleza y polaridad del solvente, la presión aplicada y la temperatura del sistema cromatográfico.

Un cromatograma de flujo es ampliamente utilizado y es obtenido por un proceso en que solventes recorren la columna, hasta que la sustancia sea separada en solución efluente, conocido como eluato. El eluato es controlado, reuniendo fracciones conforme especificado en la monografía y examinándose cada fracción por método adecuado. La sustancia puede ser determinada en el eluato por varios métodos: titulación, colorimetría, espectrometría o ser aislada (purificada) en ocasión de la evaporación del solvente. La eficiencia de la separación puede ser medida por cromatografía en camada delgada (CCD) de cada fracción recogida a lo largo de la corrida cromatográfica.

### *Cromatografía en columna por partición*

En la cromatografía de partición, las sustancias a ser separadas son repartidas entre dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales, la fase fija, es adsorbido en un soporte sólido, presentando así un área de superficie bastante amplia para el solvente circulante o fase móvil. El elevado número de sucesivos contactos entre líquido-líquido permite una separación efectiva, la cual no ocurre a través de la extracción líquido-líquido habitual.

El soporte sólido generalmente es polar, mientras la fase fija adsorbente es más polar que la fase móvil. El soporte sólido más utilizado consiste en tierra silicosa cromatográfica cuyo tamaño de partícula es satisfactorio para el caudal apropiado del eluyente. En la cromatografía de partición de fase reversa, la fase adsorbida fija es menos polar que la fase móvil, y el adsorbente sólido, se torna apolar por tratamiento con un agente silanizante (ej.: diclorodimetilsilano; parafinas), para producir una arena cromatográfica silanizada.

La muestra a ser cromatografiada generalmente es insertada en un sistema cromatográfico de dos maneras: (a) una solución de la muestra en un pequeño volumen de la fase móvil en el tope de la columna; o (b) una solución de la muestra en un pequeño volumen de la fase fija es mezclada con el *soporte sólido* y transferida para la columna formando una camada transversal sobre el material adsorbente.

El desarrollo y la elución son alcanzados a través de la "corrida" del solvente circulante. El solvente (fase móvil) generalmente es saturado con el solvente (fase fija) antes del uso.

En el caso de cromatografía de partición líquido-líquido convencional, el grado de partición de un determinado compuesto entre las dos fases líquidas está expresado a través de su coeficiente de partición o distribución. En el caso de compuestos que se disocian, se puede controlar la distribución al modificar el pH, constante dieléctrica, fuerza iónica, y otras propiedades de las dos fases. La elución selectiva de los componentes de la mezcla puede ser alcanzada con el cambio exitoso de la fase móvil para una que proporcione un

coeficiente de partición más favorable, o alterando el pH de la fase fija *in situ* con una fase fija constituida de la solución de un ácido o una base apropiados en un solvente orgánico.

Salvo disposición contraria de la monografía individual, ensayos y pruebas empleando cromatografía de partición en columna son realizados en consonancia con los métodos convencionales descritos a continuación.

*Soporte sólido* – Utilizar arena de sílice purificada. Para fase reversa de cromatografía de partición, utilizar arena de sílice cromatográfica.

*Fase estacionaria* -- Utilizar el solvente o solución especificada en la monografía individual. Se es utilizada una mezcla de líquidos en la fase estacionaria, mezclar antes de introducir el soporte sólido.

*Fase móvil* -- Utilizar el solvente o solución especificados en la monografía individual. Equilibrar con agua, si la fase estacionaria es una solución acuosa; si la fase estacionaria es un fluido polar orgánico, equilibrar con este fluido.

*Preparación de una Columna Cromatográfica* – El tubo cromatográfico mide cerca de 22 mm de diámetro interno y de 200 a 300 mm de largo, sin disco de vidrio poroso, en el cual es acoplado un tubo de distribución, sin grifo, con cerca de 4 mm de diámetro interno y aproximadamente 50 mm de largo. Introducir un tampón delgado de lana de vidrio en la base del tubo. Añadir la cantidad especificada de soporte sólido en un vaso de precipitados (probeta) de 100-250 ml y mezclar hasta producir una pasta homogénea. Transferir la mezcla para el tubo cromatográfico, tapar, presionándolo levemente, hasta obtener una masa uniforme. Si la cantidad de soporte sólido especificada fuese más de 3 g, transferir la mezcla para la columna en porciones de aproximadamente 2 g, tapando cada porción. Si el ensayo o prueba solicita una columna multisegmentada, con una fase estacionaria diferente para cada segmento, tapar después de la adición de cada segmento, y añadir cada segmento siguiente directamente al anterior. Si una solución del analito fuese incorporada en la fase estacionaria, completar la transferencia cuantitativa para el tubo cromatográfico a través del lavado del vaso de precipitados utilizado para la preparación de la mezcla de ensayo con una mezcla de aproximadamente 1 g de soporte sólido y varias gotas del solvente utilizado para preparar la solución de ensayo. Introduzca un tampón delgado de lana de vidrio encima de la columna de llenado completa. La fase móvil fluye a través de una columna adecuadamente llenada como una corriente moderada o, si fuese utilizada la cromatografía de fase reversa, lentamente, gota a gota.

Transferir la fase móvil para el espacio de la columna sobre la columna de llenado, y déjela fluir a través de la columna bajo acción de la gravedad. Humedecer la punta de la columna cromatográfica con cerca de 1 ml de la fase móvil antes de cada cambio de composición de la fase móvil y después de completar la elución. Si el analito fuese introducido en la columna como una solución de la fase móvil, déjelo pasar completamente por la columna de llenado, entonces adicione la fase móvil en varias porciones menores,

permitiendo que cada una sea completamente retirada antes de añadir la fase móvil almacenada.

#### *Cromatografía en columna por cambio iónico*

Utilizar como fase estacionaria resina de cambio iónico. El cambio de iones consiste en intercambio reversible de iones presentes en la solución con iones del polímero resinoso (celulosa modificada o soporte de gel de sílice). La elección de la resina, fuerte o suave, aniónica o catiónica, dependerá en gran parte del pH en el cual deberá ocurrir el cambio iónico y de la naturaleza de los iones (aniones o cationes) a ser cambiados. Las resinas fuertemente ácidas y fuertemente básicas son convenientes para la mayoría de las aplicaciones analíticas. Se emplea, en la práctica, gran exceso (200 – 300%) de resina sobre la cantidad de la muestra estequiométricamente calculada; la capacidad de las resinas varía de 2 a 5 mM/g (peso seco).

*Tratamiento de la resina y preparado de la columna* – Suspender la resina de cambio iónico en agua y dejar en reposo por 24 horas. Introducirla en columna adecuada y, tratándose de resina aniónica, convertirla en básica pasando a través de la columna, solución de hidróxido de sodio SR, a la velocidad de 3 ml/ min., hasta que el eluato proporcione reacción negativa para cloruro. Pasar, en seguida, agua exenta de dióxido de carbono. En caso de resina catiónica, la conversión para la forma ácida se da por el paso de ácido clorhídrico SR a través de la columna, seguida de lavado con agua exenta de dióxido de carbono hasta que el eluato proporcione reacción neutra.

Se desarrolla columna de cambio iónico de manera análoga a la descrita para cromatografía de adsorción. Terminada la operación, se regenera la resina lavándola con hidróxido de sodio SR (columnas aniónicas) o con ácido clorhídrico SR (columnas catiónicas) y, en seguida, con agua exenta de dióxido de carbono hasta que proporcione reacción neutra.

#### **5.2.17.4 CROMATOGRAFÍA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIENCIA**

La cromatografía a líquido de alta eficiencia (CLAE) es una técnica de separación fundamentada en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, la fase móvil, líquida, y la fase estacionaria sólida, contenida en una columna cilíndrica. Las separaciones son alcanzadas por partición, adsorción, cambio iónico, exclusión por tamaño o interacciones estereoquímicas, dependiendo del tipo de fase estacionaria utilizada. La CLAE presenta ventajas sobre la cromatografía a gas para los análisis de combinaciones orgánicas. Muestras no volátiles y termolábiles son, preferencialmente, analizadas por CLAE. La mayoría de los análisis farmacéuticos están basados en el método de separación por partición y deben ocurrir en tiempo corto de análisis. Varios factores químicos y físico químicos influyen en la separación cromatográfica, los cuales dependen de la naturaleza química de las sustancias a ser separadas, de la composición y caudal de la fase móvil, de la composición y área superficial de la fase estacionaria.

## APARATOS

El equipo utilizado consiste en un depósito que contiene la fase móvil, una bomba con la finalidad de llevar la fase móvil por el sistema cromatográfico, un inyector para introducir la muestra en el sistema, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de captura de datos, como un *software*, integrador o registrador. Además de recibir y enviar informaciones para el detector, *softwares* son utilizados para controlar todo el sistema cromatográfico, proporcionando mayor operacionalidad y logística de análisis.

Los sistemas cromatográficos modernos consisten de bombas para presurizar la fase móvil, controladas por *software*, que pueden ser programadas para variar la relación de componentes de la fase móvil, como es requerido para cromatografía por gradiente de solvente, o para mezclar, de forma isocrática, la fase móvil (fases móviles con relación fija de solventes). Presiones operacionales de hasta 5000 psi (cerca de 345 bar) y caudal de hasta 10 ml por minuto pueden ser utilizados. Presiones superiores quedan condicionadas a evolución del instrumental.

Después de disolver la muestra en la fase móvil o en otro solvente adecuado, la solución es inyectada en el sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando jeringa apropiada, o por medio de un inyector o muestreador automático. Este consiste en una bandeja, capaz de acomodar diversos frascos conteniendo las muestras. Algunos muestreadores automáticos pueden ser programados para inyectar diferentes volúmenes de muestra, diversas cantidades de inyecciones, controlar el intervalo entre inyecciones y otras variables operacionales.

Cuando se trabaja a altas presiones, una válvula de inyección es esencial. Esta presenta un sistema calibrado, con volumen definido, denominado anillo de inyección o ansa de muestreo, que será llenado con la solución a ser analizada y, posteriormente, transferida a la columna.

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación es alcanzada por partición de los componentes, presentes en la solución a ser analizada, entre las fases móvil y estacionaria. Sistemas que consisten de fases estacionarias polares y fases móviles apolares son definidos como *cromatografía en fase normal*, mientras el opuesto, fases móviles polares y fases estacionarias apolares, son denominados de *cromatografía en fase reversa*. La afinidad de una sustancia por la fase estacionaria y, consecuentemente, su tiempo de retención en la columna, es controlada por la polaridad de la fase móvil.

Las fases estacionarias utilizadas en *cromatografía en fase reversa* consisten, típicamente, de una molécula orgánica químicamente ligada a las partículas de sílice u otros soportes, como grafito poroso. El diámetro de las partículas es de, normalmente, 3 µm a 10 µm. Cuanto menor es el diámetro de la partícula y la película que recubre el soporte, más rápida y eficiente será la transferencia de las sustancias entre las fases estacionarias y móviles. La polaridad de la columna depende de los grupos funcionales presentes,

siendo los más comunes los grupos apolares *octil*, *octadecil*, *fenil*, *cianopropil* y polar, *nitrilo*. La proporción de grupos silanoles no ligados al grupo funcional influencia, significativamente, en la eficiencia de la separación cromatográfica y en el formato del pico eluido. Comercialmente, están disponibles columnas cromatográficas con diferentes cualidades de fases estacionarias, inclusive aquellas con pequeña proporción de grupos silanoles libres, denominadas *capeadas*. Generalmente, columnas de sílice en fase reversa presentan vida útil en la banda de pH de 2 a 8, no obstante, columnas conteniendo grafito poroso o materiales poliméricos, como el estireno-divinilbenceno, son estables en una banda más amplia de pH. De forma menos común, pueden ser utilizados líquidos, no ligados, como revestimiento del soporte de sílice y, por tanto, deben ser inmiscibles con la fase móvil. Las columnas normalmente usadas para separaciones analíticas tienen diámetros internos de 1 mm a 5 mm. Esas pueden ser calentadas, proporcionando separaciones más eficientes, pero sólo raramente son utilizadas temperaturas superiores a 60 °C, debido al potencial de degradación de la fase estacionaria o a la volatilidad de la fase móvil. A menos que especificado en la monografía de la sustancia a ser analizada, las columnas son utilizadas en temperatura ambiente.

Los detectores más frecuentemente utilizados en cromatografía a líquido de alta eficiencia son los espectrofotométricos (UV/Vis). Los detectores espectrofotométricos son utilizados para detectar compuestos con agrupamiento cromóforo. Tales detectores consisten de una célula de flujo localizada en el término de la columna cromatográfica. La radiación ultravioleta atraviesa, constantemente, por la célula de flujo y es recibida en el detector. Con el sistema en funcionamiento, las sustancias son eluidas de la columna, pasan por la célula de detector y absorben la radiación, resultando en alteraciones mensurables en el nivel de energía. Esos detectores pueden presentar largo de onda fijo, variable o múltiple. Detectores de largo de onda fijo operan en un único valor, típicamente 254 nm, emitido por una lámpara de mercurio de baja presión. Aquellos con largo de onda variable contienen una fuente continua de emisión, como una lámpara de deuterio o xenón de alta presión, y un monocromador o un filtro de interferencia, para generar radiación monocromática a un valor seleccionado por el operador, pudiendo, además, ser programados para alterar el largo de onda durante el desarrollo del análisis. Los detectores de largo de onda múltiple miden, simultáneamente, la absorbancia en dos o más largos de onda, siendo denominados de detectores de arreglo de diodos (DAD). En estos, la radiación ultravioleta es transmitida a través de la célula de flujo, adsorbida por la muestra y entonces separada en sus componentes originales, que son detectados, individualmente, por el detector de fotodiodos, registrando datos de absorbancia en toda la banda del espectro ultravioleta y visible y, adicionalmente, los espectros de cada pico registrado en el cromatograma.

Los detectores de índice de refracción miden la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil pura y de la fase móvil conteniendo la sustancia a ser analizada. Son utilizados para detectar sustancias que no absorben en el ultravioleta o visible, no obstante son menos sensibles que los detectores espectrofotométricos. Los detectores de ín-

dice de refracción presentan la desventaja de ser sensibles a pequeños cambios de la composición de los solventes de la fase móvil, tasa de flujo y temperatura.

Los detectores fluorimétricos son utilizados para detectar compuestos con agrupamiento fluoróforo o que pueden ser convertidos en derivados fluorescentes, por transformación química o adicionando reactivos fluorescentes a grupos funcionales específicos. Si la reacción química es requerida, se puede realizar en el momento de la preparación de la muestra o, alternativamente, el reactivo puede ser introducido en la fase móvil, con la reacción ocurriendo antes de la detección.

Los detectores potenciométricos, voltamétricos o electroquímicos son útiles para cuantificación de sustancias que pueden ser oxidadas o reducidas en un electrodo. Esos detectores son altamente selectivos, sensibles y seguros, pero requieren fases móviles libres de oxígeno y iones de metales reductibles. Una bomba de flujo continuo debe ser utilizada, asegurando que el pH, la fuerza iónica, y la temperatura de la fase móvil permanezcan constantes. Detectores electroquímicos con electrodos específicos de carbono pueden ser utilizados, ventajosamente, para cuantificar nanogramos de sustancias fácilmente oxidables, como fenoles y catecol.

Los detectores de espectrometría de masas tienen la capacidad de medir la masa molar de una sustancia, combinados con la cromatografía líquida proporcionan una alta selectividad una vez que picos no resueltos pueden ser aislados monitoreando un valor de masa seleccionado. Esos detectores pueden ser de cuadrupolo simple denominados (MS) o (MS/MS), cuando asociados, para ejemplificar algunos de los modelos utilizados. Las fuentes de ionización más comunes son las del tipo "ionización por electrospray" y la "ionización química a presión atmosférica".

Los detectores de conductividad tienen aplicación en la cromatografía de cambio iónico y miden la conductividad de la fase móvil continuamente que es modificada con la presencia de analitos en la célula.

Actualmente, sistemas de recolección de datos modernos están disponibles con las funciones de recibir y almacenar las señales provenientes del detector y, posteriormente, proporcionar el manejo de esas informaciones, generando los cromatogramas con los datos de área y altura del pico, identificación de la muestra y métodos. Las informaciones también pueden ser recopiladas en sistemas simples de grabación de datos, como registradores, para la garantía de la integridad de los datos generados.

## PROCEDIMIENTO

El largo y el diámetro interno de la columna, el tipo y el tamaño de las partículas de la fase estacionaria, la temperatura de la operación, la composición y el caudal de la fase móvil y el tipo de detección son descritos en las monografías individuales.

La composición de la fase móvil tiene influencia significativa en el rendimiento cromatográfico y en la separación de las sustancias presentes en la solución a ser analizada. Para un análisis cuantitativo precisa, reactivos de alto grado de pureza o solventes orgánicos de pureza cromatográfica deben ser utilizados. El agua, de calidad adecuada, debe presentar baja conductividad y absorción en la banda del ultravioleta. En la cromatografía de partición, el coeficiente de partición y, consecuentemente, la separación pueden ser modificados por la adición de otro solvente a la fase móvil. En la cromatografía de cambio iónico, la retención de las sustancias es afectada por el pH, por la fuerza iónica y por otras modificaciones en la composición de la fase móvil. La técnica de modificar continuamente la composición de los solventes de la fase móvil durante el recorrido cromatográfico es denominada de elución gradiente, y es aplicada para separar mezclas complejas de sustancias con diferentes factores de capacidad. No obstante, detectores que son sensibles a modificaciones en la composición de la fase móvil, como los refractómetros, tiene su utilización limitada con la técnica de elución gradiente.

El detector debe presentar una amplia banda de actuación y las sustancias a ser analizadas deben estar separadas de cualquier interferente. La banda lineal para una sustancia es aquella en la cual la respuesta del detector es directamente proporcional a su concentración.

Los sistemas de CLAE son calibrados comparando las respuestas de los picos obtenidos con las respectivas concentraciones de sustancias químicas de referencia (SQR). Resultados cuantitativos confiables son obtenidos por medio de calibración con estándar externo, cuando inyectoros o muestreadores automáticos son preferencialmente utilizados. Ese método envuelve la comparación directa de las respuestas obtenidas con los picos, separadamente analizados, de las soluciones estándar y muestra. En los casos en que la estandarización externa es utilizada, los cálculos pueden ser realizados según la ecuación:

$$Ca = Cp (Ra / Rp)$$

en que,

$Ca$  = concentración de la solución muestra;

$Cp$  = concentración de la solución estándar;

$Ra$  = respuesta (área o altura) del pico de la solución muestra;

$Rp$  = respuesta (área o altura) del pico de la solución estándar.

Si la inyección es realizada por medio de jeringa, mejores resultados cuantitativos son obtenidos por medio de calibración con estándar interno, adicionándose una cantidad conocida de una sustancia química de referencia no interferente a las soluciones estándar y muestra. La relación de las respuestas obtenidas con la sustancia a ser analizada y con el estándar interno es utilizada para expresar el resultado cuantitativo. En los casos en que la estandarización interna es utilizada, los cálculos pueden ser realizados según la ecuación:



$$Ca = Cp \frac{(Ra / Rai)}{(Rp / Rpi)}$$

en que,

$Rai$  = respuesta (área o altura) del pico del estándar interno en la solución muestra;

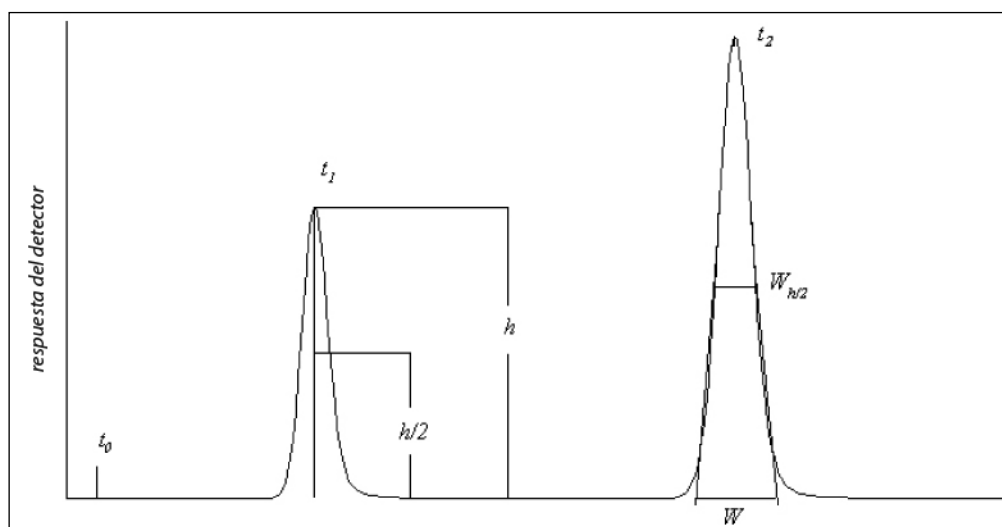
$Rpi$  = respuesta (área o altura) del pico del estándar interno en la solución estándar.

Debido a variaciones normales entre equipos, solventes, reactivos y técnicas, es necesaria una prueba de adecuación del sistema para asegurar que el método descrito sea apli-

cado de forma irrestricta. Los principales parámetros de la adecuación del sistema están descritos en *Interpretación de los cromatogramas* y en *Adecuación del sistema*.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

En la **Figura 1** está representada una separación cromatográfica típica de dos sustancias, siendo  $t_1$  y  $t_2$  los respectivos tiempos de retención. Los términos  $h$ ,  $h/2$  y  $W_{h/2}$  corresponden a la altura, a la media altura, al largo a media altura respectivamente, y  $W$  representa el largo del pico en la línea de base, por el método de la triangulación. La señal relativa al tiempo muerto,  $t_0$ , se refiere a una sustancia no retenida en la columna cromatográfica.



**Figura 1** - Separación cromatográfica de dos sustancias.

*Tiempo de retención (t), Factor de retención (k) y Tiempo de retención relativo*

El tiempo de retención en cromatografía es característico de la sustancia analizada, no obstante no es exclusivo. La comparación entre los tiempos de retención de la muestra y de la sustancia química de referencia puede ser utilizada como indicativo de la identidad de la sustancia, sin embargo es insuficiente para garantizar la total caracterización de la muestra. El tiempo de retención absoluto puede variar entre equipos y conforme el uso de solventes y reactivos diferentes. En ese sentido, las comparaciones son hechas en términos de factor de retención,  $k$ , calculado según la expresión:

$$k = \frac{(t-t_0)}{t_0}$$

en que,

$t$  = tiempo de retención de la sustancia analizada;

$t_0$  = tiempo muerto.

El factor de retención,  $k$ , es la razón entre la cantidad de la sustancia con afinidad por la fase estacionaria y la cantidad con afinidad por la fase móvil. Cuanto mayor a afinidad de la sustancia por la fase estacionaria mayor su retención.

El concepto de tiempo de retención relativo también puede ser aplicado. Para tanto, se debe definir una sustancia, de una mezcla, como la principal. Esa tendrá el tiempo de

retención relativo de 1. Todas las otras sustancias tendrán sus tiempos de retención relacionados con el tiempo de retención de la sustancia principal.

*Número de bandejas teóricas (N)*

El número de bandejas teóricas,  $N$ , es indicativo de la eficiencia de la columna. Puede estar expresado en números de bandejas teóricas por columna o número de bandejas teóricas por metro. Para picos con formato gaussiano, el número de bandejas teóricas por columna es calculado según las expresiones:

$$N = 16x \left( \frac{t}{W} \right)^2 \text{ ou } N = 5,54x \left( \frac{t}{W_{h/2}} \right)^2$$

El valor de  $N$  depende de la sustancia a ser analizada y de las condiciones de análisis, como fase móvil, temperatura y fase estacionaria.

*Resolución (R)*

La resolución,  $R$ , es el parámetro cromatográfico que indica el grado de separación entre dos sustancias en una mezcla, y es calculada según las expresiones,

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \text{ ou } R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$



en que,

$t_2$  y  $t_1$  = tiempos de retención de las dos sustancias de la mezcla;

$W_2$  y  $W_1$  = respectivas anchuras de los picos en la línea de base, por el método de la triangulación;

$W_{1h/2}$  y  $W_{2h/2}$  = respectivas anchuras de los picos a la media altura.

El área o a altura del pico son, usualmente, proporcionales a la cantidad de la sustancia eluida. el área bajo el pico, generalmente, es más utilizada, no obstante puede ser menos precisa si hubiere otros picos interferentes. Para medidas manuales, el gráfico debe ser obtenido en velocidad mayor que la usual, minimizando los errores en la obtención de la anchura y de la anchura a la media altura de los picos. Para el análisis cuantitativo, las sustancias deben estar totalmente separadas de cualquier sustancia interferente.

#### Factor de cola ( $T$ )

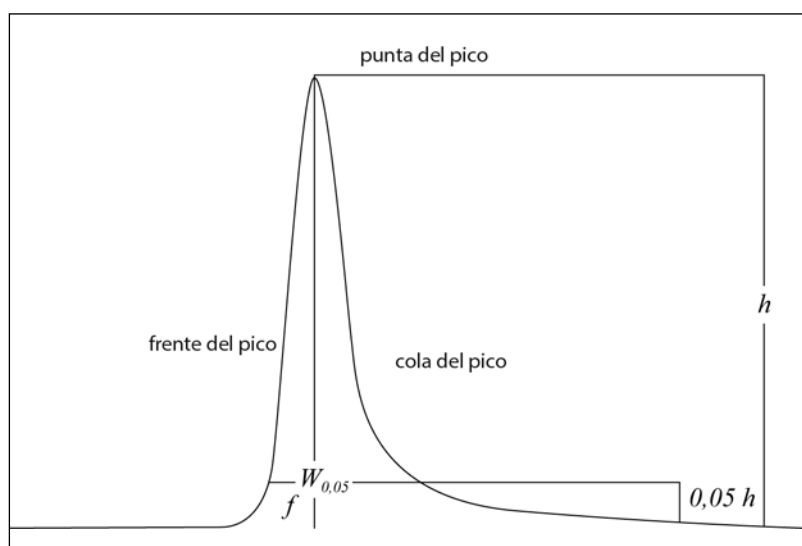
El factor de cola,  $T$ , que indica la simetría del pico, presenta valor igual a 1 cuando el pico es perfectamente simétrico. Ese valor aumenta a medida que la asimetría del pico se torna más pronunciada. En algunos casos, valores inferiores a 1 pueden ser observados. A medida que la asimetría del pico aumenta, la integración y la precisión se tornan menos confiables. El factor de cola es calculado según la expresión:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

en que,

$W_{0,05}$  = anchura del pico a 5% de la altura;

$f$  = valor de la porción anterior del pico, con relación a la anchura a 5% de la altura, de acuerdo con la **Figura 2**



**Figura 2** - Cromatograma representando la asimetría del pico.

#### ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Las pruebas de adecuabilidad del sistema son parte integrante de los métodos de cromatografía líquida. Son aplicadas con la finalidad de verificar si la resolución y la reproductibilidad del sistema cromatográfico están adecuadas para los análisis a ser realizados. Los principales parámetros necesarios para la verificación de la adecuabilidad del sistema son descritos a continuación.

La resolución,  $R$ , es función de la eficiencia de la columna,  $N$ , y es especificada para garantizar que sustancias eluidas próximamente, presenten separación satisfactoria sin interferencias mutuas.

Réplicas de inyecciones de la solución estándar son trabajadas, estadísticamente, para verificar si los requisitos para la precisión del análisis fueron alcanzados. A menos que especificado en la monografía individual, son utilizados los datos de cinco réplicas de inyecciones para calcular el desvío estándar relativo (DPR), si la especificación fuese igual o inferior a 2,0%. Si el desvío estándar relativo especificado fuese superior a 2,0%, los datos de seis réplicas deben ser utilizados.

El factor de cola,  $T$ , que indica la simetría del pico, es igual a 1 para picos perfectamente simétricos y mayor que 1 para picos que presentan asimetría. En algunos casos, valores menores que 1 pueden ser observados.

Estas pruebas son realizadas después de recoger los resultados de réplicas de inyecciones de la solución estándar u otra solución especificada en la monografía individual. La especificación de esos parámetros cromatográficos, en una monografía, no impide la modificación de las condiciones de análisis. Ajustes en las condiciones de trabajo, para alcanzar los parámetros de adecuabilidad del sistema, pueden ser necesarios. A menos que especificado en la monografía individual, los parámetros de adecuabilidad del sistema son determinados a partir de los datos obtenidos con el pico de la sustancia de interés. La precisión del sistema, demostrada por medio de réplicas de la solución estándar, debe ser alcanzada antes de las inyecciones de las soluciones muestras. La adecuabilidad del sistema debe ser verificada durante todo el análisis cromatográfico, por inyección de solución estándar en intervalos de tiempo apropiados. Cuando hubiere cambio significativo en el equipo o en un reactivo, las pruebas de adecuabilidad del sistema deben ser realizadas antes de las inyecciones de la muestra.

El análisis no será válido a menos que los requisitos de la prueba de adecuabilidad del sistema sean alcanzados.

#### 5.2.17.4.1 Cromatografía de iones

La cromatografía de iones se refiere al método de separación y determinación de iones utilizando cromatografía a líquido de alta eficiencia (CLAE). Esta técnica está basada en un proceso de separación de los componentes de la muestra entre dos fases: fase móvil y fase estacionaria. El proceso de separación es resultante de interacciones específicas entre las especies presentes en la muestra en ambas las fases. El mecanismo de interacción con la fase estacionaria es a cambio iónico, donde las columnas utilizadas son constituidas por un grupo funcional cargado, generalmente  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{NR}_3^+$  ligado a una matriz polimérica, como sílice o copolímero del tipo poliestireno-divinilbenceno. La fase móvil también contiene especies iónicas ocurriendo, de esta forma, una competición entre la distribución de las especies presentes en la muestra entre a fase móvil y la fase estacionaria. Para cada ion, el proceso de cambio está caracterizado por el equilibrio de distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria.

Los intercambiadores utilizados pueden ser clasificados en fuertes, medios y suaves, dependiendo del grupo funcional ligado a la matriz polimérica. Los intercambiadores iónicos fuertes son aquellos que se ionizan completamente en una amplia banda de pH, como grupo sulfónico y amonio cuaternario. El grado de disociación de los intercambiadores iónicos suaves y medios es dependiente del pH y, de esta forma, la capacidad de estos intercambiadores varía en función del pH. Se puede citar como ejemplo, el grupo carboxílico y poliamina.

Esta técnica permite que la conductividad eléctrica sea usada para la detección y determinación cuantitativa de los iones en solución, después de la separación. Generalmente, la cromatografía de iones con columna de cambio aniónica y detector por conductividad puede ser utilizada para la determinación de los iones  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{I}^-$ , entre otros. En virtud de la conductividad eléctrica ser una propiedad común a todas las especies iónicas en solución, el detector por conductividad tiene la capacidad de monitorear todas las especies iónicas. El problema que ocurre en la utilización de la conductividad eléctrica para cuantificar las especies iónicas eluidas puede ser causado por la alta conductividad de los iones presentes en la fase móvil, principalmente debido al ion sodio, imposibilitando la cuantificación de otros iones. Este problema es superado con el uso de un supresor del eluyente, posicionado después de la columna de separación, donde ocurre la conversión de los iones del eluyente en especies que contribuyen para una conductancia baja o nula. El ácido carbónico, resultante del cambio catiónico, es levemente disociado, poseyendo una baja conductividad (señal de conductividad de la línea base es menos significativa). De esta forma, la sensibilidad, para la determinación de aniones, puede ser aumentada significativamente, en un factor de 10 veces o superior, cuando son utilizados supresores.

Un equipo de cromatografía de iones consiste, básicamente, en el mismo sistema utilizado para CLAE. Este sistema consiste de una bomba de alta propulsión, una válvula de inyección con ansa de muestreo adecuada, columna de separación (para la separación de aniones debe ser utilizada una columna de cambio aniónico), una post-columna, caso necesario, para conversión de los iones del eluyente en especies con menor conductividad y un detector de conductividad.

#### PROCEDIMIENTO

Para operar el cromatógrafo de iones, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante. Las determinaciones son hechas por comparación con soluciones de referencia, conteniendo concentraciones conocidas del analito.

*Fase móvil:* preparar la fase móvil de acuerdo con las especificaciones recomendadas por el fabricante de la columna de cambio aniónico utilizada. Se recomienda la utilización de fase móvil compuesta por una mezcla de carbonato y bicarbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ), en la banda de concentración de 1,0 a 4 mmol/L, dependiendo de la columna utilizada. Utilizar el caudal de la fase móvil recomendada por el fabricante del equipo y de acuerdo con la columna de cambio iónico utilizada. Durante los análisis utilizando la detección por conductividad, regenerar la columna de supresión química, conforme recomendación del fabricante. Se recomienda la utilización de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 mol/L y posterior lavado con agua purificada.

*Calibración:* preparar al menos cuatro soluciones de referencia del elemento a ser determinado, cubriendo la banda de concentración recomendada por el fabricante del equipo para el analito en análisis e inyectar, separadamente, cada solución de referencia en el equipo, utilizando ansa de muestreo adecuada. Se recomienda el uso de ansa de muestreo de 20 a 100  $\mu\text{L}$ . Registrar los cromatogramas e integrar las señales en área o en altura de pico. Después de la calibración, trazar la curva de calibración. Preparar la solución de la muestra conforme indicado en la monografía, ajustando su concentración para que esta quede situada dentro de la banda de concentración de las soluciones de referencia. Inyectar la muestra en el cromatógrafo, registrar la lectura y repetir esta secuencia tres veces, adoptando el promedio de las tres lecturas. Determinar la concentración del elemento por la curva de calibración. En el caso que sea hecha la determinación simultánea de varios aniones, pueden ser hechas soluciones de referencia conteniendo todos los analitos.

#### 5.2.17.5 CROMATOGRAFÍA A GAS

Cromatografía a gas (CG) es una técnica de separación cromatográfica basada en la diferencia de distribución de especies de una mezcla entre dos fases no miscibles, en la cual la fase móvil es un gas de arrastre que se mueve a través de la fase estacionaria contenida en una columna. CG está basada en el mecanismo de adsorción, distribución de masa o exclusión por tamaño. Es aplicada a sustancias y sus derivados que se volatilizan bajo las temperaturas em-

pleadas, y es utilizada para identificación, prueba de pureza y determinación cuantitativa.

Cuando un constituyente vaporizado es conducido por el gas de arrastre para dentro de la columna, él es particionado entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria por un proceso de distribución contracorriente dinámico, presentando una retención mayor o menor debido a fenómenos de sorción y desorción sobre a fase estacionaria.

## EQUIPO

El equipo consiste en una fuente de gas de arrastre y un controlador de flujo, una cámara de inyección, una columna cromatográfica contenida en un horno, un detector y un sistema de adquisición de datos (o un integrador o registrador). El gas de arrastre circula por la columna con flujo y presión controlados y sigue directamente para el detector.

El inyector, la columna y el detector presentan temperatura controlada. La cromatografía se realiza a temperatura constante o utilizando un programa de temperatura adecuado. Los compuestos que harán la cromatografía, tanto en solución como gases, son inyectados, entrando en contacto con el gas de arrastre en la cámara de inyección. Dependiendo de la configuración del equipo, la mezcla a ser analizada debe ser inyectada directamente en la columna o debe ser vaporizada en la cámara de inyección y mezclada en el gas de arrastre antes de entrar en la columna.

Una vez en la columna, los constituyentes de la mezcla son separados en función de sus diferentes índices de retención lineal, los cuales son dependientes de la presión de vapor y del grado de interacción con la fase estacionaria. El índice de retención, que define la resolución, el tiempo de retención y la eficiencia de la columna con relación a los componentes de la mezcla, también es dependiente de la temperatura. El uso de programas de temperatura para el horno donde está la columna presenta una ventaja en la eficiencia de separación de los compuestos que se comportan diferentemente en la presión de vapor.

Los compuestos salen separados de la columna, pasando por un detector, que responde a cantidad de cada compuesto presente. El tipo de detector a ser utilizado depende de la naturaleza de los compuestos a ser analizados y es especificado en cada monografía. Los detectores son calentados para evitar la condensación de los compuestos eluidos. La salida del detector está dada en función del tiempo de retención, generando un cromatograma, que consiste de una serie de picos en el eje del tiempo. Cada pico representa un compuesto de la mezcla vaporizada, a pesar de que algunos picos puedan salir superpuestos. El tiempo de elución es característico de un compuesto individual y la respuesta del instrumento, medido como el área del pico o la altura del pico, es en función de la cantidad presente.

### Inyectores

Inyecciones directas de soluciones es el modo usual de inyección, a menos que sea indicado diferentemente en la monografía. La inyección puede realizarse directamente

en la cabeza de la columna utilizando una jeringa o una válvula de inyección, o en una cámara de vaporización que puede estar equipada con un divisor de flujo. La cantidad de muestra que puede ser inyectada en una columna capilar sin saturar es menor cuando comparada a la cantidad que puede ser inyectada en columnas empaquetadas. Columnas capilares, sin embargo, frecuentemente son utilizadas con inyectores capaces de dividir la muestra en dos fracciones (modo *split*), una menor que entra en la columna y otra mayor que es descartada. Esos inyectores pueden ser utilizados sin divisor de muestra (modo *splitless*) para análisis de componentes en menor cantidad o en trazos.

Las inyecciones de la fase de vapor pueden ser efectuadas por sistema de inyección en espacio confinado (*headspace*) estático o dinámico.

Sistema de inyección en espacio confinado (*headspace*) estático (*purge y trap*) incluye un dispositivo de concentración, por donde las sustancias volátiles de la solución son arrastradas hasta una columna adsorbente, mantenida a baja temperatura donde son adsorbidas. Las sustancias retenidas son entonces desorbidas en una fase móvil por calentamiento rápido de la columna adsorbente.

Sistema de inyección en espacio confinado (*headspace*) dinámico incluye una cámara de calentamiento de las muestras, termostáticamente controlada, en la cual se colocan frascos (*viales*) cerrados donde muestras sólidas o líquidas son colocadas por un período de tiempo determinado, para permitir que los componentes volátiles de las muestras alcancen el equilibrio entre la fase no gaseosa y la fase de vapor. Después de establecido el equilibrio, una cantidad pre-determinada del espacio confinado del frasco es inyectada en el cromatógrafo.

### Fases estacionarias

Las fases estacionarias están contenidas en columnas que pueden ser:

- Una columna capilar de sílice fundida cuya pared está revestida con la fase estacionaria;
- Una columna empaquetada con partículas inertes impregnadas con la fase estacionaria;
- Una columna empaquetada con la fase estacionaria sólida. Las columnas capilares, usualmente hechas de sílice fundida, presentan un diámetro interno ( $\emptyset$ ) de 0,10 a 0,53 mm y un largo de 5 a 60 m. La fase líquida o estacionaria que puede estar químicamente ligada a la superficie interna, es una película de 0,1 a 5,0  $\mu$ m de espesor, a pesar de que fases estacionarias no polares puedan alcanzar 5  $\mu$ m de espesor.

Las columnas empaquetadas, de vidrio o metálicas, presentan largo de 1 a 3 m con un diámetro interno ( $\emptyset$ ) de 2 a 4 mm. Las fases estacionarias consisten, generalmente, en polímeros porosos o soportes sólidos impregnados con la fase líquida llegando a, aproximadamente, 5% (p/p). Columnas de alta capacidad, con la fase líquida llegando a, aproximadamente, 20% (p/p), son utilizadas para una amplia banda de compuestos y para determinación de com-

puestos con bajo peso molecular como el agua. La capacidad requerida influencia la elección del soporte sólido.

Los soportes para análisis de compuestos polares en columnas empaquetadas con una fase estacionaria de baja polaridad y baja capacidad deben ser inertes para evitar una excesiva prolongación de los picos. La reactividad de los materiales de soporte puede ser reducida por silanización antes del llenado con la fase líquida. Generalmente se utiliza tierra de diatomeas lavada con ácido y calcinada. Los materiales están disponibles en diversos tamaños de partícula, siendo las partículas más comúnmente utilizadas de 150 a 180  $\mu\text{m}$  (80 a 100 mesh) y de 125 a 150  $\mu\text{m}$  (100 a 120 mesh).

#### *Fases móviles*

El suprimento del gas de arrastre puede ser obtenido a partir de un cilindro de alta presión o por un generador de gas de alta pureza. En ambos los casos, el gas pasa por una válvula de reducción de presión y el flujo es medido para, entonces, entrar en la cámara de inyección y en la columna. El tiempo de retención y la eficiencia del pico dependen de la calidad del gas de arrastre; el tiempo de retención es directamente proporcional al largo de la columna y la resolución es proporcional a la raíz cuadrada del largo de la columna. Para columnas empaquetadas, el promedio de flujo del gas acarreador está usualmente expresado en mililitros por minuto, a la presión atmosférica y temperatura ambiente. El flujo medio es medido en la salida del detector, o con un dispositivo mecánico calibrado o con un tubo de "burbujeo", mientras la columna está con temperatura de funcionamiento. La velocidad lineal del gas de arrastre a través de la columna empaquetada es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del diámetro interno de la columna para un dado volumen de flujo. Flujos de 60 ml/min en una columna de 2 mm de diámetro interno y 15 ml/min en una columna de 2 mm de diámetro interno, proporcionan velocidades lineales idénticas y, con eso, tiempos de retención similares. A menos que especificado en la monografía, el promedio de flujo para columnas empaquetadas es de, aproximadamente, 30 a 60 ml/min. Para columnas capilares, la velocidad del flujo lineal es usualmente utilizada en lugar del promedio de flujo. Esto es determinado a partir del largo de la columna y del tiempo de retención de una muestra de metano diluida, utilizando un detector por ionización de llama. Operando a altas temperaturas, existe presión de vapor suficiente para que ocurra una gradual pérdida de la fase líquida, un proceso llamado sangrado.

Helio o nitrógeno son, generalmente, empleados como gases de arrastre para columnas empaquetadas, mientras que los gases de arrastre utilizados para columnas capilares son nitrógeno, helio e hidrógeno.

#### *Detectores*

Detectores por ionización de llama son los más utilizados pero, dependiendo de la finalidad de la análisis, otros detectores pueden ser empleados, incluyendo: conductividad térmica, captura de electrones, nitrógeno-fósforo, espectrometría de masas, espectrometría en el infrarrojo con

transformada de Fourier, entre otros. Para análisis cuantitativos, los detectores deben presentar una amplia variación dinámica lineal: la respuesta debe ser directamente proporcional a la cantidad de compuesto presente en el detector en una amplia banda de concentraciones. Detectores por ionización de llama presentan una amplia banda lineal y son sensibles a la mayoría de los compuestos. La respuesta de los detectores depende de la estructura y de la concentración del compuesto y del promedio de flujo de la combustión, del aire y del gas de arrastre. A menos que especificado diferentemente en la monografía, detectores por ionización de llama operan tanto con helio cuanto con nitrógeno como gas de arrastre para columnas empaquetadas, y con helio o hidrógeno para columnas capilares.

Los detectores por conductividad térmica emplean hilo de metal calentado localizado en la corriente del gas de arrastre. Cuando un analito entra en el detector con el gas de arrastre, la diferencia en la conductividad térmica de la corriente de gas de arrastre (gas y componentes de la muestra) relativo a un flujo de referencia del gas de arrastre sin analito es medida. En general, detectores por conductividad térmica responden uniformemente a compuestos volátiles sin considerar su estructura; no obstante, son considerados menos sensibles que el detector por ionización de llama.

Detectores por ionización de llama alcalina, también llamado NP o detector nitrógeno-fósforo, contienen una fuente termiónica, con una sal metal álcali o un elemento de vidrio conteniendo rubidio u otro metal, que resulta en una eficiente ionización de nitrógeno orgánico y compuestos conteniendo fósforo. Es un detector selectivo que presenta baja respuesta para hidrocarburos.

Detectores por captura de electrones contienen una fuente radioactiva de radiación ionizante. Exhiben una respuesta extremadamente alta a compuestos halogenados y grupo nitró, pero poca respuesta a hidrocarburos. La sensibilidad aumenta con el número y el peso atómico de átomos de halógeno.

#### *Dispositivos para tratamiento de datos*

Estaciones de tratamiento de datos conectados en la salida de los detectores calculan el área y la altura de los picos, y presentan los cromatogramas completos conteniendo los parámetros de la corrida y los datos de los picos. Los datos de los cromatogramas pueden ser almacenados y reprocesados por integración electrónica u otro tipo de cálculo que sea necesario. Esas estaciones de tratamiento de datos son utilizadas también para programar los recorridos cromatográficos.

#### PROCEDIMIENTO

Columnas empaquetadas y capilares deben ser condicionadas antes del uso hasta que la línea de base esté estable. Eso debe ser realizado operando a una temperatura arriba de la especificada por el método o por repetidas inyecciones del compuesto o de la mezcla a realizar la cromatografía. El fabricante de la columna generalmente da instrucciones para el adecuado procedimiento de condicionamiento de la columna. En caso de polisiloxanos metil y fenil sustituidos

térmicamente estables, una secuencia especial aumenta la eficiencia y la inactividad: mantener la columna a la temperatura de 250 °C por 1 hora, con flujo de gas helio, para retirar el oxígeno y solvente. Para el flujo de helio, calentar hasta 340 °C por 4 horas, y entonces reducir el calentamiento hasta temperatura de 250 °C, y condicionar con flujo de helio hasta la estabilidad de la línea de base.

Después del procedimiento de condicionamiento, equilibrar la columna, el inyector y el detector a las temperaturas y flujo de los gases especificados en la monografía hasta la obtención de una línea de base estable. Preparar la(s) solución(es) muestra y de referencia como descrito. Las soluciones deben estar exentas de partículas sólidas.

Muchos fármacos son moléculas polares reactivas. En ese caso, puede ser necesaria la conversión de estos a derivados menos polares y más volátiles, por tratamiento de los grupos reactivos con reactivos apropiados.

Los ensayos requieren comparación cuantitativa de un cromatograma con otro. La mayor fuente de error es la irreproducibilidad de la cantidad de muestra inyectada, marcadamente cuando inyecciones manuales son realizadas con el auxilio de una jeringa. Los efectos de variabilidad pueden ser minimizados por la adición de un estándar interno, un compuesto no interferente adicionado en la misma concentración en las soluciones muestra y estándar. El promedio de las respuestas del pico del analito en relación al estándar interno es comparado entre los cromatogramas de la muestra y del estándar. Cuando el estándar interno es químicamente similar a la sustancia a ser analizada, existe también una compensación para variaciones menores en la columna y en las características del detector. En algunos casos, el estándar interno puede ser conducido a través de la preparación de la muestra antes del análisis cromatográfico para controlar otros aspectos cuantitativos del ensayo. Inyectores automáticos aumentan la reproductibilidad de las inyecciones de las muestras y reducen la necesidad de estándares internos.

### 5.2.17.5.1 Cromatografía a gas en espacio confinado (*headspace*)

La cromatografía a gas en espacio confinado (*headspace*) es una técnica particularmente adecuada para la separación y determinación de compuestos volátiles presentes en muestras sólidas y líquidas. Este método está basado en el análisis de una fase de vapor en equilibrio con una fase sólida o líquida.

#### EQUIPO

El equipo consta de un cromatógrafo a gas al cual se adapta un dispositivo para la introducción de la muestra, que puede estar conectado a un módulo de programación que controla automáticamente la presión y la temperatura. Se es necesario, se puede acoplar un dispositivo de eliminación de solventes. La muestra a ser analizada es introducida en un frasco provisto de un obturador adecuado que lo cierra y de un sistema de válvulas que permite la entrada de un gas de arrastre. El frasco es colocado en una cámara termostatazada a determinada temperatura para la muestra ser examinada.

La muestra es dejada en esta temperatura por tiempo suficiente para permitir que se establezca el equilibrio entre la fase sólida y la fase gaseosa. El gas de arrastre es introducido en el frasco y, después de determinado tiempo, una válvula es abierta para permitir que el gas se expanda hasta la columna cromatográfica, arrastrando los componentes volátiles.

En lugar de utilizar un cromatógrafo especialmente adaptado para la introducción de las muestras, también se pueden utilizar jeringas herméticas y un cromatógrafo convencional. En este caso, el equilibrio entre las dos fases es conducido en una cámara separada y la fase de vapor es transferida para la columna, tomando las precauciones necesarias para evitar cualquier modificación del equilibrio.

#### PROCEDIMIENTO

Ajustar las condiciones de trabajo del equipo a fin de obtener una respuesta satisfactoria, utilizando las soluciones de referencia.

##### *Calibración directa*

Introducir separadamente, en frascos idénticos, la preparación a examinar y cada una de las soluciones de referencia, según las condiciones descritas en la monografía y evitando el contacto entre la muestra y el dispositivo de inyección. Cerrar herméticamente los frascos e introducirlos en la cámara termostatazada a temperatura y presión descritas en la monografía. Después de alcanzar el equilibrio, proceder a análisis cromatográfico en las condiciones descritas.

##### *Adición de estándar*

Añadir, a una serie de frascos idénticos, volúmenes iguales de la solución a examinar. Añadir a todos los frascos, excepto a uno de ellos, cantidades crecientes de una solución de referencia, de concentración conocida de la sustancia a examinar. De este modo, se obtiene una serie de preparaciones conteniendo cantidades crecientes de determinada sustancia. Cerrar herméticamente los frascos e introducirlos en la cámara termostatazada, según condiciones de temperatura y presión descritas en la monografía. Después de alcanzar el equilibrio, proceder al análisis cromatográfico en las condiciones descritas.

Calcular la ecuación de la recta por regresión lineal, utilizando el método de los mínimos cuadrados y, a partir de ella, obtener la concentración de la sustancia en examen en la preparación de la muestra, indicada por el intercepto de la ecuación.

## 5.2.18 POLAROGRAFIA

La polarografía, método analítico electroquímico, se fundamenta en la medida de la corriente eléctrica resultante de la electrólisis de sustancias electroactivas (reducibles u oxidables) bajo determinado potencial de electrodo y condiciones controladas. En otras palabras, la técnica implica en el registro del aumento de la corriente en electrodo polarizable, durante la electrólisis de sustancia disuelta en el medio electrolítico, en función del aumento de la ten-



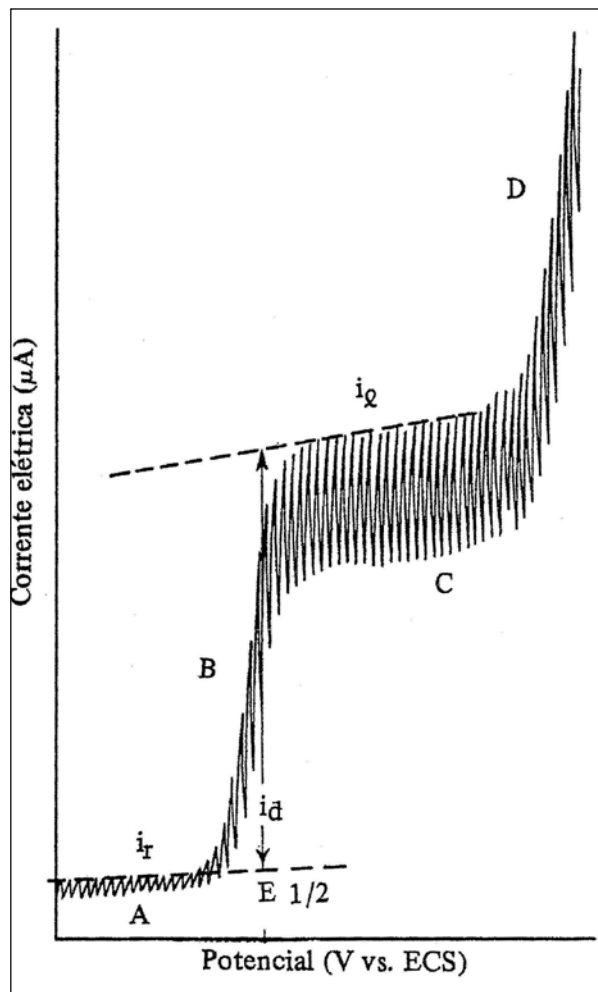
sión aplicada al sistema. El gráfico de esta evolución de la corriente con relación a la tensión – el polarograma – da informaciones cuali y cuantitativas sobre constituyentes electro reductibles o electro oxidables de la muestra.

Entre las variantes de metodología polarográfica, la más simple es la técnica en corriente continua. Requiere, a ejemplo de la potenciometría, el empleo de dos electrodos, el de referencia (generalmente electrodo de calomelano saturado, ECS) y el microelectrodo indicador (generalmente electrodo de mercurio goteante, EMG). En algunos casos se emplea un tercer electrodo, auxiliar. El ECS – de elevada área superficial – da potencial constante durante el ensayo, mientras el EMG – gotas de mercurio de dimensiones reproducibles fluyendo periódicamente de la extremidad de capilar ligado al depósito del metal – asume el potencial que le es dado por la fuente externa. El equipo polarográfico comprende, además de los electrodos, la célula polarográfica (cuba de electrólisis), fuente de alimentación variable, dotada de voltímetro y microamperímetro (galvanómetro) y registrador gráfico o digital.

De forma simplificada, la técnica consiste en la disolución de la muestra (el método tiene sensibilidad para concentraciones de especie electroactiva en la banda de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  M) en electrolito de soporte, responsable del mantenimiento de pequeña corriente residual, pero que se muestra inerte en la banda de potencial de transformación de la muestra (ventana de potencial). Inicialmente, sin aplicación de tensión en la fuente, (potenciostato de precisión), la tensión suministrada al microelectrodo es nula y no habrá indicación de corriente en el microamperímetro. El creciente aumento de tensión hará con que un pequeño potencial alcance los electrodos. Bajo esta tensión, además reducida, eventuales impurezas del electrolito soporte y pequeñas concentraciones de oxígeno pueden sufrir reducción en el EMG (cátodo, en este caso), reduciéndose y provocando la indicación de pequeño paso de corriente. La elevación progresiva de la tensión aplicada acentuará el proceso de reducción y el aumento casi proporcional de la corriente. Se alcanza, finalmente, el potencial necesario a la reducción del analito en la solución de la muestra, lo que se refleja en elevación acentuada de la corriente leída en el microamperímetro (galvanómetro) y registrada en el polarograma. Hay, sin embargo, límite para la proporcionalidad de la elevación tensión-corriente. Mientras la corriente se eleva (y la reducción se procesa), ocurre disminución progresiva de la concentración de la especie electroactiva original junto a la superficie del electrodo. En dado momento – la velocidad de la electrólisis siendo constante – tal concentración alcanza nivel insuficiente para permitir elevación adicional de la corriente y esta última pasa a ser limitada por la difusión con la cual la especie electroactiva consigue difundirse en el seno (interior) de la solución electrolítica para la superficie del EMG. Surge el nivel observado en el polarograma (**Figura 1**), siendo la corriente medida – entonces denominada corriente de difusión – un parámetro proporcional a la concentración de especie electroactiva en la muestra (aspecto cuantitativo de la polarografía). Superado determinado nivel de tensión, la corriente vuelve a elevarse. Ese aumento es causado por la reacción del electrolito soporte. Su presencia, en elevadas concentraciones, impide

que las moléculas electroactivas de la muestra alcancen el microelectrodo por migración eléctrica y asegura, por eso, que la corriente límite sea efectivamente regulada apenas por difusión.

Al emplearse un microelectrodo de mercurio goteante, la superficie del electrodo es constantemente renovada (se forma gota nueva cada 3-5 segundos), ocurriendo, de ahí, variación en la corriente medida dentro de dado intervalo; la corriente es más baja cuando la gota se forma, llegando al máximo en el instante de la caída. El fenómeno explica la forma “diente de sierra” característica de la onda polarográfica.



**Figura 1 - Polarograma de especie electroreducible.**

#### POLAROGRAMA

Es ilustrado en la **Figura 1** un polarograma típico (EMG), caracterizado por 4 fases distintas. El segmento A es debido a la corriente capacitiva,  $i_c$ , incorporada a la corriente farádica,  $i_p$ , resultante de la oxidación o reducción de impurezas del electrolito soporte, o de la muestra y pequeñas concentraciones de oxígeno, cuando este no es retirado por completo de la solución. El conjunto de estas corrientes se denomina corriente residual,  $i_r$  ( $i_r = i_c + i_p$ ). En el segmento B del polarograma ocurre la corriente farádica,  $i_f$ , debido a la conversión de la sustancia en ensayo. La electrodescomposición lleva a la escasez de esta sustancia junto al microelectrodo, verificándose el nivel (segmento C) donde aparece la corriente límite,  $i_l$ . Esta comprende la suma de

las corrientes residual y de difusión ( $i = i_r + i_d$ ) en que la corriente de difusión – proporcional a la concentración de la especie electroactiva en la muestra – tiene su valor determinado por:

$$i_d = i_l + i_r$$

Dos otras corrientes indeseables – la de migración y la de convección – pueden incorporar la corriente límite. La primera es suprimida por el empleo de electrolito soporte inerte en la banda de potencial empleada, en concentraciones, en el mínimo, 100 veces mayores que las de la especie electroactiva.

La corriente de convección, a su vez, es eliminada por la no agitación de la solución.

Finalmente, el segmento D del polarograma, en el cual ocurre reversión de la proporcionalidad tensión-corriente, corresponde a la reducción de otras especies electroactivas, cuando presentes, o, más frecuentemente, a la electrólisis del soporte.

#### Ecuación de Ilkovic

A ecuación de Ilkovic establece relaciones entre variables comprendidas en la medida polarográfica y la corriente de difusión en el EMG:

$$i_d = 708nD^{1/2}Cm^{3/2}t^{1/2}$$

en que

$i_d$  = corriente de difusión, en  $\mu\text{A}$

708 = constante dependiente de diversos parámetros, incluyendo la unidad adoptada para las variables, dimensión de la gota de mercurio e instante de la medida de  $i_d$ .

$n$  = número de electrones necesarios a la reducción u oxidación de una molécula o ion de sustancia electroactiva,

$D$  = coeficiente de difusión, en  $\text{cm}^2/\text{s}$ ,

$C$  = concentración de sustancia electroactiva, en milimoles/L,  $m$  = masa del flujo de mercurio, en  $\text{mg}/\text{s}$ ,

$t$  = tiempo de vida de la gota, en s.

La constante 708 – englobando constante natural y el valor del faraday – es establecida para operación a 25 °C y es aplicable a la polarografía de corriente continua muestreada, en la cual, en vez del registro continuo de corriente, se efectúa apenas la lectura de la corriente al término de la vida de la gota de mercurio, permitiendo obtención de polarograma lineal. No obstante, al emplearse instrumentos dotados de amortiguador de “diente de sierra” en el registrador, se considera la corriente media de los pulsos. La corriente de difusión obtenida según la ecuación de Ilkovic pasa a ser a media para toda la vida de la gota de mercurio. En este caso la constante adquiere el valor 607.

Las variables comprendidas en la ecuación de Ilkovic deben ser controladas para que la corriente de difusión sea efectivamente proporcional a la concentración de especie electroactiva en la muestra analizada. Algunos iones y moléculas orgánicas en solución acuosa modifican su coeficiente de difusión a la razón de 1 a 2% para cada grado

centígrado aumentado, tornando necesario que la célula polarográfica tenga su temperatura controlada con tolerancia de  $\pm 0,5$  °C. Los parámetros  $m$  y  $t$ , relacionados con dimensión y velocidad de renovación de la gota de mercurio, dependen de la geometría del capilar, siendo la corriente de difusión proporcional a la raíz cuadrada de la altura de la columna de mercurio. Alturas adecuadas – midiéndose de la extremidad del capilar hasta el nivel de mercurio en el depósito – se encuentran entre 40 y 80 cm. El diámetro interno del capilar en este caso es de 0,04 mm para largos entre 6 y 15 cm. La altura exacta del capilar es ajustada para permitir la formación de una gota cada 3-5 segundos, con circuito abierto y capilar inmerso en el electrolito bajo ensayo.

Así, si durante un ensayo en particular todos los parámetros – a excepción de la concentración de la especie electroactiva – fueren mantenidos constantes, la ecuación de Ilkovic puede ser escrita como

$$i_d = KC$$

en que K representa el conjunto de variables mantenidas constantes.

Esta relación directa entre corriente de difusión y concentración es usualmente adoptada mediante la determinación previa de la corriente de difusión de solución estándar de referencia, de concentración conocida. En seguida, bajo condiciones idénticas, se determina la corriente de difusión de la muestra y, finalmente, su concentración:

$$\frac{(i_d)_P}{(i_d)_A} = \frac{C_P}{C_A}$$

en que P y A corresponden, respectivamente, a estándar y muestra.

Una vez que polarógrafos, en su mayoría, son dotados de registradores automáticos, es más fácil determinar gráficamente corrientes de difusión por la medida de la altura de la onda polarográfica (ver **Figura 1**). Los valores anotados, en cm, pueden ser directamente aplicados a la fórmula, sin necesidad de su conversión en unidades de corriente eléctrica:

$$\frac{A_P}{A_A} = \frac{C_P}{C_A}$$

en que  $A_P$  y  $A_A$  corresponden a las alturas de las ondas polarográficas del estándar y de la muestra, respectivamente.

#### Potencial de media onda

La medida de la altura de la onda polarográfica para fines de análisis cuantitativo debe ser efectuada trazándose líneas rectas junto a los picos de las oscilaciones de la corriente residual y de la corriente límite y uniéndose, por medio de tercera recta paralela al eje de las abscisas, las prolongaciones de las dos primeras. La recta vertical es trazada pasando por el punto de inflexión de la onda polarográfica, correspondiendo a la mitad de la distancia entre la corriente resi-

dual y la corriente límite ( $I = 1 / 2i_a$ ). La proyección de esta recta sobre el eje de las ordenadas da el llamado potencial de media onda, parámetro empleado para caracterizar sustancias electroactivas (aspecto cualitativo de la polarografía). El potencial de media onda,  $E_{1/2}$ , está dado en volts *versus* ECS (electrodo de referencia), salvo cuando hubiere especificación diferente, y su valor como parámetro de identificación deduce de su independencia de la concentración y características del EMG. No obstante, este parámetro varía en función de la composición, pH y temperatura del medio electrolítico. Cabe resaltar que, para los equipos modernos, la medida de la altura de la onda polarográfica puede ser hecha automáticamente empleando programas específicos para adquisición y procesamiento de datos.

#### Eliminación de oxígeno

El oxígeno es reducido en el EMG en dos etapas, convirtiéndose inicialmente en peróxido de hidrógeno y, en seguida, en agua. El hecho de tales reacciones ocurren en potenciales más negativos que cero volts, *versus* ECS, pudiendo así interferir con la onda polarográfica de la muestra, torna necesario eliminar el gas disuelto en la solución previamente a la determinación. La mejor forma consiste en burbujear nitrógeno exento de oxígeno a través de la solución durante un período de 10 a 15 minutos inmediatamente antes del ensayo, tomando la precaución de previamente saturar el nitrógeno (para evitar alteraciones en la solución electrolítica debidas a la evaporación) burbujéandolo a través de pequeño volumen de solución electrolítica en recipiente separado.

Es importante mantener la cuba electrolítica parada y sin vibraciones durante el registro polarográfico con el intuito de evitar la formación de corrientes de convección. En consecuencia, es necesario retirar el tubo de nitrógeno de la solución durante el registro, y dejar el tubo sobre la superficie de la solución para llenar la parte superior de la célula polarográfica con nitrógeno (N) previniendo, así, la entrada de aire en la célula polarográfica. Soluciones alcalinas pueden ser desoxigenadas por la adición de bisulfito de sodio, siempre que este no interactúe con integrantes de la solución electrolítica.

#### Máximo polarográfico

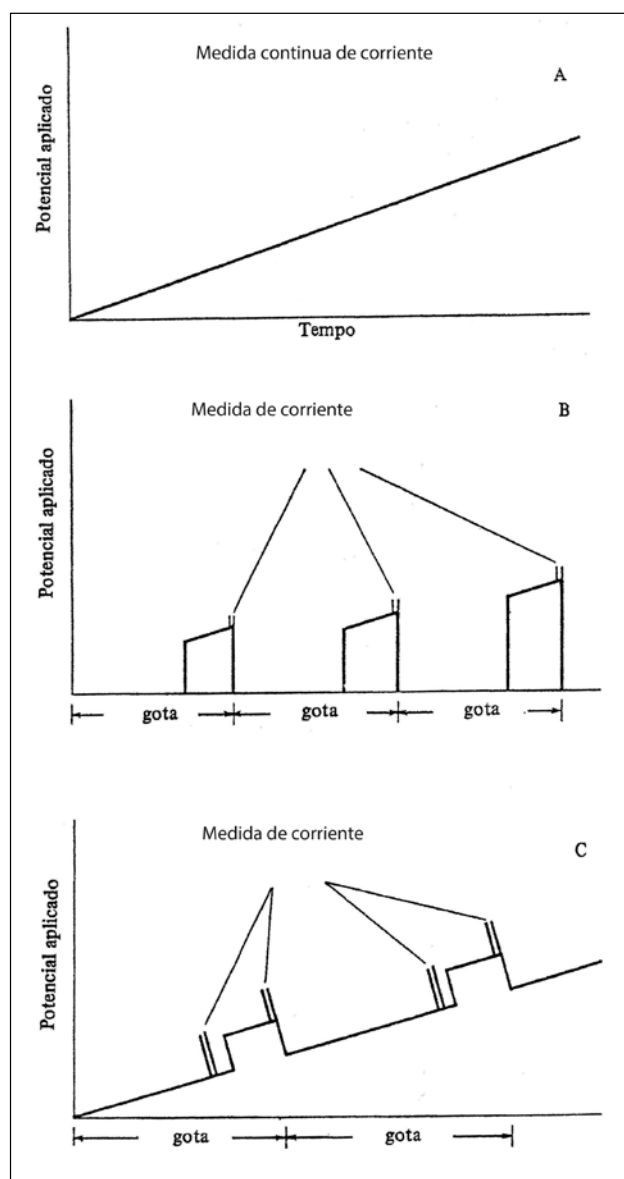
Efectuada la reducción de la especie electroactiva (EMG catodizado), muchas veces la onda polarográfica se eleva acentuadamente, muchas veces, antes de caer, de forma igualmente acentuada, hasta el valor de la corriente límite. El fenómeno es denominado máximo polarográfico y la corriente correspondiente recibe el nombre de corriente de adsorción ( $i_a$ ). Trae el inconveniente de dificultar la medida de la onda polarográfica (corriente de difusión) y sus causas – todavía poco claras – comprenden la adsorción de electrolito a la superficie de la gota de mercurio. La eliminación del máximo polarográfico es, sin embargo, fácilmente efectuada mediante adición de cantidades diminutas de determinados tensoactivos (supresores de máximo) al medio electrolítico. Sobresalen, para tal fin, el uso de solución de gelatina a 0,005% (p/v) y solución de rojo de metilo a 0,01% (p/v), entre otras.

#### Advertencia

Vapores de mercurio son tóxicos. Al manosear el metal, trabajar en área ventilada y evitar derrames que, en el caso que ocurran, deben ser inmediata y cuidadosamente recogidos.

#### POLAROGRAFIA DE PULSO

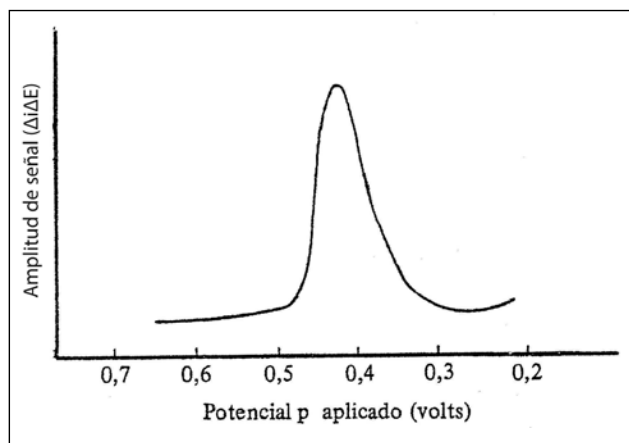
Polarografía de pulso consiste en una variante de técnica, superior, por la precisión y sensibilidad, a la polarografía de corriente continua en el dosificación y en la identificación de elevado número de sustancias en bajas concentraciones, incluyendo elementos de trazo, metabolitos y, evidentemente, fármacos. Su sensibilidad, cerca de 10 veces más elevada que la de la polarografía DC, permite determinaciones de  $10^{-6} M$ .



**Figura 2 - Medida de la corriente en relación al tiempo en la polarografía de corriente continua (A); en la polarografía de pulso (B); y en la polarografía de pulso diferencial (C).**

En lugar de la aplicación linealmente progresiva de potencial y medida continua de la corriente desarrollada, la polarografía de pulso comprende la aplicación de pulsos de po-

tencial creciente al EMG, coincidentes con el período final de vida de las gotas de mercurio, cada pulso presentando potencial ligeramente superior al anterior. La corriente, por su vez, es muestreada en el instante final de duración del pulso de potencial, período en el cual la corriente capacitiva adquiere valor prácticamente nulo y la corriente residual se compone casi que exclusivamente de la corriente de difusión.



**Tabla 2** - Polarograma obtenido en la polarografía de pulso diferencial.

Por otro lado, la técnica de pulsos no provoca disminución acelerada de la camada de difusión (concentración de especies electroactivas junto al electrodo), propiciando la obtención de corrientes de difusión más elevadas para concentraciones equivalentes. De ahí el aumento de sensibilidad inherente a la técnica. Otro aspecto favorable de la polarografía de pulso es la mayor facilidad en la medida de la corriente límite, exenta de oscilaciones, al contrario de lo que ocurre en la polarografía de corriente continua.

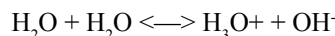
En la polarografía de pulso diferencial, pulsos constantes, de pequeña amplitud, son superpuestos a una rampa de potencial de tensión linealmente creciente. La medida de la corriente es efectuada dos veces cada pulso – inmediatamente antes de la aplicación del pulso y, nuevamente, en su instante final – registrándose apenas la diferencia entre los dos valores medidos (**Figura 2**). El registro gráfico de este sistema de medida diferencial da una curva semejante a la derivada de la onda polarográfica, mostrando pico característico (**Figura 3**). El potencial del pico polarográfico corresponde a  $E_{1/2} - \Lambda/2$  en que  $\Lambda E$  representa la altura del pico. Gracias a la naturaleza del polarograma, que presenta picos en vez de ondas polarográficas tradicionales, la polarografía de pulso diferencial propicia resolución más elevada, a punto de permitir determinaciones simultáneas de especies electroactivas con potenciales de media-onda próximos entre sí, en concentraciones de la orden de  $10^{-7}M$ .

## 5.2.19 DETERMINACIÓN DEL PH

### DETERMINACIÓN POTENCIOMÉTRICA DEL pH

El valor de pH es definido como la medida de la actividad del ion hidrógeno de una solución. Convencionalmente es usada la escala de la concentración de ion hidrógeno de

la solución. El agua es un electrolito extremadamente suave, cuya autoionización produce ion hidronio (hidrógeno hidratado) e ion hidróxido:



Las concentraciones del ion hidronio en las soluciones acuosas pueden variar entre límites amplios, que experimentalmente

$$pH = -\log [H_3O^+] = \log 1/[H_3O^+],$$

Desta forma, a escala de pH é uma escala invertida em relação às concentrações de ion hidrônio, ou seja, quanto menor a concentração de ion hidrônio, maior o valor do pH.

A determinação potenciométrica do pH é feita pela medida diferença de potencial entre dois eletrodos adequados, imersos na solução em exame. Um destes eletrodos é sensível aos íons hidrogênio e o outro é o eletrodo de referência, de potencial constante.

A equação que expressa a medida potenciométrica de uma célula é :

$$pH = pH_t = (E - E_t) / K,$$

en que

$E$  = potencial medido cuando la célula contiene la solución muestra,

$E_t$  = potencial medido cuando la célula contiene la solución tampón,

$pH$  = valor de pH en la solución muestra

$pH_t$  = valor de pH en la solución tampón, y

$K$  = variación del potencial por unidad de variación de pH – teóricamente equivale a  $0,0591631 + 0,000198(t-25)$ , en que  $t$  corresponde a la temperatura en la cual se opera.

El valor de pH está expresado por la ecuación en relación al pH de la solución estándar ( $pH_p$ ) y determinado en medidor de pH utilizando electrodo de vidrio.

Los aparatos comercialmente utilizados para la determinación de pH son instrumentos potenciométricos, provistos de amplificadores electrónicos de corriente con célula de vidrio calomelano, los cuales son capaces de reproducir valores correspondientes a 0,02 de unidades de pH. La escala de pH es calibrada no sólo en milivolts, pero también en unidades correspondientes de pH. De esa forma, no hay necesidad de aplicarse la ecuación arriba, que traduce la medida electrométrica de pH. Una vez que las medidas de actividad hidrogénica son sensibles a variaciones de temperatura, todos los medidores de pH son equipados con ajuste electrónico de temperatura.

### Soluciones tampón para calibración del medidor de pH

Son empleadas buscando la medición del aparato, permitiendo linealidad en las respuestas con relación a las alteraciones de potencial observadas. Las más importantes son: tetraoxalato de potasio 0,05 M, fosfato equimolar 0,05 M,



tetraborato de sodio 0,01 M, carbonato de sodio y hidróxido de calcio saturado a 25 °C.

Las soluciones tampón son preparadas de la siguiente manera:

- **Tetraoxalato de potasio, 0,05M** – Reducir el tetraoxalato de potasio a polvo fino y desecar en desecador con sílice. Disolver exactamente 12,71g de  $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en agua para alcanzar 1000 ml.
- **Biftalato de potasio, 0,05M** – Reducir el biftalato de potasio a polvo fino y desecar a 110 °C hasta peso constante. Disolver exactamente 10,21g de  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , previamente desecado a 100 °C durante 1 hora, en agua, para alcanzar 1000 ml.
- **Fosfato equimolar, 0,05M** – Reducir el  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a polvo fino y desecar a 110 °C hasta peso constante. Disolver 3,55g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 3,40g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en agua, para alcanzar 1000 ml.
- **Tetraborato de sodio, 0,01M** – Desecar el tetraborato de sodio en desecador conteniendo solución acuosa de bromato de sodio hasta peso constante. Disolver 3,81g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , en agua, para alcanzar 1000 ml. Evitar absorción de dióxido de carbono.
- **Hidróxido de calcio, saturado a 25°C** – Reducir el hidróxido de calcio a polvo fino y desecar con sílice en desecador hasta peso constante. Transferir 5 g a balón

volumétrico y añadir agua hasta 1000 ml. Agitar bien y mantener en temperatura de  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , para adecuada saturación (aproximadamente 0.02 M). Decantar a 25°C antes de usar. Proteger para evitar absorción de dióxido de carbono.

- **Carbonato de sodio** – Desecar el carbonato de sodio en desecador con sílice gel hasta peso constante. Pesar exactamente 2,10 g. Desecar en estufa de 300 a 500 °C hasta peso constante. Pesar 2,65 g. Disolver ambas muestras en agua hasta 1000 ml.

Tales soluciones deben ser recién preparadas con agua exenta de dióxido de carbono y empleadas en plazo de tres meses, tomándose cautela para evitar el crecimiento de hongos y bacterias. Se acepta el empleo de conservantes desde que no interfiera en la medición potenciométrica del pH.

El agua utilizada en el preparado de las soluciones debe ser recientemente destilada, calentada a ebullición por, como mínimo, 15 minutos, enfriada y mantenida en recipiente impermeable al dióxido de carbono. Preparar, individualmente, las seis soluciones estándar y almacenarlas en frascos de vidrio o de polietileno adecuados. Observar el plazo de validez de las soluciones, una vez que el pH sufre alteraciones con el pasar del tiempo.

**Tabla 1** - Relación entre las temperaturas y los valores de pH de las soluciones-tampón para calibración del medidor de pH

Temperatura (°C)	Tetraoxalato de potasio 0,05M	Biftalato de potasio 0,05M	Fosfato equimolar	Tetraborato de sodio 0,01M	Hidróxido de calcio saturado a 25°C	Carbonato de sodio
10	1,67	4,00	6,92	9,33	13,00	10,18
15	1,67	4,00	6,90	9,27	12,81	10,12
20	1,68	4,00	6,88	9,22	12,63	10,07
25	1,68	4,01	6,86	9,18	12,45	10,02
30	1,68	4,01	6,85	9,14	12,30	9,97
35	1,69	4,02	6,84	9,10	12,14	9,93
40	1,70	4,03	6,84	9,07	11,99	-

## PROCEDIMIENTO

### Aferición del medidor de pH

Retirar el vaso de precipitados conteniendo solución de KCl en la cual está sumergido el electrodo cuando el medidor no está en uso;

Lavar el electrodo con chorros de agua destilada y secar con papel filtro;

Sumergir el electrodo en solución tampón de referencia, verificándose la temperatura en que se va a operar;

Ajustar el valor de pH hasta el valor de la tabla, mediante el valor de calibración;

Lavar el electrodo con varias porciones de la segunda solución tampón de referencia, sumergir el electrodo y verificar el valor de pH registrado. El valor de pH no debe presentar variaciones que superen 0,07 del valor de la tabla para la segunda solución estándar. Hay aparatos que poseen fras-

cos acoplados con detergentes aniónicos, empleados como soluciones de lavado entre cada una de las operaciones de aferición de los valores de pH. El agua también se presta a esa función;

Si no hubiere precisión en las medidas, verificar posibles daños en los electrodos y cambiarlos.

### Determinación del pH en la solución muestra

Después de la aferición conveniente, lavar el electrodo con agua (o soluciones propias) y con varias porciones de la solución muestra. Para dilución de las muestras, usar agua destilada exenta de dióxido de carbono;

La primera determinación da un valor variable, habiendo necesidad de proceder a nuevas lecturas. Los valores encontrados posteriormente no deberán variar más que 0,05 de unidad en tres lecturas sucesivas;

Para determinaciones que exijan alta precisión, las temperaturas de las soluciones tampón y muestra, de los electro-



dos y de las aguas de lavado no deben estar arriba de 2 °C entre sí. Así, para que se reduzcan los efectos de histéresis térmica o eléctrica de los electrodos, las soluciones deben estar a la misma temperatura por, como mínimo, 30 minutos antes del inicio de la operación;

Es importante que, después de la utilización del aparato, se conserve el electrodo en solución apropiada, normalmente de KCl.

Contaminaciones de las soluciones stock deben ser evitadas por la adopción de procedimientos sistemáticos, tales como el cierre inmediato de los frascos conteniendo las soluciones, a fin de prevenir introducciones accidentales de pipetas o bastones, el uso de pipetas individuales para cada solución.

#### DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DEL pH

Se basa en el empleo de soluciones indicadoras o de papeles indicadores, que tienen la propiedad de mudar de coloración conforme la variación del pH. En este caso, se trata de medida aproximada, indicando apenas una banda de valores, más o menos amplia, conforme el indicador empleado. La determinación es llevada a cabo adicionándose gotas de la solución indicadora a la solución en examen o humedeciéndose papeles indicadores con la solución en examen y observándose el cambio de coloración. Los colores desarrollados por los indicadores en diversas bandas de pH están relacionados en *Indicadores* (14.1)

#### ACIDEZ Y ALCALINIDAD: ENSAYOS RÁPIDOS

Una solución es considerada neutra cuando no modifica el color de los papeles azul y rojo de tornasol, o cuando el papel indicador universal adquiere los colores de la escala neutra, o cuando 1 ml de la misma solución toma color verde con una gota de azul de bromotimol SI (pH 7,0).

Es considerada *ácida* cuando toma color rojo el papel azul de tornasol o 1 ml toma color amarillo por una gota de rojo de fenol SI (pH 1,0 a 6,6).

Es considerada *levemente ácida* cuando toma color levemente rojo el papel azul de tornasol o 1 ml toma color anaranjado por una gota de rojo de metilo SI (pH 4,0 a 6,6).

Es considerada *fuertemente ácida* cuando toma color azul el papel de rojo de congo o 1 ml toma color de rojo por la adición de una gota de anaranjado de metilo SI (pH 1,0 a 4,0).

Es considerada *alcalina* cuando toma color azul el papel rojo de tornasol o 1 ml toma color azul por una gota de azul de bromotimol SI (pH 7,6 a 13,0).

Es considerada *levemente alcalina* cuando toma color de azul el papel rojo de tornasol o 1 ml toma color de rosa por una gota de rojo de cresol SI (PH 7,6 a 8,8).

Es considerada fuertemente alcalina cuando toma color de azul por una gota de timolftaleína SI (pH 9,3 a 10,5) o de rojo por una gota de fenolftaleína SI (pH 10,0 a 13,0).

## 5.2.20 DETERMINACIÓN DE AGUA

Muchas sustancias farmacopeicas se encuentran en la forma hidratada o contienen agua adsorbida, tornándose relevante su determinación por métodos específicos como el *método volumétrico* (5.2.20.1); *método de la destilación azeotrópica* (5.2.20.2), o *método semimicro* (5.2.20.3), siendo indicado en la monografía específica para cada sustancia.

### 5.2.20.1 MÉTODO VOLUMÉTRICO

Determinar el tenor de agua, por el método directo, salvo cuando hubiere otra especificación en la monografía específica de la sustancia en análisis.

#### MÉTODO DIRECTO

Se basa en la reacción cuantitativa del agua con solución anhídrica de dióxido de azufre y yodo en presencia de una solución tampón que reacciona con iones hidrógeno.

En la solución volumétrica, original, conocida como Reactivo de Karl Fischer, el dióxido de azufre y el yodo son disueltos en piridina y metanol. La muestra puede tanto ser titulada directamente (método directo) como por retorno (método indirecto).

#### Aparatos

Se admite el empleo de cualquier equipo que permita la exclusión adecuada de la humedad atmosférica y la determinación del punto final de la titulación. Para sustancias incoloras, es posible detectarse el punto de equivalencia por el cambio de color del reactivo, de amarillo canario para ámbar. Lo inverso es observado al adoptarse la titulación por retorno. Todavía, es más frecuente y preciso determinarse el final de la titulación electrométicamente. Comprende el uso de dispositivo eléctrico capaz de generar diferencia de potencial de 200 mV entre dos electrodos de platino inmersos en la solución a ser titulada. Al ser alcanzado el punto de equivalencia, ligero exceso de reactivo provoca elevación brusca del flujo de corriente entre 50 a 150 A, durante 30 segundos a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza de la muestra (el período es menor cuando la sustancia es soluble en el reactivo).

Algunos tituladores automáticos poseen mecanismo para cierre inmediato de la válvula que controla la entrada del titulante, así que detecta el cambio de potencial. Los aparatos comercialmente disponibles poseen un sistema cerrado que consiste de una o dos buretas automáticas, vaso de titulación, agitador magnético y electrodo específico. El aire en el sistema es mantenido seco, con el uso de desecantes adecuados.

#### Reactivo de Karl Fischer

Añadir 125 g de yodo a una solución conteniendo 670 ml de metanol y 170 ml de piridina. Dejar enfriar. Transfe-

rir 100 ml de piridina para probeta de 250 ml, mantenida fría en baño de hielo, pasar corriente de dióxido de azufre a través del solvente hasta que su volumen alcance 200 ml. Lentamente, y bajo agitación, añadir esa solución a la mezcla de yodo, fría, previamente preparada. Agitar hasta completa disolución del yodo y aguardar 24 horas antes de estandarizar. Cuando recién preparada, la solución reactiva neutraliza cerca de 5 mg de agua/ml, pero se deteriora con rapidez, por tanto, se recomienda a su estandarización inmediatamente antes del uso, o diariamente, cuando en uso continuo. Proteger de la luz cuando en uso. Almacenar el reactivo bajo refrigeración en frasco ámbar, provisto de tapa esmerilada hermética. Como opción al preparado del reactivo, se puede recurrir a soluciones reactivas comerciales. También, pueden ser utilizados reactivos comerciales que contengan otros solventes, base diferente de la piridina u otro alcohol que no el metanol. Esos reactivos pueden ser soluciones individuales u obtenidas por la mezcla de dos reactivos provenientes de soluciones distintas. Cuando la monografía especifique que el reactivo debe ser diluido, seguir las instrucciones del fabricante del producto. Como diluyente puede utilizarse metanol u otro solvente adecuado, como éter monoetílico de etilenoglicol.

#### Estandarización del reactivo

Colocar cantidad suficiente de metanol u otro solvente apropiado en el frasco de titulación para cubrir los electrodos y añadir cantidad suficiente de reactivo para suministrar el color característico de la orientación o la indicación de (100 ± 50) microamperes de corriente continua en ocasión de la aplicación de 200 mV entre los electrodos.

Para la determinación de trazos de agua (menos de 1%), es preferible usar reactivos con un factor de equivalencia de agua inferior a 2,0, como el tartrato de sodio dihidratado ( $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$ ), previamente desecado a 150 °C, por 3 horas. Pesar, rápidamente, de 150 a 350 mg de sal, exactamente pesados, por diferencia, en el frasco de titulación y titular hasta el punto de equivalencia. El título del reactivo, en mg de agua/ml de reactivo, es suministrado por la ecuación:

$$2x \left( \frac{18,02}{230,08} \right) \left( \frac{p}{v} \right)$$

en que

18,02 = peso molecular del agua

230,08 = peso molecular del tartrato de sodio di-hidratado

p = masa, en mg, de la porción de ensayo de sal,

v = volumen, en ml, de reactivo consumido en la titulación.

Para a determinación precisa de cantidad significativa de agua (más de 1%), utilizar agua como referencia. Transferir de 25 a 250 mg de agua, exactamente pesados, por diferencia, para el frasco de titulación y titular hasta el punto de equivalencia. Calcular el título del reactivo, T, en mg de agua/ml de reactivo, por la ecuación

$$T = \frac{P}{v}$$

en que

p = masa, en mg, del agua,

v = es el volumen, en ml, de reactivo consumido.

#### Procedimiento

Salvo cuando en la monografía esté especificado de modo diverso, transferir 35 a 40 ml de metanol, u otro solvente apropiado, para el recipiente de titulación y titular con el reactivo estandarizado hasta cambio visual o electrométrico, con el objetivo de eliminar toda la humedad que pueda estar presente (desconsiderar el volumen consumido, pues él no entra en los cálculos). Rápidamente, añadir al recipiente de titulación cantidad, exactamente pesada de la muestra, que contenga 10 a 250 mg de agua, mezclar y titular hasta cambio visual o electrométrico. Calcular el tenor de agua de la muestra, en mg, por la ecuación

$$\text{Tenor de agua (mg)} = v \times T$$

en que

v = volumen, en ml, de reactivo consumido;

T = título del reactivo.

#### MÉTODO INDIRECTO

Sigue el mismo principio del método directo, sin embargo, en ese caso, se incorpora exceso de reactivo a la muestra y, después de aguardarse el tiempo necesario a la reacción cuantitativa, se titula el exceso de reactivo con solución estándar de agua en metanol. Esa técnica, de uso irrestricto, es especialmente recomendada para sustancias que liberan, lentamente, su contenido de agua.

#### Aparatos y reactivo

Utilizar los mismos descritos en el método directo.

#### Estandarización de solución estándar de agua (método indirecto)

Preparar solución estándar de agua diluyendo 2 ml de agua en cantidad suficiente de metanol, u otro solvente adecuado, para completar 1000 ml. Estandarizar esa solución conforme el procedimiento anterior, utilizando alícuotas de 25 ml. Calcular el contenido de agua, en mg/ml de solución, por la ecuación

$$\frac{v' \times T}{25}$$

en que

v' = volumen, en ml, de reactivo consumido,

T = título del reactivo, en mg/ml.

Procedimiento Cuando en la monografía así especifique, transferir 35 a 40 ml de metanol, u otro solvente apropiado, para el recipiente de titulación y titular con el reactivo estandarizado hasta cambio visual o electrométrico, a fin de eliminar toda la humedad que pueda estar presente (desconsiderar el volumen consumido, pues él no entra en los cálculos). Rápidamente, añadir al recipiente de titulación,

cantidad, exactamente pesada de la muestra, que contenga 10 a 250 mg de agua y un volumen en exceso, exactamente medido, del reactivo. Dejar en reposo por el tiempo necesario para que la reacción se complete y titular el reactivo no consumido con solución estándar de agua, hasta cambio visual o electrométrico. Calcular el contenido, en mg, de agua en la porción de ensayo por la ecuación:

$$\text{Conteúdo de água} = T [v' - (v \times v_r)]$$

en que

T = título del reactivo,

v' = volumen, en ml, del reactivo adicionado en exceso después de la incorporación de la porción de ensayo,

v = volumen, en ml, de solución estándar de agua, necesario

la neutralización del exceso de reactivo,

v<sub>r</sub> = volumen, en ml, de reactivo por ml de solución estándar de agua, determinado en la estandarización de esa.

Caso sea especificado en la monografía, calcular el tenor de agua en porcentaje.

## MÉTODO CULOMBIMÉTRICO

Para determinación coulombimétrica del agua se utiliza el reactivo de Karl Fischer. El yodo, sin embargo, no es utilizado como solución volumétrica, pero obtenido por oxidación anódica de una solución conteniendo yoduro. La célula de reacción es constituida de un amplio compartimiento anódico y de un restringido compartimiento catódico; separados, entre sí, por un diafragma. También, pueden ser utilizados otros tipos adecuados de células de reacción, como por ejemplo, sin el diafragma. Cada compartimiento tiene un electrodo de platino que conduce la corriente a través de la célula. El yodo, que se produce en el electrodo anódico, reacciona, inmediatamente, con el agua que está en el compartimiento. Cuando toda el agua es consumida, se produce un exceso de yodo que normalmente se detecta, electrométicamente, indicando el punto final. No es necesario cambiar el reactivo de Karl Fischer después de cada determinación. Un requisito necesario para ese método es que cada componente de la muestra sea compatible con los demás componentes y que no produzcan reacciones secundarias. Normalmente las muestras son transferidas al recipiente de titulación, en la forma de soluciones, mediante la inyección a través de un septo. Los gases pueden ser introducidos en la célula utilizando un tubo de entrada adecuado. La precisión del método depende, fundamentalmente, de la eliminación de la humedad en el sistema. El control del sistema puede ser monitoreado por la línea de base. Ese método es, especialmente adecuado, para sustancias químicas inertes como hidrocarburos, alcoholes y éteres. En comparación con el método volumétrico de Karl Fischer, la coulombimetría es un método de microtitulación.

### Aparatos

Se admite el empleo de cualquier equipo disponible comercialmente que posea un sistema totalmente hermético, equipado con electrodos específicos y agitador magnético. El microprocesador del equipo controla el procedimiento

analítico y posibilita la visualización de los resultados. No es necesario proceder a la calibración previa del equipo, ya que la corriente consumida puede ser medida en la forma absoluta.

### Reactivo

Utilizar el mismo descrito en el método directo.

### Preparación de la muestra

Si la muestra es soluble, disolver cantidad adecuada, exactamente pesada, en metanol anhidro o en otro solvente adecuado. Si la muestra es insoluble, puede extraerse el agua utilizándose un solvente anhidro que puede ser inyectado, en cantidad adecuada, exactamente pesada, en la solución del analito. Alternativamente, puede utilizarse técnica de evaporación, en que el agua liberada es colectada en un tubo de aire corriente de gas inerte y anhidro.

### Procedimiento

Con una jeringa seca, inyectar rápidamente, la muestra previamente preparada conforme descrito en *Preparación de la muestra*, medido con exactitud y con un contenido de agua estimado de 0,5 mg a 5 mg, o de acuerdo con las instrucciones del fabricante del equipo. Mezclar y cuantificar por coulombimetría, determinando el punto final electrométicamente. Determinar el contenido de agua en la muestra directamente en la planilla del equipo y calcular el porcentaje presente de la sustancia. Realizar la determinación en blanco y proceder las correcciones necesarias.

## 5.2.20.2 MÉTODO DE LA DESTILACIÓN AZEOTRÓPICA

A semejanza del método volumétrico, el azeotrópico posibilita la determinación de agua contenida en muestras de naturaleza múltiple. El agua presente es destilada con tolueno, solvente en el cual es prácticamente inmiscible, y separada en tubo receptor apropiado después de enfriamiento. Conviene, sin embargo, emplear tolueno previamente saturado con agua para evitar resultados bajos debido a la disolución de agua residual en el solvente anhidro.

### APARATO

Utilizar balón de fondo redondo (A) con capacidad para 500 ml, conectado por un tubo cilíndrico (D) al tubo receptor (B) (**Figura 1**). Las dimensiones críticas de las piezas del aparato son: tubo cilíndrico de 9 a 11 mm de diámetro interno; tubo receptor con capacidad de 5 ml, y porción cilíndrica, con 146 – 156 mm de largo, graduada en subdivisiones de 0,1 ml, de modo que el error de lectura no sea superior a 0,05 ml para cualquier volumen indicado, pudiendo, opcionalmente, ser provisto de grifo. La parte superior del tubo cilíndrico se liga, siempre, por medio de juntas esmeriladas, al condensador de reflujo vertical (C) de, aproximadamente, 400 mm de largo, por lo menos, por 8 mm de diámetro interno.

Partes del balón y del tubo cilíndrico pueden ser guarnecidas con tejido de amianto para mayor aislamiento térmico. El calor para la destilación debe ser, preferentemente, suministrado por calentador eléctrico dotado de control por regulador o baño de aceite.

Limpiar el tubo receptor y condensador con mezcla sulfocrómica, enjuagar con agua y secar en estufa. Introducir en el balón seco 200 ml de tolueno y aproximadamente 2 ml de agua y destilar durante 2 horas. Enfriar y, después de cerca de media hora, medir el volumen de agua acumulado en el tubo graduado.

#### PROCEDIMIENTO

Añadir al balón cantidad de muestra, exactamente pesada, que contenga de 2 a 4 ml de agua. Si la sustancia es de naturaleza pastosa, envolverla en hoja de aluminio de modo que la dimensión del paquete sea suficiente solamente para su paso por el cuello del frasco. Si la sustancia induce a

ebullición, añadir arena lavada y seca en cantidad suficiente para cubrir el fondo del balón o tubos capilares de vidrio, del tipo empleado para determinación de punto de fusión, vedados en una de las extremidades. Añadir 200 ml de tolueno, encender el equipo y calentar, moderadamente, durante 15 minutos. Cuando el tolueno comience a hervir, regular el calentamiento para que destile 2 gotas por segundo. Destilada prácticamente toda el agua, acelerar la velocidad de destilación para 4 gotas por segundo. Concluida la destilación del agua, verter cerca de 10 a 15 ml de tolueno por la boca del condensador de reflujo y proseguir la destilación por más 5 minutos. Retirar la fuente de calor, aguardar el enfriamiento del tubo receptor a temperatura ambiente y desplazar eventuales gotas de agua retenidas en la pared del tubo receptor con el auxilio de alambre de cobre con extremidad envuelta en caucho (látex). Una vez concluida la separación de las fases, leer el volumen de agua depositado en el tubo receptor (descontando el volumen inicial) y calcular el porcentaje de agua en la porción de ensayo.

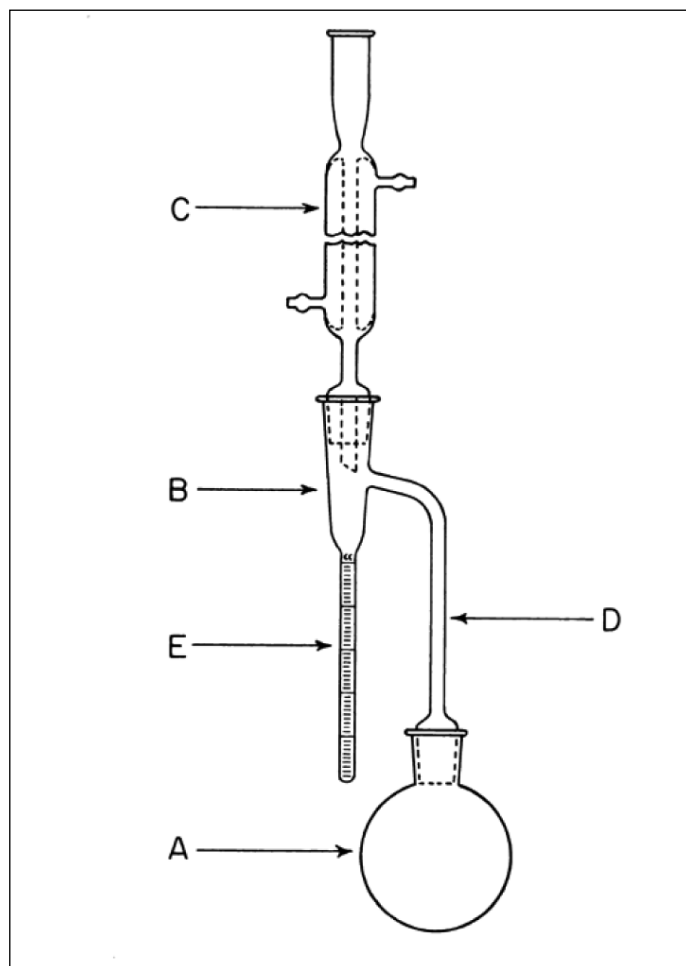


Figura 1 - Aparato para determinación de agua por el método azeotrópico.

#### 5.2.20.3 DETERMINACIÓN DEL AGUA POR EL MÉTODO SEMIMICRO

La determinación del agua por el método semimicro es realizada en un aparato de titulación de capacidad de 60 ml, provisto de 2 electrodos de platino, de un tubo de admisión para el nitrógeno, de un tapón adaptado a la extremidad de

una bureta y de un tubo de admisión de aire protegido por un agente de secado. La porción de ensayo es introducida por un tubo lateral provisto de un tapón esmerilado. Durante la titulación, la agitación debe ser asegurada mediante el auxilio de un agitador mecánico o a través del burbujeo de nitrógeno seco.

El término de la reacción es determinado por la intensidad del aparato. Un circuito apropiado, constituido por un potenciómetro de aproximadamente 2000  $\Omega$ , conectado a una batería de 1,5 V, permite aplicar una diferencia de potencial variable. Esta es ajustada de tal manera para conducir una corriente inicial suave a través de los electrodos de platino conectados en serie a un microamperímetro. La aguja del microamperímetro se desvía después de cada adición del reactivo, volviendo inmediatamente a su posición inicial. El fin de la reacción es indicado por un desvío que persiste por, como mínimo, 30 segundos.

Utilizar el yodo sulfuroso SR después de determinar su equivalente en agua. Las soluciones y los reactivos utilizados deben ser mantenidos en condición anhidra y preservados de la humedad atmosférica durante el dosificación o cualquier manipulación.

El yodo sulfuroso SR debe ser conservado al abrigo de la luz, de preferencia en un frasco provisto de una bureta automática.

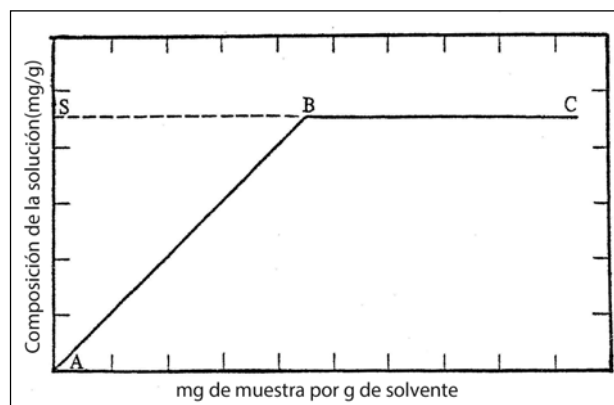
Las soluciones de yodo sulfuroso SR, comercialmente, disponibles presentan (o pueden presentar) una composición que difiere de la solución de yodo sulfuroso SR por sustitución de la piridina por diversos compuestos básicos. El empleo de esas soluciones reactivas debe ser precedido de evaluación que permita, en cada caso, verificar estequiometría y ausencia de incompatibilidad entre la sustancia a ser ensayada y el reactivo. Salvo indicación contraria, el *Método A* debe ser utilizado.

*Método A.* Introducir en el frasco de titulación cerca de 20 ml de metanol anhidro o el solvente prescrito en la monografía. Adicione al reactivo yodo sulfuroso SR solución hasta el cambio amperométrico. Introducir, rápidamente, la porción de ensayo, agitar durante 1 minuto y titular con la solución yodo sulfuroso SR hasta nuevo cambio.

*Método B.* Introducir en el frasco de titulación cerca de 10 ml de metanol anhidro o del solvente prescrito en la monografía. Añadir yodo sulfuroso SR hasta el cambio amperométrico. Introducir, rápidamente, la porción de ensayo de la sustancia en un estado de división conveniente, y enseguida un volumen de yodo sulfuroso SR, suficiente para obtener un exceso de aproximadamente 1 ml. En ese caso, también, puede ser utilizado el volumen prescrito en la monografía. Dejar en reposo en frasco cerrado y al abrigo de la luz durante 1 minuto o durante el tiempo prescrito en la monografía, agitando ocasionalmente. Titular el exceso de yodo sulfuroso SR con metanol anhidro o con otro solvente prescrito en la monografía, adicionado de una cantidad de agua conocida y próxima de 2,5 g/L, hasta regresar a la suave corriente inicial.

## 5.2.21 ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD POR FASES

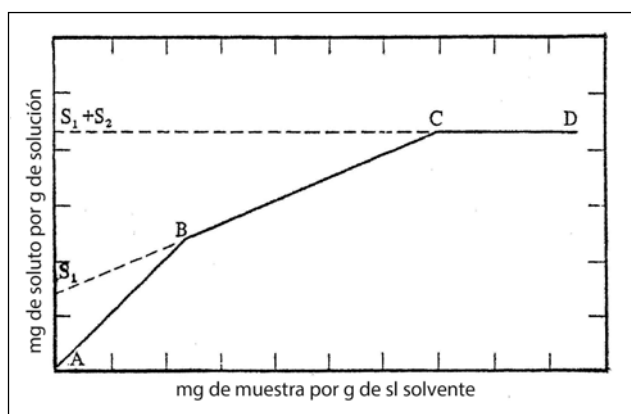
La solubilidad de sustancia pura en dado solvente, a temperatura constante, es parámetro característico de la sustancia, pudiendo, pues, servir para fines de identificación y evaluación de grado de pureza. En ese principio, se basa el análisis de solubilidad por fases. El procedimiento consiste en la adición de porciones crecientes de muestra a volúmenes constantes de solvente en el cual la sustancia analizada muestra apenas ligera solubilidad, buscando la obtención de solución saturada de esa sustancia. Una vez promovido el equilibrio del sistema – por agitación prolongada, bajo temperatura constante – se determina el contenido total de soluto en la solución sobrenadante (generalmente por técnica gravimétrica) y se traza el diagrama de solubilidad por fases, representando la composición de la solución, en mg de soluto por g de solvente (ordenadas), por la composición del sistema, en mg de muestra adicionada por g de solvente (abscisas). La **Figura 1** ilustra diagrama de ese tipo. a lo largo del segmento AB, la totalidad del sólido disuelve y es encontrada en la solución (inclinación corresponde a la unidad). En el punto B la muestra satura la solución y adiciones subsiguientes no implican aumento en su concentración. La inclinación del segmento de recta BC es, por tanto, nula y la intersección de la prolongación de esa recta con el eje de las Y da el valor de la solubilidad de la sustancia.



**Figura 1 - Diagrama de solubilidad por fases de muestra constituida por una sola sustancia.**

Si la muestra es constituida de dos sustancias (una de ellas impureza de la otra, por ejemplo), el diagrama asume la forma ilustrada en la **Figura 2**. El segmento AB presenta inclinación unitaria; el punto B indica saturación de la solución con relación a uno de los componentes de la muestra (generalmente aquel que está presente en mayor proporción); el segmento BC indica la solubilización del segundo componente y el segmento CD la saturación de la solución con este último (inclinación nula).





**Figura 2 - Diagrama de solubilidad por fases de muestra conteniendo dos sustancias.**

El valor de la inclinación del segmento BC – fase en que solamente el segundo componente es solubilizado – corresponde a la proporción de este componente en la muestra. La sustracción de este valor de la unidad da el contenido del primer componente en la muestra, permitiendo el empleo de la fórmula (1-1).100 para la obtención del tenor. La inclinación,  $i$ , es obtenida por la fórmula  $(Y_2 - Y_1) / (X_2 - X_1)$ , en que  $Y_1, Y_2$  y  $X_1, X_2$  corresponden, respectivamente, a proyecciones de puntos del segmento de recta BC sobre la ordenada (composición de la solución) y la abscisa (composición del sistema). La extrapolación del segmento BC da el límite de solubilidad,  $S_1$  en mg de soluto por g de solvente, del primer componente, mientras la prolongación de la recta del segmento CD hasta el eje de las Y lleva a la suma de las solubilidades de los dos componentes,  $S_1 + S_2$ .

La ocurrencia de desvíos pronunciados en los puntos que constituyen los segmentos de recta del diagrama indica falta de equilibrio en el sistema, a pesar de que estos también puedan ser atribuidos a la existencia de solución sólida o a desvíos del comportamiento teórico. Si necesario, la inclinación  $i$  puede ser calculada por aproximación gráfica o a partir del método estadístico de los mínimos cuadrados.

Una peculiaridad del análisis de solubilidad por fases es no ser técnica aplicable a mezclas cuyos componentes están presentes en la muestra en la proporción de sus solubilidades. En este caso particular, ambos los componentes promueven saturación en el mismo punto, dando, como resultado, diagrama de fases equivalente al de sustancia pura.

#### ELECCIÓN DE SOLVENTE

La elección de solvente para análisis de solubilidad por fases está basada en la solubilidad del componente presente en mayor proporción en la muestra y en el método de dosificación adoptado para la determinación de la concentración de la solución formada. Siendo más usual la técnica gravimétrica, conviene al solvente presentar volatilidad suficiente para permitir su evaporación al vacío, pero insuficiente para dificultar operaciones de transferencia y pesaje. Se recomiendan solventes con punto de ebullición entre 60 °C y 150 °C. En términos de solubilidad, es conveniente que el solvente presente capacidad de solubilización de muestra en proporción no inferior a 4 mg/g ni superior

a 50 mg/g. La solubilidad óptima comprende la banda de 10 a 20 mg.

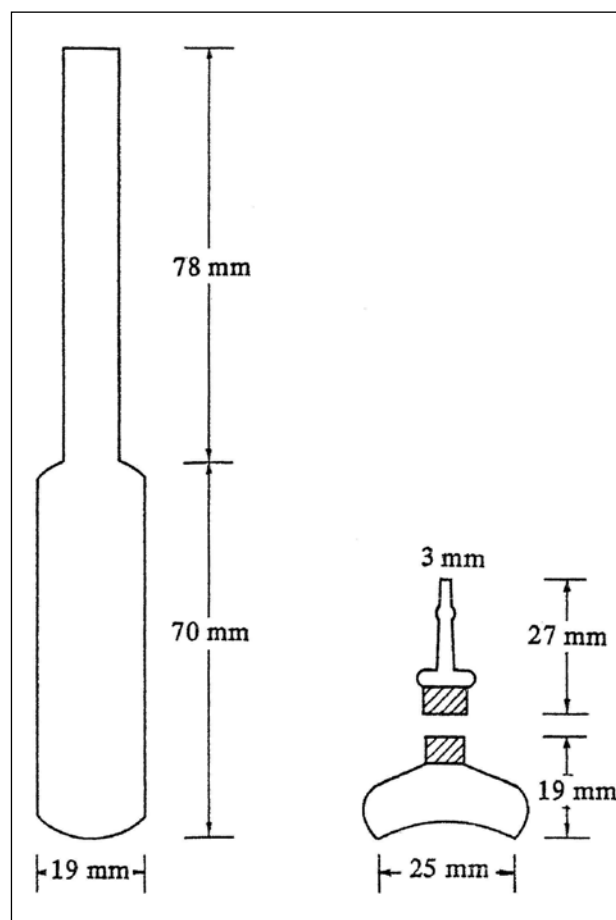
Recomendaciones adicionales incluyen la inercia del solvente frente a los componentes de la muestra (previéndose, inclusive, la posibilidad de formación de solvatos o sales) y el empleo de solvente de pureza y concentración conocida (trazos de impurezas afectan intensamente la solubilidad), admitiéndose, sin embargo, el empleo de mezclas.

#### APARATOS

Comprende baño maría termostatzado, frascos y ampollas apropiadas y balanza analítica, con precisión de  $\pm 10 \mu\text{g}$ .

El baño de agua es provisto de termostato con tolerancia de control de temperatura no superior a 0,1 °C, especialmente en la banda de 25-30 °C, usual para los ensayos. El baño es equipado con barra horizontal rotativa (25 rpm) provista de garras fijadoras para las ampollas. Como alternativa, puede ser usado vibrador (100 a 120 vibraciones / segundo) igualmente provisto de garras fijadoras de ampollas.

La ampolla – con capacidad para 15 ml – al lado del llamado frasco de solubilidad también empleado en los ensayos, está ilustrada en la **Figura 3**. Recipientes de especificación diferente son admisibles desde que herméticos y apropiados a la técnica descrita.



**Figura 3 - Ampolla utilizada en el análisis de solubilidad por fases.**

## PROCEDIMIENTO

### Composición del sistema

Pesar con exactitud un mínimo de 7 ampollas de 15 ml rigurosamente limpias. Transferir cantidades crecientes exactamente pesadas de muestra para cada ampolla, de modo que la primera contenga cantidad apenas ligeramente menor que la solubilizable en 5 ml de solvente y la última contenga ligero exceso de muestra. Después de transferir 5,0 ml de solvente para cada ampolla, enfriarlas en mezcla de hielo seco y acetona y sellarlas con soplete aire/gas, tomando la precaución de guardar fragmentos de vidrio resultantes del proceso.

Permitir que las ampollas alcancen la temperatura ambiente y pesarlas, conjuntamente con sus respectivos fragmentos de vidrio. Calcular la composición del sistema, en mg/g, para cada ampolla, por la fórmula:  $1000(M_2 - M_1)/(M_3 - M_2)$ , en que  $M_2$  corresponde a la masa de la ampolla conteniendo muestra;  $M_1$  es a masa de la ampolla vacía y  $M_3$  es la masa de la ampolla conteniendo muestra, solvente y eventuales fragmentos de vidrio.

### Equilibrio

El período necesario al establecimiento de equilibrio en los sistemas contenidos en las ampollas es variable de acuerdo con la naturaleza de la muestra, método de agitación (rotación o vibración) y temperatura. La experiencia indica plazo medio de 1 a 7 días para agitación por vibración y 7 a 14 días para el proceso rotacional. Para confirmar la promoción de equilibrio, calentar la penúltima ampolla de la serie a 40 °C con el objetivo de obtener supersaturación. El resultado es positivo si el punto correspondiente a esta ampolla fuese coherente con los demás en el diagrama de fases. Todavía, resultado diverso no significa necesariamente no haber sido alcanzado el equilibrio. Hay sustancias con tendencia a permanecer en solución supersaturada y, siendo este el caso, cabe la ejecución de serie de análisis, variándose el período de espera con el fin de asegurar la coherencia de los puntos de la curva de solubilidad.

### Composición de la solución

Alcanzado el equilibrio, colocar las ampollas en soporte apropiado para que permanezcan en posición vertical, con los cuellos arriba del nivel del agua del baño termostatizado. Aguardar la decantación de los sólidos en las ampollas, abrirlas y recoger 2,0 ml de cada una por medio de pipeta provista de copo de algodón o de otro material capaz de actuar como filtro. Retirar el material filtrante de la pipeta y transferir el líquido límpido para frasco de solubilidad (**Figura 3**) tarado y debidamente identificado, pesando cada frasco después de la operación. Enfriar los frascos en baño de hielo seco y acetona y, en seguida, evaporar el solvente bajo presión reducida. Aumentar gradualmente la temperatura de evaporación, tomando la precaución de no exceder el límite compatible con la estabilidad de la muestra y desecar el residuo hasta peso constante. Calcular la composición de la solución en cada frasco, en mg/g, por la fórmula  $1000 (P_3 - P_1)/(P_2 - P_3)$ , en que  $P_3$  corresponde a la

masa del frasco conteniendo el residuo de la evaporación;  $P_1$  es la masa del frasco de solubilidad vacío (tara) y  $P_2$  es la masa del frasco conteniendo la solución.

Trazar diagrama de fases con base en los valores obtenidos y determinar la pureza porcentual de la muestra en función de la inclinación del segmento de recta.

## APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE SOLUBILIDAD POR FASES EN LA PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS

Mientras las soluciones obtenidas en el proceso analítico descrito contienen esencialmente todas las impurezas presentes en la muestra en proporción aumentada con relación a la muestra original, prestándose – después de evaporación del solvente – a la determinación cualitativa de las impurezas, la fase es adecuada, por la elevada pureza, al preparado de estándares de referencia para otros ensayos analíticos.

### Procedimiento

Pesar cantidad apropiada de muestra y suspenderla en solvente adecuado para – alcanzado el equilibrio – disolver solamente 10% del material. Cerrar el frasco y aguardar establecimiento del equilibrio a la temperatura ambiente (en general, 24 horas son suficientes). En seguida, recolectar la solución sobrenadante límpida y evaporar, a temperatura ambiente o próxima de esta, hasta sequedad. Por el hecho de que la solución contenga las impurezas de la muestra original, se obtiene, por este procedimiento, material en que la proporción de impurezas se encuentra aumentada, siendo la relación de enriquecimiento aproximadamente igual a la razón de la masa de la muestra por la masa de sólidos disueltos en el volumen de solvente empleado. Purificar el residuo no disuelto por lavado y secado (estándar de referencia).

## 5.2.22 ELECTROFORESIS

### PRINCIPIOS GENERALES

Por acción de un campo eléctrico, las partículas cargadas disueltas o dispersas en una solución electrolítica migran en dirección al electrodo de polaridad opuesta. En la electroforesis en gel, el desplazamiento de las partículas es retardado por las interacciones con el gel de la matriz que constituye el medio de migración y se comporta como un tamiz molecular.

Las interacciones de oposición de la fuerza eléctrica y de la tamización molecular resultan en la tasa de diferencial de migración de acuerdo con el tamaño, forma y carga de partículas. Debido a sus propiedades físico-químicas diferentes, las diversas moléculas contenidas en una mezcla migrarán a velocidades diferentes durante la electroforesis, quedando así separadas en fracciones bien definidas. Las separaciones electroforéticas pueden ser conducidas en sistemas sin fase de soporte (por ejemplo, separación en solución libre en la electroforesis capilar), y o en medios estabilizados como placas de camada fina, películas o geles.

## ELECTROFORESIS DE FRONTERA, O DIVISIÓN, O LÍMITE LIBRE, O EN MOVIMIENTO

Ese método es principalmente utilizado en la determinación de movilidades, siendo las características experimentales directamente mensurables y reproducibles. Se aplica, sobretodo, a sustancias de masa moleculares relativamente elevadas, poco difusibles. Las divisiones son, inicialmente, marcadas por un proceso físico como la refractometría o la conductimetría. Después de la aplicación de un campo eléctrico definido, durante un tiempo determinado, se obtienen nuevas divisiones y sus respectivas posiciones son observadas. Las condiciones operacionales posibilitan la determinación de las divisiones y de los constituyentes.

## ELECTROFORESIS EN SOPORTE, O ELECTROFORESIS DE ZONA

Ese método es usado apenas para muestras reducidas. La naturaleza del soporte, como papel, gel de agarosa, acetato de celulosa, almidón, agarosa, metacrilamida o gel mixto, introduce un número de factores adicionales que modifican la movilidad:

- debido a la sinuosidad de la canalización del soporte, a la distancia aparentemente recorrida que es menor que la distancia real;
- ciertos soportes no son eléctricamente neutros y, como el medio constituye una fase estacionaria, puede algunas veces originar una considerable corriente electroosmótica importante;
- el calentamiento debido al efecto de Joule puede producir cierta evaporación del líquido del soporte, lo que conduce, por capilaridad, a un desplazamiento de la solución de las extremidades para el centro; así, la fuerza iónica tiende a aumentar progresivamente.

La velocidad de migración depende de cuatro factores principales: movilidad de la partícula, corriente de electroosmótica, corriente de evaporación e intensidad del campo. Por esas razones es necesario proceder en condiciones experimentales bien determinadas y utilizar, si posible, estándares de referencia.

### Aparatos

Un aparato de electroforesis consta de:

- un generador de corriente continua de tensión controlable y de preferencia estabilizada;
- una cuba de electroforesis. Generalmente rectangular, de vidrio o de material plástico rígido, con dos compartimientos separados, anódico y catódico, que contienen la solución tampón conductora. En cada compartimiento sumerge un electrodo, de platino o de grafito, esos están conectados por medio de un circuito debidamente aislado de la fuente de alimentación del terminal correspondiente para formar, respectivamente, el ánodo y cátodo, conectados por un circuito convenientemente aislado al poste correspondiente del generador. El nivel del líquido en los dos compartimientos es igual para evitar el efecto de sifonaje. La cuba de electroforesis

debe estar equipada con una tapa hermética, permitiendo mantener en su interior una atmósfera saturada de unidad y atenuar así, la evaporación del solvente durante la migración. Se utiliza un dispositivo de seguridad que corte la corriente, cuando se retira la tapa de la cuba. Si la medida de corriente eléctrica excede a 10 W es preferible enfriar el soporte;

- un dispositivo de soporte:

*Electroforesis en tiras.* En la electroforesis las tiras en el soporte, son previamente impregnadas con la misma solución conductora y cada extremidad sumergida en el compartimiento del electrodo. Las tiras quedan bien extendidas, fijadas sobre un soporte apropiado para evitar la difusión de la solución conductora como, por ejemplo, una moldura horizontal, un soporte en V invertido, o una superficie uniforme, con puntos de contacto en intervalos adecuados.

*Electroforesis en gel.* En la electroforesis en gel, el dispositivo consiste en una placa de vidrio, como, por ejemplo, una simple lámina de microscopio, en la cual se deposita una camada de gel adherente y de espesor uniforme en toda la superficie de la lámina. El contacto entre el gel y la solución conductora varía en función del tipo del aparato utilizado. Se evita cualquier condensación de humedad o secado de la camada sólida;

- un dispositivo de medición o medios de detección.

*Procedimiento.* Colocar la solución de electrolito en los compartimientos de los electrodos. Colocar el soporte, convenientemente embebido con la solución del electrolito en la cuba, de acuerdo con el tipo de aparato utilizado. Trazar la línea de partida y aplicar la muestra de ensayo. Dejar pasar la corriente durante el tiempo indicado; enseguida desconectar la corriente, retirar el soporte de la cuba, secar y revelar.

## ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN TUBO CILÍNDRICO

En la electroforesis en gel de poliacrilamida, cilíndrico (en tubo) la fase estacionaria es constituida por un gel preparado a partir de acrilamida y de N,N'-metilenobisacrilamida. Los geles son preparados en tubos, generalmente con 7,5 cm de largo y 0,5 cm de diámetro interno (gel cilíndrico); una única muestra es aplicada en cada tubo.

*Aparatos.* El aparato es constituido de dos depósitos destinados a recibir las soluciones tampón y construidos con un material apropiado, tal como el polimetacrilato de metilo. Están dispuestos, verticalmente, uno arriba del otro, y son provistos, cada uno, de un electrodo de platino. Esos dos electrodos son ligados a una fuente de corriente posibilitando operar con intensidad y tensión constantes. Para geles cilíndricos, el aparato tiene en la base superior del depósito un número de juntas de elastómero situadas a igual distancia del electrodo.

*Procedimiento.* De un modo general, se recomienda desgasificar las soluciones antes de la polimerización y utilizar el gel inmediatamente después de su preparación. Preparar

el gel según las indicaciones de la monografía. Colocar la mezcla de gel en los tubos de vidrio apropiados, cerrados en la extremidad inferior con un tapón, hasta una altura igual en todos ellos, a la distancia de cerca de 1 cm del borde superior del tubo. Evitar la introducción de burbujas de aire en los tubos. Cubra la mezcla con una camada de agua a fin de impedir el contacto con el aire y dejar en reposo. La formación del gel requiere, generalmente, cerca de 30 minutos y está completa cuando aparece una delimitación nítida entre el gel y la camada acuosa. Eliminar la camada acuosa. Llenar el depósito inferior con la solución tampón, prescrita y retirar los tapones de los tubos. Encajar los tubos en las juntas del depósito superior de modo que su parte inferior se sumerja en la solución tampón del depósito inferior y ajuste de forma que el fondo de los tubos esté inmerso en la solución tampón del depósito inferior. Delicadamente llenar los tubos en la solución del depósito inferior. Preparar las soluciones problema y estándar conteniendo el colorante indicado prescrito. Llenar, cuidadosamente, los tubos con la solución tampón indicada. Aplicar las soluciones, cuya densidad fue aumentada, por adición de sacarosa, por ejemplo, a la superficie del gel, utilizando un tubo diferente para cada solución. Colocar la misma solución tampón en el depósito superior. Conectar los electrodos a la fuente de corriente y proceder a la electroforesis, utilizando la corriente de intensidad o de tensión constante y a la temperatura prescrita en la monografía. Interrumpa la corriente cuando el indicador coloreado alcance el depósito inferior. Retirar, inmediatamente, los tubos y proceder a la extrusión del gel. Localizar la posición de las bandas en los electroforetogramas según el procedimiento indicado.

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO DE SODIO (DSS-EGPA)

*Campo de aplicación.* La electroforesis en gel de poliacrilamida es utilizada para la caracterización cualitativa de las proteínas contenidas en preparaciones biológicas, para controles de pureza y determinaciones cuantitativas.

*Finalidad.* El análisis por electroforesis en gel es un proceso adaptado a la identificación y al control de la homogeneidad de las proteínas contenidas en preparaciones farmacéuticas. Es utilizada como rutina para evaluar la masa molecular de las subunidades proteicas y determinar las subunidades que componen las proteínas purificadas. En el mercado existe una gran variedad de geles y reactivos listos para ser utilizados en vez de los que se describen a continuación, siempre que los resultados obtenidos sean equivalentes y que puedan ser satisfechas las condiciones de validez descritas en *Validación del ensayo*.

#### *Características de los geles de poliacrilamida*

Las propiedades de tamiz de los geles de poliacrilamida están relacionadas con su estructura particular que es la de una red tridimensional de fibras y poros resultantes de la formación de ligaciones cruzadas entre la bisacrilamida bifuncional y las cadenas adyacentes de poliacrilamida. La polimerización es catalizada por un generador de radicales libres compuesto de persulfato de amoníaco (PSA) y

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). El tamaño real de los poros de un gel es tan menor cuanto más elevada sea su concentración en acrilamida. Como la concentración de acrilamida del gel aumenta, su porosidad efectiva disminuye.

La porosidad real de un gel es definida de modo operacional por sus propiedades de tamiz molecular, eso es, la resistencia que él opone a la migración de las macromoléculas. Existen límites para las concentraciones de acrilamida que pueden ser utilizadas. En concentraciones muy elevadas los geles se deshacen más fácilmente y se tornan difíciles de manipular. Cuando el tamaño de los poros de un gel disminuye, la velocidad de migración de una proteína en ese gel disminuye, también. Ajustando la porosidad de un gel, alterando la concentración en acrilamida, es posible optimizar la resolución del método para un determinado producto proteico. De ese modo, las características físicas de un gel dependen, por tanto, de su tenor en acrilamida y en bisacrilamida. Además de la composición del gel, el estado de la proteína constituye otro factor importante para su movilidad electroforética.

En el caso de las proteínas, la movilidad electroforética depende del pK de los grupos con carga eléctrica y del tamaño de la molécula. Es igualmente afectada por la naturaleza, concentración y pH del tampón, por la temperatura, intensidad del campo eléctrico y por la naturaleza del soporte.

#### ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

El método descrito a título de ejemplo es aplicable al análisis de los polipéptidos monómeros de masa molecular comprendida entre 14 000 y 100 000 Dalton. Es posible ampliar ese intervalo por diferentes técnicas (por ejemplo, por los empleos de geles en gradiente o de sistemas tampón especiales), pero tales técnicas no forman parte de este texto. La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes usando el dodecilsulfato de sodio (DSS-EGPA) es la técnica de electroforesis más utilizada para evaluar la calidad farmacéutica de los productos proteicos y es sobre todo el foco de este texto. De modo general, la electroforesis analítica de las proteínas es realizada en gel de poliacrilamida en condiciones que favorecen la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas y que limitan el fenómeno de agregación. Se utiliza frecuentemente ese efecto del dodecilsulfato de sodio (DSS) un detergente fuertemente aniónico, para disociar las proteínas antes de su aplicación en el gel, en combinación con el calor. Los polipéptidos desnaturalizados se conectan al DSS, adquieren cargas negativas y se caracteriza por una relación carga/masa constante cualquiera que sea el tipo de proteína considerada. Siendo la cantidad de DSS ligada casi siempre proporcional a masa molecular del polipéptido e independiente de su secuencia, los complejos DSS-polipéptido migran en los geles de poliacrilamida con movilidades que son función del tamaño del polipéptido.

La movilidad electroforética de los complejos detergente-polipéptidos resultantes presenta siempre la misma relación funcional con la masa molecular. La migración de los



complejos DSS es, como sería de preverse, en dirección al anodo a la velocidad más elevada para los complejos de baja masa molecular del que para los de alta. Es, así, posible determinar la masa molecular de una proteína a partir de su movilidad relativa, después de comparación con soluciones estándar de valor de masa molecular conocida y la observación de una banda única constituye un criterio de pureza. Todavía, las modificaciones eventuales en la constitución del polipéptido, por ejemplo, una N- o una O-glicosilación, tienen un impacto significativo no negligenciable sobre la masa molecular aparente de una proteína, no se liga a una molécula de carbohidratos de forma semejante a un polipéptido. Con efecto, el DSS no se conecta de la misma manera a los agrupamientos glucídicos o a los agrupamientos peptídicos, de modo que la constancia de la relación carga/masa deja de ser verificada. La masa molecular aparente de las proteínas que sufrieron modificaciones polvos-traslacionales no refleja realmente la masa de la cadena polipeptídica.

#### *Condiciones reductoras*

La asociación de las subunidades polipeptídicas y la estructura tridimensional de las proteínas se basan, muchas veces, en la existencia de puentes disulfuro. Uno de los objetivos a alcanzar en el análisis DSS-EGPA en condiciones reductoras es romper esa estructura por reducción de los puentes disulfuro. La desnaturación y la disociación completas de las proteínas por tratamiento con 2-mercaptoetanol o con ditioneitol (DTT) provocan un desdoblamiento de la cadena polipeptídica seguida de una complejación con el DSS. En esas condiciones, la masa molecular de las subunidades polipeptídicas puede ser calculada por regresión lineal con la ayuda de estándares de masa molecular apropiada.

#### *Condiciones no reductoras*

Para ciertos análisis, la disociación completa de la proteína en subunidades peptídicas no es deseable. En la ausencia de tratamiento por los agentes reductores, como el 2-mercaptoetanol o el DTT, los puentes disulfuro covalentes permanecen intactas y la conformación oligomérica de la proteína es preservada. Los complejos DSS-oligómero migran más lentamente que las subunidades DSS-peptídicas. Además de eso, las proteínas no reducidas pueden no ser, totalmente, saturadas en DSS y, por consecuencia, no se conectan al detergente en una relación de masa constante. Esa circunstancia torna la determinación de la masa molecular de esas moléculas por el DSS-EGPA más difícil que el análisis de polipéptidos totalmente desnaturados, pues, para que la comparación sea posible es necesario que los estándares y las proteínas desconocidas tengan configuraciones semejantes. No obstante, la obtención en el gel de una única banda coloreada permanece como criterio de pureza.

#### CARACTERÍSTICAS DE LA ELECTROFORESIS DE GEL EN SISTEMA TAMPÓN DISCONTINUO

El método electroforético más divulgado para la caracterización de las mezclas complejas de proteínas se fun-

damenta en el empleo de un sistema tampón discontinuo que incluye dos geles continuos, pero distintos: un gel (inferior) de separación o de resolución y un gel (superior) de concentración. Esos dos geles son de porosidad, pH y fuerza iónica diferentes. Además de eso, los diferentes iones móviles son usados en los geles y en los tampones del electrodo. La discontinuidad del sistema tampón conduce a una concentración de gran volumen de las muestras en el gel de concentración y, por tanto, a una mejoría de la resolución. Cuando el campo eléctrico es aplicado, un gradiente de tensión negativo se instaura a través de la solución de la muestra y arrastra las proteínas del gel de concentración para el gel de apilamiento. Los iones glicinato contenidos en el tampón del electrodo siguen las proteínas en el gel de apilamiento. Se forma, rápidamente, una zona de división móvil cuya frente es constituida por los iones cloruro de alta movilidad y la parte de atrás por los iones glicinato más lentos. Un gradiente de alta tensión localizado se instaura entre las frentes iónicas de la cabeza y de la cola y lleva los complejos DSS-proteína a concentrarse en una banda mucho estrecha que migra entre las fracciones cloruro y glicinato.

En amplia escala, independientemente del volumen de la muestra aplicada, el conjunto de los complejos DSS-proteína sufre un efecto de condensación y penetra en el gel de separación en la forma de una banda estrecha, bien definida, de alta densidad proteica. El gel de apilamiento, de poros anchos, no retarda, generalmente, la migración de las proteínas, pero desempeña, principalmente, el papel de medio anticonvecitivo. En la interfaz de los geles de apilamiento y de separación, las proteínas son confrontadas con un brusco aumento del efecto de ralentización debido al pequeño diámetro de los poros del gel de separación. Cuando penetran en el gel de separación, esa ralentización prosigue debido al efecto de tamiz molecular ejercido por la matriz. Los iones glicinato pasan a las proteínas cuya migración prosigue, entonces, en un medio de pH uniforme constituido por la solución tampón de trometamina (TRIS) y por la glicina. El efecto de tamiz molecular conduce a una separación de los complejos DSS-polipéptido con base en su respectiva masa molecular.

#### PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA DSS VERTICALES DE TAMPÓN DISCONTINUO

##### *Montaje del molde*

Con un detergente suave, limpiar las dos placas de vidrio (por ejemplo de tamaño 10 cm x 8 cm), el peine de politetrafluoroetileno, los dos separadores y el tubo de caucho de silicona (por ejemplo, diámetro de 0,6 mm x 350 mm), y enjuagar, abundantemente, con agua. Secar todos los elementos con servilleta de papel o tela. Lubricar los separadores y el tubo con lubricante que no sea a la base de silicona. Colocar los separadores a 2 mm del borde a lo largo de los dos lados cortos y de uno de los lados largos de la placa de vidrio. Ese último corresponderá al fondo del gel. Comenzar a instalar el tubo sobre la placa de vidrio utilizando uno de los separadores como guía. Alcanzada la extremidad del separador, doblar el tubo con precaución para hacerlo seguir el lado largo de la placa de vidrio. Mantenga el tubo



en su lugar con uno de los dedos, dóblelo de nuevo para hacerlo seguir el segundo lado corto de la placa, utilizar el separador como guía. Colocar la segunda placa en el lugar, alineándola, perfectamente, sobre la primera, y mantenga el conjunto por presión manual. Colocar dos pinzas en cada uno de los lados cortos del molde y después, con precaución, cuatro otras pinzas en el lado largo que constituirá la base del molde. Verificar si el tubo sigue el borde de las placas y no se desplazó después de la colocación de las pinzas. El molde está listo y el gel puede ser colocado en el.

#### *Preparación de los geles*

Para los geles del sistema tampón discontinuo, se recomienda colocar primero el gel de separación y dejarlo polimerizar antes de colocar el gel de concentración, porque el tenor en acrilamida-bisacrilamida en los dos geles, en el tampón y del pH es diferente.

*Preparación del gel de separación.* En un matraz preparar el volumen apropiado de una solución de acrilamida de concentración deseada, usando los valores indicados en la **Tabla 1**. Mezclar los componentes por la orden indicada. Antes de añadir la solución de persulfato de amoníaco y la de tetrametiletildiamina (TEMED), filtrar, si necesario, por succión usando una membrana de acetato de celulosa (diámetro de los poros; 0,45  $\mu\text{m}$ ); mantenga bajo succión agitando la unidad de filtración hasta no formar más burbujas en la solución. Añadir las cantidades apropiadas de solución de PSA y de TEMED (**Tabla 1**), agitar e introducir, inmediatamente, en el espacio que separa las dos placas de vidrio del molde. Dejar una altura libre suficiente para

el gel de concentración (altura de un diente del peine más 1 cm). Usando una pipeta de vidrio afilada, recubra, con precaución, la solución con alcohol isobutílico saturado de agua. Dejar polimerizar el gel en posición vertical, a temperatura ambiente.

*Preparación del gel de apilamiento.* Cuando la polimerización termine (cerca de 30 minutos), agotar el alcohol isobutílico y lavar varias veces la superficie del gel con agua para eliminar completamente el alcohol isobutílico y, si necesario, la acrilamida no polimerizada. Dejar el mínimo de líquido en la superficie del gel y, eventualmente, absorba el agua residual con la punta de una servilleta de papel. En un matraz, preparar un volumen apropiado de una solución de acrilamida de concentración deseada usando los valores registrados en la

Antes de juntar la solución de PSA y de TEMED, filtrar si necesario, por succión por una membrana de acetato de celulosa (diámetro de los poros: 0,45 mantenga bajo succión agitando la unidad de filtración hasta no formar más burbujas en la solución. Añadir las cantidades apropiadas de soluciones de persulfato de amoníaco y de TEMED (**Tabla 2**), agitar y añadir, inmediatamente, sobre el gel de separación. Colocar, inmediatamente, en el lugar un peine de politetrafluoroetileno limpio en la solución del gel de concentración, tomando la precaución de evitar la formación de burbujas de aire. Añadir solución para el gel de concentración para llenar totalmente los intersticios del peine. Dejar polimerizar el gel en posición vertical, a temperatura ambiente.

Componentes de la solución	Volumen de los componentes en ml por volumen del molde del gel de:							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
<i>6% de Acrilamida</i>								
Agua	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	16,5
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
<i>8% de Acrilamida</i>								
Agua	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,003	0,006	0,009	0,002	0,005	0,008	0,024	0,03
<i>10% de Acrilamida</i>								
Agua	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,002	0,016	0,02
<i>12% de Acrilamida</i>								
Agua	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
<i>14% de Acrilamida</i>								
Agua	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
<i>15% de Acrilamida</i>								
Agua	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
Tris 1,5 M pH 8,8 <sup>(2)</sup>	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
(TEMED) Tetrametiletilendiamina <sup>(5)</sup>	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

(1) Solución de acrilamida: acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30% (p/v) SR

(2) Tris 1,5 M pH 8,8: tampón de trisclorhidrato 1,5 M pH 8,8.

(3) DSS 100 g/L: solución de dodecilsulfato de sodio a 10% (p/v).

(4) PSA 100 g/L: solución de persulfato de amonio a 10% (p/v). El persulfato de amonio da los radicales libres que inducen la polimerización de la acrilamida y de la bisacrilamida. La solución de persulfato de amonio se descompone, lentamente, y es renovada toda semana.

(5) TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

<i>Componentes de la solución</i>	<i>1 ml</i>	<i>2 ml</i>	<i>3 ml</i>	<i>4 ml</i>	<i>5 ml</i>	<i>6 ml</i>	<i>8 ml</i>	<i>10 ml</i>
Agua	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Solución de acrilamida <sup>(1)</sup>	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
Tris M pH 6,8 <sup>(2)</sup>	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
(DSS) 100 g/L de Dodecil Sulfato de Sodio <sup>(3)</sup>	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
(PSA) 100 g/L de Persulfato de Amoníaco <sup>(4)</sup>	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
(TEMED) Tetrametilendiamina <sup>(5)</sup>	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

(1) Solución de acrilamida: acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30% (p/v) SR

(2) Tris M pH 6,8: tampón de trisclorhidrato M de pH 6,8.

(3) DSS 100 g/L: solución de dodecilsulfato de sodio a 10% (p/v).

(4) PSA 100 g/L: solución de persulfato de amoníaco a 10% (p/v). El persulfato de amoníaco da los radicales libres que inducen la polimerización de la acrilamida y de la bisacrilamida. La solución de persulfato de amoníaco se descompone, lentamente, y es renovada toda semana.

(5) TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

### *Montaje del gel en el aparato de electroforesis y separación electroforética*

Cuando la polimerización termine (cerca de 30 minutos), retirar el peine con precaución. Lavar los pozos inmediatamente con agua o tampón de electroforesis DSS- EGPA para eliminar la acrilamida eventualmente no polimerizada. Si necesario, enderezar los dientes del gel de apilamiento, con una aguja hipodérmica, de punta partida, anexada a una jeringa, de uno de los lados cortos de la placa, retirar con precaución el tubo y recolocar las pinzas. Proceda del mismo modo del otro lado corto y después en la base del molde.

Introducir el gel en el aparato de electroforesis. Introducir los tampones de electroforesis en los depósitos superior e inferior. Eliminar las burbujas, eventualmente aprisionadas, en la base del gel entre las placas de vidrio. Es recomendable emplear para ese fin una aguja hipodérmica doblada fijada en una jeringa. Nunca establezca tensión eléctrica en el gel sin las muestras porque puede destruir la discontinuidad del sistema tampón. Antes de depositar la muestra, lave o rellene los pozos con precaución con tampón de electroforesis DSS-EGPA. Preparar las soluciones problema y estándar utilizando el tampón para muestra recomendada y tratar como se especifica en la monografía de la sustancia a ser analizada. Aplicar en los pozos del gel de concentración el volumen apropiado de las diferentes soluciones. Proceda a la electroforesis en las condiciones recomendadas por el fabricante del aparato. Ciertos fabricantes de aparatos para DSS- EGPA proveen geles de diversas superficies y espesores. Para obtener una separación óptima, puede ser necesario hacer variar la duración de la electroforesis y los parámetros eléctricos como indicado por el fabricante. Verificar que el frente de coloración se desplaza en el gel de separación, ella alcanza la base del gel, parar la electroforesis. Retirar el molde del aparato y separar las dos placas de vidrio. Retirar los separadores, separar y rechazar el gel de apilamiento y proceder, inmediatamente, a la coloración.

### DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN LOS GELES

La coloración con azul de Coomassie es el método más corrientemente utilizado para las proteínas, con un nivel de detección de 1 µg a 10 µg de proteína por banda. La coloración con nitrato de plata es el método más sensible para la visualización de las proteínas en geles; posibilita la

detección de bandas con 10 ng a 100 ng de proteína. Todas las etapas de la coloración de los geles son realizadas a temperatura ambiente; con agitación moderada y con movimiento orbital en un equipo apropiado. Es necesario el uso de guantes para evitar depositar en el gel impresiones digitales que también quedarían coloreadas.

*Coloración con azul de Coomassie.* Sumergir el gel durante, por lo menos, una hora en un gran exceso de azul de Coomassie SR. Eliminar la solución de coloración. Sumergir el gel en un gran exceso de solución de descoloración (consiste en una mezcla de 1 volumen de ácido acético glacial y 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua). Renovar varias veces la solución de descoloración hasta que las bandas proteicas aparezcan, nítidamente, sobre fondo claro. Cuanto más fuerte sea la descoloración del gel, tanto menores cantidades de proteínas son detectables por ese método. Es posible acelerar la descoloración incorporando en la solución de descoloración algunos gramos de resina de cambio iónico o una esponja.

*Nota:* las soluciones ácido-alcohólicas utilizadas en ese método no fijan totalmente las proteínas del gel. Puede, por tanto, haber pérdida de ciertas proteínas de masa molecular baja durante las operaciones de coloración y descoloración de los geles finos. Puede ser conseguida una fijación permanente colocando el gel durante 1 hora en una mezcla de 1 volumen de ácido tricloroacético, 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua, antes de sumergirse en azul de Coomassie SR.

*Coloración con nitrato de plata.* Sumergir el gel durante 1 hora en un gran volumen de solución de fijación (consiste en añadir 0,27 ml de formaldehído en 250 ml de metanol y diluir para 500 ml con agua). Eliminar y renovar la solución de fijación y dejar incubar durante, por los menos, 1 hora, o durante toda la noche, se así es más práctico. Eliminar la solución de fijación y colocar el gel en un volumen en exceso de agua durante 1 hora y, en seguida, sumergir durante 15 minutos en solución de glutaraldehído a 1% (v/v). Lavar el gel colocándolo por dos veces en un volumen excesivo de agua durante 15 minutos y, en seguida, sumergirlo durante 15 minutos, al abrigo de la luz, en nitrato de plata SR1 recientemente preparado. Lavar el gel colocándolo por tres veces en un volumen excesivo de agua durante 15 minutos y, en seguida, sumergirlo durante cerca de 1 minuto en solución de desarrollo (consiste en

diluir 2,5 ml de ácido cítrico monohidratado a 2% (p/v) y 0,27 ml de formaldehído en agua a 500 ml) hasta obtener coloración satisfactoria. Suspenda el desarrollo por inmersión durante 15 minutos en solución de ácido acético a 10% (v/v). Lavar con agua.

#### *Secado de los geles de poliacrilamida DSS coloridos*

El tratamiento de los geles es ligeramente diferente conforme el método de coloración utilizado. En el caso de la coloración con Coomassie, la etapa de descoloración es seguida de una inmersión del gel en solución de glicerol a 10% (p/v) durante, por lo menos, 2 horas (o una noche). En el caso de la coloración con plata, el lavado final es seguido de una inmersión en solución de glicerol a 2% (p/v) durante 5 minutos. Sumergir dos hojas de celulosa porosa en agua durante 5 a 10 minutos. Colocar una de las hojas en una moldura de secado. Levantar, delicadamente, el gel y depositarlo sobre la hoja de celulosa. Eliminar burbujas que, eventualmente, hayan quedado aprisionadas y añadir algunos mililitros de agua a lo largo de los bordes del gel. Cubrir con la segunda hoja y eliminar eventuales burbujas de aire aprisionadas. Terminar el conjunto del cuadro de secado. Colocar en la estufa o dejar secar a temperatura ambiente.

#### DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR

La masa molecular de las proteínas es determinada por comparación de su movilidad con la movilidad de varios marcadores proteicos de peso molecular conocidos. Existen, para la estandarización de los geles, mezclas de proteínas de masa molecular exactamente conocida que posibilitan obtener una coloración uniforme. Tales mezclas están disponibles para diferentes bandas de masa molecular. Las soluciones madre concentradas de las proteínas de masa molecular conocida son diluidas en tampón para muestreo apropiada y depositadas en el mismo gel que la muestra proteica a ser examinada. Inmediatamente después de la electroforesis, determinar la posición exacta del colorante de marcación (azul de bromofenol) para identificar el frente de migración de los iones. Para ese efecto, puede cortarse una pequeña porción del borde del gel, o sumergir en el interior del gel, en el nivel de la frente de migración del colorante, una aguja mojada en tinta China. Después de la coloración del gel, determinar la distancia de migración de cada banda proteica (marcadores y bandas desconocidas) a partir del borde superior del gel de separación y dividir cada una de esas distancias de migración por la distancia recorrida por el colorante de marcación. Las distancias de migración, así, obtenidas son llamadas movilidades relativas de las proteínas (en referencia a la frente de coloración) y, convencionalmente, representadas por Rf. Construir un gráfico usando los logaritmos de la masa molecular relativa (Mr) de los estándares proteicos en función de los Rf correspondientes. Los gráficos obtenidos son ligeramente sigmoides. El cálculo de las masas moleculares desconocidas puede ser calculado por regresión lineal, o por interpolación a partir de la curva de variación de log (Mr) en función del Rf desde que los valores obtenidos para las muestras desconocidas se sitúen en la parte lineal del gráfico.

#### *Validación del ensayo*

El ensayo sólo será válido si las proteínas utilizadas como marcadores de masa molecular se distribuyen en 80% del largo del gel y si, en el intervalo de separación deseado (por ejemplo, el intervalo que cubra el producto y su dímero, o el producto y sus impurezas relacionadas) existir para las bandas proteicas en causa una relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular y el valor del Rf. Exigencias de validación suplementarios hablando al respecto de la preparación de la muestra pueden ser especificadas en las monografías en particular.

#### DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS IMPUREZAS

Cuando sea especificado en una monografía en particular un tenor en impurezas, es conveniente preparar una solución estándar correspondiente a ese tenor diluyendo la solución problema. Si, por ejemplo, este límite fuese de 5%, la solución estándar es una dilución a 1:20 de la solución problema. El electroforetograma obtenido con la solución problema no presenta ninguna banda debido a la impureza (además de la banda principal) que sea más intensa que la banda principal del electroforetograma obtenido con la solución estándar. Desde que se opere en condiciones validadas, es posible cuantificar las impurezas por normalización con relación a la banda principal, utilizando un densitómetro integrador. En ese caso, es verificada la linealidad de las respuestas.

#### 5.2.22.1 ELECTROFORESIS CAPILAR

Electroforesis capilar (EC) es un método físico de análisis basado en la migración, dentro de un capilar, de solutos cargados, disueltos en una solución electrolítica, bajo la influencia de una corriente eléctrica. Actualmente, la EC comprende una familia de técnicas de separación electrocinéticas que separan compuestos basada, sobretodo, en la diferencia de movilidad electroforética, separación entre fases, punto isoelectrico, tamaño molecular, o además, en la combinación de una o más de estas propiedades.

#### PRINCIPIOS GENERALES

En EC, la separación es gobernada por dos factores. El primero corresponde al movimiento de los solutos en el capilar debido al campo eléctrico (E), también denominado de velocidad electroforética. El segundo ocurre en función del flujo del electrolito debido a la superficie cargada en la pared del capilar, siendo llamado de flujo electrosmótico. La movilidad electroforética de un soluto ( $\mu_{ep}$ ) está relacionada a características específicas como tamaño molecular, forma y carga eléctrica así como propiedades inherentes al electrolito en el cual la migración ocurre (fuerza iónica del electrolito, pH, viscosidad y presencia de aditivos). Bajo la influencia de tensión, los solutos cargados migran a través del electrolito con una determinada velocidad,  $V_{ep}$ , dada en cm/s, y calculada por la ecuación:

$$V_{ep} = \mu_{ep} \cdot E = \left( \frac{q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

donde:

$\mu_{ep}$  = movilidad electroforética;  
 $V$  = tensión aplicada;  
 $q$  = carga efectiva del soluto;  
 $\eta$  = viscosidad del electrolito;  
 $r$  = radio de Stoke's;  
 $V$  = voltaje aplicada al sistema;  
 $L$  = largo total del capilar.

Cuando un campo eléctrico es aplicado a lo largo del capilar, un flujo de electrolito es generado en el interior del mismo. La migración de diferentes solutos a lo largo del capilar en dirección al detector, independiente de la presencia de carga iónica, indica que además de la movilidad electroforética, está involucrada una fuerza adicional. Caso no hubiese esta fuerza adicional, compuestos con carga positiva migrarían por el capilar mientras los aniones permanecerían a la distancia del detector y los solutos neutros simplemente no migrarían. La fuerza adicional que direcciona todos los solutos a través del capilar es denominada de flujo electrosmótico (FEO) y posee papel importante en los diversos tipos de EC.

El FEO tiene su origen a partir de la ionización de los grupos silanoles en la pared interna del capilar, que son transformados en grupos silanoato (Si-O-), en pH arriba de tres. Estos grupos con carga negativa atraen los cationes del electrolito, formando una camada interna en la pared del capilar. La doble camada formada próxima a la superficie del capilar es esencialmente estática. La camada más difusa, próxima a la doble camada es móvil y, bajo acción de una tensión eléctrica, migra en dirección al cátodo acarreado conjuntamente el agua de hidratación. Entre las dos camadas existe un plano de rozamiento y el desequilibrio eléctrico generado corresponde a la diferencia de potencial que atraviesa las dos camadas, denominada de potencial zeta ( $\zeta$ ).

La velocidad del flujo electrosmótico es dependiente de la movilidad electrosmótica ( $\mu_{eo}$ ) que, por su vez, está directamente relacionada a la densidad de carga de la pared interna del capilar y a las características del electrolito. La velocidad del flujo electrosmótico ( $V_{eo}$ ) puede ser calculada por la ecuación:

$$V_{eo} = \mu_{eo} \cdot E = \left( \frac{\epsilon \cdot \zeta}{\eta} \right) \cdot \left( \frac{V}{L} \right)$$

donde

$\epsilon$  = constante dieléctrica del electrolito;  
 $\zeta$  = potencial zeta de la superficie del capilar;  
 $\eta$  = viscosidad del electrolito;  
 $V$  = voltaje aplicada al sistema;  
 $L$  = largo total del capilar.

Las movilidades electroforética y electrosmótica de un soluto pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas, dependiendo de la carga (positiva o negativa) del soluto y de la velocidad del soluto ( $v$ ), conforme a ecuación abajo:

$$V = V_{ep} \pm V_{eo}$$

La suma o diferencia entre las dos velocidades es usada en la dependencia de las movilidades actúen en la misma dirección o en direcciones opuestas. En la electroforesis capilar en su forma más usual, aniones migrarán en dirección opuesta al flujo electrosmótico y sus velocidades serán menores que la velocidad del flujo electrosmótico. Cationes migrarán en la misma dirección del flujo electrosmótico y sus velocidades serán mayores del que la velocidad del flujo electrosmótico. En esta condición, en la cual existe una rápida velocidad de flujo electrosmótico con relación a la velocidad electroforética de los solutos, cationes y aniones pueden ser separados en la misma corrida electroforética.

El tiempo ( $t$ ) necesario para que el soluto migre una distancia ( $l$ ) del terminal de inyección del capilar hasta la ventana de detección del capilar (largo efectivo del capilar) es definido por la ecuación:

$$t = \frac{l}{V_{ep} \pm V_{eo}} = \frac{l(L)}{V(\mu_{ep} \pm \mu_{eo})}$$

donde:

$l$  = distancia del terminal de inyección del capilar hasta la ventana de detección del capilar (largo efectivo del capilar);

$V_{ep}$  = velocidad electroforética;

$V_{eo}$  = velocidad del flujo electrosmótico.

La reproductibilidad en la velocidad de migración de los solutos está directamente relacionada al mantenimiento de un valor constante del flujo electrosmótico entre diferentes corridas electroforéticas. Para algunas aplicaciones específicas, puede ser necesario reducir el mismo suprimir el flujo electrosmótico a través de modificaciones en la pared del capilar o en la concentración, composición y/o pH de la solución electrolítica.

Después de introducción de la muestra en el capilar, cada soluto de la muestra migra junto al electrolito como una banda independiente, conforme su movilidad intrínseca. Bajo condiciones ideales el único factor que puede contribuir para la ampliación de la banda es oriundo de la difusión molecular del soluto a lo largo del capilar (difusión longitudinal). En este caso, la eficiencia de la banda está expresada como número de bandejas teóricas ( $N$ ) de acuerdo con la ecuación:

$$N = \frac{(\mu_{ep} \pm \mu_{eo}) \cdot (VL)}{2DL}$$

donde:

$D$  = coeficiente de difusión molecular del soluto en el electrolito;

Los demás términos fueron abordados anteriormente.

La separación entre dos bandas puede ser alcanzada por la modificación de la movilidad electroforética de los solutos, por el flujo electrosmótico y por el aumento de la eficiencia



cia de las bandas de cada soluto en análisis. La resolución puede ser calculada a través de la ecuación:

$$Rs = \frac{\sqrt{N}(\mu_{epb} - \mu_{epa})}{4(\mu_{ep} + \mu_{eo})}$$

donde:

$\mu_{epb}$  y  $\mu_{epa}$  = movilidades electroforéticas de dos solutos a ser separados;

$\mu_{eo}$  = movilidad del flujo electrosmótico

$\mu_{ep}$  =movilidad electroforética media de los solutos ( $(\mu_{epb} + \mu_{epa})/2$ )

## EQUIPO

Un equipo de electroforesis capilar está compuesto por:

- una fuente de alto voltaje;
- dos depósitos de electrolitos, mantenidos en el mismo nivel, conteniendo soluciones anódica y catódica;
- dos electrodos (cátodo y anodo), inmersos en los depósitos de los electrolitos y conectados a la fuente de alto voltaje;
- un capilar de sílice fundido provisto de ventana de detección para alineamiento a determinados tipos de detectores. Los terminales del capilar son inmersos en los depósitos conteniendo las soluciones electrolíticas. El capilar debe ser llenado con la solución electrolítica prescrita en la monografía;
- sistema de inyección de la muestra de soluto(s) por acción hidrodinámica o electrocinética. La elección del proceso de inyección y su automatización son imprescindibles en el análisis cuantitativo por electroforesis capilar. La introducción de la muestra por el modo electrocinético debe llevar en consideración la movilidad electroforética intrínseca de cada soluto, permitiendo adecuada discriminación de los diferentes componentes de la muestra;
- detector capaz de monitorear la cantidad de solutos que pasan a través del segmento de detección del capilar en intervalo específico de tiempo. Los detectores más usuales están basados en espectrofotometría de absorción (UV y UV-VIS) o fluorimetría. Análisis también pueden ser realizados utilizando detectores electroquímicos o a través de la espectrometría de masas;
- sistema de control de temperatura capaz de mantenerla constante en el interior del capilar. Alteraciones de temperatura implican la falta de reproductibilidad en la separación de solutos;
- sistema computadorizado para registro e integración de los electroferogramas.

La monografía de cada sustancia debe detallar el tipo de capilar, las soluciones electrolíticas, el método de pre- condicionamiento, las condiciones de la muestra y de la migración electroforética.

La solución electrolítica debe ser filtrada (filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ ) para retirar partículas y desairada para evitar la formación de burbujas que puedan interferir en el sistema de detección o interrumpir el contacto eléctrico en el capilar durante la migración electroforética. Los métodos electroforéticos deben establecer un detallado procedimiento de

lavado del capilar entre cada corrida a fin de permitir tiempos de migración reproducibles de los solutos en análisis.

### 5.2.22.1.1 Electroforesis capilar en solución libre

#### PRINCIPIO

En esta técnica los solutos son separados en un capilar conteniendo apenas electrolito sin cualquier medio anticonvectivo. El mecanismo de separación está basado en las diferencias presentadas por la razón carga / masa de las especies analizadas que migran como bandas las velocidades diferenciadas. Los solutos son separados por la combinación entre la movilidad electroforética intrínseca y la magnitud del flujo electrosmótico en el capilar. Capilares recubiertos internamente, con reducido flujo electrosmótico, pueden ser utilizados para aumentar la capacidad de separación de los solutos que adsorben en la superficie del capilar.

La técnica en solución libre es adecuada para análisis de solutos de pequeña masa molecular ( $PM < 2000$ ) y elevada masa molecular ( $2000 < PM < 100\ 000$ ). Debido a la alta eficiencia del sistema, moléculas con diferencias mínimas en su razón masa / carga pueden ser discriminadas. La técnica también permite separación de solutos quirales a través de la adición de selectores quirales en el electrolito de separación. La optimización de la separación requiere la evaluación de diferentes parámetros instrumentales y relacionados a la solución electrolítica.

#### PARÁMETROS INSTRUMENTALES

*Voltaje* – el tiempo de separación es proporcional al voltaje aplicado. Todavía, un aumento en el voltaje usado puede causar producción de calor excesivo (*efecto Joule*), determinando elevación de la temperatura y gradientes de viscosidad en el electrolito dentro del capilar, los cuales son responsables de la ampliación de la banda y reducción en la resolución de los solutos en análisis;

*Polaridad* – la polaridad del electrodo puede ser normal (anodo en la admisión y cátodo en la salida). En este caso el flujo electrosmótico se mueve en dirección al cátodo. Si la polaridad del electrodo es revertida, la dirección del flujo electrosmótico es contraria a la salida y apenas solutos cargados con movilidad electroforética superior a la del flujo electrosmótico migran en dirección a la salida;

*Temperatura* – el principal efecto de la temperatura es observado en la viscosidad y conductividad eléctrica del electrolito. Alteraciones en estas dos propiedades del electrolito determinan diferencias en la velocidad de migración;

*Capilar* – el largo y diámetro interno influyen parámetros analíticos como tiempo de migración total de los solutos, eficiencia de las separaciones y capacidad de carga. Bajo voltaje constante, el aumento del largo total y efectivo del capilar puede disminuir la corriente eléctrica que, por su vez, determina el aumento en el tiempo de migración de los analitos. Capilares con menor diámetro interno poseen mejor capacidad de disipación del calor generado por la corriente eléctrica (*efecto Joule*), permitiendo la elevación de

el voltaje aplicada y reducción en el tiempo de análisis. El límite de detección del método también puede ser influenciado por el diámetro interno, dependiendo del volumen de muestra inyectado y del sistema de detección utilizado. La eficiencia de las separaciones también puede ser aumentada por la reducción del diámetro interno del capilar.

La adsorción de componentes de la muestra en la pared interna del capilar puede limitar la eficiencia. Por esta razón, estrategias para evitar estas interacciones deben ser consideradas en el desarrollo de un método de separación por electroforesis capilar. Este es un factor crítico, por ejemplo, en muestras conteniendo proteínas. Una de estas estrategias (uso de pH(s) extremos y adsorción de electrolitos cargados con carga positiva) requiere la modificación de la composición del electrolito para prevenir la adsorción de las proteínas. Alternativamente, es posible recubrir la pared interna del capilar con un polímero a través de ligaciones covalentes, previniendo la interacción de proteínas con la superficie de la sílice cargada negativamente. Para esta propuesta, capilares con la pared interna previamente recubierta con polímeros de naturaleza neutro-hidrofílica, catiónica y aniónica son disponibles comercialmente.

#### PARÁMETROS DE LA SOLUCIÓN ELECTROLÍTICA

*Naturaleza del tampón y concentración* – Los electrolitos para electroforesis capilar deben presentar capacidad tampón adecuada en la banda de pH escogido y baja movilidad a fin de minimizar la generación de corriente eléctrica. Para disminuir la distorsión del pico electroforético es importante combinar la movilidad del ion del electrolito a la movilidad del soluto. La elección del solvente de la muestra es importante para alcanzar una uniformidad del soluto el cual permite el aumento de la eficiencia de separación y mejora la detección. Además de eso, un aumento en la concentración del electrolito en un pH específico determina la disminución del flujo electrosmótico y de la velocidad del soluto.

*pH del electrolito* – El pH del electrolito puede afectar la separación a través de la modificación de la carga del soluto o de otros aditivos, así como de la alteración del flujo electrosmótico. El cambio en el valor del pH del electrolito arriba o abajo del punto isoeléctrico de proteínas y péptidos influencia la separación de estos solutos, a través de la modificación de la carga líquida de carácter negativo para positivo. En general, un aumento en el pH del electrolito ocasiona elevación del flujo electrosmótico.

*Solventes orgánicos* – Solventes orgánicos como metanol, acetonitrilo entre otros pueden ser añadidos al electrolito acuoso para aumentar la solubilidad del soluto y/o de otros aditivos presentes en el electrolito, o además, influenciar el grado de ionización de los solutos de la muestra. La adición de estos solventes en el electrolito generalmente provoca la reducción del flujo electrosmótico.

*Aditivos para separaciones quirales* – Las separaciones enantioméricas deben ser realizadas a través de la adición de selectores quirales al electrolito de corrida. Los selectores quirales más utilizados son las ciclodextrinas. Sin embargo, éteres corona, polisacáridos y proteínas también pueden ser

empleados para esta finalidad. La discriminación enantiomérica está regida por diferentes interacciones entre el selector quiral y cada uno de los enantiómeros del soluto en análisis. Así, la elección correcta del selector influencia directamente la resolución enantiomérica obtenida para solutos quirales. Durante el desarrollo de un método para separación enantiomérica, es recomendable probar ciclodextrinas de diferentes tamaños de cavidad, ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), ciclodextrinas modificadas con agrupamientos neutros (metil, etil, hidroxialquil, etc.), o con agrupamientos ionizables (aminometil, carboximetil, sulfobutil eter, etc.). La resolución de separaciones quirales es igualmente controlada por la concentración del selector quiral, de la composición y pH del electrolito y de la temperatura de análisis. Aditivos orgánicos como metanol y Urea pueden ser empleados para modificar la resolución obtenida.

#### 5.2.22.1.2 Cromatografía Electrocinética Micelar (CIEN)

##### PRINCIPIO

En la Cromatografía Electrocinética Micelar, la separación ocurre en una solución electrolítica que contiene un tensoactivo a una concentración arriba de la concentración micelar crítica (*cmc*). Las moléculas del soluto son distribuidas entre el electrolito y la fase pseudoestacionaria compuesta de micelas, de acuerdo con el coeficiente de partición del soluto. Es una técnica que puede ser usada para separación de solutos neutros e/o ionizados, manteniendo la eficiencia, velocidad y adecuabilidad instrumental de la electroforesis capilar. El tensoactivo aniónico dodecil sulfato de sodio (DSS) es uno de los tensoactivos más usados en la CEM, a pesar de otros también ser utilizados, como, por ejemplo, tensoactivos catiónicos (sales de cetiltrimetilamonio).

En pH neutro o alcalino, un fuerte flujo electrosmótico es generado moviendo los iones del electrolito de separación en la dirección del cátodo. Si DSS fuese utilizado como tensoactivo, la migración electroforética de la micela aniónica será en la dirección opuesta, en dirección al ánodo. Como resultado, la velocidad de migración micelar total es reducida, en comparación al flujo de la solución electrolítica. En el caso de solutos neutros, una vez que el analito puede estar distribuido entre la micela y el electrolito, y no hay movilidad electroforética, la velocidad de migración del analito dependerá solamente del coeficiente de separación entre la micela y el electrolito. En el electroferograma, los picos correspondientes cada soluto neutro están siempre localizados entre el marcador de flujo electrosmótico y el de la micela (el tiempo transcurrido entre estos dos picos es llamado de ventana de separación). Para solutos ionizados, la velocidad de migración depende del coeficiente de partición del soluto entre la micela y electrolito y de la movilidad electroforética del soluto en la ausencia de la micela.

En la CEM el mecanismo de solutos neutros y levemente ionizados es esencialmente cromatográfica. Así, la migración del soluto y la resolución pueden ser representadas en términos de factor de retención del soluto ( $k$ ), también denominada de razón de distribución de masa ( $D_m$ ), que es la relación entre número de moles del soluto en el interior

de la micela y en la fase móvil. Para una sustancia neutra,  $k$  puede ser calculado a través de la siguiente ecuación:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \times \left( 1 - \frac{t_R}{t_{mc}} \right)} = K \times \frac{V_S}{V_M}$$

donde

$t_R$  = tiempo de migración del soluto;

$t_0$  = tiempo de migración de un soluto no retenido (determinado por la inyección de un marcador de flujo electrosmótico que no se liga a la micela, por ejemplo, metanol);

$t_{mc}$  = tiempo de migración de la micela (determinado por la inyección de un marcador de micela, como Sudan III, el cual migra continuamente asociado a la micela a lo largo de la migración electroforética);

$K$  = coeficiente de partición del soluto;

$V_S$  = volumen de la fase micelar;

$V_M$  = volumen de la fase móvil;

Igualmente, la resolución entre 2 picos adyacentes ( $R_s$ ) está dada por:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k_b}{k_b + 1} \times \frac{1 - \left( \frac{t_0}{t_{mc}} \right)}{1 + k_a \times \left( \frac{t_0}{t_{mc}} \right)}$$

donde:

$N$  = número de bandejas teóricas de cada soluto;

$\alpha$  = selectividad;

$k_a$  y  $k_b$  = factores de retención para ambos solutos respectivamente ( $k_b > k_a$ ).

De forma similar, sin embargo no idéntica, las ecuaciones dan los valores de  $k$  y  $R_s$  para solutos con carga.

## OPTIMIZACIÓN

El desarrollo de métodos por CEM envuelve parámetros instrumentales y de la solución electrolítica:

### Parámetros instrumentales

**Voltaje** – El tiempo de separación es inversamente proporcional al voltaje aplicado. Todavía, un aumento en el voltaje puede causar producción excesiva de calor, elevando los gradientes de temperatura y viscosidad del electrolito en la sección transversal del capilar. Este efecto puede presentar impacto relevante en electrolitos que presenten mayor conductividad como aquellos que contienen sistemas micelares. Los sistemas que presentan menor capacidad de disipación del calor determinan la ampliación de las bandas y menor resolución entre los picos.

**Temperatura** – Alteraciones en la temperatura del capilar afectan el coeficiente de partición del soluto entre el electrolito y las micelas, la concentración micelar crítica y la viscosidad del electrolito. Estos parámetros influyen directamente en el tiempo de migración de los solutos durante la separación electroforética. La utilización de un adecuado sistema de refrigeración aumenta la reproducibilidad del tiempo de migración de los solutos.

**Capilar** – Las dimensiones del capilar (largo y diámetro interno) contribuyen en el tiempo de análisis y en la eficiencia de las separaciones. Un aumento del largo total y efectivo del capilar puede disminuir la corriente eléctrica (bajo voltaje constante), aumenta el tiempo de migración y mejora la eficiencia de separación. El diámetro interno del capilar controla la disipación del calor (en un dado electrolito y corriente eléctrica) y consecuentemente la ampliación de las bandas de los solutos.

### Parámetros de la solución electrolítica

**Naturaleza del tensoactivo y concentración** – La naturaleza del tensoactivo, de forma análoga a la fase estacionaria en cromatografía, afecta la resolución, pues modifica la selectividad de la separación. El log  $k$  de una sustancia neutra aumenta linealmente con la concentración del tensoactivo en la fase móvil. dado que la resolución en CEM alcanza un máximo cuando  $k$  presenta valor próximo a la

$$\sqrt{t_{mc}/t_0}$$

modificaciones en la concentración de tensoactivo presente en la fase móvil determinan alteraciones en la resolución de las bandas.

**pH del electrolito** – el pH no altera el coeficiente de partición de solutos no ionizados, pero puede determinar cambios en el flujo electrosmótico en capilares no recubiertos. Una disminución en el pH del electrolito reduce el flujo electrosmótico, proporcionando un aumento en la resolución de los solutos neutros y en el tiempo de análisis.

**Solventes orgánicos** – solventes orgánicos (metanol, propanol, acetonitrilo) pueden ser añadidos a la solución electrolítica para mejorar la separación de solutos hidrofóbicos. En general, la adición de estos modificadores reduce el tiempo de migración y la selectividad de la separación. El porcentual de solvente orgánico adicionado debe llevar en consideración la concentración micelar crítica del tensoactivo, teniendo en vista que valores excesivos pueden afectar, o también, inhibir el proceso de formación de las micelas y, por consiguiente, la ausencia del fenómeno de partición. La disociación de micelas en la presencia de porcentuales elevados de modificador no significa necesariamente mejores resultados en la separación. En determinadas situaciones, la interacción hidrofóbica entre el monómero del tensoactivo y solutos neutros forman complejos solvofóbicos que puede ser separados electroforéticamente.

**Modificadores para separaciones quirales** – la separación de enantiómeros en CEM puede ser obtenida a través de la inclusión de selectores quirales al sistema micelar, ligados covalentemente al tensoactivo o añadidos al electrolito de separación. Micelas que poseen ligaciones con propiedades de discriminación quiral incluyen sales de N-dodecanoyl-*L*-aminoácidos, sales biliares, entre otros. La resolución quiral también puede ser obtenida a través de selectores quirales, tales como las cidodextrinas, adicionadas directamente a las soluciones electrolíticas que contienen tensoactivos no quirales.

*Otros aditivos* – La selectividad puede ser modificada a través de varias estrategias, por adición de sustancias químicas al electrolito. La adición de diversos tipos de ciclodextrinas al electrolito también puede ser utilizada para reducir interacción de solutos hidrofóbicos con la micela, aumentando así la selectividad para este tipo de soluto.

La adición de sustancias capaces de modificar las interacciones soluto-micela por adsorción en esta última ha sido usada para aumentar la selectividad de las separaciones en CEM. Estos aditivos pueden ser un segundo tensoactivo (iónico o no iónico) que origina mezcla de micelas o cationes metálicos que disuelven la micela formando complejos de coordinación con los solutos.

## CUANTIFICACIÓN

Las áreas de los picos deben ser divididas por el tiempo de migración correspondiente para suministrar el área correcta con el objetivo de:

- compensar el desplazamiento en el tiempo de migración entre corridas, reduciendo así la variación de la respuesta;
- compensar las diferentes respuestas de los componentes de la muestra con diferentes tiempos de migración.

Cuando un estándar interno es utilizado, se debe verificar si ningún pico de soluto a ser analizado presenta superposición al pico del estándar interno.

## CÁLCULOS

El tenor del componente (o componentes) en análisis debe ser calculado a partir de los valores obtenidos. Cuando prescritos, el tenor porcentual de uno o más componentes de la muestra a ser analizada es calculado por la determinación del área corregida (s) del pico (s) como un porcentaje del total de las áreas corregidas de todos los picos, excluyendo aquellos resultantes de solventes o reactivos añadidos (proceso de normalización). Es recomendable la utilización de un sistema de integración automática (integrador o sistema de adquisición y procesamiento de datos).

## ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

Los parámetros de adecuabilidad del sistema son empleados para verificar el comportamiento del método por electroforesis capilar. La elección de estos parámetros depende del tipo de Electroforesis Capilar utilizado. Los factores son: factor de retención (k) (apenas para cromatografía electrocinética micelar), número aparente de bandejas teóricas (N), factor de simetría ( $A_s$ ) y resolución ( $R_s$ ). Las ecuaciones que permiten calcular los valores de N y  $R_s$  a través de los electroferogramas son suministradas abajo.

*Número aparente de bandejas teóricas*

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

donde:

$t_R$  = Tiempo de migración o distancia de línea de base a partir del punto de inyección hasta la línea perpendicular del punto máximo del pico correspondiente al componente.  
 $W_h$  = Ancho del pico a media altura

## Resolución

A resolución ( $R_s$ ) entre picos de alturas similares de 2 componentes puede ser calculada usando a expresión:

$$R_s = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

$$t_{R2} > t_{R1}$$

donde:

$t_{R1}$  y  $t_{R2}$  = tiempos de migración o distancias de la línea de base a partir del punto de inyección hasta a línea perpendicular del punto máximo de dos picos adyacentes  
 $w_{h1}$  y  $w_{h2}$  = largura de los picos a la media altura

Cuando apropiado, la resolución puede ser calculada a través de la medida de la altura del valle ( $H_v$ ) entre 2 picos parcialmente resueltos en una preparación estándar y la altura del pico menor ( $H_p$ ), calculando la razón pico/valle (p/v):

$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$$

## Factor de simetría

El factor de simetría ( $A_s$ ) de un pico puede ser calculado usando a expresión:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

donde:

$w_{0,05}$  = largura del pico determinada a 5% del valor de la altura;  $d$  = distancia entre la línea perpendicular del pico máximo y la tangente del pico a 5% de la altura del pico.

Pruebas para repetibilidad de área (desvío estándar de las áreas o de la razón área / tiempo de migración) y para repetibilidad del tiempo de migración (desvío estándar del tiempo de migración) son introducidos como parámetros de adecuabilidad. La repetibilidad del tiempo de migración da una prueba para adecuabilidad de procedimientos de lavado del capilar. Una práctica alternativa para evitar la falta de repetibilidad del tiempo de migración es usar el tiempo de migración relativo a un estándar interno.

Un prueba para verificar la razón señal/ruido de una preparación estándar (o la determinación del límite de cuantificación) también puede ser útil para determinación de sustancias relacionadas.

## Proporción señal: ruido

Los límites de detección y cuantificación corresponden a la razón señal : ruido de 3 y 10, respectivamente.

La proporción señal : ruido (S/N) es calculada usando a expresión:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

donde:

$H$  = altura del pico correspondiente al componente específico, en el electroferograma obtenido con la solución referencia, medida a partir del máximo del pico hasta la línea de base extrapolada del señal observado a lo largo de una distancia igual a 20 veces el ancho a media altura del pico;  $h$  = intervalo de la línea de base en un electroferograma obtenido después de inyección del blanco, observado a una distancia igual a 20 veces el ancho a media altura del pico en el electroferograma obtenido con la solución referencia, y si posible, localizado próximo del tiempo de retención donde este pico sería encontrado.

## 5.2.23 ANÁLISIS ENANTIOMÉRICO

### FÁRMACOS QUIRAIS

Los enantiómeros generalmente exhiben diferentes propiedades farmacológicas y toxicológicas debido a que los principales objetivos moleculares como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos son quirales. Por ejemplo, los enantiómeros del éter metílico del levorfanol, el dextrometorfano y el levometorfano, son utilizados diferentemente en la terapéutica. Mientras el dextrometorfano es indicado como antitusivo, el levometorfano es indicado como analgésico.

Debido al reconocimiento de la importancia del uso clínico de fármacos enantioméricamente puros en el tratamiento de diversas enfermedades, las industrias farmacéuticas son incentivadas constantemente a disponer fármacos resueltos en cantidades industriales.

Para garantizar la seguridad y la eficiencia de los fármacos disponibles y en desarrollo, es necesario resolver los enantiómeros y examinar cada uno cuanto a las actividades farmacológicas y toxicológicas. Después de la identificación del enantiómero más activo (eutómero) se debe evaluar el exceso enantiomérico del eutómero desde la síntesis hasta el consumo para garantizar la calidad del medicamento.

### SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICO DE FÁRMACOS

La separación, o resolución, de enantiómeros por cromatografía a líquido de alta eficiencia (CLAE) comenzó a ser aplicada desde los años sesenta. En los años setenta, con el apareamiento de las columnas de pequeñas partículas para cromatografía a líquido, se incluyó el desarrollo de las fases estacionarias quirales para resolución de fármacos racémicos.

La CLAE es considerada una de las técnicas más eficientes para separación, detección y cuantificación de fármacos. El

uso de fase estacionaria quiral (FEQ) adecuada se torna un poderoso método para la separación de los enantiómeros.

La resolución cromatográfica de los enantiómeros puede ser alcanzada por varios métodos, todavía, es siempre necesario el uso de algún tipo de discriminador o selector quiral. El método indirecto y el directo son los dos caminos para separación de los enantiómeros utilizando cromatografía a líquido.

En el método indirecto, los enantiómeros son convertidos en diastereoisómeros por la reacción con una sustancia quiral. Los diastereoisómeros son sustancias que presentan propiedades físico-químicas diferentes y, por tanto, pueden ser separados utilizando fase estacionaria no quiral.

El método indirecto fue largamente utilizado en el pasado. No obstante presenta limitaciones como necesidad del aislamiento de la sustancia de interés y su derivatización. Esos hechos dificultan el desarrollo del proceso automatizado para gran número de muestras. Además de eso, la pureza enantiomérico de los agentes derivatizantes es importante para evitar falsos resultados. Otra limitación son las diferentes velocidades y/o constantes de reacción para los enantiómeros ya que los estados de transición reacionales son diastereoisoméricos lo que puede resultar en proporción diferente de la composición enantiomérico inicial.

En el método directo, la mezcla de enantiómeros a ser resuelta es inyectada directamente en el cromatógrafo. Para la separación de los enantiómeros se puede utilizar una FEQ, o un solvente quiral, o una fase móvil con aditivo quiral. La resolución ocurre debido a la formación de complejos diastereoisoméricos entre la mezcla enantiomérica y el selector quiral utilizado para la resolución. El uso de FEQ es hoy el método más empleado para resolución por CLAE.

En las tablas a continuación (**Tablas 1, 2, 3, 4 y 5**) son presentadas las principales clases de fases estacionarias utilizadas para la resolución de mezclas racémicas y algunos ejemplos de selectores quirales en cada clase. Consultar el fabricante para la indicación del uso de cada selector.

**Tabla 1 - Fases estacionarias quirales del tipo Pirkle.**

<i>Discriminador quiral*</i>
( <i>R</i> )-DNB-fenilglicina
( <i>S</i> )-DNB-fenilglicina
( <i>R</i> )-DNB-leucina
( <i>S</i> )-DNB-leucina
Fosfonato de dimetilo de DNB- $\alpha$ -amino-2,2-dimetil-4-pentenila
DNB-tetraidrofenantreno
Naftiletilamida

La mayoría das columnas do tipo Pirkle son disponibles en las dos formas enantioméricas.



**Tabla 2 - Fases estacionarias quirales del tipo proteína.**

<i>Discriminador quiral</i>
a1-Glicoproteína ácida
Albumina sérica bovina
Albumina sérica humana
Celobiodrolase I
Pepsina
“Ovomucoid”

**Tabla 3 - Fases estacionarias quirales del tipo cavidad o inclusión.**

<i>Discriminador quiral</i>
$\alpha$ -Ciclodextrina
$\beta$ -Ciclodextrina
$\gamma$ -Ciclodextrina
<i>O</i> -( <i>S</i> )-2-Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
<i>O</i> -( <i>R/S</i> ) 2-Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
<i>O</i> -( <i>S</i> )-Naftiletílcarbamoil- $\beta$ -ciclodextrina

**Tabla 4 - Fases estacionarias quirales del tipo carbohidratos.**

<i>Discriminador quiral</i>
Tris (dimetilfenilcarbamoil) celulosa
Tris (4-metilbenzoato) celulosa
Tris (fenilcarbamoil) celulosa
Triacetato de celulosa
Tribenzoato de celulosa
Éter tribenzílico de celulosa
Tricinamato de celulosa

**Tabla 5 - Fases estacionarias quirales del tipo antibióticos macrocíclicos.**

<i>Discriminador quiral</i>
Vancomicina
Teicoplanina
Ristocetina

## 5.2.24 CONDUCTIVIDAD DEL AGUA

La conductividad eléctrica del agua es una medida del flujo de electrones la cual es facilitada por la presencia de iones. Moléculas de agua se disocian en iones en función del pH y de la temperatura resultando en una determinada conductividad. Algunos gases, en especial el dióxido de carbono, se disuelven en agua e interactúan para formar iones que afectan la conductividad y el pH del agua. Esos iones y su conductividad resultante pueden ser considerados como intrínsecos al agua. La exposición de la muestra a la atmósfera puede alterar la conductividad/resistividad, debido a la pérdida o ganancia de gases disueltos.

El ion cloruro y el ion amonio son algunas de las principales impurezas encontradas en la agua y, también, influyen en su conductividad. Esos iones externos pueden tener impacto significativo en la pureza química del agua y comprometer su utilización en aplicaciones farmacéuticas.

Las conductividades combinadas de los iones intrínsecos secos y de los iones externos varían en función del pH y son la base para las especificaciones de la conductividad descritas en la tabla 3 y empleadas cuando realizada la etapa 3 de la prueba. Dos etapas preliminares son incluidas en esta prueba. Si las condiciones de la prueba y los límites de conductividad son atendidos en cualquiera de estas etapas preliminares (Etapas 1 y 2), el agua satisface las exigencias de esta prueba y no es necesaria la aplicación de la Etapa 3. Solamente en el caso de que la muestra no obedezca a las exigencias de la Etapa 3, el agua es juzgada como no conforme con los requisitos de la prueba de conductividad.

### INSTRUMENTACIÓN Y PARÁMETROS OPERACIONALES

La conductividad del agua debe ser medida usando instrumentos calibrados con resolución de 0,1  $\mu$ S/cm. El termómetro debe tener divisiones de 0,1 °C y cubrir la banda de 23 a 27 °C. Los electrodos deben ser mantenidos conforme la recomendación del fabricante del aparato.

La constante de conductividad de la célula es un factor usado como multiplicador para los valores de la escala del conductímetro.

*Constante de la célula:* el valor debe ser conocido en  $\pm 2\%$ . Generalmente células de conductividad presentan constante de 0,1 cm<sup>-1</sup>, 1 cm<sup>-1</sup> y 2 cm<sup>-1</sup>. La mayoría de los equipos presenta la constante de la célula definida. Es necesario comprobar esa constante con solución de KCl de referencia descrita en la **Tabla 1**. Normalmente la verificación es realizada utilizando solamente una solución de referencia; en ese caso utilizar la solución de referencia de menor conductividad. Sin embargo, es recomendable medir periódicamente la conductividad de los demás estándares y observar la concordancia entre la lectura del conductímetro y el valor nominal de cada solución de referencia.

*Calibración:* conforme instrucciones del fabricante. La mayoría de los equipos de múltiples escalas posee un único punto calibración, luego es necesario calibrar siempre que se use una escala diferente. La lectura obtenida debe estar entre +0,1  $\mu$ S/cm del valor nominal de la solución de referencia.

Para la calibración del conductímetro, utilizar las soluciones de referencias descritas a continuación.

*Solución A (0,01 M):* pesar exactamente 0,7455 g de cloruro de potasio seco a 105 °C durante 2 horas, transferir para balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua.

*Solución B (0,005 M):* pipetear 50 ml de la *Solución A* para balón volumétrico de 100 ml y completar con agua.

*Solución C (0,001 M):* pipetear 10 ml de la *Solución A* para balón volumétrico de 100 ml y completar con agua.

*Solución D (0,0005 M):* pipetear 5 ml de la *Solución A* para balón volumétrico de 100 ml y completar con agua.

*Solución Y (0,0001 M)*: pipetear 5 ml de la *Solución A* para balón volumétrico de 500 ml y completar con agua.

**Nota 1:** para el preparado de las soluciones arriba utilizar siempre agua exenta de dióxido de carbono, o sea, con conductividad inferior a 0,10  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

**Nota 2:** no utilizar compensación de temperatura y mantener las soluciones de referencia a 25 °C durante la lectura.

**Tabla 1 - Conductividad de las soluciones de cloruro de potasio (25°C).**

<i>Solución</i>	<i>Concentración (mol/L)</i>	<i>Conductividad <math>\mu\text{S}/\text{cm}</math></i>
A	0,01	1412
B	0,005	717,5
C	0,001	146,9
D	0,0005	73,9
E	0,0001	14,9

## PROCEDIMIENTO

El procedimiento escrito a continuación es establecido para medidas de agua purificada y agua para inyectables.

Alternativamente la Etapa 1 puede ser realizada (con modificaciones) apropiadas de acuerdo en el ítem 1 de la Etapa 1) usando instrumentos de tipo “en línea” que hayan sido calibrados apropiadamente, cuyas constantes de célula hayan sido exactamente determinadas y cuyas funciones de compensación de temperatura hayan sido deshabilitadas.

La adecuabilidad de tales instrumentos “en línea” para prueba de control de calidad es también dependiente de la localización en el sistema de agua. Evidentemente, el posicionamiento del instrumento precisa reflejar la calidad del agua que será usada.

### *Etapa 1*

1. Enjuagar la célula por lo menos con tres porciones de la muestra.
2. La determinación debe ser realizada en recipiente apropiado o como determinación “en línea”. El valor obtenido debe ser inferior a 1,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , en la temperatura de 25,0 °C + 0,1 °C.
3. En la tabla 2, localizar el valor de la temperatura más próxima y menor que la temperatura en la cual la conductividad fue medida. El valor de conductividad correspondiente a esa temperatura es el límite. (No interpolar)
4. Si el valor de conductividad medido no es mayor que el valor correspondiente en la Tabla 2, el agua atiende a

las exigencias para la conductividad. Sin embargo, si el valor medido es mayor que el de la tabla, proceder a la determinación de acuerdo con la Etapa 2.

**Tabla 2 - Valores límites para conductividad de acuerdo con la temperatura (solamente para valores de conductividad sin compensación de temperatura).**

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Conductividad (pS/cm)</i>
0	0,6
5	0,8
10	0,9
15	1,0
20	1,1
30	1,3
35	1,4
40	1,5
45	1,7
50	1,8
55	1,9
60	2,1
65	2,2
70	2,4
75	2,5
80	2,7
85	2,7
90	2,7
95	2,9
100	3,1

### *Etapa 2*

1. Transferir cantidad suficiente de agua (100 ml o más) para recipiente apropiado y agitar a muestra. Ajustar a (25 ± 1) °C y agitar la muestra vigorosamente observando periódicamente la lectura del conductímetro. Cuando el cambio en la conductividad debido a la absorción de dióxido de carbono atmosférico es menor que 0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$  por 5 minutos, registrar la conductividad.
2. Si la conductividad no es mayor que 2,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , el agua obedece a las exigencias para la prueba de conductividad. Si la conductividad es mayor que 2,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , proceder conforme la Etapa 3.

### *Etapa 3*

Realizar este prueba como máximo 5 minutos después de la *Etapa 2* con la misma muestra manteniéndola a temperatura de (25 ± 1) °C. Añadir solución saturada de cloruro de potasio (0,3 ml para 100 ml de muestra) y determinar el pH con precisión de 0,1 unidad de acuerdo con *Determinación del pH (5.2.19)*. Utilizando la **Tabla 3** determinar el valor límite para la conductividad de acuerdo con el pH.

**Tabla 3** - Valores límites de conductividad de acuerdo con el pH (solamente para muestras mantenidas en atmósfera y temperatura equilibradas).

pH	Conductividad (pS/cm)
5,0	4,7
5,1	4,1
5,2	3,6
5,3	3,3
5,4	3,0
5,5	2,8
5,6	2,6
5,7	2,5
5,8	2,4
5,9	2,4
6,0	2,4
6,1	2,4
6,2	2,5
6,3	2,4
6,4	2,3
6,5	2,2
6,6	2,1
6,7	2,6
6,8	3,1
6,9	3,8
7,0	4,6

Después de determinado el pH y establecido el límite de acuerdo con la **Tabla 3**, el agua atiende la prueba si la conductividad medida en la *Etapa 2* no es mayor que ese límite. Si la conductividad fuese mayor o el valor del pH está fuera de la banda de 5 a 7, el agua no atiende la prueba para conductividad.

#### AGUA ULTRAPURIFICADA

Para el agua ultrapurificada, en general los conductímetro o resistímetro instalados en los equipos de purificación de agua poseen un circuito de compensación de la temperatura para 25,0 °C y dan la lectura directa. Esos equipos deben ser calibrados periódicamente. La conductividad del agua ultrapurificada debe ser 0,055 µS/cm a 25,0 °C (resistividad > 18,0 MΩ.cm) para una aplicación específica.

Alternativamente, caso el equipo no proporcione la lectura directa de la conductividad, proceder conforme a continuación:

1. Enjuagar la célula con por lo menos tres porciones de la muestra.
2. Determinar simultáneamente la temperatura y la conductividad del agua sin compensación automática de la temperatura. La determinación debe ser realizada en recipiente apropiado o como determinación "en línea". El valor obtenido debe ser inferior a 0,055 µS/cm, en la temperatura de 25,0 °C + 0,1°C.
3. En la **Tabla 4**, localizar el valor de temperatura más próximo y menor que la temperatura en la cual la conductividad fue medida. El valor de conductividad correspondiente a esa temperatura es el límite. (No interpolar)

Si el valor de conductividad medido no es mayor que el valor correspondiente en la **Tabla 4**, el agua ultrapurificada atiende a las exigencias para la conductividad.

**Tabla 4** - Valores límites para conductividad de acuerdo con la temperatura (solamente para valores de conductividad sin compensación de temperatura).

Temperatura (°C)	Conductividad (pS/cm)
0	0,012
5	0,017
10	0,023
15	0,031
20	0,042
25	0,055
30	0,071
35	0,090
40	0,113
45	0,140
50	0,171
55	0,207
60	0,247
65	0,294
70	0,345
75	0,403
80	0,467
85	0,537
90	0,614
95	0,696
100	0,785

## 5.2.25 LIMPIDEZ DE LÍQUIDOS

### PROCEDIMIENTO

Utilizar tubos de vidrio neutro, incoloro y transparente, con fondo chato y de 15 a 25 mm de diámetro interno, a menos que indicado de manera diferente en la monografía. Introducir, en tubos separados, el líquido en examen y la *suspensión de referencia* indicada en la monografía, preparándola por ocasión del uso, conforme especificado en la **Tabla 1**. El líquido en examen y la suspensión de referencia deben alcanzar, en los tubos, una altura de 40 mm. Cinco minutos después del preparado de la *suspensión de referencia*, comparar el contenido de los tubos, observándolos, verticalmente, bajo luz visible difusa y contra fondo negro. La difusión de la luz debe ser tal que la *suspensión de referencia I* sea fácilmente distinguida del agua y de la *suspensión de referencia II*.

Un líquido es considerado límpido cuando, al ser examinado en las condiciones anteriormente descritas, su transparencia corresponde a la del agua o a la del solvente utilizado, o cuando su opalescencia no es más pronunciada que la de la suspensión de referencia I.

#### Estándar de opalescencia

Disolver 1 g de sulfato de hidracina en agua y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente. Dejar en reposo por 4 a 6 horas. Añadir 25 ml de esa solución a una so-

lución conteniendo 2,5 g de metenamina en 25 ml de agua. Mezclar bien y dejar en reposo por 24 horas. Esa suspensión es estable por dos meses si es conservada en recipiente de vidrio, con superficie libre de defectos. La suspensión no debe adherir a las paredes del recipiente y debe ser, vigorosamente, agitada, en el recipiente original, antes del uso. Para el preparo del *estándar de opalescencia*, diluir 15 ml de la suspensión para 1000 ml con agua. El *estándar de opalescencia* debe ser preparado en el momento del uso y puede ser conservado por, como máximo, 24 horas.

**Tabla 1 - Preparo de las suspensiones de referencia**

<i>Suspensión de referencia</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Estándar de opalescencia (ml)	5	10	30	50
Agua (ml)	95	90	70	50

## 5.2.26 ALCOHOLIMETRÍA

Alcoholimetría es la determinación del grado alcohólico o título etanólico de las mezclas de agua y alcohol etílico.

El título alcohométrico volumétrico de una mezcla de agua y alcohol está expresado por el número de volúmenes de etanol a 20 °C contenido en 100 volúmenes de esa mezcla a misma temperatura. Está expresado en % (v/v).

El título alcohométrico ponderal está expresado por la relación entre la masa de etanol contenida en una mezcla de agua y etanol y la masa total de esta. Está expresado en % (m/m).

El alcohol etílico contiene, como mínimo, 95,1% (v/v) correspondiendo a 92,55% (m/m) y, como máximo, 96,9% (v/v) correspondiendo a 95,16% (m/m) de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O a 20 °C. El alcohol etílico absoluto contiene, como mínimo, 99,5% (v/v) correspondiendo a 99,18% (m/m) de C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O a 20 °C. Esos valores pueden ser observados en la tabla alcohométrica (Anexo D).

### DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO O TÍTULO ALCOHOMÉTRICO

El alcoholómetro centesimal se destina a la determinación del grado alcohólico de las mezclas de agua y alcohol indicando solamente la concentración del alcohol en volumen y expresado por su unidad de medida, grado Gay-Lussac (°G.L.).

Las determinaciones del alcoholómetro son exactas solamente para la mezcla de agua y alcohol a 20 °C, en la cual el instrumento fue graduado. Si la temperatura durante el ensayo fuese inferior o superior a 20 °C se torna necesario corregir la temperatura del alcohol para 20 °C.

La determinación del grado alcohólico de las mezclas de agua en volumen es realizada por el alcoholómetro.

Para la determinación del grado alcohólico de las mezclas de agua y alcohol en masa, puede ser utilizado el método de la densidad relativa o verificada a graduación en la tabla alcohométrica después de la determinación por el alcoholómetro.

## 5.2.27 ANÁLISIS TÉRMICO

El Análisis Térmico es un conjunto de técnicas que posibilitan medir las propiedades físico-químicas de una sustancia en función de la temperatura. Las técnicas más comúnmente utilizadas son las que miden las variaciones de energía o de masa de una sustancia.

### TERMOGRAVIMETRÍA (TG)

La termogravimetría es la técnica de Análisis Térmico en que la variación de masa de la muestra es determinada como una función de la temperatura, o tiempo de calentamiento, utilizando un programa controlado de temperatura.

#### *Aparatos*

Es constituido básicamente de una termobalanza que es una asociación entre el horno eléctrico y una balanza electrónica de alta precisión en la cual la sustancia es insertada en un porta muestra bajo atmósfera especificada y programa controlado de temperatura. El dispositivo posibilita calentar y medir simultáneamente la masa del analito. En ciertos casos, el aparato puede ser asociado a un sistema que posibilita detectar y analizar los productos volátiles.

*Calibración y/o comprobación de la termobalanza.* Transferir una cantidad adecuada de oxalato de calcio monohidratado SQR en el porta muestra. La termobalanza indicará con gran precisión y exactitud su masa. Emplear la razón de calentamiento de 10 °C/min y calentar la muestra hasta 900 °C. Al finalizar el proceso térmico registrar: i) la curva termogravimétrica (TG) marcando la temperatura en el eje de las abscisas (valores crecientes de la izquierda para la derecha) y la masa porcentual de la muestra en el eje de las ordenadas (valores crecientes de abajo para arriba); ii) la curva termogravimétrica derivada (DTG), derivada primera de la curva TG, que posibilita definir mejor donde se inició y finalizó la pérdida de masa. Determine en el gráfico la distancia entre los estándares inicial y final de la curva masa- temperatura, distancia que representa la pérdida de masa de la muestra en el dado intervalo de temperatura. Las pérdidas de masas declaradas del oxalato de calcio monohidratado SQR son calculadas, estequiométricamente, a partir de las tres etapas de pérdidas de masas debido a las sucesivas liberaciones de: a) H<sub>2</sub>O; b) CO; c) CO<sub>2</sub>. La verificación de la escala de la temperatura puede ser realizada utilizando la técnica del gancho metálico fundible (In, Pb, Zn, Al, Ag y Au) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

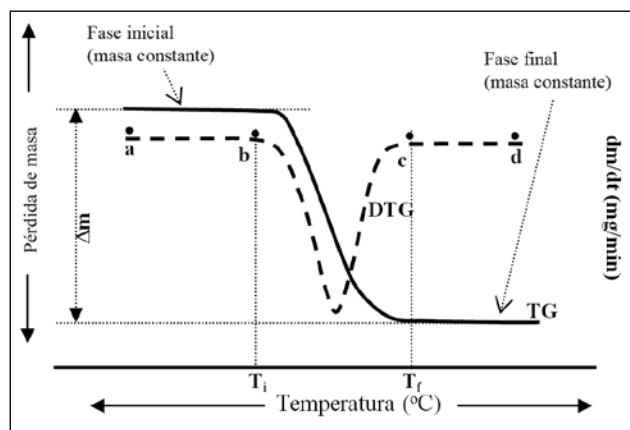
#### *Procedimiento*

Utilizar el mismo método descrito para calibración y/o comprobación adicionando una cantidad adecuada de muestra. Las curvas TG y DTG ilustradas en la **Figura 1** indican una etapa de pérdida de masa de la muestra. En la curva DTG, se observa que entre los puntos **ab** se sitúa el nivel inicial. La pérdida de masa se inicia en el punto **b** y se finaliza en el punto **c**. Entre los puntos **cd** se sitúa el nivel final. El intervalo **bc** corresponde al intervalo reaccional. Para calcular la pérdida de masa de la muestra en la curva TG, se utiliza la comparación con la curva DTG para ma-

por precisión en la localización de los puntos **b** y **c**. Trazar las prolongaciones de los estándares inicial y final de la curva TG en el eje de las ordenadas utilizando los puntos **b** y **c**. La distancia medida corresponde a la pérdida de masa ( $\Delta m$ ) de la muestra. Las proyecciones de los puntos **b** y **c** en el eje de abscisas corresponden, respectivamente, a la temperatura inicial ( $T_i$ ) y final ( $T_f$ ) de la pérdida de masa. Registrar el resultado en porcentaje de la relación  $m/m$ .

**Nota 1:** es necesaria la obtención de una curva del ensayo en blanco (calentamiento en las mismas condiciones experimentales empleándose el porta muestra vacío) antes del ensayo de la muestra para sustracción de línea base.

**Nota 2:** en el caso de la utilización frecuente del aparato, realizar, regularmente, la verificación y/o calibración. En caso contrario, realizar esas operaciones antes de cada determinación.



**Figura 1** - Ejemplo de la curva termogravimétrica y sus medidas.

#### Aplicaciones

La determinación de la variación de la masa para una sustancia en determinados intervalos de temperatura puede ser utilizada para evaluación del comportamiento térmico; determinación del tenor de humedad y/o solventes; determinación de la temperatura de ebullición y sublimación; determinación de la temperatura de descomposición térmica y determinación del tenor de cenizas.

#### CALORIMETRÍA EXPLORATORIA DIFERENCIAL (DSC)

La calorimetría exploratoria diferencial es una técnica que posibilita evaluar los fenómenos energéticos, físicos y/o químicos producidos durante el calentamiento (o enfriamiento) de una sustancia. Esa técnica posibilita medir el flujo de calor diferencial entre la muestra y un material de referencia térmicamente inerte en función de la temperatura y/o tiempo de calentamiento bajo un programa controlado de temperatura. La muestra y el material de referencia son mantenidos aproximadamente a la misma temperatura durante el experimento. Se pueden determinar las variacio-

nes de entalpía; los cambios de calor específico y la temperatura de eventos endo y exotérmicos. De acuerdo con el método de medición utilizado, hay dos modalidades: el DSC con compensación de potencia y el DSC con flujo de calor.

#### APARATOS

El DSC con compensación de potencia es constituido por una célula calorimétrica que contiene dos hornos, uno para el material de referencia y el otro para la muestra. El DSC con flujo de calor se constituye por una célula calorimétrica conteniendo un único horno que dispone de un sensor calorimétrico para la referencia y muestra. Los equipos comportan un dispositivo de programación controlada de la temperatura, uno o varios detectores térmicos y un sistema de registro que puede ser asociado a un sistema de tratamiento de datos. Las determinaciones son efectuadas bajo atmósfera especificada.

*Calibración y/o comprobación del aparato.* Calibrar el aparato para el eje de temperatura y de flujo de calor utilizando indio metálico de alta pureza o cualquier otro material certificado apropiado de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para el ajuste de la linealidad, se utiliza una combinación de dos metales como el indio y el zinc para la comprobación del eje de temperatura.

#### PROCEDIMIENTO

Para un porta muestra adecuado transferir una cantidad de la muestra, rigurosamente conocida. Fijar la temperatura inicial y final del ensayo y la razón de calentamiento. Iniciar el calentamiento. Después del ensayo, registrar la curva de la calorimetría exploratoria diferencial escribiendo en el eje de las abscisas la temperatura, o el tiempo (valores crecientes de la izquierda para la derecha) y el flujo de calor en el eje de las ordenadas, indicando el sentido (endotérmico o exotérmico). En la curva DSC ilustrada en la **Figura 2** se observa la variación entálpica entre los puntos **acd**. El punto de intersección **b**, referente a la prolongación de la línea de base con la tangente en el punto de mayor inclinación (punto de inflexión) de la curva, corresponde a la temperatura *onset* (inicio extrapolado del evento,  $T_{onset}$ ), empleado en eventos de fusión como la temperatura inicial del cambio de estado. El fin del evento térmico es marcado por el punto **c** ( $T_f$ ), sin embargo para finalidades del cálculo de área de la curvas se considera el punto **d** ( $T_{final}$ ). La variación de entalpía ( $\Delta H$ ) del fenómeno es proporcional al área bajo la curva limitada por los puntos **acd** siendo determinado el factor de proporcionalidad a partir de la determinación de la entalpía de fusión de una sustancia estándar conocida (indio, por ejemplo) en las mismas condiciones de trabajo. Cada curva término analítica es registrada conteniendo los siguientes datos: indicación de la última calibración, tamaño e identidad de la muestra, tipo de porta muestra, material de referencia, atmósfera (caudal y composición del gas), tasa de calentamiento y sensibilidad de la célula calorimétrica.



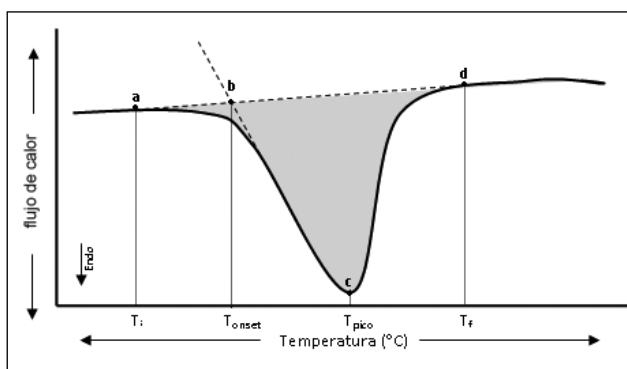


Figura 2 - Ejemplo de una curva DSC típica y sus medidas.

### Aplicaciones

La evaluación del flujo de calor diferencial referente a las variaciones de capacidad térmica y de la entalpía de las transiciones de fase de una sustancia en función de la temperatura puede ser utilizada para la determinación del punto y banda de fusión; determinación de la temperatura de sublimación, evaporación y solidificación; determinación de la temperatura de transición vítrea; evaluación de polimorfismo, construcción de diagrama de fases, determinación de la pureza (excepto las sustancias amorfas, los polimorfos inestables en la banda de la temperatura experimental, los compuestos que funden con descomposición térmica y las sustancias que poseen pureza inferior a 95%).

### Determinación de pureza

El método es basado en el hecho de que la presencia de pequeñas cantidades de impurezas en un dato material disminuye su punto de fusión y alarga su banda global de fusión. La Figura 3 ilustra ese comportamiento para tres muestras hipotéticas, una de ellas es la estándar y las otras dos contienen pequeñas cantidades de impurezas.

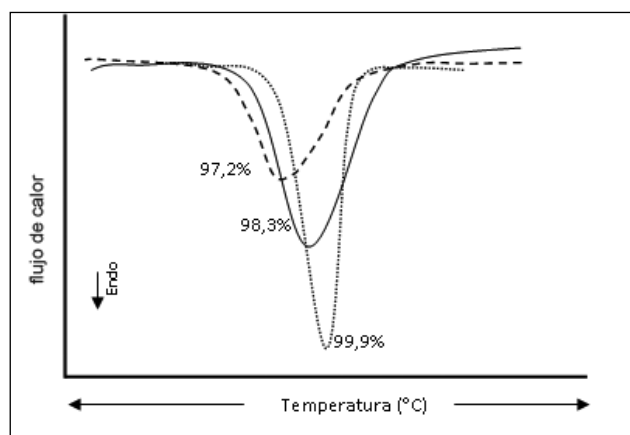


Figura 3 - Ejemplo de curvas DSC de una muestra hipotética con diferentes contenidos de pureza

Basándose en la ecuación de van't Hoff (Ecuación 1), es posible la determinación de la fracción molar de las impurezas  $X_2$  (número de moles de las impurezas por el total de número de moles de la muestra) considerando que no hay formación de fase sólida durante la fusión.

$$X_2 = \frac{(T_o - T_m) \Delta H_f}{RT_o^2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

en que  $T_m$  representa la temperatura de fusión de la muestra;  $T_o$  es el punto de fusión de la sustancia pura en grados Kelvin;  $R$  es la constante de los gases (8,3143 J.K-1.mol-1);  $\Delta H_f$  es el calor de fusión del principal componente expresado en J.mol-1.

Cuando no hay formación de fase sólida, la concentración de impureza en la fase líquida en una dada temperatura durante la fusión es inversamente proporcional a la fracción fundida en esa temperatura y la disminución del punto de fusión es directamente proporcional a la fracción molar de impureza. El gráfico de la temperatura de la muestra ( $T_s$ ) versus el inverso de la fracción fundida ( $1/F$ ) en la temperatura resulta en una recta con inclinación igual a la disminución del punto de fusión ( $T_o - T_m$ ). El punto de fusión teórico de la sustancia pura puede ser obtenido por extrapolación cuando  $1/F = 0$ .

$$T_s = T_o - \frac{RT_o^2 X_2 (1/F)}{\Delta H_f} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Sustituyendo los valores experimentales obtenidos para  $T_o - T_m$ ,  $\Delta H_f$  y  $T_o$  en la ecuación 1 es posible calcular la fracción molar de las impurezas en la muestra.

## 5.2.28 DETERMINACIÓN DE LA OSMOLALIDAD

Osmolalidad es una forma práctica que da una medida total de la contribución de varios solutos presentes en la solución por la presión osmótica de la solución. Una aceptable aproximación de la osmolalidad en solución acuosa está dada por:  $\epsilon_m = \nu m \Phi$ , si el soluto no es ionizado,  $\nu = 1$ ; sin embargo  $\nu$  es el número total de iones siempre presente o formado por la lisis de la solución de una molécula de soluto;  $m$  = molaridad de la solución, que es el número de moles del soluto por kilogramo de solvente;  $\Phi$  = coeficiente osmótico molar el cual es cuantificado de la interacción entre iones de la carga opuesta de la solución. Es dependiente del valor de  $m$ . Si la complejidad de la solución aumenta,  $\Phi$  comienza a ser difícil de medir. La unidad de osmolalidad es osmol por kilogramo (osmol/kg), pero el submúltiplo miliosmol por kilogramo (mosmol/kg) es normalmente usado.

De otra forma descrita, la osmolalidad es determinada por la medida de la disminución del punto de congelamiento. Existe una relación entre la osmolalidad y la disminución del punto de congelamiento  $\Delta T$ :

$$\epsilon_m = \Delta T / 1,86 \times 1000 \text{ mosmol/kg}$$

### EQUIPO

El equipo – Osmómetro – consiste de: contenedor refrigerado para la medida; sistema de medición de temperatura provisto de un termosensor, con un dispositivo de medición de diferentes potenciales que puede ser graduado para

la disminución de la temperatura o directamente en la osmolalidad; y debe ser incluido un recurso para homogeneizar la solución.

#### PROCEDIMIENTO

Preparar la solución referencia conforme descrito en la **Tabla 1**. Determinar el cero del equipo usando Agua. Calibrar el equipo usando la solución de referencia: pipetear

50 a 250 µL de la muestra a ser analizada; transferir para la célula de medición e iniciar el sistema de enfriamiento. Normalmente, un dispositivo de homogeneizar es programado para operar la temperatura abajo de la esperada de la disminución crioscópica para prevenir súper enfriamiento. Un dispositivo indica cuando el equilibrio es alcanzado. Antes de cada medición limpiar la célula de medición con la solución a ser examinada.

**Tabla 1 -** Informaciones para preparar la solución de referencia para la calibración del Osmómetro.

Masa en g de la solución de Cloruro de sodio por kg de agua	Osmolaridad real (mosmol/kg)	Osmolaridad ideal (mosmol/kg)	Coefficiente osmótico molal	Disminución crioscópica (°C)
3,087	100	105,67	0,9463	0,186
6,260	200	214,20	0,9337	0,372
9,463	300	323,83	0,9264	0,558
12,684	400	434,07	0,9215	0,744
15,916	500	544,66	0,9180	0,930
19,147	600	655,24	0,9157	1,116
22,380	700	765,86	0,9140	1,302

Realizar la misma operación con la muestra prueba. Leer directamente la osmolalidad o calcular por la medición de la disminución del punto de congelamiento. La prueba es considerada válida cuando el valor encontrado está entre dos valores de la escala de calibración.

## 5.2.29 ENSAYOS FÍSICOS Y FÍSICO QUÍMICOS PARA GRASAS Y ACEITES

### 5.2.29.1 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

*Proceder conforme descrito en* Determinación de la densidad de masa y densidad relativa (5.2.5).

### 5.2.29.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN

*Proceder conforme descrito en* Determinación de la temperatura y banda de fusión, Método III (5.2.2).

### 5.2.29.3 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE SOLIDIFICACIÓN

#### SEPARACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

Transferir 75 ml de solución de hidróxido de potasio en glicerol (25 g de hidróxido de potasio en 100 ml de glicerol) para vaso de precipitados de 1000 ml y calentar a 150 °C. Añadir 50 ml de muestra tratada conforme indicado en la monografía específica y proseguir el calentamiento bajo agitación. La temperatura no debe ultrapasar 150 °C. La saponificación es dada por concluida cuando la mezcla presenta homogeneidad, sin vestigios de material particulado. Transferir la mezcla para otro vaso de precipitados de 1000 ml, conteniendo 500 ml de agua casi hirviendo. Juntar, lentamente, 50 ml de solución de ácido sulfúrico 25% (v/v) y calentar, bajo agitación, hasta separación definida de fase límpida (ácidos grasos). Lavar la fase grasa con agua hirviendo a fin de eximirla de ácido sulfúrico y mantenerla, en vaso de precipitados pequeño, en baño maría hirviendo hasta decantación del agua, dejando límpida la fase oleosa. Filtrar y recolectar la mezcla de ácidos grasos todavía caliente en vaso de precipitados seco y desecarla a 150 °C durante 20 minutos. Transferir la mezcla caliente para frasco apropiado y mantenerla en baño de hielo hasta solidificación.

Para evaluar el grado de pureza de los ácidos grasos separados por el procedimiento anterior, transferir, previamente al congelamiento, 3 ml de la solución de ácidos grasos desecados para tubo de ensayo y añadir 15 ml de etanol. Calentar la solución hasta que hierva y juntar 15 ml de hidróxido de amonio 6 M. La preparación resultante debe ser límpida.

#### PROCEDIMIENTO

*Proceder conforme descrito en Determinación temperatura de congelamiento (5.2.4).*

#### 5.2.29.4 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción  $n_x$  de un medio referido al aire es igual a la relación entre el seno del ángulo de incidencia de un radio luminoso en el aire y el seno del ángulo de refracción del radio refractado en el medio considerado. Salvo indicación contraria, el índice de refracción es determinado a  $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  y en largo de onda 589,3 nm, correspondiente al de la luz de la raya D del sodio. En ese caso, el símbolo que representa el índice de refracción es  $n_{20/D}$ .

En los refractómetros corrientes hay determinación del ángulo límite. En algunos aparatos, la parte esencial es un prisma de índice de refracción conocido, en contacto con el líquido en ensayo.

Para calibración del aparato, utilizar los líquidos de referencia mencionados en la **Tabla 1**. El valor del índice de refracción de cada líquido de referencia está indicado en su rótulo.

**Tabla 1** – Líquidos de referencia en la determinación del índice de refracción.

Líquido de referencia	$\Delta n/\Delta t$ (coeficiente de temperatura)
Trimetilpentano	0,00049
Tolueno	0,00056
Metilnaftaleno	0,0048

Se es utilizada luz blanca para la determinación del índice de refracción, el refractómetro posee un sistema de compensación. El aparato deberá suministrar lecturas exactas hasta la tercera casa decimal, en el mínimo, y poseer un dispositivo que posibilite operar a la temperatura prescrita: el termómetro posibilita la lectura con la aproximación de, por lo menos,  $0,5\text{ °C}$ .

#### 5.2.29.5 DETERMINACIÓN DEL PODER ROTATORIO

*Proceder conforme descrito en Determinación del poder rotatorio y del poder rotatorio específico (5.2.8).*

#### 5.2.29.6 DETERMINACIÓN DE AGUA

Proceder conforme descrito en *Método volumétrico (5.2.20.1)*.

#### 5.2.29.7 ÍNDICE DE ACIDEZ

El índice de acidez,  $I_A$ , expresa, en miligramos, la cantidad necesaria de hidróxido de potasio para la neutralización de los ácidos grasos libres en 1 g de muestra.

Índices elevados de acidez son sugestivos de hidrólisis acentuada de los ésteres constituyentes de la materia grasa. Las causas de la degradación incluyen tratamientos químicos integrantes de los procesos industriales de extracción y purificación, actividad bacteriana, acción catalítica (calor, luz), almacenamiento inadecuado y presencia de impurezas como la humedad, entre otros.

Pesar, colocada en matraz de 250 ml, cerca de 10,0 g o exactamente la cantidad prescrita (en g) de la sustancia prueba. Añadir 50 ml de una mezcla de etanol 96% y éter etílico (1:1) v/v. Excepto cuando hubiere indicación contraria en la monografía específica, la mezcla de solventes debe ser previamente neutralizada con hidróxido de potasio 0,1 M, o hidróxido de sodio 0,1 M, en presencia de 0,5 ml de solución de fenoltaleína. Calentar la muestra hasta  $90\text{ °C}$  si es necesario para la disolución de la misma. Después de solubilización completa; titular con hidróxido de potasio 0,1 M hasta observación del color rosa pálido persistente por, como mínimo, 15 segundos. Proceder al ensayo en blanco y corregir el volumen de titulante consumido.

Calcular el  $I_A$  de acuerdo con la ecuación:

$$I_a = \frac{5,610n}{m}$$

En que

$n$  = volumen (en ml) de hidróxido de potasio 0,1 M gastado en la titulación

$m$  = masa de muestra en gramos.

#### 5.2.29.8 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

El índice de saponificación  $I_s$  exprime, en miligramos, la cantidad de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos libres y saponificar los ésteres existentes en 1 g de sustancia.

El  $I_s$  da indicios de adulteraciones de la materia grasa con sustancias insaponificables (aceite mineral, por ejemplo). Salvo indicación en la monografía específica, utilizar la cantidad de muestra indicada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Cantidad de muestra para determinar el índice de saponificación.**

Valor esperado de $I_s$	Cantidad de muestra (g)
3 – 10	12-15
10 – 40	8-12
40 – 60	5-8
60 – 100	3-5
100 – 200	2,5-3
200 – 300	1-2
300 – 400	0,5-1

Pesar, colocada en balón de 250 ml, la cantidad de muestra indicada (m), añadir 25,0 ml de solución metanólica de hidróxido de potasio 0,5 M y algunas piedras de ebullición. Adaptar el condensador de reflujo vertical. Calentar en baño maría durante 30 min, salvo en indicación específica. Añadir 1 ml de solución de fenolftaleína y titular, inmediatamente, el exceso de hidróxido de potasio con solución de ácido clorhídrico 0,5 M (ml). Efectuar ensayo en blanco en las mismas condiciones y corregir el volumen del titulante ( $n_2$  ml).

Calcular el índice de saponificación ( $L_s$ ), utilizando la expresión:

$$I_s = \frac{28,05 (n_1 - n_2)}{m}$$

### 5.2.29.9 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ÉSTERES

El índice de ésteres,  $I_E$ , expresa la cantidad de hidróxido de potasio, en miligramos, necesaria para la saponificación de los ésteres presentes en 1 g de muestra. El  $I_E$  es calculado a partir del índice de saponificación  $I_S$  y del índice de acidez  $I_A$ , conforme la ecuación:

$$I_E = I_S - I_A$$

### 5.2.29.10 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE YODO

El índice de yodo  $I_y$ , expresa, en gramos, la cantidad de yodo susceptible a complejación en 100 g de sustancia bajo las condiciones descritas a continuación. Constituye

medida cuantitativa del grado de insaturaciones de los ácidos grasos, esterificados y libres, en la muestra. El  $I_y$  valor encontrado en la determinación es sugestivo del grado de pureza del material ensayado así como de la presencia de adulterantes. La sustitución del *Método A* por el *Método B* debe ser objeto de una validación.

#### MÉTODO A

Salvo indicación en la monografía específica, utilizar la cantidad de muestra indicada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Cantidad de muestra para determinación del índice de yodo.**

Índice esperado $I$	Cantidad de muestra
Inferior a 20	1,0
20 – 60	0,5 – 0,25
60 – 100	0,25 – 0,15
Superior a 100	0,15 – 0,10

En recipiente de 250 ml, provisto de tapón esmerilado, seco, o lavado con ácido acético glacial, introducir la muestra (m g) y disolverla en 15 ml de cloroformo, salvo en indicaciones especificadas en la respectiva monografía. Añadir 25,0 ml de solución de bromato de yodo. Tapar el recipiente y conservarlo bajo protección de la luz durante 30 min, agitándolo, frecuentemente. Después de adición de 10 ml de solución de yoduro de potasio a 100 g/L y 100 ml de agua, titular con tiosulfato de sodio 0,1 M agitando, energicamente, hasta que la coloración amarilla casi haya desaparecido. Juntar 5 ml de solución de almidón y continuar la titulación, adicionando el tiosulfato de sodio 0,1 M, gota a gota, agitando, hasta la desaparición del coloración ( $n_2$  ml). La prueba en blanco debe ser realizada en las mismas condiciones y sin la muestra ( $n_1$  ml).

Calcular el índice de yodo por la expresión:

$$I_s = \frac{28,05 (n_1 - n_2)}{m}$$

#### MÉTODO B

Salvo indicación contraria, utilizar la cantidad de muestra indicada en la **Tabla 2**.

Tabla 2 - Cantidad de muestra para determinación del índice de yodo.

Índice de yodo probable I	Masa (g) correspondiente a un exceso de 150 por ciento de ICl	Masa (g) correspondiente a un exceso de 100 por ciento de ICl	Solución de cloruro de yodo (ml)
<3	10	10	25
3	8,4613	10,5760	25
5	5,0770	6,3460	25
10	2,5384	3,1730	20
20	0,8461	1,5865	20
40	0,6346	0,7935	20
60	0,4321	0,5288	20
80	0,3173	0,3966	20
100	0,2538	0,3173	20
120	0,2115	0,2644	20
140	0,1813	0,2666	20
160	0,1587	0,1983	20
180	0,1410	0,1762	20
200	0,1269	0,1586	20

5

En recipiente de 250 ml con tapón esmerilado, previamente lavado con ácido acético glacial o seco, introducir la cantidad de muestra ( $m$  g) y disolverla en 15 ml de una mezcla de volúmenes iguales de ciclohexano y ácido acético glacial, salvo en indicación contraria. Si necesario, fundir previamente la sustancia (punto de fusión superior a 50 °C). Añadir, lentamente, el volumen de solución de cloruro de yodo indicado en la **Tabla 2**. Tapar el recipiente y agitar, al abrigo de la luz, durante 30 min, salvo indicación contraria. Añadir 10 ml de solución de yoduro de potasio a 100 g/L y 100 ml de agua. Titular con tiosulfato de sodio 0,1 M, agitando, enérgicamente, hasta que la coloración amarilla casi desaparezca. Añadir 5 ml de solución de almidón y continuar la titulación adicionando, gota a gota, el tiosulfato de sodio 0,1 M hasta desaparición de la coloración ( $n_1$  ml de tiosulfato de sodio 0,1 M). Realizar un ensayo en blanco en las mismas condiciones ( $n_2$  ml de tiosulfato de sodio 0,1 M).

Calcular el índice de yodo utilizando a siguiente expresión:

$$I_i = \frac{1,269 (n_2 - n_1)}{m}$$

### 5.2.29.11 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El índice de peróxido  $I_p$  es el número que expresa, en miliequivalentes de oxígeno activo, la cantidad de peróxido en 1000 g de sustancia.

Si la monografía no indica el método a ser utilizado, ejecutar el *Método A*. La sustitución del *Método A* por el *Método B* es siempre objeto de validación.

#### MÉTODO A

Pesar 5,00 g de la muestra, colocada en matraz de 250 ml con tapón esmerilado. Añadir 30 ml de una mezcla v/v de ácido acético glacial y cloroformo (proporción 3:2). Agitar hasta disolución de la muestra y juntar 0,5 ml de solución saturada de yoduro de potasio. Agitar durante 1 min, exac-

tamente, y añadir 30 ml de agua. Titular con tiosulfato de sodio 0,01 M, adicionando, lentamente, sin parar la agitación enérgica hasta que la coloración amarilla haya casi desaparecido. Añadir 5 ml de solución de almidón. Continuar la titulación agitando enérgicamente, hasta desaparición de la coloración ( $n_1$  ml de tiosulfato de sodio 0,01 M). Realizar un ensayo en blanco en las mismas condiciones ( $n_2$  ml de tiosulfato de sodio 0,01 M). El ensayo en blanco no consume más de 0,1 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M.

Calcular el índice de peróxidos por la expresión:

$$I_p = \frac{10 (n_1 - n_2)}{m}$$

#### MÉTODO B

**Nota:** operar al abrigo de la luz.

En un matraz, con tapón esmerilado, introducir 50 ml de una mezcla v/v de ácido acético glacial con trimetilpentano (3:2). Cerrar y agitar hasta disolución de la muestra (**Tabla 1**). Añadir 0,5 ml de solución saturada de yoduro de potasio, cerrar nuevamente y dejar la solución en reposo durante  $60 \pm 1$  s. En ese tiempo de reposo, agitar, por lo menos, tres veces y, en seguida, añadir 30 ml de agua. Titular con solución de tiosulfato de sodio 0,01 M ( $v_1$  ml), adicionado lentamente, con agitación enérgica y constante, hasta desaparición casi total de la coloración amarilla dada por la presencia del yodo. Añadir cerca de 0,5 ml de solución de almidón SI y continuar la titulación, sin parar la agitación, en especial cuando esté próximo del punto de equivalencia, para garantizar la liberación del yodo del solvente. Añadir, gota a gota, la solución de tiosulfato de sodio hasta que el color azul comience a desaparecer. Si en la titulación fuese gastado menos de 0,5 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M, repetir el procedimiento utilizando tiosulfato de sodio 0,01 M ( $v_1$  ml) bajo agitación constante y enérgica.

En el caso de que el índice de peróxido sea igual o superior a 70, y habiendo retraso en el cambio de color del indica-



dor almidón de 15 a 30 s, agitar, vigorosamente, hasta la desaparición de la coloración amarilla. Eso es debido a la tendencia de que el trimetilpentano sobrenade en la fase acuosa y al tiempo necesario para obtener una mezcla adecuada entre el solvente y el titulante acuoso.

Para índices de peróxido inferiores a 150, se utiliza tiosulfato de sodio 0,01 M. Puede adicionarse a la mezcla una pequeña cantidad (0,5 a 1,0% (m/m)) de emulsionante apropiado, para retardar la separación de las fases y disminuir el tiempo de liberación del yodo (por ejemplo, polisorbato 60). Efectuar un ensayo en blanco ( $v_0$  ml). Si fuese consumido, más de 0,1 ml de tiosulfato de sodio 0,01 M, sustituir los reactivos y repetir la titulación. El índice de peróxido es calculado por la fórmula a continuación.

$$I_p = \frac{1000 (v_1 - v_0)c}{m}$$

en que:

$c$  = concentración de la solución de tiosulfato de sodio en moles por litro.

**Tabla 1 - Cantidad de muestra para determinación del índice de peróxido**

Valor esperado de $I_p$	Valor esperado de $I_p$
0-12	0-12
12-20	12-20
20-30	20-30
30-50	30-50
50-90	50-90

### 5.2.29.12 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE HIDROXILO

El índice de hidroxilo  $I_{OH}$  es el número que expresa, en miligramos, la cantidad de hidróxido de potasio necesaria para la neutralización de ácido que se combina, por acilación, con 1 g de sustancia.

#### MÉTODO A

Introducir la muestra, exactamente pesada (g), de acuerdo con la cantidad indicada en la **Tabla 1**, en balón de acetilación de 150 ml, salvo si en la monografía específica esté solicitado otro valor. Añadir el volumen de solución de anhídrido acético indicado y adaptar el condensador de reflujo.

**Tabla 2 - Tabla 1 - Cantidad de muestra y volumen del reactivo acetilante.**

$I_{OH}$ esperado	Cantidad de muestra (g)	Volumen de reactivo (de acetilación) en mililitros
10 - 100	2,0	5,0
100 - 150	1,5	5,0
150 - 200	1,0	5,0
200 - 250	0,75	5,0
250 - 300	0,6 o 1,20	5,0 o 10
300 - 350	1,0	10,0
350 - 700	0,75	15,0
700 - 950	0,5	15,0

Calentar a baño maría durante 1 h, cuidando para mantener el nivel del agua del baño cerca de 2,5 cm arriba del nivel del líquido contenido en el balón. Retirar el balón y dejarlo enfriar. Añadir 5 ml de agua a través de la extremidad superior del condensador. Si la adición del agua origina una turbación, añadir piridina hasta la desaparición de la turbación y anotar el volumen adicionado. Agitar, calentar nuevamente el balón en baño de agua durante 10 min. Retirar el balón y dejarlo enfriar. Lavar el condensador y las paredes del balón con 5 ml de alcohol, previamente neutralizado en presencia de solución de fenoltaleína. Titular con solución alcohólica de hidróxido de potasio 0,5 M, en presencia de 0,2 ml de solución de fenoltaleína SI ( $n_1$  ml). Realizar un ensayo en blanco, en las mismas condiciones ( $n_2$  ml).

Calcular el índice de hidroxilo utilizando la expresión:

$$I_{OH} = \frac{28,05(n_2 - n_1)}{m} + I_A$$

en que

$I_A$  = Índice de acidez

#### MÉTODO B

En matraz seco y provisto de tapón esmerilado introducir la porción de ensayo ( $m$  g). Añadir 2,0 ml de reactivo de anhídrido propiónico, cerrar el balón y agitar suavemente, hasta disolución. Después de 2 h de reposo, salvo bajo indicación contraria, retirar el tapón del matraz y transferir su contenido para otro de 500 ml con boca ancha conteniendo 25,0 ml de solución de anilina a 9 g/L en ciclohexano y 30 ml de ácido acético glacial. Agitar y después de 5 min de reposo añadir 0,05 ml de solución cristal violeta SI. Titular con ácido perclórico 0,1 M hasta cambio para verde esmeralda ( $n_1$  ml). Realizar un ensayo en blanco en las mismas condiciones ( $n_2$  ml).

Calcular el índice de hidroxilo utilizando a expresión:

$$I_{OH} = \frac{5,610 (n_2 - n_1)}{m} + I_A$$

en que

$I_A$  = Índice de acidez

Por la posibilidad de haber presencia de agua, determinar el tenor de humedad (*y* por ciento) en la muestra según el método específico. El índice de hidroxilo es obtenido por la ecuación:

$$I_{OH} = (\text{índice encontrado}) - 31,1y$$

### 5.2.29.13 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACETILO

El índice de acetilo es la cantidad de álcali, en mg de hidróxido de potasio, necesaria para la neutralización del ácido acético liberado por la hidrólisis de 1 g de sustancia acetilada. Es usado para establecer el grado de presencia de alcoholes libres en sustancias grasas. Es calculado con base en la diferencia entre los índices de saponificación de la sustancia acetilada por la técnica descrita a continuación y de la sustancia no acetilada.

#### PROCEDIMIENTO

Transferir 10 g de sustancia y 20 ml de anhídrido acético para balón Kjeldahl de 200 ml de capacidad. Adaptar el condensador de reflujo. Apoyar el frasco sobre tela de amianto en cuyo centro haya sido cortado un orificio de cerca de 4 cm de diámetro y calentar sobre llama de quemador de gas con altura máxima de 25 mm (evitando que la llama alcance la base del balón). Mantener en ebullición regular durante 2 horas, enfriar y transferir el contenido del balón para vaso de precipitados de 1000 ml conteniendo 600 ml de agua. Añadir 0,2 g de polvo de piedra pómez y hervir durante 30 minutos. Enfriar y transferir la mezcla para embudo de separación, rechazando la camada acuosa inferior. Lavar la sustancia acetilada con tres o más porciones de 50 ml de solución saturada caliente de cloruro de sodio, hasta que la solución de lavado no proporcione más reacción ácida al papel de tornasol. Añadir, además, 20 ml de agua caliente al embudo y agitar, removiendo, en seguida, lo más completamente posible, la fase acuosa. Transferir la sustancia para cápsula de porcelana, añadir 1

g de sulfato de sodio pulverizado y filtrar a través de papel de filtro plegado. Determinar el índice de saponificación de la sustancia original, no acetilada, y de la sustancia acetilada por el procedimiento descrito y calcular el índice de acetilo por la fórmula:

$$I_{AC} = \frac{(b - a) \cdot 1335}{1335 - a}$$

en que

*a* = índice de saponificación de la sustancia original,

*b* = índice de saponificación de la sustancia acetilada.

### 5.2.29.14 DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS INSAPONIFICABLES

Sustancias insaponificables son aquellas remanentes a la reacción de saponificación, no volátiles a 100 – 105 °C y que fueron acarreadas en el proceso de extracción de la sustancia de ensayo.

Si la monografía específica no indica el procedimiento, utilizar el *Método I*. Utilice material de vidrio con boca esmerilado y desengrasado.

#### MÉTODO I

Añadir 2,0 – 2,5 g de la muestra en balón de 250 ml. Añadir 25 ml de hidróxido de potasio etanólico 0,5 M. Acoplar un condensador de reflujo al balón y hervir en baño maría por 1 hora, bajo agitación. Transferir el contenido del balón para embudo de separación, usando 50 ml de agua y, mientras el líquido todavía esté tibio, extraer, mediante agitación vigorosa, con tres cantidades de 50 ml de éter exento de peróxidos. Lavar el balón con la primera alícuota de éter. Mezclar las soluciones etéreas en embudo de separación conteniendo 20 ml de agua. (Si las soluciones etéreas contienen sólidos en suspensión, filtrar para el embudo de separación a través de un filtro de papel libre de grasa. Lavar el filtro con éter libre de peróxido). Agitar, cuidadosamente, y descartar la fase acuosa. Lavar la fracción orgánica, con dos porciones de 20 ml de agua. En seguida, añadir tres cantidades de 20 ml de hidróxido de potasio 0,5 M y agitar, vigorosamente, en cada una de las adiciones. Después de cada tratamiento debe ser realizado el lavado con 20 ml de agua. Finalmente, lave con cantidades sucesivas de 20 ml de agua hasta que la fase acuosa no muestre reacción alcalina en presencia de fenoltaleína. Transferir la fracción orgánica para un balón previamente tarado, lavando el embudo de separación con éter exento de peróxidos. Eliminar el éter y añadir 3 ml de acetona al balón. Eliminar el solvente por completo hasta constante la temperatura no superior a 80 °C. Disolver el contenido del balón en 10 ml de etanol recientemente hervido (96%) y previamente neutralizado. Titular con hidróxido de sodio etanólico 0,1 M y solución de fenoltaleína como indicador. Si el volumen de solución titulante gastado no excede 0,1 ml, la cantidad de residuos pesados, debe ser tomada como materia insaponificable. Calcular la materia insaponificable como un porcentaje de la sustancia a ser examinada. Si el volumen de titulante gastado excede 0,1 ml, la cantidad de residuos pesados no pueden ser tomadas como la materia insaponificable y de la prueba debe ser repetido.

#### MÉTODO II

En un balón de 250 ml, acoplado en sistema de condensación por reflujo, introducir la cantidad prescrita (*m* g) de la muestra. Juntar 50 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio 2 M y calentar en baño maría, durante 1 h bajo agitación. Después de enfriar la temperatura inferior a 25 °C, transferir el contenido del balón para embudo de separación. Añadir 100 ml de agua. Añadir 100 ml de éter exento de peróxidos y agitar cuidadosamente. Repetir la operación dos veces más con 100 ml de éter etílico. Re-

unir las fracciones etéreas en otro embudo de separación conteniendo 40 ml de agua. Agitar, suavemente, durante algunos minutos y dejar separar las fases. Rechazar la fase acuosa. Lavar la fase etérea dos veces con 40 ml de agua cada vez. Lavar en seguida, sucesivamente, con 40 ml de hidróxido de potasio a 30 g/L y con 40 ml de agua. Repetir tres veces esta operación. Lavar, repetidamente, la fase etérea con 40 ml de agua de cada vez, hasta que la fase acuosa no dé reacción exento de peróxidos. Evaporar el éter hasta la sequedad, con las precauciones usuales. Juntar 6 ml de acetona al residuo. Eliminar, cuidadosamente, el solvente en corriente de aire. Seque a 100 – 105 °C, hasta masa constante, deje enfriar en desecador y pese (*a g*). El resultado es calculado en porcentaje *m/m*.

$$\% \text{ de insaponificables} = 100^a/m$$

Disolver el residuo en 20 ml de alcohol, neutralizados previamente en presencia de solución de fenolftaleína y titular con solución alcohólica de hidróxido de sodio 0,1 M. Si el volumen de solución alcohólica de hidróxido de sodio 0,1 M gastado en esa titulación es superior a 0,2 ml, indica que hubo separación incompleta de las dos fases y residuo obtenido no puede ser considerado insaponificable. El ensayo debe ser repetido.

### 5.2.29.15 IDENTIFICACIÓN DE ACEITES FIJOS

#### 5.2.29.15.1 Identificación de los aceites vegetales por cromatografía en camada delgada

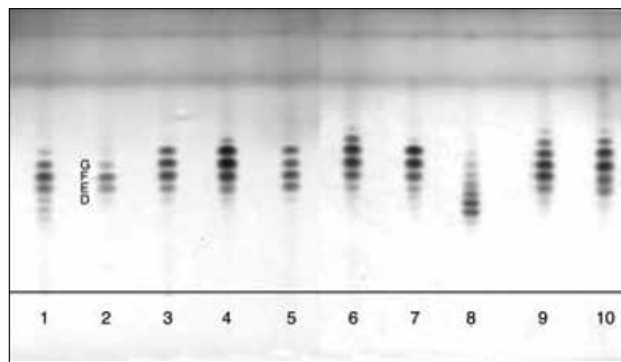
*Fase fija:* gel de sílice octadecilsilanizada (RP-18).

*Solución muestra.* Salvo indicación en monografía específica, disolver cerca de 20 mg (1 gota) de la muestra en 3 ml de diclorometano.

*Solución estándar.* Disolver cerca de 20 mg (1 gota) de aceite de maíz en 3 ml de diclorometano.

*Procedimiento.* Aplicar, separadamente, 1 µL de cada solución en la placa. Desarrollar dos veces en la distancia de 0,5 cm con éter. En seguida, desarrollar dos veces la distancia de 8 cm con mezcla de diclorometano, ácido acético glacial con acetona (2:4:5). Dejar la placa secar al aire y nebulizar con solución de ácido fosfomolibdico a 100 g/L en alcohol. Calentar la placa a 120 °C durante cerca de 3 min. Examinar a la luz del día.

El cromatograma presenta manchas comparables a las reproducidas en la **Figura 1**.



**Figura 1 - Cromatografía en camada delgada para la identificación de los aceites fijos.**

- |                        |   |
|------------------------|---|
| 1. Aceite de maní      | 6. Aceite de soja                             |
| 2. Aceite de oliva     | 7. Aceite de girasol                          |
| 3. Aceite de sésamo    | 8. Aceite de canola                           |
| 4. Aceite de maíz      | 9. Aceite de canola (exento de ácido erúxico) |
| 5. Aceite de almendras | 10. Aceite de germen de trigo                 |

#### 5.2.29.15.2 Impurezas alcalinas

Introducir 10 ml de acetona recientemente destilada, 0,3 ml de agua y 0,05 ml de solución alcohólica de azul de bromofenol a 0,4 g/L en tubo de ensayo. Neutralizar, si necesario, con ácido clorhídrico 0,01 M o hidróxido de sodio 0,01 M. Añadir 10 ml de la muestra, agitar y dejar en reposo. El punto de cambio es indicado por el desarrollo de color amarillo en la camada superior. No es necesario volumen superior a 1,1 ml de ácido clorhídrico 0,01 M

#### 5.2.29.15.3 Aceites extraños en aceites vegetales por cromatografía en camada delgada

Proceder por cromatografía en camada delgada (5.2.17.1), utilizando placa (kieselguhr G). Impregnar la placa, colocándola en una cámara cerrada conteniendo la cantidad necesaria de la mezcla de éter etílico y parafina líquida (90:10; v/v) para que la superficie del líquido alcance cerca de 5 mm de la camada de adsorbente. Cuando la mezcla de impregnación haya recorrido, por lo menos, 12 cm de la camada, retirar la placa de la cámara y dejar evaporar el solvente durante 5 min. Desarrollar en la misma dirección de la impregnación.

*Preparación de la mezcla de ácidos grasos.* Calentar bajo reflujo, durante 45 min, 2 g de la muestra con 30 ml de solución alcohólica de hidróxido de potasio 0,5 M. Juntar 50 ml de agua, dejar enfriar. Transferir para embudo de separación. Agitar tres veces con 50 ml de éter etílico de cada vez. Rechazar las soluciones etéreas. Acidificar la fase acuosa con ácido clorhídrico y agitar tres veces con 50 ml de éter etílico de cada vez. Reúna las soluciones etéreas y lávelas tres veces con 10 ml de agua de cada vez. Rechazar las aguas de lavado. Añadir sulfato de sodio anhidro a la fracción etérea y filtrar. Evaporar el éter en temperatura inferior a 50 °C. Utilizar el residuo para preparar la solución problema.

Los ácidos grasos pueden, también, ser obtenidos a partir de la solución saponificada resultante de la reacción de determinación de insaponificables.

**Solución muestra.** Disolver 40 mg de la mezcla de ácidos grasos obtenidos de la muestra en 4 ml de cloroformo.

**Solución estándar.** Disolver, en 4 ml de cloroformo, 40 mg de la mezcla de ácidos grasos obtenidos a partir de una mezcla de 19 volúmenes de aceite de maíz y 1 volumen de aceite de canola.

**Procedimiento.** Aplicar, separadamente, en la placa, 3  $\mu$ L de cada solución. Desarrollar el cromatograma con mezcla de ácido acético glacial: agua (90:10 v/v) por recorrido de 8 cm. Secar la placa a 110 °C durante 10 min. Dejar enfriar. Introducir la placa, salvo indicación contraria, en cuba de cromatografía saturada de vapores de yodo. Para tal, coloque yodo en cristizador, de forma baja, en el fondo de la cuba. Después de cierto tiempo, aparecen manchas castañas o amarillas castañas. Retirar la placa de la cuba y aguardar algunos minutos. Cuando la coloración de fondo, castaña de la camada desaparezca, pulverizar con solución de almidón; aparecen, entonces, manchas azules que, cuando se secan, pueden pasar a castañas y vuelven de nuevo a azul después de pulverización con agua. El cromatograma obtenido con la *Solución muestra* presenta siempre manchas correspondientes a las manchas del cromatograma obtenido con la *Solución estándar*: una con  $R_f$  próxima de 0,5 (ácido oleico) y otra con  $R_f$  próxima de 0,65 (ácido linoleico). En ciertos aceites puede aparecer una mancha con  $R_f$  próxima de 0,75 (ácido linolénico). Por comparación con el cromatograma obtenido con la *Solución estándar*, verifique la ausencia de la mancha con  $R_f$  0,25 (ácido erúxico) en el cromatograma obtenido con la solución problema.

#### 5.2.29.15.4 Aceites extraños en aceites fijos por cromatografía a gas

Cuando no hubiere cualquier indicación en la monografía específica, utilice el *Método A*. La investigación de aceites extraños es efectuada sobre los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite en análisis, utilizando cromatografía a gas (5.2.17.5).

##### MÉTODO A

Ese método no se aplica a los aceites que contienen glicéridos de ácidos grasos con grupos epoxi, hidro epoxi, ciclopropil o ciclopropenilo, ni a los que contienen gran cantidad de ácidos grasos con número de átomos de carbono en la cadena inferior a 8, ni aquellos cuyo índice de ácido sea superior a 2,0.

**Solución muestra.** Si la monografía indica, seque la muestra antes de iniciar el ensayo. Pesar 1,0 g de la muestra, en balón de boca esmerilada de 25 ml. Acoplar condensador de reflujo y un dispositivo que posibilite hacer pasar una corriente de nitrógeno en el interior del balón. Añadir 10 ml de metanol anhidro y 0,2 ml de solución de hidróxido de potasio a 60 g/L en metanol. Adaptar el condensador y hacer pasar una corriente de nitrógeno con flujo de cerca

de 50 ml/min hasta eliminación del aire. Agitar y calentar hasta la ebullición. Cuando la preparación quede límpida (normalmente cerca de 10 min después), calentar por más 5 min. Enfriar en agua corriente y transferir para un embudo de separación. Lavar el balón con 5 ml de heptano, añadir al contenido del embudo de separación y agitar. Añadir 10 ml de solución de cloruro de sodio a 200 g/L y agitar vigorosamente. Dejar separar las fases y transferir la fase orgánica para un balón conteniendo sulfato de sodio anhidro. Dejar en reposo y filtrar.

**Solución estándar (a).** Preparar 0,50 g de mezcla de sustancias de referencia, conforme prescrito en la monografía específica. Si la monografía no indica la solución estándar, utilice una de las que son descritas en la **Tabla 1**. Disolver en heptano y diluir a 50,0 ml con el mismo solvente. Observación: Para cromatografía en columna capilar y razón de *split* es recomendado que el componente con cadena larga de la mezcla en análisis sea adicionado a la mezcla de calibración, cuando el análisis cuantitativo sea realizado por curva de calibración.

**Solución estándar (b).** Diluir 1,0 ml de la solución estándar (a) y completar para 10,0 ml con heptano.

**Solución estándar (c).** Preparar 0,50 g de una mezcla de metil ésteres de ácidos grasos conforme indicado en la monografía de la sustancia en análisis. Disolver en heptano y diluir hasta 50 ml en balón volumétrico con el mismo solvente. Mezclas comerciales de metil ésteres de ácidos grasos, también, pueden ser utilizadas.

##### Condiciones cromatográficas

###### Columna:

- material: sílice fundida, vidrio o cuarzo;
- tamaño: 10 a 30 m de largo y 0,2 a 0,8 mm de diámetro interno;
- fase estacionaria: poli(cianopropil) metilfenilmetilsiloxano o de macrogol
- 20 000 (espesor del película de 0,1 a 0,5  $\mu$ m) u otra fase estacionaria apropiada;
- Gas de arrastre: helio o hidrógeno para cromatografía;
- Flujo del gas de arrastre: 1,3 ml/min (para columnas de 0,32 mm de diámetro interno);
- Razón de *split*: 1:100 o menor, de acuerdo con el diámetro interno de la columna en uso (1:50 cuando el diámetro sea de 0,32 mm);
- Detector: ionización de llama;

###### Temperatura:

- columna: 160 – 200 °C, de acuerdo con la fase estacionaria y largo (200 °C para una columna de 30 m de largo, revestida internamente con macrogol 20 000). si necesario o indicado en la monografía de la sustancia en análisis, elevar la temperatura de la columna de 170 a 230 °C con rampa de calentamiento de 3 °C por minuto (columna con macrogol 20 000).
- inyector: 250 °C;
- detector: 250 °C;

Volumen de inyección: 1 µL;

Sensibilidad: A altura del pico principal en el cromatograma obtenido con la *Solución de estándar (a)* es de 50 a 70% de la escala total del registrador.

*Adecuación del sistema cuando fuesen utilizadas las mezclas de sustancias referencia (Tabla 2).*

Observación. Para cromatografía en columna capilar y razón de *split* es recomendado que el componente con cadena larga de la mezcla en análisis sea adicionado a la mezcla de calibración, cuando el análisis cuantitativo sea realizado por curva de calibración.

- resolución: como mínimo, de 4 entre los picos de caprilato de metilo y caprato de metilo, calculados en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar (a)*;
- razón señal/ruido: como mínimo, 5 para el pico referente al caprato de metilo, observado en el cromatograma obtenido por el análisis de la *Solución estándar (b)*;
- número de bandejas teóricas: mínimo de 15000, calculado para el pico correspondiente al caproato de metilo.

*Adecuación del sistema cuando fuesen utilizadas las mezclas de sustancias referencia listadas en las Tablas 1, o 3:*

Observación. Para cromatografía en columna capilar y razón de *split* es recomendado que el componente con cadena larga de la mezcla en análisis sea adicionado a la mezcla de calibración, cuando el análisis cuantitativo sea realizado por curva de calibración.

- resolución: como mínimo, de 1,8 entre los picos de oleato de metilo y estearato de metilo, calculados en el cromatograma obtenido con la *Solución estándar (a)*;
- razón señal/ruido: como mínimo, 5 para el pico referente al miristato de metilo observado en el cromatograma obtenido por el análisis de la *Solución estándar (b)*;
- número de bandejas teóricas: mínimo de 30 000, calculado para el pico correspondiente al estearato de metilo.

*Evaluación del cromatograma.* Evite condiciones de análisis que posibiliten el surgimiento de 'picos enmascarados' (presencia de constituyentes con tiempos de retención próximos como, por ejemplo, los ácidos linolénico y araquídico).

#### *Análisis cualitativo*

Identificar los picos del cromatograma obtenido con la *Solución estándar (c)* (en condiciones isotérmicas de operación o con programación lineal de temperatura).

Cuando fuesen utilizadas condiciones isotérmicas de operación, los picos pueden ser identificados por comparación con el cromatograma obtenido de la *Solución estándar (a)* e informaciones registradas en las **Tablas 1, 2, o 3:**

- a) medir el tiempo de retención reducido ( $t'_R$ ) de cada pico obtenido de la *Solución estándar (a)*. El  $t'_R$  el tiempo de retención medido en relación al pico del solvente y no en relación al tiempo de la inyección. Trazar la recta por medio de la ecuación:

$$\text{Log}(t'_R) = f(\text{número de carbonos de la cadena equivalente})$$

- b) los logaritmos de los tiempos de retención reducidos de los ácidos insaturados son puntos de la recta con valores no enteros de átomos de carbono denominados de 'largo equivalente de cadena'. El largo equivalente de cadena corresponde al número teórico de átomos de carbonos de ácidos grasos saturados que tendrían el mismo  $t'_R$ . Por ejemplo, el ácido linoleico posee  $t'_R$  como ácido graso teóricamente saturado con 18,8 átomos de carbono. Identificar los picos del cromatograma obtenido con la solución prueba por curva de calibración y por el tiempo de retención reducido. Largos de cadena están registrados en la **Tabla 4.**

#### *Análisis cuantitativo*

Generalmente, la cuantificación es realizada usando el método de normalización, en el cual la suma de las áreas bajo los picos del cromatograma, con excepción del pico del solvente, es considerada como siendo igual a 100%. Utilizar, preferencialmente, un integrador electrónico.

El tenor porcentual de cada componente es calculado determinando el área bajo el pico correspondiente con relación a la suma de las áreas bajo todos los picos. No considerar los picos cuya área sea inferior a 0,05 por ciento del área total.

En determinados casos, cuando la cadena de ácidos grasos es inferior o igual a doce átomos de carbono, pueden ser indicados factores de corrección en las monografías individuales para convertir el área bajo los picos en porcentaje m/m.

**Tabla 1 - Mezcla de sustancias para calibración.**

<i>Mezcla de sustancias</i>	<i>Composición (%m/m)</i>
Laurato de metilo	5
Miristato de metilo	5
Palmitato de metilo	10
Estearato de metilo	20
Araquidato de metilo	40
Oleato de metilo	20

**Tabla 2 - Mezcla de sustancias para calibración.**

<i>Mezcla de sustancias</i>	<i>Composición (%m/m)</i>
Caproato de metilo	10
Caprilato de metilo	10
Caprato de metilo	20
Laurato de metilo	20
Miristato de metilo	40



**Tabla 3 - Mezcla de sustancias para calibración.**

<i>Mezcla de sustancias</i>	<i>Composición (% m/m)</i>
Miristato de metilo	5
Palmitato de metilo	10
Estearato de metilo	15
Araquidato de metilo	20
Oleato de metilo	20
Eicosanoato de metilo	10
Behenato de metilo	10
Lignocerato de metilo	10

**Tabla 4 - Largo equivalente de cadena (valores calculados a partir de curva de calibración y análisis con columna de macrogol 20000).**

<i>Ácido graso</i>	<i>Largo de cadena equivalente</i>
Acido caproico	6,0
Ácido caprílico	8,0
Acido cáprico	10,0
Acido láurico	12,0
Acido mirístico	14,0
Acido palmítico	16,0
Acido palmitoleico	16,3
Acido margárico	17,0
Acido esteárico	18,0
Acido oleico	18,3
Acido linoleico	18,8
Acido gama-linolénico	19,0
Acido alfa-linolénico	19,2
Acido araquídico	0,0
Acido eicosanoico	20,2
Acido araquidónico	21,2
Acido behénico	22,0
Acido erúcido	22,2
Acido 12-oxoesteárico	22,7
Acido ricinoléico	23,9
Acido 12-hidroxiesteárico	23,9
Lignocerato de metilo	24,0
Acido nervónico	24,2

**MÉTODO B**

*Este método no se aplica a los aceites que contengan glicéridos de ácidos grasos con grupos epoxi, hidroepoxi, ciclopropilo o ciclopropenilo, ni a los aceites cuyo índice ácido sea superior a 2,0.*

**Solución problema.** Introducir 0,100 g de la muestra en tubo de centrifuga de 10 ml con tapón esmerilado. Disolver con 1 ml de heptano y 1 ml de dimetilcarbonato. Agitar enérgicamente, calentando a calor suave (50 – 60 °C). Añadir 1 ml de solución de sodio a 12 g/L en metanol anhidro a la solución todavía caliente. Agitar enérgicamente, durante cerca de 5 min. Añadir 3 ml de agua destilada y agitar enérgicamente, durante cerca de 30 s. Centrifugar durante 15 min a 1500 g. Inyectar 1 µL de la fase orgánica.

**Soluciones estándar y evaluación de los cromatogramas.** En la ausencia de indicación específica en la monografía individual, proceda conforme descrito en *Método A*.

**Condiciones cromatográficas.** La cromatografía puede ser realizada, utilizando:

columna de sílice fundida de 30 m de largo y 0,25 mm de diámetro interno, recubierta con macrogol 20 000 (espesor de la película: 0,25 µm);

gas de arrastre: helio para cromatografía, con flujo 0,9 ml/min;

detector de ionización de llama;

razón de *split* 1:100

Utilizar la programación de temperatura representada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Programación de temperatura para cromatografía.**

	<i>Tiempo (minutos)</i>	<i>Temperatura (grados Cent)</i>
Columna	0-15	100
	15-36	100-225
	36-61	225
Inyector		250
Detector		250

**MÉTODO C**

Ese método no se aplica a los aceites que contengan glicéridos de ácido grasos con grupos epoxi, hidroperoxi, aldehído, cetona, ciclopropil y ciclopropenilo, así como, a los aceites con grupos poliinsaturados conjugados o con grupos acetilénicos por causa de la destrucción parcial o total de esos grupos.

**Solución problema.** En frasco cónico de 25 ml, disolver 0,10 g de la muestra en 2 ml de solución de hidróxido de sodio a 20 g/L en metanol. Adaptar el frasco al condensador de reflujo vertical y calentar durante 30 min. A través del condensador, añadir 2,0 ml de solución metanólica de trifluoruro de boro y calentar durante 30 min. A través del condensador, añadir 4 ml de heptano y calentar durante 5 min. Enfriar la mezcla y añadir 10,0 ml de solución saturada de cloruro de sodio. Agitar durante 15 s y añadir una cantidad de solución saturada de cloruro de sodio suficiente para hacer la fase superior llegar al cuello del frasco recipiente. Retirar alícuota de 2 ml de la fase superior. Lavar tres veces con 2 ml de agua de cada vez y secar con sulfato de sodio anhidro.

**Soluciones estándar, condiciones cromatográficas y evaluación de los cromatogramas.** En la ausencia de indicación en la monografía específica, proceder conforme descrito en *Método A*.

## 5.2.29.16 DETERMINACIÓN DE ESTEROLES EN ACEITES FIJOS

### SEPARACIÓN DE LA FRACCIÓN DE ESTEROLES

Preparar la fracción insaponificable. Separar la fracción de esteroleos del aceite fijo por cromatografía en camada delgada, utilizando una placa de gel de sílice G (espesor de la camada entre 0,3 mm y 0,5 mm).

*Solución muestra (a).* En balón de 150 ml, introducir volumen de solución de betulina a 2 g/L en diclorometano, que corresponda a cerca de 10% del tenor de esteroleos de la muestra utilizada para el dosificación (por ejemplo, volumen de 500 µL de solución de betulina en el caso del aceite de oliva virgen, y de 1500 µL en el caso de otros aceites vegetales). Si en la monografía está registrada la exigencia del cálculo del tenor porcentual de cada esteroles en la fracción esterólica, la adición de la betulina puede ser omitida. Evaporar hasta a que se seque en corriente de nitrógeno. Añadir 5,00 g de la muestra y añadir 50 ml de hidróxido de potasio alcohólico 2 M. Acoplar condensador de reflujo vertical. Calentar en baño maría durante 1 h, bajo agitación. Enfriar hasta temperatura inferior a 25 °C y transferir el contenido del balón para un embudo de separación, con el auxilio de 100 ml de agua. Agitar, con precaución, tres veces con 100 ml de éter etílico exento de peróxidos. Reunir las fracciones etéreas en otro embudo de separación con el auxilio de 40 ml de agua destilada. Agitar suavemente durante algunos minutos. Dejar separar las fases por decantación y rechazar la fase acuosa. Lavar la fase orgánica varias veces con 40 ml de agua (por vez) hasta que la fase acuosa no presente reacción alcalina a fenolftaleína. Transferir la fracción orgánica para un balón, tarado y lavar el embudo de separación con éter etílico. Evaporar el éter. Añadir al residuo 6 ml de acetona. Eliminar, cuidadosamente, el solvente con corriente de nitrógeno. Secar en estufa a 100 – 105 °C hasta masa constante. Disolver el residuo con volumen mínimo de diclorometano.

*Solución muestra (b).* Someter 5,00 g de aceite de canola al mismo procedimiento descrito para la *Solución muestra (a)* a partir de “Añadir 50 ml de hidróxido de potasio alcohólico 2 M...”.

*Solución problema (c).* Someter 5,00 g de aceite de girasol al mismo procedimiento descrito para la *Solución problema (a)* a partir de “Añadir 50 ml de hidróxido de potasio alcohólico 2 M...”.

*Solución estándar.* Disolver 25 mg de colesterol y 10 mg de betulina en 1 ml de diclorometano. Utilizar una placa diferente para cada solución problema.

Aplicar, separadamente, 20 µL de la *Solución estándar* en forma de banda de 20 mm por 3 mm y 0,4 ml de la solución problema (a), (b) o (c) en forma de banda de 40 mm por 3 mm. Migrar por la distancia de 18 cm con la fase móvil éter:n-hexano (35:65; v/v). Secar las placas en corriente de nitrógeno. Revelar con solución de diclorofluoresceína a 2 g/L en etanol. Examinar en 254 nm.

El cromatograma obtenido con la *Solución estándar* presenta bandas correspondientes, respectivamente, al colesterol y a la betulina. Los cromatogramas obtenidos con las *Soluciones muestra* presentan bandas de *R<sub>f</sub>* próximos de los correspondientes a los esteroleos. De cada uno de los cromatogramas raspar la región de la placa correspondiente a las bandas de los esteroleos así como una zona situada 2 – 3 mm para arriba y para abajo de las zonas visibles correspondientes a la solución estándar. Colocar esas regiones en tres matraces diferentes de 50 ml. Añadir cada uno, 15 ml de diclorometano caliente y agitar. Filtrar, separadamente, cada solución por un filtro de vidrio poroso (40), o por filtro de papel apropiado. Lavar, cada filtro, tres veces con 15 ml de diclorometano. Transferir lo filtrado y líquidos de lavado en matraz, tarado. Evaporar hasta la sequedad en corriente de nitrógeno y pesar.

### DOSIFICACIÓN DE LOS ESTEROLES

Proceder por *cromatografía a gas (5.2.17.5)*. La dosificación debe ser realizada al abrigo de la humedad y preparar las soluciones en el momento del uso.

*Solución muestra.* A los esteroleos separados a partir de la muestra por cromatografía en camada delgada, añadir 0,02 ml de la mezcla, recientemente preparada, de clorotrimetilsilano: hexametildisilazano: piridina anhidra (1:3:9; v/v/v) por miligramo de residuo. Agitar, cuidadosamente, hasta disolución completa de los esteroleos. Dejar en reposo en desecador con pentóxido de difósforo durante 30 min. Centrifugar, si necesario, y utilizar el sobrenadante.

*Solución estándar (a).* A nueve partes de los esteroleos separados del aceite de canola por cromatografía en camada delgada, juntar una parte de colesterol. Añadir 0,02 ml de la mezcla, recientemente preparada, de clorotrimetilsilano: hexametildisilazano: piridina anhidra (1:3:9; v/v/v) por miligramo de residuo. Agitar, cuidadosamente, hasta disolución completa de los esteroleos. Dejar en reposo en desecador con pentóxido de difósforo durante 30 min. Centrifugar, si necesario, y utilizar el sobrenadante.

*Solución estándar (b).* A los esteroleos separados del aceite de girasol por cromatografía en camada delgada, juntar 0,02 ml de la mezcla, recientemente preparada, de clorotrimetilsilano: hexametildisilazano: piridina anhidra (1:3:9; v/v/v) por miligramo de residuo. Agitar, cuidadosamente, hasta disolución completa de los esteroleos. Dejar en reposo en desecador con pentóxido de difósforo durante 30 min. Centrifugar, si necesario, y utilizar el sobrenadante.

### Condiciones cromatográficas

- columna de sílice fundida de 20 a 30 m de largo y 0,25-0,32 mm de diámetro interno, recubierta por película de poli[metil(95)fenil(5)]siloxano o de poli[metil(94)fenil(5)vinil(1)]siloxano (espesor de la película 0,25 µm);
- gas de arrastre: gas hidrógeno con flujo de 30 a 50 cm/s o helio con flujo de 20 a 35 cm/s;
- razón de *split* (1/50 o 1/100);
- temperaturas: columna: 260 °C;
- inyector: 280 °C;

- detector: 290 °C;
- volumen de inyección: 1 µL.

**Resultados.** El cromatograma obtenido con la *Solución estándar (a)* presenta cuatro picos principales correspondiendo, respectivamente, al colesterol, brassicasterol, campesterol y β-sitosterol. El cromatograma obtenido con la *Solución estándar (b)* presenta cuatro picos principales correspondiendo, respectivamente, al campesterol, estigmasterol, β-sitosterol y Δ<sup>7</sup>-estigmasterol. Los tiempos de retención relativos de los diferentes esteroides en relación al β-sitosterol son indicados en la **Tabla 1**.

El pico correspondiente al estándar interno (betulina) está, nítidamente separado, de los picos correspondientes a los esteroides a ser cuantificados.

**Tabla 1 - Tiempos de retención relativos, de los esteroides en relación al β-sitosterol, obtenidos con dos diferentes columnas.**

<i>Esteroides</i>	<i>Poli[metil(95) fenil(5) siloxano]</i>	<i>Poli[metil(94) fenil(5) vinil(1) siloxano]</i>
Colesterol	0,63	0,67
Brassicasterol	0,71	0,73
24-Metilenocolesterol	0,80	0,82
Campesterol	0,81	0,83
Campestanol	0,82	0,85
Estigmasterol	0,87	0,88
Δ <sup>7</sup> -Campesterol	0,92	0,93
Δ <sup>5,23</sup> -Estigmastadienol	0,95	0,95
Clerosterol	0,96	0,96
β-Sitosterol	1	1
Sitostanol	1,02	1,02
Δ <sup>5</sup> -Avenasterol	1,03	1,03
Δ <sup>5,24</sup> -Estigmastadienol	1,08	1,08
Δ <sup>7</sup> -Estigmasterol	1,12	1,12
A <sup>7</sup> -Avenasterol	1,16	1,16
Betulina	1,4	1,6

Examinar el cromatograma obtenido con la *Solución muestra*. Identificar los picos y calcular el tenor porcentual de cada esteroide en la fracción de esteroides usando la ecuación:

$$\frac{A}{S} \times 100$$

en que

A = área bajo el pico correspondiente del compuesto a cuantificar;

S = suma de las áreas bajo los picos correspondientes a los compuestos indicados en la **Tabla 1**.

Si en la monografía hubiere exigencia, calcule el tenor de cada esteroide en la muestra, en miligramos por 100 gramos, utilizando la expresión:

$$\frac{A \times m_s \times 100}{A \times m_s}$$

en que

A = área bajo el pico correspondiente al compuesto a ser cuantificado;

A<sub>s</sub> = área bajo el pico correspondiente a betulina;

m = masa de la porción de la muestra para el ensayo, en gramos;

m<sub>s</sub> = masa, en miligramos, de la betulina adicionada

## 5.2.30 CARBONO ORGÁNICO TOTAL

La determinación del carbono orgánico total (COT) es un método sensible e inespecífico de cuantificar los átomos de carbono ligados por covalencia en moléculas orgánicas presentes en una muestra. El análisis es utilizado para identificar la contaminación del agua por impurezas orgánicas y auxiliar en el control de los procesos de purificación y distribución. Bajos niveles de COT sugieren la ausencia de compuestos químicos orgánicos potencialmente peligrosos en el agua usada en la elaboración de fármacos. El tenor de COT puede estar relacionado a la ocurrencia de endotoxinas, al crecimiento microbiano y al desarrollo de biopelículas en las paredes de la tubería de los sistemas de distribución de agua de uso farmacéutico. El contenido de COT es independiente del estado de oxidación de la materia orgánica y no sufre interferencia de otros átomos ligados a la estructura orgánica, como nitrógeno e hidrógeno. Hay varios métodos apropiados para el análisis del COT y las determinaciones pueden ocurrir en línea o en el laboratorio (fuera de línea).

Los métodos en general se fundamentan en la oxidación completa de las moléculas orgánicas a dióxido de carbono, que es cuantificado como carbono. Normalmente, el carbono orgánico es oxidado por combustión, aplicando calor, emisión de rayos ultravioleta o agentes oxidantes, como el persulfato de sodio. La cuantificación del dióxido de carbono está hecha por detección del gas producido con infrarrojo o por la lectura de la conductividad de la solución.

El método comprendido en ese capítulo es sugestivo y el usuario puede adoptar cualquier otro que sea apropiado y accesible a sus finalidades específicas, siempre que el límite de cuantificación sea adecuado a la banda de lectura esperada. Utiliza una solución estándar de sustancia fácilmente oxidable, como la sacarosa, por ejemplo, en una concentración tal que la respuesta instrumental obtenida corresponda al límite establecido para el COT. El método puede igualmente ser realizado con un aparato instalado en línea, que haya sido convenientemente calibrado y que satisfaga al ensayo de conformidad del sistema.

En la **Tabla 1** son mostrados los valores medios esperados para los principales tipos de purificación de agua

Figura 1 - Valores típicos de COT en agua

Tipo de purificación	Banda esperada de COT (mg/L)
Agua potable	0,5 a 7,0
Destilación	Cerca de 0,10
Desionización	0,05 a 0,50
Ósmosis reversa	,04 a 0,10
Ósmosis reversa + desionización	0,01 a 0,05
Tecnologías combinadas	0,003 a 0,005
Tecnologías combinadas + Oxidación UV	< 0,002

## EQUIPO

Consiste de un inyector, un equipo para descomponer la muestra, un sistema para separar el dióxido de carbono formado, un detector y un registrador del señal eléctrico emitido. El tubo de descomposición debe ser capaz de generar, como mínimo, 0,450 mg/L de carbono orgánico, para una muestra de 1,071 mg/L de sacarosa.

El límite de detección del equipo, especificado por el fabricante, es igual o inferior a 0,050 mg de carbono por litro (0,05 ppm). La conformidad del sistema es verificada, periódicamente, por medio de una solución preparada con una sustancia de difícil oxidación, como por ejemplo, a 1,4-benzoquinona. La localización del aparato es escogida para asegurar que los resultados obtenidos sean representativos del agua utilizada. La lectura debe ser hecha inmediatamente después de la recolección de la muestra de agua.

## AGUA COT (ACOT)

Utilizar agua de alta pureza, que satisfaga las siguientes especificaciones:

- Conductividad: como máximo 0,1  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a 25 °C;
- Carbono orgánico total – como máximo 0,10 mg/L.

Dependiendo del tipo de equipo utilizado los contenidos en metales pesados y en cobre pueden ser críticos. Observar las instrucciones del fabricante.

Utilizar el agua COT como blanco; en la preparación de las soluciones del estándar; de solución de conformidad del sistema y en la limpieza del equipo. La preparación de la solución estándar y de la solución de conformidad del sistema debe ser concomitante a la de la muestra.

## PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO.

Lavar, cuidadosamente, el material de vidrio por medio de un proceso que elimine la materia orgánica. Dejar el material inmerso en mezcla de partes iguales de solución de peróxido de hidrógeno diluido a 30% y ácido nítrico diluido. Enjuagar con agua COT.

Caso use una microjeringa para inyectar la muestra, esta debe ser lavada con mezcla de solución de hidróxido de sodio a 5% con alcohol etílico absoluto (1:1), o en ácido clorhídrico a 25%. Enjuagar abundantemente con agua COT.

## PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

*Blanco.* Preparar la solución del blanco, o cualquier otra solución necesaria para definir la línea de base, o proceder a la calibración, según las instrucciones del fabricante. Utilizar el blanco apropiado para regular el cero del aparato.

*Solución estándar.* Disolver la sacarosa R, previamente desecada en temperatura de 105 °C durante 3 h, en agua COT, para obtener una solución conteniendo 1,19 mg de sacarosa por litro (0,50 mg de carbono por litro), para verificar el instrumento.

Utilizar solución, en agua COT, de ftalato ácido de potasio, previamente seco a 105 °C durante 4 hs, en la concentración determinada por el fabricante del equipo, para la calibración del instrumento. Preservar la solución, acidificando con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a  $\text{pH} < 2$ . Para determinar carbono orgánico e inorgánico, separadamente, preparar, también, la solución estándar de solución de bicarbonato de sodio (seco en desecador, como mínimo por 18 horas) y carbonato de sodio decahidratado (seco a 500 – 600 °C por 30 minutos), en la proporción del contenido de carbono de 1:1, en agua COT.

La concentración de la solución estándar está calculada para el agua purificada, cuyo límite de COT es de 500 ppb. Para otros tipos de agua, hacer la debida adecuación.

*Solución de conformidad del sistema.* Disolver 1,4-benzoquinona en agua COT, para obtener una solución a 0,75 mg de 1,4-benzoquinona por litro (0,50 mg de carbono por litro).

*Muestra.* Recoger la muestra de agua en recipiente limpio; seco y con tapa, dejando un mínimo de aire. Cuidar para no haber cualquier tipo de contaminación. No utilizar material de plástico. Proceder al análisis el más breve posible, para minimizar los riesgos de deterioro o de contaminación de la muestra.

## CONFORMIDAD DEL SISTEMA

Proceder las lecturas (L) de las soluciones de *agua COT* ( $L_{\text{Cot}}$ ), *solución estándar* ( $L_{\text{pa}}$ ), *solución de conformidad del sistema* ( $L_{\text{CS}}$ ) y registrar. Calcular la eficacia del sistema en porcentaje, usando a expresión:

$$\frac{L_{\text{CS}} - L_{\text{Cot}}}{L_{\text{pa}} - L_{\text{Cot}}} \times 100$$

El sistema estará conforme si el valor obtenido está entre 85% y 115% del valor teórico.

## PROCEDIMIENTO

Emplear el método analítico recomendado por el fabricante del equipo utilizado. Inyectar volumen adecuado de la muestra y proceder a la lectura del carbono total.

Determinar la lectura de la muestra ( $L_{Am}$ ). La muestra satisface el ensayo si  $L_{Am}$  no es superior a  $L_{Pa} - L_{Cot}$ .

$$L_{Am} < L_{Pa} - L_{Cot}$$

Para cálculos diferenciados de las fracciones de carbono orgánico e inorgánico, hacer la lectura del carbono orgánico total, mudar la configuración del equipo para la lectura de carbono inorgánico y calcular el carbono orgánico por sustracción. Alternativamente, puede medir el carbono orgánico después de eliminación del carbono inorgánico y sustraer del carbono total. Normalmente, para aguas de alta pureza la fracción de carbono inorgánico es despreciable.

# 5

## 5.3 MÉTODOS QUÍMICOS

### 5.3.1 REACCIONES DE IDENTIFICACIÓN

#### 5.3.1.1 IONES, GRUPOS Y FUNCIONES

Los métodos clásicos de identificación de funciones o determinados grupos químicos presentes en fármacos consisten en reacciones que resultan en formación de precipitado, producto colorido, desprendimiento de gas, decoloración del reactivo utilizado u otro fenómeno cualquier fácilmente perceptible. Estos ensayos no son aplicables a mezclas de fármacos.

#### *Acetato*

1. Calentar la muestra con cantidad igual de ácido oxálico; se desprenden vapores ácidos con olor característico de ácido acético.
2. Calentar la muestra con ácido sulfúrico SR y etanol; se desprenden acetato de etilo, de olor característico.
3. Tratar solución neutra de la muestra con cloruro férrico SR; se produce color rojo oscuro, que desaparece por la adición de ácidos minerales.
4. Disolver la muestra en agua, añadir cinco gotas de nitrato de lantano SR, dos gotas de yodo 0,1 M y una gota de solución concentrada de amoníaco. Calentar cuidadosamente hasta ebullición. Después de algunos minutos se forma precipitado azul o aparece coloración azul intensa.

#### *Acetilo*

Colocar la muestra en tubo de ensayo y juntar tres gotas de ácido fosfórico SR. Cerrar el tubo con tapa atravesada por otro tubo de ensayo menor lleno de agua y en cuyo exterior se depositó una gota de nitrato de lantano SR. Calentar el conjunto en baño maría durante cinco minutos (ciertas sustancias acetiladas se hidrolizan con dificultad; en este caso la mezcla debe ser calentada lentamente, hasta ebullición, sobre llama directa). Transferir la gota de nitrato de lantano SR a una cápsula de porcelana y mezclar con una gota de yodo SR. Colocar en el borde de la mezcla una gota de hidróxido de amonio 2 M. En la zona de contacto de los dos líquidos aparece lentamente color azul que persiste por poco tiempo.

#### *Alcaloide*

Disolver algunos miligramos de la muestra en 5 ml de agua, juntar ácido clorhídrico SR hasta acidificar la solución y, en seguida, verter 1 ml de iodobismutato de potasio acuoacético; se forma inmediatamente precipitado anaranjado o rojo anaranjado.

#### *Aluminio, ion*

1. Juntar la muestra a hidróxido de amonio 6 M; se forma precipitado blanco gelatinoso, insoluble en exceso del mismo reactivo.
2. Añadir la muestra a hidróxido de sodio M o sulfuro de sodio SR; se forma precipitado blanco gelatinoso, soluble en exceso del mismo reactivo.

A la solución de la muestra juntar hidróxido de amonio 5 M hasta que se forme turbación. Añadir, en seguida, de tres a cuatro gotas de la solución recién preparada de quinalizarina a 0,05% en hidróxido de sodio a 1% (p/v). Calentar hasta ebullición, enfriar y acidificar con exceso de ácido acético 5 M; se produce color violeta rojizo.

#### *Amina aromática primaria*

Acidificar la solución de la muestra con ácido clorhídrico 2 M y juntar cuatro gotas de nitrito de sodio SR. Después de 1 a 2 minutos, añadir 1 ml de 2-naftol SR; aparece color anaranjado intenso o rojo, formándose generalmente precipitado.

#### *Amoníaco y amina alifática volátil*

Disolver la muestra en tubo de ensayo, añadir óxido de magnesio y calentar si necesario; se desprenden paulatinamente vapores alcalinos, que oscurecen el papel de plata-manganeso colocado en la parte superior del tubo.

#### *Amonio, ion*

Juntar a la muestra exceso de hidróxido de sodio M a frío; ocurre desprendimiento de amoníaco, de olor característico, y que cambia para azul a color rojo del papel de tornasol. La descomposición es acelerada por el calentamiento.



*Antimonio (III), ion*

Tratar la solución de la muestra, fuertemente acidificada por ácido clorhídrico (en el máximo 2 M), con sulfuro de hidrógeno SR; se forma precipitado anaranjado de sulfuro de antimonio, insoluble en hidróxido de amonio 6 M, pero soluble en sulfuro de amonio SR, hidróxido de sodio 2 M y ácido clorhídrico concentrado.

Disolver la muestra en tartrato de sodio y potasio SR; después de enfriamiento, juntar, gota a gota, sulfuro de sodio SR1; se forma precipitado rojo anaranjado soluble en hidróxido de sodio 2 M.

*Arsénico*

1. La una solución amoniaca de la muestra añadir sulfuro de sodio SR y acidificar con ácido clorhídrico diluido; se forma precipitado amarillo, insoluble en ácido clorhídrico, pero soluble en soluciones alcalinas.
2. Calentar 5 ml de la solución de la muestra fuertemente clorhídrica en baño maría con volumen igual de hipofosfito de sodio SR; se forma precipitado de color marrón a negro. En el caso que se trate de As (V), la reducción es más lenta; el aumento de yoduro de potasio SR ejercerá efecto catalítico.

*Barbitúrico sin sustituyente en el nitrógeno*

A una solución metanólica de la muestra juntar algunas gotas de solución conteniendo nitrato de cobalto (II) a 10% (p/v) y cloruro de calcio a 10% (p/v), mezclar y añadir, con agitación, algunas gotas de hidróxido de sodio 2 M; se forma precipitado azul violeta.

*Bario, ion*

1. Tratar solución de la muestra con ácido sulfúrico M; se forma precipitado blanco, insoluble en los ácidos clorhídrico y nítrico.
2. Colocar la muestra en la zona reductora de llama; esta adquiere color verde amarillo, que se presenta azul cuando visto a través de vidrio verde.

*Benzoato*

1. Tratar solución neutra de la muestra con cloruro férrico SR; se forma precipitado amarillo oscuro, soluble en éter etílico.
2. Acidular solución moderadamente concentrada de la muestra con ácido sulfúrico M; se forma precipitado de ácido benzoico, fácilmente soluble en éter etílico.

*Bicarbonato*

1. Tratar la muestra con ácido mineral; se produce efervescencia con desprendimiento de gas incoloro que, al reaccionar con hidróxido de calcio SR, forma inmediatamente precipitado blanco.

2. A una solución fría de la muestra juntar fenoltaleína SI; la solución permanece inalterada o queda apenas levemente colorida.

*Bismuto, ion*

Disolver la muestra en ligero exceso de ácidos nítrico o clorhídrico y diluir con agua; se forma precipitado blanco que, tratado con sulfuro de hidrógeno, pasa a marrón; el compuesto resultante es soluble en mezcla caliente de partes iguales de ácido nítrico y agua, pero insoluble en sulfuro de amonio SR.

*Bisulfito*

Tratar la muestra con ácido clorhídrico 3 M; se desprende dióxido de azufre, reconocido por su olor penetrante característico y por oscurecer papel de filtro humedecido con nitrato de mercurio (I) SR.

*Borato*

1. A una solución de la muestra acidulada con ácido clorhídrico, juntar algunas gotas de solución de yodo a 0,1% (p/v) y de solución de alcohol polivinilo a 2% (p/v); se produce color verde intenso. La reacción es alterada por agentes de oxidación o reducción.
2. Tratar la muestra con ácido sulfúrico, añadir metanol y llevar la mezcla a la ignición; ella quema con llama de bordes verdes.

*Bromato*

1. A solución de la muestra acidificada con ácido sulfúrico SR, juntar agua de cloro SR; se desprende bromo, que le da color pardo a la solución; agitándose esta con cloroformo, el solvente adquiere color variando de rojo a marrón rojizo y la camada acuosa permanece incolora.
2. Tratar la solución de la muestra con ácido nítrico SR y nitrato de plata SR; se forma precipitado caseoso blanco levemente amarillento, insoluble en ácido nítrico y poco soluble en hidróxido de amonio 6 M

*Calcio, ion*

1. Humedecer la muestra con ácido clorhídrico y llevarla a la zona reductora de la llama; aparece color rojo anaranjado transitorio.
2. Disolver la muestra, juntar dos gotas de rojo de metilo SI, neutralizar con hidróxido de amonio 6 M, añadir ácido clorhídrico 3 M, gota a gota, hasta acidular la solución y verter oxalato de amonio SR; se forma precipitado blanco de oxalato de calcio, insoluble en ácido acético 6 M, pero soluble en ácido clorhídrico SR.

*Carbonato*

1. Tratar la muestra con ácido mineral; se produce efervescencia, con desprendimiento de gas incoloro que, al

reaccionar con hidróxido de calcio SR, forma inmediatamente precipitado blanco.

2. A una solución fría de la muestra soluble juntar fenoltaleína SI; aparece color rojo.

#### *Plomo, ion*

3. Tratar solución de la muestra con ácido sulfúrico M; se forma precipitado blanco, insoluble en ácido clorhídrico 3 M o ácido nítrico 2 M, pero soluble en hidróxido de sodio M calentado, en acetato de amonio a 10% (p/v) y en exceso de ácido sulfúrico M.
4. Tratar solución de la muestra, exenta de ácidos minerales, con cromato de potasio SR; se forma precipitado amarillo, insoluble en ácido acético 6 M, pero soluble en hidróxido de sodio M y en ácido nítrico, en caliente.

#### *Cianuro*

Tratar solución de la muestra con sulfato ferroso SR, hidróxido de sodio SR y cloruro férrico SR, calentar hasta ebullición y acidular con ácido clorhídrico; se produce coloración o precipitado azul. Si la cantidad de cianuro presente es pequeña, se forma solución coloidal de coloración azul verdosa.

#### *Citrato*

A 15 ml de piridina añadir algunos miligramos de la muestra disuelta o suspendida en 1 ml de agua, agitar, juntar 5 ml de anhídrido acético a la mezcla, agitar nuevamente; aparece color rojo claro.

#### *Clorato*

1. Tratar solución de la muestra con nitrato de plata SR en medio de ácido nítrico SR; no se forma precipitado. Verter ácido sulfuroso o solución reciente de nitrito de sodio SR a esta mezcla; se forma precipitado blanco, insoluble en ácido nítrico SR, pero soluble en hidróxido de amonio 6 M.
2. Someter la muestra a la ignición; se forma cloruro, identificado por ensayos apropiados.
3. Tratar la muestra seca con ácido sulfúrico; ocurre crepitación desprendiéndose gas amarillo verdoso (para este ensayo usar cantidad pequeña de clorato, debiendo tomar cuidado extremo al ejecutarlo, pues el gas que se forma se descompone de modo explosivo arriba de 45 °C – utilizar campana).

#### *Cloruro*

1. Tratar solución de la muestra, acidificada con ácido nítrico, con nitrato de plata SR; se forma precipitado blanco caseoso, insoluble en ácido nítrico, pero, soluble en ligero exceso de hidróxido de amonio 6 M.

2. Mezclar la muestra seca con igual peso de dióxido de manganeso, humedecer con ácido sulfúrico SR y calentar suavemente; se desprende cloro, identificado por el olor y por la producción de color azul en papel de almidón con yoduro humedecido.

#### *Cobre (II), ion*

1. Tratar la solución de la muestra con ferrocianuro de potasio SR; se forma precipitado marrón rojizo, insoluble en ácidos diluidos, pero soluble en hidróxido de amonio.
2. Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico y virutas de hierro metálico; se deposita película roja de cobre metálico.
3. Tratar solución de la muestra con exceso de hidróxido de amonio 6 M; se forma primero precipitado azulado y, en seguida, solución fuertemente azulada.

#### *Éster*

Juntar a la muestra solución de clorhidrato de hidroxilamina a 7% (p/v) en metanol y solución de hidróxido de potasio a 10% (p/v) en etanol, calentar hasta ebullición, enfriar, acidular con ácido clorhídrico SR y juntar solución de cloruro férrico SI; se produce color rojo azulado o rojo.

#### *Hierro*

Tratar la muestra con sulfuro de amonio SR; se forma precipitado negro, que se disuelve en ácido clorhídrico 3 M, con desprendimiento de gas sulfhídrico, caracterizado por el papel acetato de plomo.

#### *Férrico, ion*

1. Tratar solución ácida de la muestra con ferrocianuro de potasio SR; se forma precipitado azul oscuro, que no disuelve por adición de ácido clorhídrico SR, pero es descompuesto por hidróxido de sodio 2 M.
2. Tratar la muestra con tiocianato de amonio SR; se produce color rojo intenso que no desaparece con adición de ácidos minerales diluidos, pero puede ser extraído con éter etílico, pasando la coloración roja para la cámara etérea.

#### *Ferroso, Ion*

1. Tratar solución de la muestra con ferrocianuro de potasio SR; se forma precipitado azul oscuro, insoluble en ácido clorhídrico 3 M, pero descompuesto por hidróxido de sodio M.
2. Tratar solución de la muestra con hidróxido de sodio M; se forma precipitado blanco verdoso, que pasa rápidamente a verde y, en seguida, cuando agitado, a marrón.

*Fosfato (o ortofosfato)*

1. Tratar solución neutra de la muestra con nitrato de plata SR; se forma precipitado amarillo, soluble en ácido nítrico 2 M o hidróxido de amonio 6 M.
2. Tratar solución nítrica de la muestra con molibdato de amonio SR; se forma precipitado amarillo, soluble en hidróxido de amonio 6 M; la reacción es acelerada por el calor.

*Hipofosfito*

1. Calentar solución de la muestra, acidulada por ácido sulfúrico SR, con sulfato cúprico SR; se forma precipitado rojo.
2. Tratar solución de la muestra con cloruro mercúrico SR; se forma precipitado blanco, que se torna gris en la presencia de exceso de hipofosfito.

*Yoduro*

1. Tratar solución de la muestra con agua de cloro SR, gota a gota; se desprende yodo, que cambia el color de la solución de amarillo para rojo; agitándose esta solución con cloroformo, esta adquiere color violeta.
2. Tratar solución de la muestra acidificada con ácido nítrico SR, con nitrato de plata SR; se forma precipitado amarillo caseoso, insoluble en ácido nítrico SR e hidróxido de amonio 6 M

*Lactato*

Tratar solución de la muestra, acidulada por ácido sulfúrico SR, con permanganato de potasio SR y calentar la mezcla; se desprende acetaldehído, identificado por el olor característico.

*Litio, ion*

1. Tratar la solución de la muestra moderadamente concentrada y alcalinizada por hidróxido de sodio SR, con carbonato de sodio SR; se forma, por calentamiento, precipitado blanco, soluble en cloruro de amonio SR.
2. Humedecer la muestra con ácido clorhídrico y calentar en la zona reductora de la llama; esta adquiere color rojo intenso.

*Magnesio, ion*

1. Tratar solución de la muestra con hidróxido de sodio SR; se forma precipitado blanco, que se disuelve con la adición de cloruro de amonio SR.
2. Tratar solución de la muestra, en la presencia de cloruro de amonio SR, con carbonato de amonio SR; no se forma precipitado pero, al añadir fosfato de sodio dibásico heptahidratado SR, se forma precipitado cristalino blanco, insoluble en hidróxido de amonio 6 M.

*Mercurio*

1. Tratar solución de la muestra con sulfuro de hidrógeno SR; se forma precipitado negro, insoluble en sulfuro de amonio SR y en ácido nítrico 2 M hirviendo.
2. Aplicar solución de la muestra, sin exceso de ácido nítrico, en lámina de cobre brillante; se forma depósito que, al ser pulido, se torna brillante y plateado.

*Mercurio (II), ion*

1. Tratar solución de la muestra con hidróxido de sodio M; se forma precipitado amarillo.
2. Tratar solución neutra de la muestra con yoduro de potasio SR; se forma precipitado escarlata, muy soluble en exceso de reactivo.

*Mercurio (I), ion*

1. Tratar la muestra con hidróxido de sodio M; la sal se descompone, dando color negro.
2. Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico SR; se forma precipitado blanco, que oscurece al ser tratado con hidróxido de amonio 6 M.
3. Tratar solución de la muestra con yoduro de potasio SR; se forma precipitado amarillo que, con el tiempo, puede pasar a verde.

*Nitrato*

1. Calentar la muestra con ácido sulfúrico y cobre metálico; se desprenden vapores rojo pardos (realizar en campana).
2. Tratar solución de la muestra con igual volumen de ácido sulfúrico, enfriar la mezcla y juntar 0,5 ml de solución de sulfato ferroso 0,5 M; en la interfaz se produce color pardo a violeta.

*Nitrito*

1. Tratar la muestra con ácidos minerales diluidos o con ácido acético 5 M; se desprenden vapores pardos (realizar en campana).
2. Tratar papel de almidón yodado con solución de la muestra; el indicador se torna color azul.
3. Añadir la muestra a la solución acidificada de permanganato de potasio SR; desaparece el color.

*Oxalato*

1. Tratar solución neutra o alcalina de la muestra con cloruro de calcio SR; se forma precipitado blanco, insoluble en ácido acético 6 M, pero soluble en ácido clorhídrico.

- Tratar solución acidificada caliente de la muestra con permanganato de potasio SR; desaparece el color.

#### Permanganato

- Tratar solución de la muestra, acidulada por ácido sulfúrico SR, con peróxido de hidrógeno a 3% (p/v) SR; el color desaparece en frío.
- Tratar solución de la muestra, acidulada por ácido sulfúrico SR, con ácido oxálico SR en solución calentada; el color desaparece.

#### Peróxido

Tratar solución de la muestra, ligeramente acidulada por ácido sulfúrico SR, con dicromato de potasio SR; aparece color azul intenso. Agitando la mezcla con igual volumen de éter etílico y dejando que los líquidos se separaren, el color azul pasa para la camada etérea.

#### Potasio, ion

- Tratar solución alcalina de la muestra con tetrafenilborato sódico a 1% (p/v); se forma precipitado blanco.
- Tratar solución de la muestra con ácido acético SR y 1 ml de cobaltinitrito de sodio SR; se forma inmediatamente precipitado amarillo o amarillo anaranjado, en la ausencia de iones amonio.
- Colocar la solución de la muestra, acidulada con ácido clorhídrico SR, en la zona reductora de la llama; esta adquiere color violeta; la presencia de pequeña cantidad de sodio enmascara el color.
- Tratar solución de la muestra con ácido perclórico SR; se forma precipitado blanco cristalino.

#### Plata, ion

- Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico; se forma precipitado caseoso blanco, insoluble en ácido nítrico SR, pero fácilmente soluble en hidróxido de amonio 6 M.
- Tratar la solución de la muestra con hidróxido de amonio 6 M y pequeña cantidad de solución de formaldehído; por calentamiento, se deposita espejo de plata metálica en la superficie del recipiente.

#### Salicilato

- Tratar la solución diluida de la muestra con cloruro férrico SR; se produce color violeta.
- Tratar solución moderadamente concentrada de la muestra con ácido mineral; se forma precipitado cristalino blanco de ácido salicílico, que funde entre 156 y 160 °C.

#### Sodio, ion

- Colocar solución de la muestra, acidulada, con ácido clorhídrico SR, en la zona reductora de la llama; esta adquiere color amarillo intenso.
- Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico o nítrico y, en seguida, con acetato de uranilo y zinc SR; se forma precipitado cristalino amarillo oro, después de agitación por algunos minutos.

#### Succinato

- Tratar solución neutra de la muestra con cloruro férrico SR; se forma precipitado marrón claro.
- Tratar solución neutra de la muestra con nitrato de plata SR; se forma precipitado blanco, fácilmente soluble en hidróxido de amonio 6 M.

#### Sulfato

- Tratar solución de la muestra con cloruro de bario SR; se forma precipitado blanco, insoluble en ácido clorhídrico SR y en ácido nítrico SR.
- Tratar solución de la muestra con acetato de plomo SR; se forma precipitado blanco, soluble en acetato de amonio SR, pero insoluble en ácido clorhídrico o nítrico SR.
- Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico SR; no se forma ningún precipitado (*distinción del tiosulfato*).

#### Sulfito

- Tratar la muestra con ácido clorhídrico 3 M; se desprende dióxido de azufre, reconocido por su olor penetrante característico y por oscurecer papel de filtro humedecido con nitrato de mercurio (I) SR.
- Acidificar solución de la muestra con ácido clorhídrico SR, calentar con algunas gotas de permanganato de potasio SR y juntar gotas de cloruro de bario SR; se forma precipitado blanco.

#### Tartrato

- Disolver algunos miligramos de la muestra en agua, acidificada con ácido acético SR, añadir una gota de solución de sulfato ferroso a 1% (p/v) y una gota de peróxido de hidrógeno a 3% (p/v); se produce color amarillo fugaz. Juntar hidróxido de sodio 2 M gota a gota; se produce color azul intenso.
- Acidificar solución de la muestra con ácido sulfúrico M, juntar algunas gotas de resorcinol 2% (p/v) y añadir, cuidadosamente, ácido sulfúrico, para que se formen dos camadas; calentando en baño maría, por algunos minutos, en la interfaz aparece un anillo rojo.

*Tiocianato*

Tratar solución de la muestra con cloruro férrico SR; se produce color rojo, que no desaparece por la adición de ácidos minerales moderadamente concentrados y puede ser extraído con éter etílico, pasando la coloración roja para la camada etérea.

*Tiosulfato*

1. Tratar solución de la muestra con ácido clorhídrico; se forma precipitado blanco, que pasa luego a amarillo, y se desprende dióxido de azufre, reconocido por el olor.
2. Tratar solución acética de la muestra con cloruro férrico SR; se produce color violeta oscuro que desaparece rápidamente.

*Xantina*

Tratar la muestra con dos gotas de solución concentrada de peróxido de hidrógeno concentrado y cinco gotas de ácido clorhídrico 2 M, y calentar hasta sequedad en baño maría; se obtiene residuo rojo amarillento que, tratado con hidróxido de amonio 2 M, cambia para rojo violeta.

*Zinc, ion*

1. Tratar solución de la muestra con ferrocianuro de potasio SR; se forma precipitado blanco, insoluble en ácido clorhídrico 3 M
2. Tratar solución neutra o alcalina de la muestra con sulfuro de amonio SR; se forma precipitado blanco.
3. Tratar solución de la muestra con solución de hidróxido de sodio 2 M, gota a gota; se forma precipitado blanco, soluble en exceso de hidróxido de sodio SR.

### 5.3.1.2 IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES POR CROMATOGRAFÍA EN CAMADA DELGADA

#### PROCEDIMIENTO

Preparar cromatoplaça utilizando *Kieselguhr G* como soporte. Introducir la cromatoplaça en la cuba conteniendo el solvente de impregnación y dejar desarrollar hasta que el solvente alcance el topo de la cromatoplaça. Retirar la cromatoplaça de la cuba y dejar evaporar el solvente. Preparar solución de la muestra a 0,25% (p/v) y solución del estándar a 0,25% (p/v) utilizando, como solvente, mezcla de 9 volúmenes de cloroformo y 1 volumen de metanol. A no ser que la monografía establezca diferentemente, aplicar sobre la cromatoplaça 2 µL de la solución de muestra, 2 µL de la solución estándar y 2 µL de la mezcla 1:1 de las soluciones de la muestra y del estándar. Desarrollar el cromatograma con el eluyente especificado en la monografía, dejándolo subir en el mismo sentido que el solvente de impregnación. Retirar la cromatoplaça de la cuba, dejar evaporar el eluyente, calentar la cromatoplaça a 120 °C por 15 minutos y nebulizar con solución de ácido sulfúrico a

10% (v/v) en etanol a 96%. Calentar a 120 °C por 10 minutos más, dejar enfriar y examinar a la luz normal y a la luz ultravioleta (366 nm). La mancha principal del cromatograma obtenido con la solución de la muestra corresponderá a la mancha principal obtenida en el cromatograma de la solución del estándar. La mancha principal resultante de la aplicación de la mezcla de las soluciones de muestra y de estándar aparecerá como única y compacta.

*Solventes de impregnación*

- Mezcla de 1 volumen de formamida y 9 volúmenes de acetona
- Mezcla de 1 volumen de 1,2-propanodiol y 9 volúmenes de acetona
- Mezcla de 1 volumen de parafina líquida y 9 volúmenes de éter de petróleo de banda de ebullición 40 -60 °C.

*Eluyentes A – Cloroformo*

B – Mezcla de 3 volúmenes de tolueno y 1 volumen de cloroformo

C – Tolueno

D – Mezcla de 4 volúmenes de ciclohexano y 1 volumen de tolueno

Y – Mezcla de volúmenes iguales de ciclohexano y éter de petróleo de banda de ebullición 40 – 60 °C F – Mezcla de 2 volúmenes de ácido acético glacial y 3 volúmenes de agua

G – Mezcla de 8 volúmenes de hexano y 2 volúmenes de dioxano.

### 5.3.1.3 INVESTIGACIONES DE ESTEROIDES EXTRAÑOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAMADA DELGADA

#### PROCEDIMIENTO I

Preparar cromatoplaças conforme descrito en *Cromatografía en camada delgada (5.2.17.1)*, utilizando gel de sílice G como soporte. Preparar 3 soluciones utilizando, como solvente, mezcla de 9 volúmenes de cloroformo y 1 volumen de metanol en las siguientes concentraciones: 1,5% (p/v) de la sustancia en examen – *Solución 1*; 1,5% (p/v) de la sustancia química de referencia (SQR) correspondiente – *Solución 2* y 0,03% (p/v) de cada una de las siguientes SQR: prednisolona y acetato de cortisona – *Solución 3*. Aplicar sobre la cromatoplaça 1 µL de cada una de estas soluciones, separadamente, y desarrollar el cromatograma utilizando, como eluyente, mezcla de 77 volúmenes de diclorometano, 15 volúmenes de éter, 8 volúmenes de metanol y 1,2 volúmenes de agua. Secar el cromatograma al aire, calentar a 105 °C por 10 minutos y nebulizar con solución de azul de tetrazolio alcalino SR. La mancha principal del cromatograma obtenida con la *Solución 1* corresponde, en posición, color e intensidad, a la mancha principal del cromatograma obtenido con la *Solución 2*. Cualquier mancha secundaria obtenida con la *Solución 1* no es más intensa que la mancha correspondiente en el cromatograma obtenida con la *Solución 3*.



## PROCEDIMIENTO II

Proceder a la cromatografía utilizando gel de sílice G como soporte y, como eluyente, mezcla de 95 volúmenes de 1,2-dicloroetano, 5 volúmenes de metanol y 0,2 volúmenes de agua.

Aplicar sobre la cromatoplaça, separadamente, 1 µL de cada una de las 3 soluciones en mezcla de 9 volúmenes de cloroformo y 1 volumen de metanol, como en el *Procedimiento I*, con excepción de la *Solución 3*, en que se adiciona acetato de desoxicortona SQR.

### 5.3.1.4 INVESTIGACIÓN DE SUSTANCIAS RELACIONADAS A SULFONAMIDAS POR CROMATOGRFÍA EN CAMADA DELGADA

## PROCEDIMIENTO I

Proceder a la cromatografía en camada delgada (5.2.17.1) utilizando gel de sílice H como soporte. Preparar solución de la sustancia en examen a 1,0% (p/v) utilizando, como solvente, mezcla de 9 volúmenes de etanol a 96% y 1 volumen de hidróxido de amonio 13,5 M – *Solución 1*. Preparar solución de sulfanilamida SQR a 0,005% (p/v), usando el mismo solvente – *Solución 2*. Aplicar separadamente sobre la cromatoplaça 10 µL de la *Solución 1* y de la *Solución 2*. Desarrollar el cromatograma usando mezcla de 15 volúmenes de 1-butanol y 3 volúmenes de hidróxido de amonio M como eluyente. Retirar la cromatoplaça de la cuba, calentar a 105 °C por 10 minutos y nebulizar con solución a 0,1% (p/v) de 4-dimetilaminobenzaldehído en etanol a 96%, conteniendo 1% de ácido clorhídrico (v/v): cualquier mancha secundaria obtenida en el cromatograma con la *Solución 1*, diferente de la mancha principal, no es más intensa que aquella obtenida en el cromatograma con la *Solución 2*.

## PROCEDIMIENTO II

Proceder a la cromatografía en camada delgada (5.2.17.1) utilizando gel de sílice H como soporte y mezcla de 20 volúmenes de cloroformo, 2 volúmenes de metanol y 1 volumen de dimetilformamida como fase móvil. Aplicar sobre la cromatoplaça, separadamente, 10 µL de cada una de las siguientes soluciones: 0,25% (p/v) de la sustancia en examen en mezcla de 9 volúmenes de etanol y 1 volumen de hidróxido de amonio 13,5 M – *Solución 1*; 0,00125% (p/v) de sulfanilamida SQR en el mismo solvente de la *Solución 1* – *Solución 2*. Desarrollar el cromatograma, dejar secar al aire y revelar conforme prescrito en el *Procedimiento I*: cualquier mancha secundaria obtenida con la *Solución 1*, diferente de la mancha principal, no es más intensa que aquella obtenida en el cromatograma con la *Solución 2*.

### 5.3.1.5 IDENTIFICACIÓN DE FENOTIAZINAS POR CROMATOGRFÍA EN CAMADA DELGADA

Proceder conforme descrito en *Cromatografía en camada delgada* (5.2.17.1). Usar *Kieselguhr G* como soporte. Im-

pregnar la cromatoplaça seca, colocándola en cuba conteniendo mezcla de 10 volúmenes de 2-fenoxietanol, 5 volúmenes de macrogol 300 y 85 volúmenes de acetona. Dejar el eluyente subir por lo menos 17 cm. Retirar la cromatoplaça de la cuba y utilizar inmediatamente.

Aplicar sobre la cromatoplaça, separadamente, 2 µL de cada una de las soluciones siguientes: 0,2% (p/v) de la sustancia en examen en cloroformo – *Solución 1* y 0,2% (p/v) de la sustancia química de referencia (SQR) correspondiente – *Solución 2*, operando en atmósfera de nitrógeno y luz reducida. Desarrollar el cromatograma usando, como eluyente, mezcla de 2 volúmenes de dietilamina y 100 volúmenes de éter de petróleo de banda de ebullición 40 – 60 °C saturada con 2-fenoxietanol. Retirar la cromatoplaça de la cuba, dejar secar al aire y examinar bajo luz ultravioleta con intensidad máxima en 366 nm: se observa fluorescencia, producida en pocos minutos. En seguida, nebulizar la cromatoplaça con solución de ácido sulfúrico a 10% (v/v) en etanol y observar la coloración producida: la mancha principal en el cromatograma, obtenida con la *Solución 1*, corresponde, en posición, color e intensidad de fluorescencia a aquella obtenida en el cromatograma con la *Solución 2* y tiene la misma estabilidad por el período de, por lo menos, 20 minutos después de la nebulización.

### 5.3.1.6 INVESTIGACIÓN DE IMPUREZAS RELACIONADAS A FENOTIAZINAS POR CROMATOGRFÍA EN CAMADA DELGADA

## PROCEDIMIENTO

Preparar cromatoplaças utilizando gel de sílice GF<sub>254</sub> como soporte, operando en atmósfera de nitrógeno y al abrigo de la luz. Preparar solución conteniendo 2,0% (p/v) de la sustancia en examen en mezcla de 95 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de dietilamina – *Solución 1*. Preparar solución a 0,01% (p/v) de la sustancia en examen, utilizando el mismo solvente – *Solución 2*. Aplicar sobre la cromatoplaça, separadamente, 10 µL de cada solución recién preparada. Usar fase móvil especificada en la monografía. Dejar el solvente subir 12 cm arriba del punto de aplicación. Retirar la cromatoplaça de la cuba, dejar secar al aire y examinar bajo luz ultravioleta (254 nm). Despreciar cualquier mancha sobre a línea base. Cualquier mancha secundaria obtenida en el cromatograma con la *Solución 1*, excepto la mancha principal, no es más intensa que la mancha obtenida con la *Solución 2*, excepto si la monografía lo establece diferentemente.

*Fases móviles*

- A Mezcla de 80 volúmenes de ciclohexano, 10 volúmenes de acetona y 10 volúmenes de dietilamina
- B Mezcla de 85 volúmenes de hexano, 10 volúmenes de acetona y 5 volúmenes de dietilamina
- C Mezcla de 15 volúmenes de 1-butanol y 3 volúmenes de hidróxido de amonio M

## 5.3.2 ENSAYOS LÍMITE PARA IMPUREZAS INORGÁNICAS

$$m = 354,6/l$$

siendo  $l$  el límite de cloruro en ppm en la materia prima.

### 5.3.2.1 ENSAYO LÍMITE PARA CLORUROS

*Preparación muestra:* transferir la cantidad de muestra especificada en la monografía, o indicada en la **Tabla 1**, o calculada, para un tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno), adicionando un volumen de 30 a 40 ml de agua destilada. Caso sea utilizada una solución de la muestra, transferir el volumen de la solución especificado en la monografía, o calculado, para el tubo de Nessler y completar el volumen para 30 a 40 ml con agua destilada. Neutralizar, si necesario, con ácido nítrico SR. Se debe emplear una cantidad de muestra que posibilite el uso de volumen mayor del que 0,2 ml de ácido clorhídrico estándar.

*Preparación estándar:* transferir el volumen de ácido clorhídrico estándar (HCl 0,01 M SV), indicado en la monografía, o en la **Tabla 1**, o calculado, para un tubo de Nessler y añadir un volumen de 30 a 40 ml de agua destilada.

*Procedimiento:* a los tubos de Nessler conteniendo la preparación estándar y la preparación muestra, añadir 1 ml de ácido nítrico SR. Si, después de la acidificación, la preparación no esté perfectamente límpida, filtrar a través de papel de filtro exento de cloruro, transferir el filtrado para el tubo de Nessler y añadir 1 ml de nitrato de plata SR. Completar el volumen para 50 ml con agua destilada y homogeneizar. Dejar en reposo, al abrigo de la luz, durante 5 minutos. La turbidez de la preparación muestra no debe ser superior a la de la estándar.

Fijándose el volumen de solución estándar en 1 ml puede calcularse  $m$  (masa en gramo de la muestra) por la fórmula:

**Figura 1** - Límites de impureza cloruro y cantidades correspondientes de la materia prima para realizarse el ensayo considerando la utilización constante de 1,0 ml de la solución estándar que contiene  $3,546 \times 10^{-4}$  g de cloruro.

Cantidad de muestra (g)	Límite de cloruro (ppm)	Cantidad de muestra (g)	Límite de cloruro (ppm)
0,10	3546 (= 0,355%)	3,8	93
0,15	2364 (= 0,236%)	4,0	88
0,20	1773 (= 0,180%)	4,2	84
0,25	1418 (= 0,142%)	4,4	80
0,30	1182 (= 0,120%)	4,6	77
0,35	1013 (= 0,100%)	4,8	74
0,40	886	5,0	71
0,45	788	5,2	68
0,50	709	5,4	65
0,55	645	5,6	63
0,60	591	5,8	61
0,65	545	6,0	59
0,70	506	6,2	57
0,75	473	6,4	55
0,80	443	6,6	53
0,85	417	6,8	52
0,90	394	7,0	50
0,95	373	7,2	49
1,00	354	7,4	48
1,2	295	7,6	46
1,4	253	7,8	45
1,6	221	8,0	44
1,8	197	8,2	43
2,0	177	8,4	42
2,2	161	8,6	41
2,4	148	8,8	40
2,6	136	9,0	39
2,8	126	9,2	38
3,0	118	9,4	37
3,2	111	9,6	37
3,4	104	9,8	36
3,6	98	10,0	35

Siendo fija la cantidad de cloruro ( $= 3,546 \times 10^{-4}$  g) en la preparación estándar, si el límite de cloruro en determinada sustancia fuese, por ejemplo, 354 ppm, se deberá utilizar 1 g de la sustancia para obtenerse hasta la misma turbidez del estándar; si el límite fuese de 71 ppm de cloruro, deberán ser utilizados 5 g de muestra y así sucesivamente.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía iónica (5.2.17.4.1)*, utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio aniónica y detector por conductividad con supresión química.

### 5.3.2.2. ENSAYO LÍMITE PARA SULFATOS

*Preparación muestra:* transferir la cantidad de la muestra especificada en la monografía, o indicada en la **Tabla 2**, o calculada, para un tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno), adicionando 30 a 40 ml de agua destilada. Caso sea utilizada una solución de la muestra, transferir el volumen de la solución especificado en la monografía, o calculado, para el tubo de Nessler y completar el volumen para 30 a 40 ml con agua destilada. Si necesario, neutralizar con ácido clorhídrico SR. Se puede, eventualmente, utilizar ácido acético. Si la preparación no

está perfectamente límpida, filtrar a través de papel de filtro exento de sulfato. Transferir lo filtrado para tubo de Nessler. Se debe emplear una cantidad de muestra que posibilite el uso de volumen mayor del que 0,2 ml de solución de ácido sulfúrico estándar. Fijándose el volumen de solución estándar en 2,5 ml puede calcularse  $m$  (masa en gramo de la muestra) por la fórmula:

$$m = 1200,8/l$$

siendo  $l$  el límite de sulfato en ppm en la materia prima.

*Preparación estándar:* transferir el volumen de ácido sulfúrico estándar ( $H_2SO_4$  0,005 M SV) indicado en la monografía, o indicado en la **Tabla 2**, o calculado, para un tubo de Nessler y añadir un volumen de 30 a 40 ml de agua destilada.

*Procedimiento:* a los tubos de Nessler conteniendo la preparación estándar y la preparación muestra, añadir 1 ml de ácido clorhídrico 3 M y 3 ml de cloruro de bario SR. Completar el volumen para 50 ml con agua destilada. Homogeneizar. Dejar en reposo por cerca de 10 minutos. La turbidez de la preparación muestra no debe ser superior a la de la estándar.

**Tabla 2 - Límites de impureza sulfato y cantidades correspondientes de la materia prima para realizar el ensayo considerando la utilización constante de 2,5 ml de la solución estándar que contiene  $1,2008 \times 10^{-3}$  g de sulfato.**

<i>Cantidad de muestra (g)</i>	<i>Límite de sulfato (ppm)</i>	<i>Cantidad de muestra (g)</i>	<i>Límite de sulfato (ppm)</i>
0,50	2401 (= 0,240%)	4,6	261
0,55	2183 (= 0,220%)	4,8	250
0,60	2001 (= 0,200%)	5,0	240
0,65	1847 (= 0,185%)	5,2	231
0,70	1715 (= 0,171%)	5,4	222
0,75	1601 (= 0,160%)	5,6	214
0,80	1501 (= 0,150%)	5,8	207
0,85	1412 (= 0,141%)	6,0	200
0,90	1334 (= 0,133%)	6,2	194
0,95	1264 (= 0,126%)	6,4	187
1,00	1200 (= 0,120%)	6,6	182
1,2	1001 (= 0,100%)	6,8	177
1,4	858	7,0	171
1,6	750	7,2	166
1,8	667	7,4	162
2,0	600	7,6	158
2,2	546	7,8	154
2,4	500	8,0	151
2,6	462	8,2	146
2,8	429	8,4	143
3,0	400	8,6	139
3,2	375	8,8	136
3,4	353	9,0	133
3,6	333	9,2	130
3,8	316	9,4	127
4,0	300	9,6	125
4,2	286	9,8	122
4,4	273	10,0	120

Siendo fija la cantidad de sulfato ( $= 1,2008 \times 10^{-3}$  g), si el límite de sulfato en determinada sustancia fuese, por ejemplo, 500 ppm, deberán ser utilizados 2,4 g de muestra para obtenerse hasta la misma turbidez del estándar; si el límite fuese de 151 ppm de sulfato, deberán ser utilizados 8 g de muestra y así sucesivamente.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía iónica (5.2.17.4.1)*, utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio aniónica y detector por conductividad con supresión química.

### 5.3.2.3 ENSAYO LÍMITE PARA METALES PESADOS

La determinación de metales pesados puede ser efectuada por

dos métodos: ensayo límite por formación de partículas sólidas de sulfuros o determinación por espectrometría atómica.

El ensayo límite consiste en la formación de partículas sólidas de los sulfuros de metales pesados, en suspensión, y posterior comparación visual de la intensidad del color en las preparaciones muestra y estándar en tubo de Nessler. El ensayo es semi cuantitativo y posibilita inferir si a muestra pasa o no en la prueba, representando la suma de la concentración de los elementos contaminantes en la muestra.

El método por espectrometría atómica posibilita cuantificar cada elemento contaminante en la muestra y límites diferenciados son establecidos para cada elemento de acuerdo con su toxicidad y el tipo de forma farmacéutica. Elementos como As, Cd, Pb y Hg, debido a la elevada toxicidad presentan límites más bajos que los demás. Debido a la mayor biodisponibilidad de elementos eventualmente presentes en sustancias utilizadas en la fabricación de productos parenterales, los límites requeridos son inferiores aquellos relacionados para utilización por vía oral.

#### MÉTODO DEL ENSAYO LÍMITE

##### *Reactivos especiales*

*Solución stock de nitrato de plomo:* disolver, exactamente, 159,8 mg de nitrato de plomo en 100 ml de agua adicionada de 1 ml de ácido nítrico. Diluir con agua para 1000 ml y homogeneizar. Preparar y almacenar esa solución en recipientes de vidrio exentos de sales solubles de plomo.

*Solución estándar de plomo (10 ppm Pb):* en el día del uso, diluir 10 ml de la solución stock de nitrato de plomo para 100 ml con agua. Cada mililitro de esa solución contiene el equivalente a 10  $\mu$ g de plomo (10 ppm Pb).

*Tampón acetato pH 3,5:* disolver 25,0 g de acetato de amonio en 25 ml de agua y añadir 38 ml de ácido clorhídrico 6 M. si necesario, ajustar el pH en 3,5 con hidróxido de amonio 6 M o ácido clorhídrico 6 M. Diluir para 100 ml con agua y homogeneizar.

*Preparo del reactivo de tioacetamida:* disolver 4 g de tioacetamida en agua y completar el volumen a 100 ml. Tomar 0,2 ml y añadir a 1 ml de la mezcla de hidróxido de sodio M, 5 ml de agua y 20 ml de glicerina. Calentar en baño maría por 20 s, enfriar y utilizar inmediatamente.

#### MÉTODO I

*Preparación muestra:* transferir para tubo adecuado solución de la muestra preparada conforme especificado en la monografía y diluir para 25 ml con agua, o disolver y diluir con agua para 25 ml a cantidad de muestra, en gramos, especificada en la monografía o calculada según a ecuación:

$$2 / (1000l)$$

en que

$l$  = límite de metales pesados en la muestra en porcentaje (p/p).

Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético M o hidróxido de amonio 6 M utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación estándar:* transferir para tubo adecuado 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb) y diluir para 25 ml con agua. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético M o hidróxido de amonio 6 M utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación control:* transferir para un tercer tubo volumen de solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía o en *preparación muestra* y añadir 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb). Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético M o hidróxido de amonio 6 M utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Procedimiento:* cada una de las preparaciones añadir 2 ml de tampón acetato pH 3,5 y 1,2 ml de tioacetamida. Diluir con agua para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 2 minutos. Después de 2 minutos, se desarrollará tonalidad que varía del amarillo al negro. Observar las preparaciones de arriba para abajo, según el eje vertical del tubo, sobre fondo blanco. Cualquier coloración desarrollada en la preparación muestra no es más intensa que en la estándar. La prueba solamente es válida si la intensidad de la coloración desarrollada en la preparación control fuese igual o superior a aquella de la estándar.

#### MÉTODO II

*Preparación muestra:* transferir para tubo adecuado solución de la muestra preparada conforme especificado en la monografía y diluir para 25 ml con solvente orgánico (dioxano o acetona, conteniendo, en el mínimo, 15% v/v de agua), o disolver y diluir con el mismo solvente para 25 ml la cantidad de muestra, en gramos, especificada en la monografía o calculada según a ecuación:

2 / (1000*l*)

en que

*l* = límite de metales pesados en la muestra en porcentaje (p/p).

Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación estándar:* transferir para tubo adecuado 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb) y diluir para 25 ml con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación control:* transferir para un tercer tubo volumen de solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía o en preparación muestra y añadir 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb). Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Procedimiento:* cada una de las preparaciones añadir 2 ml de tampón acetato pH 3,5 y 1,2 ml de tioacetamida. Diluir con agua para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 2 minutos. Después de 2 minutos, se desarrollará coloración que varía del amarillo al negro. Observar las preparaciones de arriba para abajo, según el eje vertical del tubo, sobre fondo blanco. Cualquier coloración desarrollada en la preparación muestra no es más intensa del que en la estándar. La prueba solamente es válida si la intensidad de la coloración desarrollada en la preparación control fuese igual o superior a aquella en la estándar.

### MÉTODO III

*Preparado de la muestra:* utilizar la cantidad de muestra, en gramos, especificada en la monografía o calculada según la ecuación:

2 / (1000*l*)

en que

*l* = límite de metales pesados en la muestra en porcentaje (p/p).

Transferir la muestra para crisol adecuado, añadir ácido sulfúrico suficiente para humedecer la sustancia e incinerar, cuidadosamente, bajo temperatura baja. Añadir a la masa carbonizada 2 ml de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico. Calentar, con cuidado, hasta que no se desprendan más vapores blancos. Incinerar en mufla a 500 – 600 °C hasta completa combustión del carbono.

Enfriar en temperatura ambiente, añadir 4 ml de ácido clorhídrico 6 *M*, cubrir, digerir en baño maría por 15 minutos, descubrir y evaporar en baño maría, lentamente, hasta sequedad. Humedecer el residuo con 1 gota de ácido clorhídrico, añadir 10 ml de agua caliente y digerir en baño maría por 2 minutos. Alcalinizar al papel tornasol con hidróxido de amonio 6 *M* adicionado gota a gota. Diluir con agua para 25 ml y ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M*, utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Filtrar si necesario, lavar el crisol y el filtro con 10 ml de agua y combinar el filtrado y las aguas de lavado en tubo adecuado para comparación de color. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación estándar:* transferir para tubo adecuado 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb) y diluir para 25 ml con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Preparación control:* transferir para un tercer tubo volumen de solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía o en preparación muestra y añadir 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb). Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con el mismo solvente empleado para la disolución de la muestra para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

*Procedimiento:* cada una de las preparaciones añadir 2 ml de tampón acetato pH 3,5 y 1,2 ml de tioacetamida. Diluir con agua para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 2 minutos. Después de 2 minutos, se desarrollará coloración que varía del amarillo al negro. Observar las preparaciones de arriba para abajo, según el eje vertical del tubo, sobre fondo blanco. Cualquier coloración desarrollada en la preparación muestra no es más intensa del que aquella en la estándar. La prueba solamente es válida si la intensidad de la coloración desarrollada en la preparación control fuese igual o superior a aquella en la estándar.

### MÉTODO IV

*Preparado de la muestra:* Pesar, exactamente, cantidad de muestra recomendada en la monografía o calculada según la ecuación:

2 / (1000*l*)

en que

*l* = límite de metales pesados en la muestra en porcentaje (p/p).

Transferir para tubo de digestión de vidrio borosilicato de 100 ml y añadir cerca de 10 ml de ácido nítrico. Proceder a la digestión en chapa de calentamiento o bloque digestor en temperatura de 120 °C, durante 3 horas. Se recomienda calentar el sistema lentamente, para evitar proyección de



la muestra. Caso haya evaporación del ácido, añadir otra alícuota de 5 ml. Caso una preparación límpida no sea obtenida, añadir, después de enfriamiento, 2 ml de peróxido de hidrógeno a 30% (p/p) y calentar a 140 °C por una hora más. Enfriar y diluir, cuidadosamente, con pequeño volumen de agua. Transferir, con lavado, para tubo de Nessler de 50 ml, sin asar los 25 ml.

**Preparación estándar:** transferir para tubo adecuado 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb) y diluir para 25 ml con agua. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

**Preparación control:** transferir para un tercer tubo volumen de solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía o en preparación muestra y añadir 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb). Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

**Procedimiento:** cada una de las preparaciones añadir 2 ml de tampón acetato pH 3,5 y 1,2 ml de tioacetamida. Diluir con agua para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 2 minutos. Después de 2 minutos, se desarrollará coloración que varía del amarillo al negro. Observar las preparaciones de arriba para abajo, según el eje vertical del tubo, sobre fondo blanco. Cualquier coloración desarrollada en la preparación muestra no es más intensa del que en la estándar. La prueba solamente es válida si la intensidad de la coloración desarrollada en la preparación control fuese igual o superior a aquella en la estándar.

## MÉTODO V

Preparado de la muestra: *en los casos en que los métodos anteriores de preparado de muestra no fuesen eficientes, proceder conforme descrito en Descomposición por vía húmeda en sistema cerrado o Método de combustión iniciada por micro ondas en sistema presurizado descritos en Método de espectrometría atómica.*

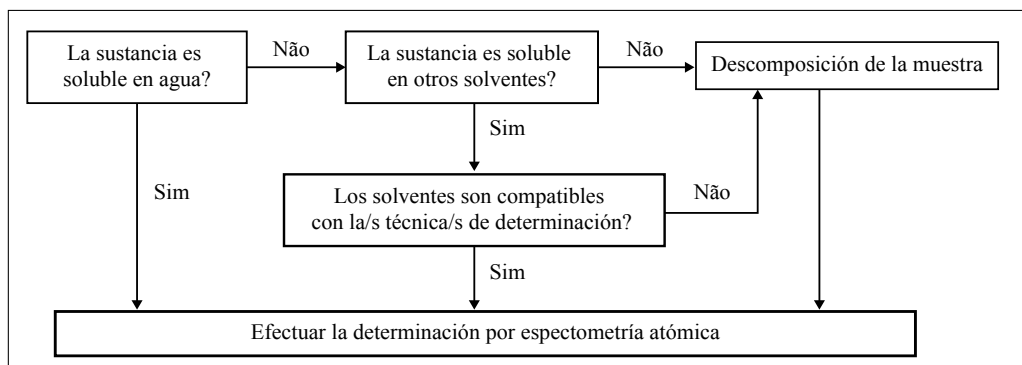
**Preparación estándar:** transferir para tubo adecuado 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb) y diluir para 25 ml con agua. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

**Preparación control:** transferir para un tercer tubo volumen de solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía o en preparación muestra y añadir 2 ml de solución estándar de plomo (10 ppm Pb). Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M* utilizando papel indicador de banda estrecha como indicador externo. Diluir con agua para aproximadamente 40 ml y homogeneizar.

**Procedimiento:** cada una de las preparaciones añadir 2 ml de tampón acetato pH 3,5 y 1,2 ml de tioacetamida. Diluir con agua para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 2 minutos. Después de 2 minutos, se desarrollará coloración que varía del amarillo al negro. Observar las preparaciones de arriba para abajo, según el eje vertical del tubo, sobre fondo blanco. Cualquier coloración desarrollada en la preparación muestra no es más intensa del que aquella en la estándar. La prueba solamente es válida si la intensidad de la coloración desarrollada en la preparación control es igual o superior a aquella en la estándar.

## MÉTODO DE ESPECTROMETRÍA ATÓMICA

Utilizar técnicas de espectrometría atómica para determinación de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru y V, conforme *Espectrometría atómica (5.2.13)*. No obstante, diferentes procedimientos de preparado de la muestra pueden ser aplicados, como demostrado en la **Figura 1**.



**Figura 1** - Procedimientos de preparado de muestra para el método de espectrometría atómica.

En el caso de sustancias solubles en agua, no hay necesidad de la descomposición previa de la muestra y esa puede ser analizada directamente después de disolución. Caso no sea soluble en agua y presentar solubilidad en otro solvente, la sustancia puede ser analizada directamente después de disolución si no hubiere incompatibilidad entre el solvente y la técnica de espectrometría atómica utilizada. Cuando ninguna de las condiciones anteriores sea atendida, se recomienda la descomposición previa de la muestra. En esos casos, dos procedimientos son recomendados:

#### *Descomposición por vía húmeda en sistema cerrado*

Pesar, exactamente, cantidad de muestra entre 0,1 y 0,5 g de muestra y añadir ácido nítrico conforme recomendación del fabricante y proceder a digestión en sistema cerrado con calentamiento convencional o con micro ondas en temperatura de 180 °C o superior. En los sistemas que emplean calentamiento convencional y micro ondas, cuando no hubiere especificación en la monografía, se recomienda la digestión por 240 min y 20 min, respectivamente.

#### *Método de combustión iniciada por micro ondas en sistema presurizado*

Proceder conforme descrito en el ítem *Métodos de combustión (5.3.3.3)*.

En principio, los dos procedimientos de descomposición descritos pueden ser utilizados indistintamente. No obstante, se recomienda la utilización de la descomposición por vía húmeda debido a mayor simplicidad y capacidad de procesamiento de muestras. Otros reactivos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, peróxido de hidrógeno y ácido fluorhídrico (no puede ser utilizado en frascos de cuarzo), también, pueden ser utilizados en la etapa de digestión, dependiendo de la necesidad.

La descomposición por combustión iniciada por micro ondas es recomendada en los casos en que la digestión por vía húmeda no sea eficiente para muestras orgánicas.

Los límites máximos permitidos para cada elemento están descritos en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Límites permitidos de impurezas de metales y no metales.**

<i>Elemento</i>	<i>Uso oral Límite máximo (µg g-1)</i>	<i>Uso parenteral Límite máximo (µg g-1)</i>
Arsénico (As)	1,5	0,15
Cadmio (Cd)	0,5	0,05
Plomo (Pb)	1,0	0,1
Mercurio (Hg)	1,5	0,15
Cromo (Cr)	25	2,5
Cobre (Cu)	250	25
Manganeso (Mn)	250	25
Molibdeno (Mo)	25	2,5
Níquel (Ni)	25	2,5
Paladio (Pd)	10	1,0
Platino (Pt)	10	1,0
Vanadio (V)	25	2,5
Iridio (Ir)	La suma de la concentración no puede exceder 10	La suma de la concentración no puede exceder 10
Osmio (Os)		
Rodio (Rh)		
Rutenio (Ru)		

#### **5.3.2.4 ENSAYO LÍMITE PARA HIERRO**

*Solución estándar de hierro (100 ppm Fe):* disolver 0,8634 g de sulfato férrico amoniacal decahidratado en agua destilada en un balón volumétrico de 1000 ml. Añadir 5 ml de ácido sulfúrico SR y completar el volumen con agua destilada.

*Solución estándar de hierro (10 ppm Fe):* diluir 10 ml de la Solución estándar de hierro (100 ppm Fe) con agua destilada y completar el volumen para 100 ml.

*Solución estándar de hierro (2 ppm Fe):* diluir 2 ml de la Solución estándar de hierro (100 ppm Fe) con agua destilada y completar el volumen para 100 ml.

#### **MÉTODO I**

*Preparación muestra:* disolver cantidad de la muestra especificada en la monografía, o en la **Tabla 1**, o calculada, en solvente adecuado, transferir para tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno). Añadir agua destilada, o el solvente indicado en la monografía, en cantidad suficiente para 40 ml. Añadir 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/v).

Fijándose el volumen de la *Solución estándar de hierro (100 ppm Fe)* en 1 ml, se puede calcular el valor de *m* (masa en gramo de la muestra) por la fórmula:

$$m = \frac{100}{l}$$

siendo *l* el límite de hierro en ppm en la materia prima.

**Preparación padrão:** empregar 10 mL de *Solução padrão de ferro (10 ppm de Fe)* ou 1 mL da *Solução padrão de ferro (100 ppm Fe)*, conforme **Tabela 1**, ou volume calculado, adicionar água destilada, ou o solvente indicado na monografía, em quantidade suficiente para 40 mL. Adicionar 2 mL de ácido cítrico a 20% (p/v).

**Procedimento:** concomitantemente, acrescentar aos tubos contendo as preparações amostra e padrão duas gotas de ácido tioglicólico. Homogeneizar, alcalinizar com hidróxido de amônio, completar o volume para 50 mL com água destilada e homogeneizar. Deixar em repouso por 5 minutos. A cor rósea produzida na preparação amostra não deve ser mais intensa do que na padrão.

## MÉTODO II

**Preparación amostra:** dissolver quantidade da amostra especificada na monografía, ou calculada, em solvente adequado, ou utilizar volumen de la solución de la muestra conforme especificado en la monografía. Añadir 2 ml de ácido clorhídrico 2 M y 0,5 ml de agua de bromo SR. Después de 5 minutos, retirar el exceso de bromo por corriente de aire en campana (CUIDADO! REACTIVO TÓXICO) y transferir para tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno).

**Preparación estándar:** someter el volumen de la *Solución estándar de hierro (2 ppm o 10 ppm de Fe)* indicado en la

monografía, o el volumen calculado, conforme descrito en la preparación muestra.

**Procedimiento:** concomitantemente, añadir a los tubos conteniendo las preparaciones muestra y estándar, 3 ml de tiocianato de potasio M, completar el volumen para 50 ml, homogeneizar y dejar en reposo por 5 minutos. La coloración producida en la preparación muestra no debe ser más intensa que en la estándar.

## MÉTODO III

**Preparación muestra:** transferir para un tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno) la cantidad de muestra especificada en la monografía, o calculada, o el volumen de la solución de la muestra indicado en la monografía. Diluir para 40 ml con agua destilada. Añadir 2 ml de ácido clorhídrico M y homogeneizar.

**Preparación estándar:** transferir el volumen de la *Solución estándar de hierro (10 ppm Fe)* indicado en la monografía, o volumen calculado, para un tubo de Nessler y proceder conforme descrito en la preparación muestra.

**Procedimiento:** añadir a los tubos conteniendo las preparaciones muestra y estándar 50 mg de cristales de peroxi-disulfato de amonio. Añadir 3 ml de tiocianato de amonio SR, completar el volumen para 50 ml con agua destilada y homogeneizar. La coloración producida en la preparación muestra no debe ser más intensa que en la estándar.

**Tabla 1 - Límites de impureza hierro y cantidad correspondientes de la materia prima para realizar el ensayo considerando a utilización constante de 1,0 ml de la solución estándar de hierro de 100 ppm, que contiene 10-4 g de hierro, en la preparación estándar.**

<i>Cantidad de muestra (g)</i>	<i>Límite de hierro (ppm)</i>	<i>Cantidad de muestra (g)</i>	<i>Límite de hierro (ppm)</i>
0,100	1000	0,4	250
0,105	950	0,5	200
0,111	900	0,667	150
0,116	850	1	100
0,125	800	1,111	90
0,133	750	1,250	80
0,143	700	1,429	70
0,154	650	1,667	60
0,167	600	2	50
0,182	550	2,5	40
0,200	500	3,333	30
0,222	450	5	20
0,250	400	10	10
0,285	350	20	5
0,333	300		

Siendo fija la cantidad de hierro (= 10-4 g de Fe) en la *Preparación estándar*, si el límite de hierro en determinada sustancia fuese, por ejemplo, 1000 ppm, deberá ser utilizado 0,1 g de muestra para obtener hasta la misma coloración de la preparación estándar; si el límite fuese 200 ppm de hierro, deberá ser utilizado 0,5 g de muestra, y así sucesivamente.

## MÉTODO IV

Alternativamente, para determinación de hierro, proceder al preparado de la solución muestra conforme descrito en *Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3)* y efectuar la determinación por una de las técnicas de *Espectrometría atómica (5.2.13)*.

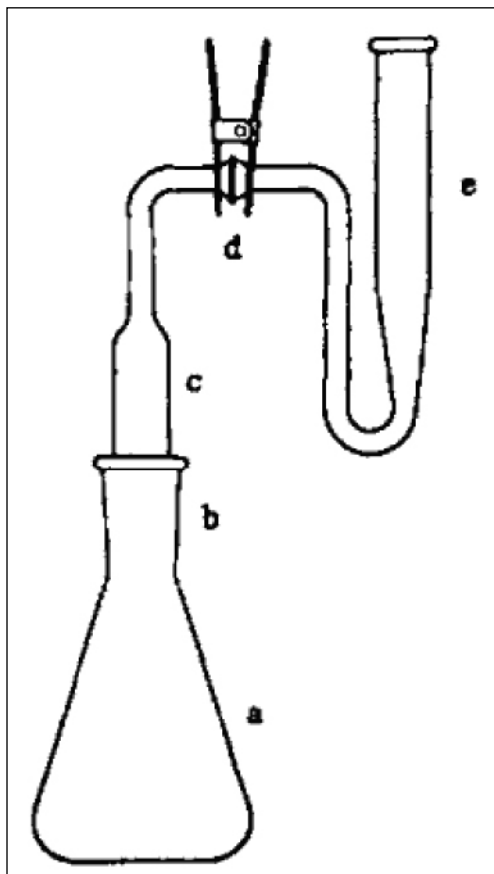
### 5.3.2.5 ENSAYO LÍMITE PARA ARSÉNICO

#### MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

El método está basado en la reacción entre el arsano ( $\text{AsH}_3$ ) liberado y dietilditiocarbamato de plata que forman complejo rojo; la absorción de la radiación puede ser medida en espectrofotómetro o colorímetro.

Dos métodos pueden ser empleados diferendo, apenas, en el preparado de la muestra y del estándar. El *Método I* es, en general, utilizado para sustancias inorgánicas, mientras el *Método II* es empleado para sustancias orgánicas.

El sistema utilizado – **Figura 1** – comprende: (a) generador de arsano; (b) y (d) juntas; (c) unidad esmerilada; (e) tubo de absorción. Otro sistema adaptado que tenga las características esenciales del presentado puede, eventualmente, ser utilizado



**Figura 1** - Sistema para determinación de arsénico por el método espectrofotométrico.

*Solución stock estándar de arsénico:* secar trióxido de arsénico por 1 hora a  $105^\circ\text{C}$ . Pesar, exactamente, 132 mg y disolver en 5 ml de solución de hidróxido de sodio (1:5) en balón volumétrico de 1000 ml. Neutralizar con ácido sulfúrico *M* y, en seguida, añadir más 10 ml de ácido sulfúrico *M*. Completar el volumen con agua recién hervida y enfriada.

*Solución estándar de arsénico:* transferir 1 ml (o 0,5; o 0,25; o 0,1 ml) de la solución stock estándar de arsénico para un balón volumétrico de 100 ml (o de 50, o de 25, o de

10 ml, de acuerdo con la necesidad del laboratorio) – Preservar el medio ambiente. Añadir 1 ml de ácido sulfúrico *M* y completar el volumen con agua recién hervida y, posteriormente, enfriada. Homogeneizar. Conservar la solución en recipiente de vidrio y utilizar en hasta 3 días. Cada ml de la solución obtenida contiene 1  $\mu\text{g}$  de arsénico.

#### *Método I*

*Preparación muestra:* transferir para frasco generador de arsano la cantidad de sustancia indicada en la monografía, o la cantidad calculada.

Fijándose el volumen de la solución estándar de arsénico en 3 ml se puede calcular *m* (masa en gramo de la muestra) por la fórmula:

$$m = 3/l$$

siendo *l* el límite de arsénico en ppm en la materia prima.

Disolver con agua destilada completando el volumen para 35 ml. Añadir 20 ml de ácido sulfúrico *M*, 2 ml de yoduro de potasio SR, 0,5 ml de cloruro de estaño SR fuertemente ácido y 1 ml de alcohol isopropílico. Homogeneizar. Dejar en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente. En la unidad (c) del aparato descrito, colocar dos porciones de algodón embebidas en solución saturada de acetato de plomo, dejando entre ellas espacio de 2 mm. El exceso de la solución debe ser eliminado exprimiendo las porciones de algodón y secándolas a presión reducida a temperatura ambiente. Las juntas (b) y (d) deben ser lubricadas con vaselina y unidas como en la **Figura 1**.

*Preparación estándar:* transferir para el frasco generador de arsano 3 ml de la *Solución estándar de arsénico*. Diluir con agua destilada para 35 ml. Proceder de la misma forma descrita para la preparación muestra.

*Procedimiento:* transferir 3 ml de dietilditiocarbamato de plata SR para la unidad de absorción (e) de los frascos generadores conteniendo las preparaciones muestra y estándar. Añadir 3 g de zinc granulado (malla de 1 mm) a la mezcla en cada frasco generador de arsano. Inmediatamente unir las unidades (c) y (e) al frasco generador. Dejar en baño de agua a  $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$  por 45 minutos. En intervalos de 10 minutos agitar, vagorosamente. Después de ese período, transferir el contenido de la unidad de absorción para celda de 1 cm. Comparar el color rojo producido en las preparaciones muestra y estándar. La coloración producida en la preparación muestra no debe ser más intensa del que en la estándar. En el caso que sea necesario, determinar la absorción en espectrofotómetro o colorímetro en largo de onda entre 535 y 540 nm empleando dietilditiocarbamato de plata SR como blanco para el ajuste del cero.

#### *Método II*

Ese método emplea, adicionalmente, peróxido de hidrógeno en la digestión de la muestra. Con ciertas sustancias puede provocar reacción violenta. Así, es importante proceder, cuidadosamente, en todas las etapas. Debe tomarse

cuidado, también, en la presencia de compuestos halogenados, especialmente, cuando se caliente la muestra con ácido sulfúrico y, posteriormente, añadir peróxido de hidrógeno a 26% (v/v). El calentamiento debe ser más suave impidiendo que alcance la temperatura de ebullición de la mezcla y carbonización para evitar la pérdida de arsénico.

*Preparación muestra:* transferir para el frasco generador cantidad de la muestra especificada en la monografía, o calculada.

Fijándose el volumen de la solución estándar de arsénico en 3 ml se puede calcular  $m$  (masa en gramo de la muestra) por la fórmula:

$$m = 3/l$$

siendo  $l$  el límite de arsénico en ppm en la materia prima.

Añadir 5 ml de ácido sulfúrico y perlas de vidrio. Si necesario, emplear mayor cantidad del ácido para humedecer completamente la sustancia cuidando para que el volumen no rebase 10 ml. Proceder a digestión en campana de preferencia usando placa de calentamiento con temperatura no superior a 120 °C por tiempo necesario al inicio de la digestión. Una vez iniciada la descomposición de la muestra, añadir gota a gota, cuidadosamente, peróxido de hidrógeno concentrado. Esperar que la reacción se ablande y, entonces, calentar entre adición de cada gota. Caso haya exceso de espuma, interrumpir el calentamiento. Así que disminuya la intensidad de la reacción, calentar, cautelosamente, con agitación del frasco para promover calentamiento homogéneo. Es necesario que se mantengan las condiciones oxidantes durante toda la digestión. Para ello, añadir pequeñas cantidades de peróxido de hidrógeno concentrado siempre que la mezcla se torne marrón o se oscurezca. Destruída la materia orgánica, aumentar paulatinamente la temperatura de calentamiento permitiendo que los vapores de trióxido de azufre sean desprendidos y la solución se torne incolora o levemente beige. Enfriar, añadir, cuidadosamente, 10 ml de agua destilada, evaporar hasta el trióxido de azufre sea nuevamente desprendido y enfriar. Caso necesario, repetir la operación, removiendo trazos de peróxido de hidrógeno. Enfriar y añadir 10 ml de agua destilada. Lavar el frasco y diluir con agua destilada completando el volumen para 35 ml. Proceder como en la preparación muestra del *Método I* iniciando por “Añadir 20 ml de ácido sulfúrico M...”.

*Preparación estándar:* transferir para frasco generador de arsano 3 ml de la *Solución estándar de arsénico* y añadir 2 ml de ácido sulfúrico. Homogeneizar. Añadir el mismo volumen de peróxido de hidrógeno concentrado empleado para la preparación muestra. Proceder, en seguida, al calentamiento de la solución obtenida hasta que se formen vapores. Enfriar y añadir, cuidadosamente, 10 ml de agua destilada. Repetir el procedimiento de calentamiento con más 10 ml y, después de, enfriar nuevamente y diluir con agua destilada para completar 35 ml. Proceder como para la preparación muestra.

*Procedimiento:* proceder conforme descrito en el *Método I*.

**Nota:** antimonio es interferente de la reacción, una vez que forma estibina ( $SbH_3$ ) dando resultado falsamente positivo en el desarrollo de color con dietilditiocarbamato de plata SR. En esos casos, se debe comparar las preparaciones en largo de onda de 535 y 540 nm, en el cual la interferencia de la estibina es insignificante.

#### MÉTODO DE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON GENERACIÓN DE HIDRUIOS

Proceder a preparación muestra conforme descrito en el ítem *Descomposición por vía húmeda en sistema cerrado – Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3)* y determinar por *Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruos (5.2.13.1.2)*. Proceder de acuerdo con las especificaciones del fabricante empleando largo de onda de 193,7 nm y resolución del monocromador de  $(0,5 \pm 0,1)$  nm.

#### MÉTODO DE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA INDUCTIVAMENTE ACOPLADO

Proceder a preparación de la muestra conforme descrito en el ítem *Descomposición por vía húmeda en sistema cerrado – Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3)* y determinar por *Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (5.2.13.2.2)*. Proceder de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se recomienda la utilización del largo de onda de 188,979 a 189,042 nm.

#### 5.3.2.6 ENSAYO LÍMITE PARA AMONÍACO

*Solución estándar de amoníaco (2,5 ppm  $NH_3$ ):* transferir 1 ml de la solución de cloruro de amonio 0,00741% (p/v) para un balón volumétrico de 10 ml. Completar el volumen con agua destilada.

*Solución estándar de amoníaco (1 ppm  $NH_3$ ):* diluir 40 ml de la solución estándar de amoníaco (2,5 ppm de  $NH_3$ ) para 100 ml con agua destilada.

*Preparación muestra:* disolver la cantidad indicada de la sustancia en análisis en 12 ml de agua destilada, alcalinizar, si necesario, con hidróxido de sodio 2 M. Transferir para balón volumétrico de 15 ml, añadir 0,3 ml de *solución alcalina de tetrayodomercurato (II) de potasio* y completar el volumen con agua destilada. Homogeneizar y dejar en reposo por 5 minutos. Transferir para un tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y diámetro interno de 22 mm).

*Preparación estándar:* transferir 10 ml de solución estándar de amoníaco (1 ppm de  $NH_3$ ), o el volumen calculado, para balón volumétrico de 15 ml, añadir 4,0 ml de agua destilada, 0,3 ml de solución alcalina de tetrayodomercurato (II) de potasio y completar el volumen. Homogeneizar y dejar en reposo por 5 minutos. Transferir para un tubo de Nessler.



*Procedimiento:* comparar el color desarrollado en las preparaciones. El color amarillo producido en la preparación muestra no debe ser más intenso que en la estándar.

### 5.3.2.7 ENSAYO LÍMITE PARA CALCIO

*Solución estándar alcohólica de calcio (100ppm Ca):* pesar, exactamente, 2,5 g de carbonato de calcio y transferir para balón volumétrico de 1000 ml con 12 ml de ácido acético. Disolver y completar el volumen con agua destilada. Transferir, inmediatamente antes del uso, 10 ml de esa solución para balón volumétrico de 100 ml y completar el volumen con etanol.

*Solución estándar de calcio (10 ppm Ca):* pesar, exactamente, 0,624 g de carbonato de calcio y transferir para balón volumétrico de 250 ml con 3 ml de ácido acético. Disolver y completar el volumen con agua destilada. Transferir, inmediatamente antes del uso, 10 ml de esa solución para balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua.

*Preparación muestra:* añadir 1 ml de oxalato de amonio SR a un tubo de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 mm de diámetro interno) conteniendo 0,2 ml de la solución estándar alcohólica de calcio (100 ppm Ca). Aguardar 1 minuto, añadir mezcla de 1 ml de ácido acético diluido y 15 ml de la solución de la muestra preparada como descrita en la monografía.

*Preparación estándar:* transferir para un tubo de Nessler las mismas cantidades de oxalato de amonio SR y de la solución estándar alcohólica de calcio (100 ppm Ca) conforme preparación muestra. Aguardar 1 minuto, añadir mezcla de 10 ml de la solución estándar de calcio (10 ppm Ca), 1 ml de ácido acético diluido y 5 ml de agua destilada.

*Procedimiento:* Homogeneizar las preparaciones en los tubos de Nessler. Después de 15 minutos, la turbidez de la preparación muestra no debe ser más intensa que la de la estándar.

Alternativamente, proceder al preparado de la muestra conforme indicado en la monografía y efectuar la determinación de calcio por *Espectrometría de absorción atómica con llama (5.2.13.1.1)* empleando llama del tipo aire acetileno, largo de onda de 422,7 nm y resolución del monocromador de  $(0,7 \pm 0,1)$  nm; o *Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (5.2.13.2.2)* empleando el largo de onda de 393,366 nm.

### 5.3.2.8 ENSAYO LÍMITE PARA MAGNESIO

*Preparación muestra:* añadir 0,1 g de tetraborato sódico a 10 ml de la solución de la muestra preparada conforme lo especificado en la monografía. Ajustar el pH entre 8,8-9,2 con ácido clorhídrico SR o hidróxido de sodio SR.

*Preparación estándar:* añadir 0,1 g de tetraborato sódico a una mezcla de 1 ml de la solución estándar de magnesio

(10 ppm Mg) y 9 ml de agua destilada. Proceder conforme preparación muestra.

*Procedimiento:* transferir la preparación muestra para un embudo de separación y extraer 2 veces, agitando por 1 minuto cada vez, con 5 ml de una solución de hidroxiquinolina a 0,1% (p/v) en cloroformo. Descartar las fases orgánicas y añadir a la fase acuosa 0,4 ml de butilamina y 0,1 ml de trietanolamina. Ajustar el pH entre 10,5-11,5 si necesario. Añadir 4 ml de la solución de hidroxiquinolina a 0,1% (p/v) en cloroformo y agitar por 1 minuto. Utilizar la fase inferior para a comparación. Proceder de la misma manera con la preparación estándar. La coloración producida en la preparación muestra no debe ser más intensa que en la estándar.

Alternativamente, proceder a la determinación de magnesio por *Espectrometría de absorción atómica con llama (5.2.13.1.1)* empleando llama del tipo aire acetileno, largo de onda de 285,2 nm y resolución del monocromador de  $(1,2 \pm 0,1)$  nm; o *Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (5.2.13.2.2)* empleando largo de onda de 285,213 nm.

### 5.3.2.9 ENSAYO LÍMITE PARA MAGNESIO Y METALES ALCALINOS TERROSOS

A 200 ml de agua destilada añadir 0,1 g de clorhidrato de hidroxilamina, 10 ml de tampón cloruro de amonio pH 10, 1 ml de solución de sulfato de zinc 0,1 M y cerca de 15 mg de negro de eriocromo T. Calentar a, aproximadamente, 40 °C. Titular con EDTA disódico 0,01 M SV hasta que la coloración violeta cambie para azul. Añadir a esa solución cantidad recomendada de la muestra disuelta en 100 ml de agua destilada o preparada de modo descrito en la monografía. Si la coloración de la solución cambia para violeta, titular con EDTA disódico 0,01 M SV hasta el cambio para azul. El volumen de la solución de EDTA disódico 0,01 M SV utilizado en la segunda titulación no debe exceder el volumen establecido en la monografía.

### 5.3.2.10 ENSAYO LÍMITE PARA ALUMINIO

*Solución estándar de aluminio (200 ppm Al):* tratar una porción de aluminio metálico con ácido clorhídrico 6 M a 80 °C por pocos minutos. Pesar 100 mg de la porción tratada y disolver en mezcla de 10 ml de ácido clorhídrico y 2 ml de ácido nítrico, a 80 °C por, aproximadamente, 30 minutos. Mantener bajo calentamiento hasta reducción del volumen para cerca de 4 ml. Enfriar hasta temperatura ambiente y añadir 4 ml de agua destilada. Dejar evaporar hasta obtener el volumen de 2 ml. Enfriar y transferir la solución, cuantitativamente, usando agua destilada, para balón volumétrico de 100 ml. Completar el volumen con agua destilada y homogeneizar. Pipetear 20 ml de esa solución y transferir para otro balón volumétrico de 100 ml. Completar el volumen con agua destilada y homogeneizar.

*Solución estándar de aluminio (10 ppm Al):* transferir, inmediatamente antes del uso, 5 ml de la *Solución estándar de aluminio (200ppm Al)* para balón volumétrico de 100

ml; completar el volumen con agua destilada y homogeneizar.

*Solución estándar de aluminio (2 ppm Al):* transferir, inmediatamente antes del uso, 1 ml de la *Solución estándar de aluminio (200 ppm Al)* para balón volumétrico de 100 ml; completar el volumen con agua destilada y homogeneizar.

*Solución diluyente de ácido nítrico:* transferir 40 ml de ácido nítrico para balón volumétrico de 1000 ml; completar el volumen con agua destilada y homogeneizar.

#### MÉTODO I

*Preparación muestra:* utilizar la cantidad especificada de la muestra, o calculada, preparada conforme especificado en la monografía.

*Preparación estándar:* utilizar el volumen especificado, o calculado, de la *Solución estándar de aluminio (10 ppm o 2 ppm)*.

*Procedimiento:* transferir para embudo de separación las preparaciones muestra y estándar y extraer con 3 porciones (20, 20 y 10 ml) de la solución de hidroxiquinolina a 0,5% (p/v) en cloroformo. Juntar los extractos clorofórmicos y diluir para 50 ml con cloroformo. Realizar una *preparación en blanco* utilizando el mismo solvente. Medir la intensidad de la fluorescencia (5.2.15) de la *preparación muestra* ( $I_1$ ), de la *preparación estándar* ( $I_2$ ) y de la *preparación en blanco* ( $I_3$ ) utilizando largo de onda de excitación de 392 nm y monocromador ajustado en 518 nm. La fluorescencia de la *preparación muestra* ( $I_1$ ), descontada de la *preparación en blanco* ( $I_3$ ) no debe ser mayor que la de la *preparación estándar* ( $I_2$ ), descontada de la *preparación en blanco* ( $I_3$ ).

#### MÉTODO II

*Preparación muestra:* transferir cantidad de la muestra especificada en la monografía, o calculada, para balón volumétrico de plástico de 100 ml, añadir 50 ml de agua destilada y someter al ultrasonido durante 30 minutos. Añadir 4 ml de ácido nítrico; completar el volumen con agua destilada y homogeneizar.

*Preparaciones estándar:* preparar soluciones conteniendo 0,01, 0,02 y 0,04 ppm de aluminio, inmediatamente antes del uso, por medio de la dilución de la *Solución estándar de aluminio (1 ppm Al)* con *Solución diluyente de ácido nítrico* en balón volumétrico de 100 ml.

*Procedimiento:* determinar las absorbancias de las preparaciones estándar y de la preparación muestra por *Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito* (5.2.13.1.4) equipado con lámpara de cátodo hueco de aluminio. Ajustar el largo de onda en 309,3 nm empleando una resolución del monocromador de  $(0,7 \pm 0,1)$  nm. Utilizar la *Solución diluyente de ácido nítrico* como blanco y proceder a calibración conforme descrito en (5.2.13.1.4) *Método 1 (Calibración directa)*. Determinar la concentración de Al en la preparación muestra en ppm. Calcular la cantidad de Al en la muestra en ppm, por medio de la mul-

tiplicación de la concentración de la preparación muestra en ppm por 100/P en la cual P es la masa en gramos de la sustancia utilizada en la preparación muestra.

#### MÉTODO III

Proceder conforme descrito en el *Método II* y efectuar la determinación por *Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado* (5.2.13.2.2). Proceder de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se recomienda la utilización del largo de onda de 396,153 nm.

#### 5.3.2.11 ENSAYO LÍMITE PARA FOSFATOS

*Solución estándar de fosfato (5 ppm):* disolver 0,716 g de fosfato de potasio monobásico en agua destilada y completar el volumen para 1000 ml. Transferir 10 ml de esa solución para un balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua destilada.

*Preparación muestra:* transferir la cantidad de la muestra especificada, o calculada, o el volumen de la solución de la muestra preparada conforme descrito en la monografía para balón volumétrico de 100 ml y completar el volumen con solvente adecuado. Transferir esa solución para vaso de precipitados y añadir 4 ml de reactivo sulfomolibdico, 0,1 ml de cloruro estañoso SR y homogeneizar.

*Preparación estándar:* transferir 2 ml de la *Solución estándar de fosfato (5 ppm)* para balón volumétrico de 100 ml y completar el volumen con solvente adecuado. Continuar conforme descrito en la preparación muestra.

*Procedimiento:* aguardar 10 minutos, transferir 20 ml del contenido de las preparaciones muestra y estándar para tubos de Nessler (capacidad de 50 ml y 22 ml de diámetro interno) y comparar la coloración de las preparaciones. La coloración producida en la preparación muestra no es más intensa que en la estándar.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía iónica* (5.2.17.4.1) utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio iónico para separación de aniones y detector por conductividad con supresión química.

#### 5.3.2.12 ENSAYO LÍMITE PARA PLOMO

Solución estándar de plomo diluida (1 ppm Pb): *diluir volumen exactamente medido de la Solución estándar de plomo (10 ppm Pb) preparada conforme descrito en Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3) con 9 volúmenes de ácido nítrico a 1% (v/v)*.

*Nota:* almacenar todas las soluciones de reactivos en recipientes de vidrio de borosilicato. Enjuagar todos los elementos de vidrio con solución de ácido nítrico a 20% (v/v) y, en seguida, con agua destilada.

*Preparación muestra:* en la ausencia de especificación en la monografía, preparar la solución muestra como sigue. Proceder cautelosamente, pues algunas sustancias pueden

reaccionar con violencia cuando digeridas con peróxido de hidrógeno. Transferir 1 g de la muestra para frasco adecuado, añadir 5 ml de ácido sulfúrico, algunas perlas de vidrio y calentar en placa de calentamiento, en campana, hasta evolución de humos. Pueden ser utilizados otros medios de calentamiento adecuados. Si necesario, añadir exceso de ácido sulfúrico para humedecer completamente la muestra no pasando un total de 10 ml. Añadir, gota a gota, con cuidado, peróxido de hidrógeno concentrado, calentando entre las adiciones, permitiendo que la reacción ocurra. Añadir las primeras gotas de a poco y muy lentamente mezclando cuidadosamente para prevenir reacción rápida e interrumpiendo el calentamiento si llega a ocurrir una excesiva formación de espuma. Agitar la solución en el frasco para permitir la reacción de la muestra adherida en las paredes. Añadir peróxido de hidrógeno siempre que la mezcla se torne marrón u oscura. Continuar la digestión hasta que vapores de trióxido de azufre sean desprendidos abundantemente para que la reacción sea completa y la solución se torne incolora. Enfriar, cautelosamente, con el aumento de 10 ml de agua destilada, evaporar nuevamente hasta que el trióxido de azufre se desprenda por completo y enfriar. Repetir ese procedimiento con 10 ml de agua destilada para retirar cualquier rastro de peróxido de hidrógeno. Cuidadosamente, diluir con 10 ml de agua destilada y enfriar.

**Nota:** si, antes de calentar, la muestra reacciona muy rápidamente y comienza a humear con 5 ml de ácido sulfúrico, se debe utilizar 10 ml de ácido sulfúrico a 50% (v/v) en frío y añadir algunas gotas de peróxido de hidrógeno antes de calentar.

**Preparación estándar:** utilizar volumen especificado, o calculado de la *Solución estándar de plomo diluida (1 ppm Pb)*. Someter al mismo tratamiento de la preparación muestra.

**Procedimiento:** transferir las preparaciones muestra y estándar para un embudo de separación usando 10 ml de agua destilada. Añadir 6 ml de citrato de amonio SR y 2 ml de clorhidrato de hidroxilamina SR1 (para la determinación de plomo en sales de hierro usar 10 ml de citrato de amonio SR). Añadir dos gotas de rojo de fenol a 0,1% (p/v) en etanol, alcalinizar con hidróxido de amonio hasta coloración roja y homogeneizar. Enfriar la solución, si necesario, y añadir 2 ml de cianuro de potasio SR. Extraer, inmediatamente, con porciones de 5 ml de la solución extractora de ditizona y recolectar cada extracto para otro embudo de separación hasta que la solución de ditizona mantenga su color verde. Agitar las soluciones de ditizona combinadas durante 30 segundos con 20 ml de ácido nítrico a 1% (v/v) y descartar la fase orgánica. Añadir a la solución ácida, 5 ml de la solución estándar de ditizona y 4 ml de cianuro amoníaco SR, y agitar durante 30 segundos. La coloración violeta producida en la fase orgánica de la preparación muestra no es más intensa que en la estándar.

Alternativamente, preparar la muestra conforme descrito en Ensayo límite para metales pesados (5.3.2.3) y determinar plomo por una de las técnicas de Espectrometría atómica (5.2.13).

## 5.3.3 ENSAYOS QUÍMICOS

### 5.3.3.1 TITULACIONES POR DIAZOTACIÓN

Ese tipo de titulación es muy útil en el análisis de fármacos que contienen grupo amino aromático primario tales como las sulfonamidas y los anestésicos locales derivados del ácido aminobenzóico. La titulación es realizada con solución volumétrica de nitrito de sodio, en medio ácido, dando la sal de diazonio de la amina aromática primaria.

Son utilizados dos métodos de cuantificación.

En el *Método I*, es utilizada solución de almidón yodado o papel de almidón yodado como indicador. El exceso de ácido nitroso convierte el yoduro a yodo, que en contacto con el almidón resulta en color azul característico.

En el *Método II*, el punto final de la titulación es determinado potenciométricamente. En ese método, se emplean electrodos de platino calomelano o platino-platino con diferencia de potencial y sensibilidad adecuados. Después del uso, se debe sumergir los electrodos por algunos segundos en ácido nítrico SR al cual se adicionó 1 mg/ml de cloruro férrico y, en seguida, lavar con agua destilada.

#### MÉTODO I

**Técnica** – Pesar, exactamente, cerca de 500 mg de la sulfonamida o a cantidad especificada en la monografía para otras aminas aromáticas primarias. Transferir para matraz de 250 ml, y añadir, con agitación, 100 ml de ácido clorhídrico SR para solubilizar la muestra. En seguida, añadir cerca de 30 ml de agua y enfriar en baño de hielo hasta aproximadamente 15 °C. Titular, bajo agitación constante, con solución de nitrito de sodio 0,1 M SV previamente estandarizada con sulfanilamida SQR. Se alcanza el punto final de titulación cuando una gota de la solución del matraz forma, inmediatamente, una coloración azul con una solución de almidón yodado SI en placa de toque o sobre papel de almidón yodado SI humedecido. Para comprobarse el término de la titulación, repetir la prueba de toque 2 minutos después de la última adición. Esa debe continuar positiva.

El peso, en mg, de la muestra correspondiente cada ml de nitrito de sodio 0,1 M SV se encuentra descrito en la monografía de cada fármaco.

#### MÉTODO II

**Técnica** – Pesar, exactamente, cerca de 500 mg de la sulfonamida, o el equivalente en masa del principio activo para las especialidades farmacéuticas, o la cantidad especificada en la monografía para otras aminas aromáticas primarias. En el caso de inyectables u otras formas líquidas debe pipetarse cantidad equivalente a 500 mg de principio activo o la cantidad especificada en la monografía. Transferir para matraz y añadir 20 ml de ácido clorhídrico SR y 50 ml de agua. Agitar hasta disolución. Enfriar hasta aproximadamente 15 °C manteniendo esa temperatura en el curso de la titulación. Añadir catalizador adecuado cuando especi-

cado. Titular, lentamente y bajo agitación magnética, con nitrito de sodio 0,1 M SV previamente estandarizado con sulfanilamida SQR.

El peso, en mg, de la muestra que equivale cada ml de nitrito de sodio 0,1 M SV adicionado se encuentra especificado en la monografía de cada fármaco.

**Nota:** *la punta de la bureta debe permanecer poco arriba de la superficie de la solución a fin de evitar la oxidación del nitrito de sodio. Se debe agitar con cuidado evitando la formación de un torbellino de aire abajo de la superficie. Cuando la titulación esté a, aproximadamente, 1 ml del punto final calculado, añadir volúmenes de 0,1 ml en intervalos de, como mínimo, 1 minuto.*

### 5.3.3.2 DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO POR EL METODO DE KJELDAHL

El método de Kjeldahl descrito en la forma de macro y de semimicro técnica se destina a la determinación de nitrógeno en sustancias relativamente lábiles como amidas y aminas. Comprende dos fases: (1) digestión catalítica de la sustancia orgánica en ácido sulfúrico con la derivado conversión cuantitativa del nitrógeno en sulfato de amonio; (2) destilación de lo digerido alcalinizado y titulación volumétrica de la amoniaco liberada en el proceso.

#### 5.3.3.2.1 Macrodeterminación (método I)

Transferir, exactamente, cerca de 1 g de muestra para balón de Kjeldahl de 500 ml. Añadir 10 g de sulfato de potasio, 0,5 g de sulfato cúprico y 20 ml de ácido sulfúrico. Inclinar el balón cerca de 45° y calentar, lentamente, manteniendo la temperatura abajo del punto de ebullición mientras hubiere desarrollo de espuma. Aumentar la temperatura hasta la ebullición vívida del ácido y proseguir con el calentamiento por 30 minutos hasta que la mezcla quede límpida y adquiera color verde claro. Enfriar, añadir 150 ml de agua, mezclar y enfriar nuevamente. Añadir, cuidadosamente, 100 ml de la solución de hidróxido de sodio 40% (p/v) posibilitando que el álcali escurra por la pared del balón y forme fase independiente bajo la solución ácida. Añadir pequeña cantidad de zinc granulado; inmediatamente, conectar el balón al bulbo de aislamiento previamente fijado al condensador, y sumergir el tubo colector en 100 ml de solución de ácido bórico 5% (p/v) en matraz de 500 ml. Homogeneizar la mezcla en el balón agitando suavemente y destilar hasta recolectar en el matraz cerca de 80% del volumen contenido en el balón. Añadir cerca de 3 gotas de mezcla de rojo de metilo con azul de metileno SI al matraz y titular con ácido sulfúrico 0,25 M SV. Realizar ensayo en blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada ml de ácido sulfúrico 0,25 M SV equivale a 7,003 mg de nitrógeno. Para muestras con bajo tenor de nitrógeno, emplear ácido sulfúrico 0,05 M SV. En ese caso, cada ml equivale a 1,401 mg de nitrógeno.

*En la presencia de nitratos o nitritos*

Transferir cantidad exactamente pesada de la muestra conteniendo cerca de 150 mg de nitrógeno para balón de

Kjeldahl de 500 ml y añadir 25 ml de ácido sulfúrico conteniendo 1 g de ácido salicílico disuelto. Mezclar y aguardar durante cerca de 30 minutos agitando con frecuencia. Añadir 5 g de tiosulfato de sodio, mezclar y, en seguida, añadir 0,5 g de sulfato cúprico. Proseguir conforme indicado en el procedimiento anterior a partir de "Inclinar el balón cerca de 45°...".

Cuando el tenor de nitrógeno en la muestra exceda 10%, añadir, previamente a la digestión, 0,5 a 1,0 g de ácido benzoico para facilitar la descomposición de la sustancia.

#### 5.3.3.2.2 Semimicrodeterminación (método II)

Transferir cantidad exactamente pesada de la sustancia correspondiente a 2 – 3 mg de nitrógeno para balón de Kjeldahl compatible con el aparato. Añadir 1 g de sulfato de potasio y 0,1 g de sulfato cúprico y, si necesario, lavar los sólidos adherentes al cuello con fino chorro de agua. Añadir 7 ml de ácido sulfúrico y, en seguida, 1 ml de peróxido de hidrógeno a 30% (v/v) de modo que los líquidos escurran por la pared del balón. Calentar el frasco y mantener la digestión hasta desaparición de los residuos de carbonización y la preparación azul clara esté perfectamente límpida. Cuidadosamente, añadir 70 ml de agua y enfriar. Conectar el balón al aparato de destilación y, a través del embudo, añadir 30 ml de solución de hidróxido de sodio 40% (p/v) posibilitando que el álcali escurra por la pared del balón y forme fase independiente bajo la solución ácida. Lavar el embudo con agua e, inmediatamente, iniciar la destilación. Recolectar el destilado en matraz de 250 ml conteniendo 15 ml de solución de ácido bórico 5% (p/v), cantidad de agua suficiente para sumergir el tubo colector y 3 gotas de mezcla de rojo de metilo con azul de metileno SI. Destilar hasta que el volumen de destilado alcance 80 a 100 ml; retirar el frasco colector, lavar las paredes con pequeña cantidad de agua y titular con ácido sulfúrico 0,005 M SV. Realizar ensayo en blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada ml de ácido sulfúrico 0,005 M SV equivale a 0,1401 mg de nitrógeno.

### 5.3.3.3 MÉTODO DE COMBUSTIÓN

Los métodos de combustión consisten en la descomposición de sustancias orgánicas en la presencia de oxígeno, a través de la oxidación de la materia orgánica para la subsiguiente etapa de identificación o dosificación. Estos métodos pueden ser aplicados de dos maneras: método del frasco de combustión en presión atmosférica y método de combustión iniciada por micro ondas en sistema presurizado.

#### MÉTODO DEL FRASCO DE COMBUSTIÓN EN PRESIÓN ATMOSFÉRICA

##### *Aparatos*

Comprende un frasco cónico de vidrio borosilicato refractario resistente, con volumen interno de 500 ml y tapa de vidrio esmerilada. Para determinación de flúor, se emplea frasco de cuarzo. La base de la tapa esmerilada que acompaña el frasco presenta una prolongación de vidrio en la



cual es fijado un hilo de platino con extremidad compuesta por un soporte de platino donde es introducida la muestra (**Figura 1**).

#### Muestras sólidas

Pesar la cantidad especificada en la monografía en pedazo de papel de filtro de formato y dimensiones apropiadas, doblar y prender en la tela de platino, dejando libre una parte de la extremidad. Colocar en el interior del frasco la solución absorbente especificada y burbujear oxígeno en esta solución para saturar el interior del frasco. Hacer la ignición de la extremidad del papel (vea **Nota 1**) y, sin demora, colocar la tapa en el frasco, manteniéndolo en posición con firmeza para evitar su desplazamiento debido a la presión ejercida por los gases de combustión. Invertir el frasco para asegurar sellado líquido en la tapa, tomando la precaución de evitar que material incompletamente quemado caiga en el líquido. Concluida la combustión, agitar el frasco, hasta que los gases formados en el proceso desaparezcan. Pasados 15 a 30 minutos, colocar pequeña porción de agua en el borde del frasco y retirar la tapa, permitiendo que esta agua fluya para el interior del frasco, lavando las paredes del cuello. Lavar tapa, cuello, hilo y red de platino con agua y juntar estas aguas de lavado a la solución absorbente. La solución obtenida según este procedimiento es designada solución muestra. Para el preparado del blanco, proceder de la misma manera, omitiendo la muestra (**Nota 2**).

#### Muestras líquidas

Embalar pequeña cantidad de algodón absorbente en pedazo de papel de filtro y pesar, en este dispositivo, la cantidad especificada de la muestra, que es adsorbida en el algodón. Después de la fijación del algodón involucrado en el papel de filtro a la rejilla de platino, proceder a la combustión tal como descrita para muestras sólidas.

#### Determinación de cloro y bromo

Quemar la cantidad especificada de sustancia bajo examen, empleando como solución absorbente 20 ml de agua añadidos de 1 ml de peróxido de hidrógeno concentrado y 3 ml de hidróxido de sodio 0,1 *M*. Concluida la absorción, juntar 2 gotas de azul de bromofenol y cantidad suficiente de ácido nítrico 0,1 *M* para cambiar el indicador de azul para amarillo, incorporando 0,5 ml de exceso. Si la sustancia en análisis contiene azufre, añadir algunas gotas de nitrato de bario 0,005 *M*. Juntar 100 ml de etanol aprovechando la adición para lavar las paredes internas del frasco y, en seguida, 15 gotas de difenilcarbazona SI. Titular con nitrato de mercurio (II) 0,005 *M* SV hasta coloración rosa permanente. Cada ml de nitrato de mercurio (II) 0,005 *M* SV equivale a 0,3550 mg de cloro o a 0,79904 mg de bromo.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía de iones* (5.2.17.4.1), utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio aniónica y detector por conductividad con supresión química.

#### Determinación de yodo

Quemar la cantidad especificada de sustancia bajo examen de la forma descrita, empleando como líquido absorbente 10 ml de agua enriquecidos con 2 ml de hidróxido de sodio *M*. Concluida la absorción, juntar 1 ml de solución de hidrato de hidracina 4 *M* en agua, tapar nuevamente el frasco y agitar hasta decoloración de la solución. En seguida, proceder como descrito en *Determinación de cloro y bromo* a partir de “Concluida a absorción...”. Cada ml de nitrato de mercurio (II) 0,005 *M* SV equivale a 1,269 mg de yodo.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía de iones* (5.2.17.4.1), utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio iónico para separación de aniones y detector por conductividad con supresión química.

#### Determinación de flúor

Quemar cantidad especificada de sustancia bajo examen de la forma descrita, empleando como solución absorbente 15 ml de agua. Completada la operación, lavar tapa, hilo de platino, tela de platino y paredes del frasco (**Nota 3**) con 40 ml de agua. Añadir 0,6 ml de alizarina SI y, en seguida, gota a gota, hidróxido de sodio 0,1 *M* hasta que el color cambie de rosado para amarillo. Añadir 5 ml de solución tampón acetato – ácido clorhídrico pH 3,5 y titular con nitrato de torio 0,005 *M* SV hasta que a color amarilla mude para amarillo rosado. Cada ml de nitrato de torio 0,005 *M* SV equivale a 0,380 mg de flúor. Habiendo dificultad en la identificación del punto de cambio, hacer ensayo preliminar con solución estandarizada de flúor inorgánico.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía de iones* (5.2.17.4.1), utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio iónico para separación de aniones y detector por conductividad con supresión química.

#### Determinación de azufre

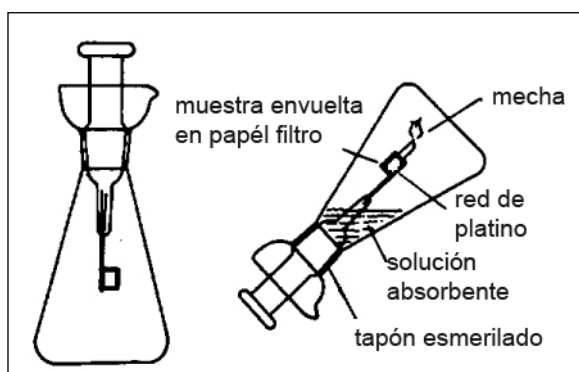
Quemar la cantidad especificada de sustancia bajo examen de la forma descrita, empleando como solución absorbente 12,5 ml de peróxido de hidrógeno SR. Concluida la absorción, juntar 40 ml de agua, aprovechando para lavar tapa, hilo y tela de platino y paredes del frasco. Hervir la solución por 10 minutos, enfriar, añadir 2 ml de ácido acético SR y 20 ml de etanol. Titular con nitrato de bario 0,01 *M* SV, usando 2 gotas de torina SI y 2 gotas de cloruro de metiltioninio SI como indicador hasta que, el color amarillo cambie para rosa. Cada ml de nitrato de bario 0,01 *M* SV equivale a 0,3206 g de azufre.

Alternativamente, proceder conforme descrito en *Cromatografía de iones* (5.2.17.4.1), utilizando cromatógrafo equipado con columna de cambio aniónica y detector por conductividad con supresión química.



## Notas:

1. Se recomienda al analista usar gafas de seguridad y protección adecuada para evitar que fragmentos de frasco lo alcancen en caso de accidente. Actualmente, existen comercialmente sistemas que evitan la ignición manual, empleando radiación infrarroja o corriente eléctrica, disminuyendo los riesgos al operador.
2. Asegurarse de que los frascos de combustión estén limpios y exentos de trazos de solventes orgánicos.
3. Sustancias conteniendo flúor dan contenidos bajos si la combustión fuese ejecutada en frascos de vidrio borosilicato. Se obtiene resultados satisfactorios en frascos de vidrio soda exento de boro pero el rendimiento ideal implica el empleo de frascos de cuarzo.



**Figura 1** - Frasco de oxígeno para determinación de azufre y halógenos.

#### MÉTODO DE COMBUSTIÓN INICIADA POR MICROONDAS EN SISTEMA PRESURIZADO

##### Aparatos

Comprende un frasco cuarzo con volumen interno de 80 ml y presión operacional de trabajo de 80 atm. La tapa que acompaña el frasco es de polímero fluorado, que posee un orificio para liberar los gases en el caso de la descomposición por vía húmeda, el cual es utilizado para la presurización del sistema con oxígeno. Un soporte de cuarzo para la muestra es insertado en el interior del frasco de descomposición.

##### Muestras sólidas

Pesar la cantidad especificada de sustancia y prensar en la forma de comprimido (aproximadamente 1,2 cm de diámetro). Colocar la muestra sobre el soporte de cuarzo conteniendo un pedazo de papel de filtro (aproximadamente 10 mg) humedecido con nitrato de amonio 6 M. Colocar en el interior del frasco la solución absorbente especificada e insertar el soporte conteniendo la muestra y el papel en el interior del frasco. Cerrar el sistema adecuadamente, conforme especificaciones del fabricante, y presurizar con 20 atm de oxígeno. Proceder a inserción de los frascos de descomposición en el rotor del horno de microondas y, sin demora, colocar el rotor en la cavidad del horno, iniciando inmediatamente la irradiación. Iniciada la ignición,

utilizando potencia máxima, la irradiación puede ser continuada por más 5 min, para que el reflujo de la solución absorbente se de, permitiendo la completa absorción de los analitos en la solución. Después del enfriamiento (20 min), el frasco de descomposición puede ser abierto y la solución transferida para recipiente apropiado con auxilio de agua y medida a volumen conocido, para la subsiguiente identificación o determinación de los analitos de interés. La solución obtenida según este procedimiento es designada solución muestra. Para el preparado del blanco, proceder de la manera descrita, omitiendo la muestra.

##### Determinación de cloro y bromo

Proseguir conforme descrito en "Determinación de cloro y bromo" en el Método del Frasco de Combustión en Presión Atmosférica.

##### Determinación de yodo

Proseguir conforme descrito en "Determinación de yodo" en el Método del Frasco de Combustión en Presión Atmosférica.

##### Determinación de flúor

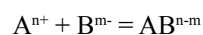
Proseguir conforme descrito en "Determinación de flúor" en el Método del Frasco de Combustión en Presión Atmosférica.

##### Determinación de azufre

Proseguir conforme descrito en "Determinación de azufre" en el Método del Frasco de Combustión en Presión Atmosférica.

#### 5.3.3.4 TITULACIONES COMPLEJOMÉTRICAS

Complejometría es el método analítico volumétrico que comprende la titulación de iones metálicos (A) con agente complejante (B). La reacción involucrada es del siguiente tipo:



Muchos complejantes denominados quelantes son capaces de formar estructuras cíclicas por medio de la coordinación simultánea de varios grupos con el ion metálico. El ácido edético (ácido etilendiaminotetracético, EDTA) es el ejemplo típico. Ese ácido es el agente complejante más utilizado. El EDTA forma complejos 1:1 con muchos metales con estado de oxidación superior a +1 siendo esos complejos mucho solubles en agua.

La estabilidad de los complejos con EDTA es dependiente del pH para los diversos metales. Luego condiciones ideales de pH deben ser establecidas para el análisis por complejación para cada metal.

En la complejometría, el punto de cambio puede ser determinado visual, o instrumentalmente. Se emplean indi-

cadore complejantes que exhiben profundas alteraciones de color mediante coordinación con el metal. Ejemplos típicos son: anaranjado de xilenol, chalcona y negro de eriocromo T. El indicador complejométrico actúa de forma competitiva con el agente titulante, logo debe ser desplazado efectivamente por este en las proximidades del punto de equivalencia.

## PROCEDIMIENTOS

### Aluminio

Pesar, exactamente, a cantidad de la sustancia indicada en la monografía, añadir 50 ml de agua y acidificar, si necesario, con cantidad mínima de ácido clorhídrico *M*, salvo que la monografía indique otro tipo de solvente. Añadir 25 ml de edetato disódico 0,1 *M SV* y 10 ml de la mezcla, en volúmenes iguales, de acetato de amonio 2 *M* con ácido acético 2 *M*. Calentar la solución hasta ebullición y mantener por 2 minutos. Enfriar. Añadir 50 ml de etanol y 3 ml de solución recién preparada de ditizona a 0,025% (p/v) en etanol. Titular el exceso de edetato disódico con sulfato de zinc 0,1 *M SV* hasta cambio del color de azul verdoso para violeta rosa. Cada ml de edetato disódico 0,1 *M SV* es equivalente a 2,698 mg de aluminio.

### Bismuto

Pesar, exactamente, la cantidad de la sustancia indicada en la monografía y disolver en cantidad mínima de ácido nítrico 2 *M*. Añadir 50 ml de agua y solución concentrada de amoniaco, gota a gota con agitación, hasta que la preparación quede turbia. Añadir 0,5 ml de ácido nítrico. Calentar a 70 °C hasta la desaparición de la turbidez de la preparación. Añadir algunas gotas de anaranjado de xilenol SI. Titular, lentamente, con edetato disódico 0,05 *M SV* hasta cambio del color de violeta rosa para amarillo. Cada ml de edetato disódico 0,05 *M SV* es equivalente a 10,45 mg de bismuto.

### Calcio

Pesar, exactamente, la cantidad de la sustancia indicada en la monografía, disolver en algunos mililitros de agua y acidificar, si necesario, con cantidad mínima de ácido clorhídrico 2 *M*. Diluir para 100 ml con agua. Titular con edetato disódico 0,05 *M SV* hasta cerca de 2 ml antes del punto de equivalencia previsto. Añadir 4 ml de hidróxido de sodio 10 *M* y gotas de chalcona SI. Proseguir la titulación hasta que el color cambie de rosa para azul intenso. Cada ml de edetato disódico 0,05 *M SV* es equivalente a 2,004 mg de calcio.

### Plomo

Pesar, exactamente, la cantidad de la sustancia indicada en la monografía y disolver en 5 a 10 ml de agua, o en cantidad mínima de ácido acético 5 *M*. Diluir para 50 ml con agua. Añadir gotas de anaranjado de xilenol SI y metenamina suficiente (cerca de 5 g) para que la solución adquiera color violeta. Titular con edetato disódico 0,05 *M SV*, o 0,1 *M SV*, conforme indicado en la monografía hasta cambio del color de violeta para amarillo. Cada ml de edetato disó-

dico 0,05 *M SV* es equivalente a 10,36 mg de plomo. Cada ml de edetato disódico 0,1 *M SV* es equivalente a 20,72 mg de plomo.

### Magnesio

Pesar, exactamente, la cantidad de la sustancia indicada en la monografía y disolver en 5 a 10 ml de agua, o en cantidad mínima de ácido clorhídrico 2 *M*. Diluir con agua para 50 ml. Añadir 10 ml de tampón de cloruro de amonio pH 10,0, y algunas gotas de negro de eriocromo T SI. Titular con edetato disódico 0,05 *M SV* o 0,1 *M SV*, conforme indicado en la monografía, hasta cambio del color de violeta para azul. Cada ml de edetato disódico 0,05 *M SV* es equivalente a 1,215 mg de magnesio. Cada ml de edetato disódico 0,1 *M SV* es equivalente a 2,431 mg de magnesio.

### Zinc

Pesar, exactamente, la cantidad de la sustancia indicada en la monografía y disolver en 5 a 10 ml de agua, o en cantidad mínima de ácido acético 5 *M*. Diluir para 50 ml con agua. Añadir gotas de anaranjado de xilenol SI y metenamina suficiente (cerca de 5 g) para que la solución adquiera color violeta. Titular con edetato disódico 0,05 *M SV* o 0,1 *M SV*, conforme indicado en la monografía, hasta cambio del color de violeta para amarillo. Cada ml de edetato disódico 0,05 *M SV* es equivalente a 3,268 mg de zinc. Cada ml de edetato disódico 0,1 *M SV* es equivalente a 6,536 mg de zinc.

## 5.3.3.5 TITULACIONES EN MEDIO NO ACUOSO

Los fármacos que son bases o ácidos suaves no pueden ser cuantificados en medio acuoso, pero pueden ser en medio no acuoso.

La titulación en medio no acuoso se basa en el concepto ácido / básico de Brønsted-Lowry, en el cual el ácido es una sustancia que dona protón y la base es aquella que recibe protón. Sustancias potencialmente ácidas son ácidas solamente en presencia de base a la cual puedan donar protón y viceversa.

El solvente desempeña, por consiguiente, papel muy importante en la determinación del carácter ácido / básico de una sustancia, ya que la fuerza del ácido o de la base depende de la capacidad del solvente de recibir o donar protones. El agua debería ser el solvente de elección, debido a la fácil disponibilidad. No obstante, el ácido más fuerte que puede existir en medio acuoso es el ion hidronio ( $H_3O^+$ ) y la base más fuerte el ion hidróxido ( $OH^-$ ), eso es conocido como *efecto nivelador* del solvente. En la dosificación de ácidos o bases muy suaves, el titulante debe ser una base o ácido muy fuerte, respectivamente, para que la reacción ácido-base ocurra; sin embargo debido al efecto nivelador del agua no es posible titular tales sustancias en medio acuoso.

Utilizando solventes poco protofilicos como el ácido acético, es posible la titulación de bases mucho suaves ya que el

ion acetonio ( $\text{CH}_3\text{COOH}_2^+$ ) es un ácido mucho más fuerte que el ion hidronio. Ácidos más fuertes que el ion hidronio no pueden ser diferenciados en medio acuoso, pero pueden en ácido acético mostrando que el orden decreciente para la fuerza de los ácidos es perclórico, bromhídrico, sulfúrico, clorhídrico y nítrico. Análogamente, la titulación de ácidos suaves es posible con el uso de solventes básicos como la *n*-butilamina. El amideto ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$ ) es una base mucho más fuerte que el hidróxido.

Los solventes empleados en la titulación en medio no acuoso deben satisfacer ciertas exigencias: (1) no reaccionar con la sustancia ni con el titulante; (2) disolver la sustancia posibilitando, como mínimo, preparado de solución 0,01 *M*; (3) disolver el producto de la titulación – si la precipitación fuese inevitable, el precipitado debe ser compacto y cristalino; (4) posibilitar, con facilidad, la visualización del punto final, sea ese medido con el uso de indicadores o potenciómetro; (5) ser de bajo costo y de fácil purificación.

Para la titulación de sustancias de carácter básico (aminas, heterocíclicos nitrogenados, compuestos de amonio cuaternario, sales alcalinas de ácidos orgánicos e inorgánicos y algunas sales de aminas) se emplean solventes de naturaleza relativamente neutra, o ácida, siendo el ácido acético glacial el más utilizado. El anhídrido acético se reserva para bases mucho suaves como amidas. La mezcla de dioxana con ácido acético puede ocasionalmente ser utilizada a fin de la reducción de la constante dieléctrica y consecuentemente menor potencial de ionización de los ácidos favoreciendo la reacción de neutralización. Como titulante se emplea, generalmente, la solución de ácido perclórico en ácido acético. Otros titulantes útiles son ácido perclórico en dioxano; ácido *p*-toluenosulfónico (ácido tósico) y ácido fluorsulfónico son generalmente utilizados con solventes apróticos como cloroformo.

Para la dosificación de sales de ácidos halogenados (clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato) debe adicionarse acetato de mercurio; ese no se disocia en solución de ácido acético. El ion haluro es una base demasiadamente suave para reaccionar cuantitativamente con ácido perclórico en ácido acético. Ese ion puede ser sustituido, cuantitativamente, por el ion acetato siendo retirado en la forma de complejo mercuríco que no se disocia. El acetato, que es una base relativamente fuerte en ácido acético, puede ser precisamente titulado con ácido perclórico.

Para la titulación de sustancias que se comportan como ácidos (haluros de ácidos, anhídridos de ácidos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, enoles, imidas, fenoles, pirroles y sulfas) se emplean como solventes los de naturaleza básica o aprótica. En la dosificación de sustancias de acidez intermediaria es común el uso de dimetilformamida. Ya en la dosificación de ácidos suaves se emplean bases más fuertes como morfolina, etilenodiamina y *n*-butilamina. Los solventes básicos seleccionados, adecuadamente, pueden posibilitar la determinación selectiva de mezcla de ácidos. Dos clases de titulantes pueden ser empleadas para determinación de sustancias ácidas: los alcóxidos de meta-

les alcalinos y los hidróxidos de alquilamonio cuaternario. El metóxido de sodio es el más empleado de los alcóxidos en mezcla de metanol y tolueno o metanol y benceno. El metóxido de litio en metanol y benceno es utilizado para los compuestos que forman precipitado gelatinoso en las titulaciones con metóxido de sodio. El más utilizado entre los hidróxidos es el de tetrabutilamonio. Con los hidróxidos de amonio cuaternario como los hidróxidos de tetrabutilamonio y el de trimetilexadecilamonio (en mezcla de benceno y metanol o alcohol isopropílico) hay ventaja de que la sal del ácido titulado es, en general, soluble en el medio de titulación.

Es importante que se protejan los solventes para la titulación de sustancias ácidas de la exposición excesiva a la atmósfera debido a la interferencia de  $\text{CO}_2$ . Por eso, se puede emplear atmósfera inerte o aparato especial durante la titulación. Para determinar la absorción de  $\text{CO}_2$  se debe proceder a la titulación del blanco que no debe consumir más que 0,01 ml del metóxido de sodio 0,1 *M* SV por mililitro de solvente.

El punto final de la dosificación puede ser determinado visualmente por el cambio de color o potenciométricamente. Generalmente la elección del método se basa en el pKa de los analitos en agua. Para bases con el pKa de 4, la detección es, en general, por medio de indicadores; para las que el pKa está entre 1 y 4, la detección es potenciométrica. En ese caso, el electrodo de vidrio / calomelano es útil. En ácido acético, tal electrodo funciona de acuerdo con lo previsto teóricamente. En el caso del electrodo de calomelano como referencia, es ventajoso sustituir el puente salino de cloruro de potasio acuoso por perclorato de litio 0,1 *M* en ácido acético glacial para titulación en solventes ácidos o por cloruro de potasio en metanol para la titulación en solventes básicos. La determinación del punto final en la cuantificación de ácidos cuyo pKa en agua es en torno de 7 puede ser hecha con el uso de indicador. Para los ácidos con pKa entre 7 y 11 se recomienda determinación potenciométrica, aunque en ciertos casos se recurra a indicadores, como violeta azoico o *o*-nitroanilina con menor precisión.

Con el uso de solventes orgánicos, se debe considerar el alto coeficiente de expansión cúbica de la mayoría de esos en relación al del agua. Eso porque hay posibilidad de ocurrir variación del tenor del titulante en medio no acuoso en función de la temperatura. Se debe corregir el volumen del titulante, multiplicando-el por el factor de corrección abajo:

$$[1 + \text{coeficiente de expansión cúbica del solvente } (t_0 - t)]$$

en que:

$t_0$  = temperatura de estandarización del titulante,  
 $t$  = temperatura de utilización del titulante.

Los sistemas más empleados para la titulación en medio no acuoso están relacionados en la **Tabla 1**.

Tabla 1 - Sistemas para titulación en medio no acuoso

Tipo de solvente	Solvente <sup>a</sup>	Indicador	Electrodos
Ácido (para titulación de bases o sus sales)	Ácido acético glacial	Alfazurina 2 G	
	Ácido fórmico	Cloruro de metilrosanilina	Vidrio / calomelano
	Ácido propiónico	p-Naftolbenceina	Vidrio / plata / cloruro de plata
	Anhídrido acético	Verde de malaquita	
Relativamente neutro (para titulación diferencial de bases)	Cloruro de sulfonila	Rojos de quinaldina	
	Acetato de etilo	p-Naftolbenceina	Calomelano / plata / cloruro de plata
	Acetonitrilo	Rojos de metilo	Vidrio / calomelano
	Alcoholes	Anaranjado de metilo	
	Benceno		
	Clorobenceno		
	Cloroformo		
Dioxana			
Básico (para titulación de ácidos)	n-Butilamina	p-Hidroxiazobenceno	Antimonio / calomelano
	Dimetilformamida	O-Nitroanilina	Antimonio / vidrio
	Etilenodiamina	Timolftaleína	Platino / calomelano
	Morfolina	Violeta azoico	Vidrio / calomelano
Relativamente neutro (para titulación diferencial de ácidos)	Acetona	Azul de bromotimol	Antimonio / calomelano
	Acetonitrilo	Azul de timol	Vidrio / calomelano
	Alcohol tert-butílico	p-Hidroxiazobenceno	Vidrio / platinob
	2-Butanona	Violeta azoico	
	Isopropilacetona		

<sup>a</sup> solventes relativamente neutros de constante dieléctrica baja, tales como benceno, cloroformo, o dioxana, pueden ser utilizados junto con cualquier solvente ácido o básico a fin de aumentar la sensibilidad de los puntos de cambio de la titulación.

<sup>b</sup> en el titulante.

#### Titulación de sustancias básicas

Disolver cantidad de la sustancia indicada en la monografía en cantidad especificada del solvente, o mezcla de solventes adecuados. En el caso de la titulación de sales de ácidos halogenados, se debe añadir 10 ml de acetato de mercurio SR. Añadir el indicador apropiado, o en el caso de determinación potenciométrica, emplear electrodo adecuado titulando con ácido perclórico 0,1 M SV en ácido acético. Para realización del ensayo en blanco, proceder de la manera descrita omitiendo la muestra.

Si  $t_0$  es diferente a  $t$  corregir el volumen por:

$$[1+0,0011(t_0-t)]$$

en que:

$t_0$  = temperatura en la cual el titulante fue estandarizado,  
 $t$  = temperatura en la cual la titulación fue realizada.

#### Titulación de sustancias ácidas

**Método I** – Disolver cantidad de la sustancia especificada en la monografía en el solvente o mezcla de solventes indicados. Añadir el indicador recomendado o, se fuera el caso,

usar el electrodo adecuado a la determinación potenciométrica. Titular con metóxido de sodio 0,1 M SV previamente estandarizada con ácido benzoico. Evitar la absorción de dióxido de carbono. Efectuar titulación en la preparación en blanco. Hacer las correcciones necesarias.

**Método II** – Disolver cantidad de la sustancia indicada en la monografía en el solvente o mezcla de solventes indicados

Titular con hidróxido de tetrabutilamonio 0,1 M SV utilizando bureta equipada con absorbente de dióxido de carbono. Determinar el punto final potenciométricamente.

Efectuar titulación en la preparación en blanco. Hacer las correcciones necesarias.

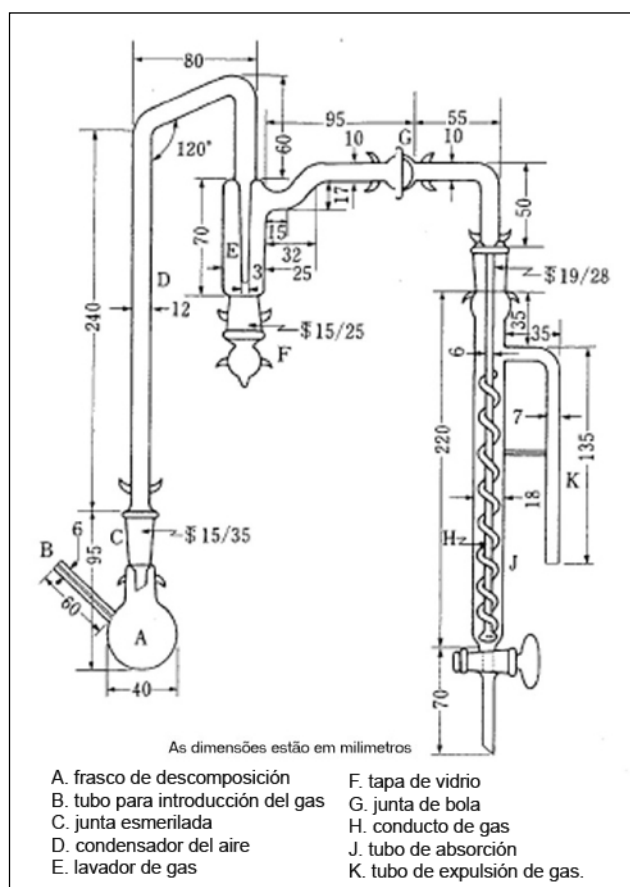
#### 5.3.3.6 DETERMINACIÓN DE METOXILA

La técnica es destinada a la determinación de grupos metoxila en sustancias orgánicas por reacción con ácido yodhídrico concentrado. El yoduro de metilo formado es separado por destilación bajo corriente continua de nitrógeno o dióxido de carbono, lavado y adsorbido en solución bromo

/ acética. El yoduro de metilo es convertido a yodo y, en seguida, titulado con tiosulfato de sodio.

#### APARATOS

El aparato (**Figura 1**) empleado en la determinación de la metoxila consiste de balón de fondo redondo con capacidad de 50 ml al cual se encuentra soldado un brazo lateral capilar con 1 mm de diámetro interno destinado al influjo de gas de arrastre inerte – nitrógeno o dióxido de carbono. Se conecta al balón por juntas esmeriladas un condensador vertical de 24 cm de altura y 12 mm de diámetro externo en cuyo topo está fijado a tubo curvo cuya extremidad capilar con 3 mm de diámetro se encuentra inmersa en frasco de lavado. La salida del lavador consiste en tubo de cerca de 10 mm de diámetro que termina en tubo removible de 6 mm de diámetro inmerso en el líquido absorbente.



**Figura 1** - Aparato empleado en la determinación de la metoxila.

#### PROCEDIMIENTO

*Preparación lavadora:* suspender 1 g de fósforo rojo en 100 ml de agua.

*Líquido absorbente:* disolver 15 g de acetato de potasio en 150 ml de una mezcla de ácido acético glacial y anhídrido acético (9:1). A 145 ml de esa solución añadir 5 ml de bromo. Preparar inmediatamente antes del uso.

Añadir preparación lavadora suficiente para cubrir mitad del lavador de gas. Añadir 20 ml del líquido absorbente al tubo de absorción. Añadir al balón cantidad de muestra correspondiente a 6,5 mg de metoxila o la cantidad indicada en la monografía. Añadir perlas de vidrio y 6 ml de ácido yodhídrico. Humedecer la junta esmerilada con ácido yodhídrico y conectar al condensador de aire. Conectar las dos partes del aparato por la junta de bola utilizando grasa de silicona para sellado. Ajustar el influjo de gas por el tubo B suficiente para formación de dos burbujas por segundo en el lavador de gas Y. Calentar gradualmente por 20 – 30 minutos el balón hasta 150 °C y mantener el calentamiento en esa temperatura por 60 minutos. Después del enfriamiento del balón hasta temperatura ambiente bajo flujo de gas, verter la preparación contenida en el tubo de absorción en matraz con capacidad de 500 ml provisto de tapa esmerilada conteniendo 10 ml de la solución acuosa de acetato de sodio trihidratado (1:5). Lavar las paredes del tubo con agua, transferir el agua de lavado para el matraz y diluir para 200 ml con agua. Añadir ácido fórmico gota a gota con agitación hasta la desaparición del color rojizo del bromo y añadir 1 ml más de ácido fórmico. Añadir 3 g de yoduro de potasio y 15 ml de ácido sulfúrico M; tapar, agitar suavemente y dejar en reposo por 5 minutos. Titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 M SV empleando almidón SI como indicador. Realizar titulación en la preparación en blanco procediendo de la manera descrita omitiendo la muestra y efectuar corrección si necesario. Cada ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 M SV equivale a 0,5172 mg de metoxila ( $\text{CH}_3\text{O}$ ).



### 5.3.3.7 DETERMINACIÓN DE DIÓXIDO DE AZUFRE

El método comprende el arrastre de  $\text{SO}_2$  liberado en el calentamiento de la sustancia en medio acuoso acidificado por corriente de dióxido de carbono seguido de la absorción del  $\text{SO}_2$  en solución de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado en el proceso es titulado con hidróxido de sodio estandarizado.

#### APARATOS

El aparato (**Figura 1**) empleado en la determinación de dióxido de azufre consiste de balón de fondo redondo tritubulado de capacidad de 1000 a 1500 ml. A una de las salidas laterales del balón se acopla dispositivo destinado al influjo de dióxido de carbono. Embudo de adición de capacidad de 100 ml y condensador de reflujo vertical ambos provistos de juntas esmeriladas son acoplados a otra salida lateral y la salida central, respectivamente. En la extremidad superior del condensador es conectado el tubo de absorción D.

#### PROCEDIMIENTO

Transferir para el balón cerca de 300 ml de agua, fijar el balón al aparato y promover influjo lento y uniforme de dióxido de carbono durante 15 minutos. Añadir al tubo de absorción 20 ml de peróxido de hidrógeno 3% (p/v) SR previamente neutralizado con hidróxido de sodio 0,1 M utilizando como indicador azul de bromofenol SI. Sin interrumpir el influjo del gas, retirar momentáneamente el embudo, añadir al balón, exactamente, cerca de 50 g de muestra y 200 ml de agua. Añadir, gota a gota, 50 ml de ácido clorhídrico 6 M por el embudo y mantener en reflujo por 45 minutos. Transferir, cuantitativamente, por lavado con agua, el líquido contenido en el tubo de absorción para matraz de 250 ml y titular con hidróxido de sodio 0,1 M SV empleando como indicador azul de bromofenol SI. Realizar titulación en la preparación en blanco procediendo de la manera descrita omitiendo la muestra y efectuar corrección si necesario. Cada ml de hidróxido de sodio 0,1 M SV equivale a 3,203 mg de dióxido de azufre.

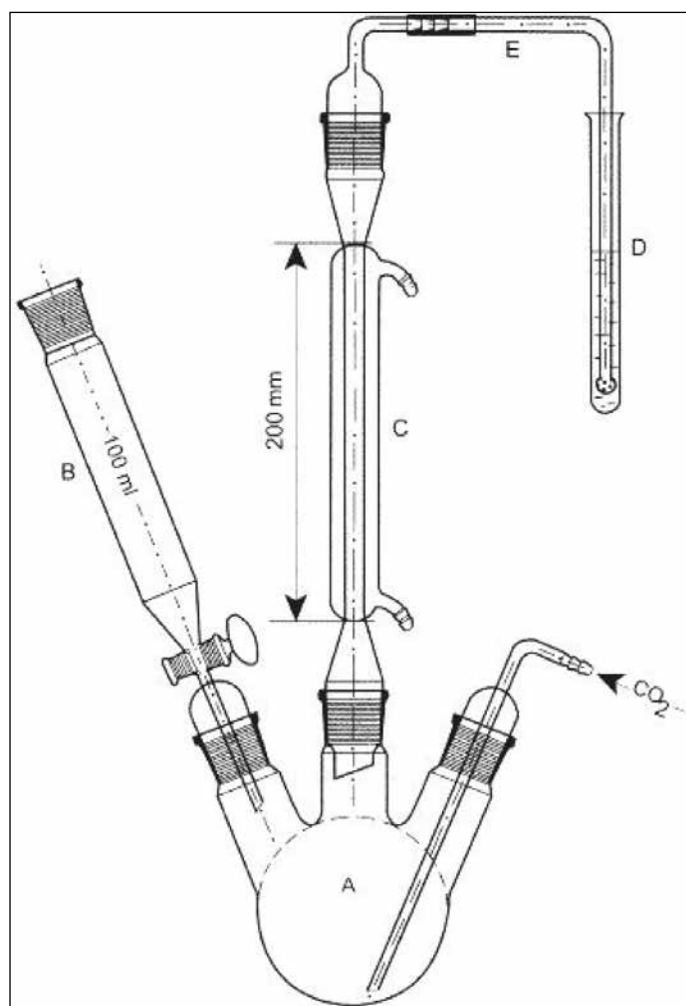


Figura 1 - Aparato empleado en la determinación de dióxido de azufre.

### 5.3.3.8 DETERMINACIÓN DEL ALCOHOL

#### 5.3.3.8.1 Método por destilación

Ese método debe ser usado en la determinación de alcohol, en solución que contenga alcohol, a menos que en la monografía sea especificado otro método. Es adecuado para análisis de la mayoría de los extractos fluidos y tinturas.

#### PROCEDIMIENTO

##### Nota

Debe ser usado balón destilador con capacidad de dos a cuatro, veces, el volumen, del líquido a ser calentado.

Durante todas las manipulaciones, tomar precaución para minimizar la pérdida de alcohol por evaporación.

Para evitar la ocurrencia de ebullición violenta, añadir fragmentos de material insoluble y poroso, tal como carbonato de silicio o perlas de vidrio.

Los líquidos que formen demasiada espuma durante la destilación deben ser tratados previamente con ácido fosfórico, sulfúrico o tánico, hasta reacción fuertemente ácida o con ligero exceso de solución de cloruro de calcio, o pequeña cantidad de parafina o además aceite de silicona, antes de iniciar a destilación.

La velocidad de destilación debe ser tal que permita la producción de destilados límpidos. Destilados turbios deben ser clarificados por agitación con talco o con carbonato de calcio, precipitados y filtrados. Ajustar la temperatura del filtrado y determinar el tenor de alcohol por la densidad.

##### Método 1

*Líquidos con menos de 30% de alcohol* – Transferir para aparato destilador adecuado, por medio de pipeta, muestra de, en el mínimo, 35 ml del líquido en el cual está siendo determinado el tenor de alcohol, registrar la temperatura en la cual el volumen fue medido. Añadir igual cantidad de agua, destilar y recoger un volumen de destilado que sea cerca de 2 ml menor que el volumen inicial de la muestra. Ajustar la temperatura del destilado a aquella en que fue medida la muestra y añadir agua suficiente hasta obtener el volumen inicial de la muestra y homogeneizar. El destilado debe ser límpido o, como máximo, levemente turbio. Determinar la densidad del líquido a 20 °C. Con el resultado, evaluar el porcentaje, en volumen, de  $C_2H_5OH$  contenido en el líquido examinado, por la Tabla Alcohométrica.

##### Método 2

*Líquidos con más de 30% de alcohol* – Proceder como indicado en el método anterior, con la siguiente modificación: diluir la muestra con volumen de agua dos veces mayor y recoger volumen de destilado cerca de 2 ml menor que dos veces el volumen inicial de la muestra. Ajustar la temperatura del destilado a aquella en que fue medida la muestra y completar con agua a volumen igual a dos veces

el volumen inicial de la muestra. Mezclar y determinar la densidad a 20 °C. La proporción de  $C_2H_5OH$ , en volumen, en ese destilado, evaluada por la densidad, es igual a la mitad de aquella del líquido examinado.

##### Tratamientos especiales

*Ácidos y Bases Volátiles* – Líquidos conteniendo bases volátiles deben ser tratados con ácido sulfúrico diluido SR, hasta reacción levemente ácida. Si están presentes ácidos volátiles, a la preparación deberá ser adicionado hidróxido de sodio SR hasta reacción levemente alcalina.

*Glicerol* – Líquidos conteniendo glicerol deben ser añadidos de volumen tal de agua que el residuo, después de la destilación, contenga, como mínimo, 50% de agua.

*Yodo* – Soluciones conteniendo yodo libre deben ser tratadas antes de la destilación con zinc pulverizado o destañadas con cantidad suficiente de solución de tiosulfato de sodio 10% (p/v) seguida de la adición de algunas gotas de hidróxido de sodio SR.

*Otras sustancias volátiles* – Elixires, tinturas y preparaciones similares que contengan proporciones apreciables de sustancias volátiles, además de alcohol y agua, tales como: aceites volátiles, cloroformo, éter, alcanfor etc., deben sufrir, antes de la destilación, uno de los tratamientos a continuación.

1. *Líquidos con menos de 50% de alcohol* – Mezclar la muestra de 35 ml, exactamente medidos, con volumen igual de agua, en embudo de separación, saturando esa mezcla con cloruro de sodio. Extraer los componentes volátiles, agitando con porción de 25 ml de hexano. Transferir la camada inferior para un segundo embudo de separación y repetir la extracción con dos porciones más de hexano. Reunir las porciones de hexano y tratar con 3 porciones de 10 ml de solución saturada de cloruro de sodio. Reunir las soluciones salinas y destilar recolectando volumen de destilado correspondiente a dos veces el volumen inicial de la muestra.
2. *Líquidos con más de 50% de alcohol* – Medir una muestra y diluir con agua de modo que contenga aproximadamente 25% de alcohol y que su volumen final sea cerca de 35 ml. a continuación proceder como indicado para líquidos con menos de 50% de alcohol, prosiguiendo a partir de “saturando esa mezcla con cloruro de sodio”.

En la preparación de colodión para destilación, usar agua en lugar de la solución saturada de cloruro de sodio, indicada anteriormente. Si no fue empleado en la muestra el tratamiento con hexano y el destilado obtenido es turbio (debido a la presencia de aceites volátiles presentes en pequeñas proporciones), él puede ser clarificado y adecuado para la determinación de la densidad, por agitación con cerca de 1/5 de su volumen de hexano o por filtración a través de fina camada de talco.

### 5.3.3.8.2 Método por cromatografía a gas

Proceder de acuerdo con las especificaciones generales para *Cromatografía a gas* (5.2.17.5). Usar aparato eficiente para la determinación cuantitativa de alcohol.

#### Solución estándar

Para líquidos conteniendo más que 10% de alcohol, preparar dos soluciones estándar de alcohol en agua, de manera que las concentraciones sean, respectivamente, cerca de 5% abajo (*solución estándar 1*) y cerca de 5% arriba (*solución estándar 2*) de la concentración de alcohol esperada en la muestra bajo análisis. Determinar la densidad de cada una de las soluciones estándar a 20 °C (5.2.5) y obtener la concentración exacta de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH por la Tabla Alcohométrica. Para líquidos conteniendo menos que 10% de alcohol, preparar, exactamente, dos soluciones estándar de alcohol, de manera que las concentraciones sean, respectivamente, cerca de 1% menor y cerca de 1% mayor que la concentración, esperada, diluyendo con agua. Determinar las densidades de las soluciones del mismo modo que las anteriores.

#### EQUIPO

Bajo condiciones típicas, el instrumento contiene una columna de 2 m x 4 mm cargada con macrogol (polietilenglicol) 400 a 20% en sílice cromatográfica calcinada. La columna es mantenida en la temperatura de 100 °C; el inyector es equipado con filtro para sólidos y es mantenido a 160 °C; como conductor se usa gas inerte, como helio, fluyendo con caudal de cerca de 60 ml por minuto.

#### PROCEDIMIENTO

Proceder con la muestra y cada una de las soluciones estándar como sigue: transferir 25 ml para recipiente adecuado de tapón esmerilado, añadir 1,0 ml del estándar interno (acetona, a menos que especificado diferentemente en la monografía) para cada 6% de alcohol estimado en la muestra y mezclar. Añadir agua solamente se es necesario para efectuar la solución. Inyectar cantidad, apropiada de la solución, en el aparato. Calcular la relación entre el área bajo el pico del alcohol y el área bajo el pico del estándar interno en los cromatogramas. Calcular el porcentaje de alcohol en la muestra por la fórmula

$$\frac{P_1 (Y - Z + P_2 (Z - X))}{(Z - X)}$$

en que

$P_1$  = porcentaje de alcohol en la *solución estándar 1*,  
 $P_2$  = porcentaje de alcohol en la *solución estándar 2*,  
 $X$  = relación entre el área bajo el pico del alcohol y el área bajo el pico del estándar interno de la *solución estándar 1*,  
 $Y$  = relación entre el área bajo el pico del alcohol y el área bajo el pico del estándar interno de la *solución estándar 2*  
 $Z$  = relación entre el área bajo el pico del alcohol y el área bajo el pico del estándar interno de la solución Muestra.

Si el valor obtenido esta fuera de la banda de los valores incluidos por las soluciones estándar, repetir el procedimiento usando aquellas que dieron una banda que incluya el valor de la muestra.

### 5.3.3.9 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El análisis de aminoácidos es realizado por medio de dos etapas: hidrólisis de las ligaciones peptídicas y evaluación de cada aminoácido en el hidrolizado resultante.

#### Técnica para hidrólisis de proteínas y péptidos aislados

1. Transferir cantidad de muestra conteniendo de 4 a 10 mg de proteína para tubo de ensayo de 20 x 150 mm con tapa de rosca y disco de politetrafluoroetileno previamente lavado con hidróxido de sodio 0,2 M, enjuagado y seco en estufa.
2. Si la muestra fuese sólida, añadir 5 de ácido clorhídrico y 5 ml de agua. Si la muestra fuese líquida, añadir ácido clorhídrico de modo que la concentración final de ácido clorhídrico sea 6 M.
3. Retirar el oxígeno del tubo por flujo de nitrógeno durante 2 – 3 minutos. Cerrar enseguida el tubo con disco y tapa a rosca.
4. Colocar el tubo en la posición vertical en estufa regulada a 110 °C ± 2 °C manteniéndolo por 22 h.
5. Retirar el tubo de la estufa y, además en la vertical, resfriarlo en agua corriente o baño de hielo.
6. Transferir, cuantitativamente, el contenido del tubo para balón volumétrico de 10 ml y completar el volumen con agua destilada.
7. Si hubiere algún residuo o precipitado, removerlo por centrifugación y filtración en placa de vidrio sinterizado, o membrana filtrante de 0,45 µm de porosidad.
8. Pipetear 5,0 ml de la solución, transferir para balón de fondo redondo y retirar el solvente la presión reducida a, como máximo, 50 °C.
9. Añadir al residuo del balón 10 ml de agua destilada y re-evaporar. Esa operación debe ser repetida dos veces más, o hasta que el residuo no presente olor de ácido clorhídrico.
10. Solubilizar la película seca formada por el hidrolizado en volumen adecuado de tampón citrato pH 2,2 (0,20 M en Na<sup>+</sup>). La solución resultante de aminoácidos debe entonces ser mantenida en frasco de vidrio, tapado y bajo refrigeración hasta la realización del análisis.

*Técnica para hidrólisis de muestras con bajo tenor de proteína conteniendo carbohidratos y/o lípidos*

1. Transferir cantidad de muestra que contenga 10 mg de proteína para balón de 150 ml de fondo redondo y boca esmerilada.
2. Añadir al medio 40 ml de ácido clorhídrico 6 M y algunas perlas de vidrio.
3. Conectar condensador de reflujo e iniciar el calentamiento del balón usando manta eléctrica. Mantener la suspensión bajo ebullición constante y suave por 24 h.
4. Enfriar hasta la temperatura ambiente y transferir, cuantitativamente, el contenido para balón volumétrico de 50 ml completando el volumen con agua destilada.
5. Seguir las demás etapas conforme los ítems 7 a 10 de la técnica anterior.
4. Pesar la muestra conteniendo 10 mg de proteína en balón de fondo redondo de 25 ml y añadir 2 ml de ácido per fórmico helado.
5. Mantener la mezcla en baño de hielo durante 4 h, si la muestra fuese soluble, o 16 h, se fuese insoluble.
6. Añadir 0,5 ml de ácido bromhídrico 40% para retirar el exceso de ácido per fórmico.
7. Acoplar el balón a evaporador rotatorio y retirar por medio de presión reducida el bromo residual haciendo pasar los vapores por solución de hidróxido de sodio M.
8. Proceder a la hidrólisis como descrito anteriormente.

*Mezclas de aminoácidos en solución (sueros) o en preparaciones farmacéuticas*

1. Diluir, adecuadamente, la solución con tampón citrato pH 2,2 (0,20 M en Na<sup>+</sup>) pudiendo ser analizada en seguida.
2. Caso esté en la forma de polvo, o comprimido, solubilizar la muestra en ácido clorhídrico 0,1 M.
3. Transferir el material para balón volumétrico y completar el volumen con el mismo tampón arriba.
4. Filtrar la solución y mantener bajo refrigeración (4 °C) hasta ser analizada.

*Técnica de hidrólisis con oxidación de cisteína y metionina*

Debido a pérdidas durante la hidrólisis ácida de proteínas, los aminoácidos sulfurados son preferentemente analizados por medio de sus respectivos derivados oxidados. La oxidación es promovida por ácido per fórmico, que convierte cisteína y metionina en ácido cisteico y metionina / sulfona, ambos resistentes a las condiciones de hidrólisis.

1. Preparar el ácido per fórmico acrecentando 1 ml de peróxido de hidrógeno 30 volúmenes a 9 ml de ácido fórmico.
2. Agitar ligeramente la solución manteniéndola enseguida en reposo por 1 h a temperatura ambiente.
3. Enfriar el ácido per fórmico formado en baño de hielo.

*Separación y análisis cuantitativo de aminoácidos aislados*

La separación de los aminoácidos en los hidrolizados es, normalmente, realizada por cromatografía de cambio iónico por medio de resinas de poliestireno sulfonado en analizadores de aminoácidos. En esos aparatos, después de la separación, los aminoácidos eluidos de las columnas cromatográficas forman sustancias de coloración azul/violeta por la reacción con ninhidrina. La determinación cuantitativa está hecha espectrofotométricamente. En el uso de autoanalizadores de aminoácidos, deben ser seguidas las especificaciones de los respectivos fabricantes.

**5.3.3.10 ENSAYO YODOMÉTRICO DE ANTIBIÓTICOS**

Este ensayo yodométrico de antibiótico se destina a la dosificación de fármacos antibióticos penicilámicos y de sus productos farmacéuticos elaborados, para los cuales la titulación yodométrica es particularmente adecuada.

*Preparación estándar*

Disolver cantidad adecuada, exactamente pesada, de la sustancia química de referencia (SQR), previamente desecada, especificada en la monografía individual, utilizando el solvente descrito en la **Tabla 1** o conforme descrito en la monografía. Diluir, cuantitativamente, con el mismo solvente, para obtener solución con concentración final conocida, especificada en la **Tabla 1** o conforme descrito en la monografía. Transferir 2,0 ml de esta solución para matraz de 250 ml con tapa.

*Preparación muestra*

A menos que especificado de otra forma en la monografía individual, disolver cantidad adecuada, exactamente pesada, de la muestra, utilizando el solvente descrito en la **Tabla 1**. Diluir, cuantitativamente, con el mismo solvente, para obtener solución con concentración final conocida, especificada en la **Tabla 1**. Transferir 2,0 ml de esta solución para matraz de 250 ml con tapa.

Tabla 1 - Solventes e concentraciones finales.

<i>Antibiótico</i>	<i>Solvente*</i>	<i>Concentración final</i>
Amoxicilina trihidratada	Agua	2,00 mg/ml
Ampicilina	Agua	2,50 mg/ml
Ampicilina sódica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Ampicilina trihidratada	Agua	2,50 mg/ml
Bencilpenicilina benzatina	<i>Solución 1</i>	4000 U/ml
Bencilpenicilina potásica	<i>Solución 1</i>	4000 U/ml
Bencilpenicilina procaína	<i>Solución 1</i>	4000 U/ml
Bencilpenicilina sódica	<i>Solución 1</i>	4000 U/ml
Cloxacilina sódica	Agua	2,50 mg/ml
Ciclacilina	Agua	2,00 mg/ml
Dicloxacilina sódica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Fenoximetilpenicilina potásica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Feneticilina potásica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Meticilina sódica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Nafcilina sódica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml
Oxacilina sódica	<i>Solución 1</i>	2,50 mg/ml

\*A menos que especificado de otra forma, la *Solución 1* es aquella definida en la sección *Soluciones en Ensayo microbiológico de antibióticos (5.5.3.3)*, excepto que la esterilización no es necesaria.

## PROCEDIMIENTO

### *Inactivación y titulación*

A cada matraz conteniendo, respectivamente, 2,0 ml de las *preparaciones estándar y muestra*, añadir 2 ml de hidróxido de sodio 1,0 M, homogeneizar con movimientos circulares y dejar en reposo por 15 minutos. Añadir 2 ml de ácido clorhídrico 1,2 M, 20,0 ml de yodo 0,005 M SV, tapar inmediatamente y dejar en reposo por 15 minutos. Titular con tiosulfato de sodio 0,01 M SV Próximo al punto final de la titulación, añadir 3 gotas de almidón SI y proseguir con la titulación hasta desaparición del color azul.

### *Ensayo en blanco*

Añadir 20,0 ml de yodo 0,005 M SV cada matraz conteniendo 2,0 ml de la *preparación estándar*. Si la *preparación estándar* contiene amoxicilina o ampicilina, añadir inmediatamente 0,1 ml de ácido clorhídrico 1,2 M. Titular con tiosulfato de sodio 0,01 M SV. Próximo al punto final de la titulación, añadir 3 gotas de almidón SI y proseguir con la titulación hasta desaparición del color azul. Proceder de forma similar para matraz conteniendo 2,0 ml de la *preparación muestra*.

$$F = \frac{2(C_p \times P_p)}{V_b - V_i}$$

en que

$C_p$  = concentración, en mg/ml, de la sustancia química de referencia en la *preparación estándar*;

$P_p$  = potencia, en µg/mg o Unidades/mg, de la sustancia química de referencia;

$V_b$  = volumen del titulante, en ml, consumido en *Ensayo en blanco*;

$V_i$  = volumen del titulante, en ml, consumido en *Inactivación y titulación*.

## 5.4 MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA

### 5.4.1 EXAMEN VISUAL E INSPECCIÓN MICROSCÓPICA

#### 5.4.1.1 EXAMEN VISUAL, OLOR Y SABOR

La identidad, pureza y calidad de un material vegetal deben ser establecidas mediante detallado examen visual, macroscópico y microscópico. Siempre que posible, el material vegetal debe ser comparado con materia prima auténtica, oriunda de muestra perfectamente identificada en la Farmacopea. La muestra que no sea semejante en color, consistencia, olor y sabor debe ser descartada por no presentar los requisitos mínimos especificados en las monografías. La identificación macroscópica de las drogas, cuando están enteras, es basada en la forma; tamaño; color; superficie; textura; fractura y apariencia de la superficie de fractura. En virtud de que esas características de identificación son subjetivas y existen adulterantes muy parecidos, es necesario realizar, al mismo tiempo, análisis microscópico y físico-químico de la muestra. La inspección microscópica es indispensable cuando el material esté rasurado o en polvo.

#### *Tamaño*

Medidas de largo, ancho y espesor deben coincidir con aquellas citadas en las monografías. Frutos y semillas pequeños exigen una muestra igual a diez unidades y posteriores cálculos del promedio y del desvío estándar.

#### *Color*

Examinar la materia prima antes de cualquier tratamiento, a la luz del día o bajo lámparas de largo de onda similares



a los de la luz del día. El color de la muestra debe ser comparado con el material de referencia.

#### *Superficie, textura y fractura*

Examinar la materia prima antes de cualquier tratamiento. Cuando necesario, utilizar lente de cinco hasta diez aumentos. Cuando indicado en la monografía, humedecer con agua o reactivo especificado para observar características de la superficie de fractura. Tocar el material para verificar se es blando o duro, doblar y partir el material para la obtención de informaciones cuanto a la fragilidad y apariencia de la fractura, si es fibrosa, lisa, rugosa, granulada, entre otras.

#### *Olor*

Antes de verificar el olor del material, certificarse de que no existe riesgo. Colocar una pequeña muestra en la palma de la mano o en recipiente de vidrio e inhalar despacio y repetidamente. Si el olor es indistinto, presionar parte del material entre los dedos e inhalar nuevamente. Cuando la monografía indique material tóxico, colocar un poco de material aplastado en agua caliente. Primeramente, determinar la intensidad del olor: ninguno; suave; distinto o fuerte y, a continuación, la sensación causada por el olor: aromático; frutado; mofado o rancio. Cuando sea posible, es importante la comparación del olor con sustancia definida, como, por ejemplo, menta pimenta debe tener olor similar al mentol y clavo de olor, similar al eugenol.

#### *Sabor*

Probar el sabor apenas cuando exigido en la monografía.

### **5.4.1.2 PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA ANÁLISIS MICROSCÓPICA**

#### **ABLANDAMIENTO DEL MATERIAL**

Los órganos y tejidos vegetales empleados normalmente se presentan secos, y para ser observados al microscopio, es conveniente primero ablandarlos mediante tratamiento con agua caliente. El tiempo necesario para el ablandamiento de cada órgano vegetal o sus partes varía de acuerdo con su textura. Tratándose de órgano recién colectado, apenas los de consistencia más firme necesitan de tal tratamiento.

#### *Método de hidratación para materiales secos*

Colocar la muestra en solución de hidratación, preparada con cinco partes de agua, cuatro partes de etanol, una parte de glicerina y cinco gotas de detergente comercial para cada 200 ml de solución, en estufa a 60 °C, por, como mínimo, 48 horas.

#### **EJECUCIÓN DE LOS CORTES**

Una vez ablandados, proceder a la preparación de los cortes de los órganos vegetales o sus partes. Las secciones pueden ser realizadas con el auxilio de objeto cortante como navaja, hoja de afeitar o bisturí, para cortes a mano. A fin

de ser seccionada, incluir la muestra en material adecuado, que permita fijar el fragmento. Secciones de mejor calidad pueden ser obtenidas con el empleo de micrótomos. Hay, básicamente, tres tipos de micrótomos: los de congelamiento, usados para los materiales más frágiles; los rotativos, para cortes en serie de material incluido en parafina; y los de guía, para aquellos materiales más resistentes, como ramas, partes de tallos y de raíces. En ese último caso, un método relativamente fácil de preparado del material a ser seccionado consiste en su inclusión en macrogol soluble en agua o en historresina.

#### *Inclusión del material en parafina*

- Hervir la muestra en agua, cuando seca, para ablandar y retirar el aire;
- deshidratar la muestra en serie de etanol diluido en agua: 50, 70, 80, 96% y, por último, en etanol absoluto;
- transferir la muestra para mezcla de etanol absoluto y xileno en la proporción 3:1 (v/v) y, a continuación, para 1:1 y 1:3;
- transferir la muestra para xileno puro;
- transferir la muestra para xileno en parafina en la proporción 1:1, manteniéndola en estufa;
- transferir la muestra para parafina calentada, para que ocurra la infiltración, manteniéndola en la estufa hasta que permanezca depositada en el fondo del recipiente;
- emblocar y dejar enfriar en recipiente con agua helada;
- seccionar el bloque para introducción en el micrótomos;
- seccionar el material y colocar en lámina de vidrio previamente untada con adhesivo de Haupt o Bissing;
- colocar las láminas sobre placa calentadora para distender los cortes;
- desparafinizar;
- guardar, como mínimo, una hora antes de colorear.

#### *Inclusión del material en macrogol (polietilenglicol – PEG 4000 o PEG 6000)*

- Hervir la muestra en agua, cuando seca, para ablandar y retirar el aire;
- colocar la muestra en vaso de precipitados, conteniendo macrogol a 20% (p/v);
- marcar el vaso de precipitados, a partir de la superficie del líquido, dividiéndolo en cinco partes aproximadamente iguales;
- dejar el material en estufa a 65 °C por 3 a 4 días;
- cuando la solución se evapore hasta 1/5 de su volumen inicial, transferir la muestra para macrogol puro y fundido donde debe permanecer durante 12 a 25 horas, en estufa a 65 °C;
- retirar de la estufa, emblocar y dejar enfriar a temperatura ambiente;
- seccionar los bloques para introducción en el micrótomos;
- seccionar el material a seco;
- lavar los cortes con agua y colorear.

#### *Inclusión en historresina*

Existen diferentes marcas de historresina en el mercado, comercializadas en kits, siendo la metodología para em-

blocamiento característica de cada fabricante. Obedecer al manual de instrucciones. Todas contienen tres elementos principales: una resina, un agente endurecedor y un agente acelerador o catalizador. La mezcla y temperatura deben seguir las especificaciones, para que haya completa interacción, obteniéndose como producto final un polímero. Los materiales vegetales deben ser previamente fijados y deshidratados. Se sugiere que las secciones a ser emblocadas sean inmersas en la resina durante una noche, para que haya completa infiltración. Sólo después de, sustituir la resina de infiltración por la mezcla de nueva porción de resina, agente endurecedor y agente acelerador. La resina de infiltración puede ser reutilizada de dos a cuatro veces, debiendo entonces ser descartada. Los cortes son colocados sobre las láminas sin adhesivo. Colorear.

## MÉTODOS DE COLORACIÓN

Los métodos de coloración pueden comprender la aplicación de un sólo colorante (coloración simple) o de dos o tres colorantes diferentes (coloración compuesta).

*Coloración simples (algunos colorantes pueden ser usados)*

- Solución de safranina a 1% (p/v) en etanol: coloración de cutina, lignina y suberina.
- Solución de Verde rápido a 0,5% (p/v) en etanol: coloración de celulosa.
- Azul de Astra a 1% (p/v) en etanol: coloración de compuestos pécticos de la laminilla media y pared.
- Floroglucina SR: coloración de lignina.

*Coloración compuesta (algunas mezclas de colorantes que pueden ser usadas)*

- Safranina-Azul de Astra: coloree la lignina de rojo y la celulosa de azul. Colocar la muestra en solución acuosa de safranina a 1% (p/v) de 5 a 25 minutos. Lavar dos veces con agua destilada. Colocar en Azul de Astra por 10 a 25 minutos. Lavar dos veces con agua destilada. Pasar por batería de etanol a 50%, 70%, 90%, 96%, y etanol absoluto (dos veces), xileno. Montar en láminas con bálsamo del Canadá o resina sintética.
- Safranina-Verde rápido: coloree la lignina de rojo y la celulosa de verde. No desparafinizar las láminas. Colocar en solución acuosa de safranina a 1% (p/v) por 10 a 20 minutos (o más). Lavar en agua corriente. Colocar en agua destilada por 1 minuto. Escurrir el agua de la lámina. Colocar en Verde rápido a 0,5% (p/v) en etanol de 10 a 40 minutos. Lavar en agua corriente. Colocar en agua destilada por 1 minuto. Repetir la operación. Escurrir el agua de la lámina. Secar en placa calentadora por 30 minutos. Retirar la parafina con xileno en dos cambios de 5 minutos. Montar en láminas con bálsamo de Canadá o resina sintética.

## PREPARADO Y MONTAJE DE LAS LÁMINAS

Los cortes histológicos son montados, entre lámina y cubreobjetos, en agua, glicerol, hidróxido de potasio a 30% (p/v), hidrato de cloral a 50% (p/v), u otro líquido cualquier

que posibilite la observación. El glicerol es más usado en los estudios microquímicos de mucílagos, goma, inulina y aleurona. El hidróxido de potasio es agente diafanizador, teniendo acción sobre proteínas, almidón, grasa, resinas y materias colorantes. El hidrato de cloral, también, es agente diafanizador y, a pesar de su acción más lenta que los hidróxidos alcalinos, tiene la ventaja de no disolver el oxalato de calcio.

Dependiendo de la finalidad a que se destina, se pueden montar los cortes en láminas para observación inmediata o en láminas dichas permanentes.

En las preparaciones para observación, inmediata, después de seleccionados y coloridos, se montan los cortes en medio adecuado, tomándose el cuidado de evitar la formación de burbujas de aire. Si el examen fuese más prolongado, se recomienda revestir los bordes del cubreobjetos de un luto (sello), que puede ser esmalte de uñas, bálsamo de Canadá o solución alcohólica de goma laca, para evitar la evaporación del medio de montaje, todos ellos aplicables con el auxilio de pincel suave y pequeño.

En las preparaciones, permanentes, después de seleccionados y coloridos, los cortes deben ser montados entre lámina y cubreobjetos, con resina sintética, bálsamo de Canadá u otro medio conveniente. Se debe mantener el montaje comprimido por medio de la aplicación de pequeños pesos sobre el cubreobjetos, en posición perfectamente horizontal y sobre papel de filtro, con la finalidad de evitar posibles excesos del medio de montaje.

## MACERACIÓN DE LOS TEJIDOS

Secciones de tallos, raíces, cáscaras u otras partes vegetales ni siempre dan idea precisa de la naturaleza real de sus células. Lo mismo acontece con materia prima comercializada, cuando rasurada o en polvo. Para revelar algunas particularidades, como, por ejemplo, engrosamientos y puntuaciones, se debe emplear uno de los métodos indicados para la disociación de tejidos. En esos métodos, la estructura a ser estudiada es tratada con sustancias químicas capaces de disolver la laminilla media y, de esa forma, posibilitar la separación de las células.

*Método de disociación de tejidos*

- Cortar el material en pequeños fragmentos o en láminas con cerca de 300 nm de espesor y colocar en agua;
- retirar todo el aire del material, hirviendo y enfriando rápidamente;
- macerar el material en solución de Jeffrey. El tiempo de maceración varía con la naturaleza del material. Generalmente las células comienzan a separarse en cerca de 24 horas. si necesario, puede ser usado bastón de vidrio de punta arredondada para amasar muy levemente el material.
- Habiendo dificultad en la separación de las células, renovar la solución maceradora;
- lavar muy bien el material con agua de grifo, para retirar los ácidos. Verter la mezcla con el tejido macerado para un embudo conteniendo papel de filtro;

- cerrar la abertura inferior del embudo y cubrir el macerado con solución acuosa de safranina a 1% (p/v), durante tiempo suficiente para buena coloración del material (de 15 minutos a 6 horas);
- abrir la punta del embudo y lavar nuevamente con agua, hasta retirar el exceso de colorante;
- deshidratar por la adición de soluciones de etanol a 50%, 70%, 90% y etanol absoluto; retirar con pinza el macerado del papel de filtro y colocar en xileno;
- montar entre lámina y cubreobjetos, con resina sintética o bálsamo de Canadá;
- mantener la lámina en posición horizontal, sin embargo no utilizar peso sobre el cubreobjetos, pues las células maceradas son muy frágiles.

## OBSERVACIÓN DE LA EPIDERMIS FOLIAR

### *Separación de la epidermis con solución de Jeffrey*

- Para obtener epidermis foliar, seccionar pequeños pedazos de hoja y colocarlos en solución de Jeffrey diluida en agua destilada a 50% (v/v), tapar el recipiente y dejar de 12 a 48 horas, de acuerdo con la textura de la hoja (la solución atacará el mesófilo, dejando la epidermis aislada);
- cuando el mesófilo esté destruido, lavar las muestras varias veces con agua destilada;
- colocar una muestra sobre lámina, seccionar entre las epidermis y colocar las dos partes de forma que las frentes externas estén dirigidas para cima;
- corar el material sobre la lámina con solución etanólica de safranina a 1% (p/v);
- preparar la lámina con gelatina glicerizada y sellar.

### *Separación de la epidermis con hidrato de cloral*

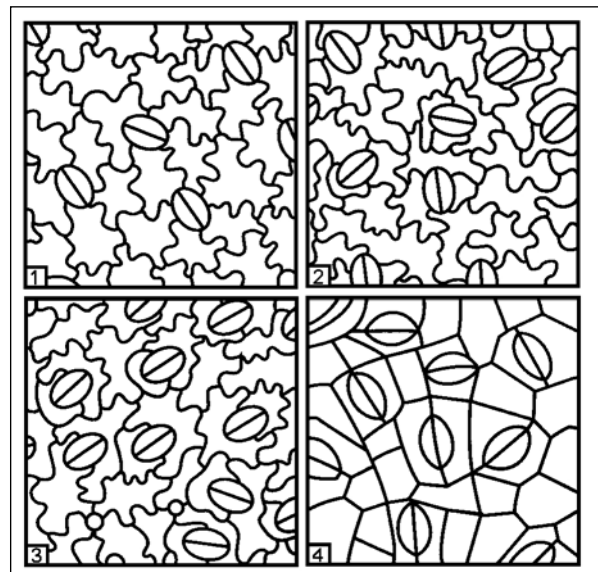
- Usar fragmentos de hojas de cerca de 0,5 cm de ancho por 0,5 cm de largo;
- colocar los fragmentos en un tubo de ensayo, adicionando 5 ml de hidrato de cloral, calentar en baño maría por cerca de 15 minutos o hasta que los fragmentos se queden transparentes;
- transferir los fragmentos para una lámina, cuidando para que la frente abaxial quede dispuesta para arriba;
- añadir una gota de hidrato de cloral y una gota de etanol glicerizado y cubrir con cubreobjetos para impedir la deshidratación. Sellar.

### *Clasificación de los estomas y determinación del índice estomático*

La clasificación empleada, didácticamente, para determinación de los tipos de estomas (**Figura 1**), se basa en la forma y disposición de las células que los rodean. Los tipos básicos son:

1. Anomocítico (células irregulares): los estomas están rodeados por un número variable de células que no difieren, en general, en ninguna característica de las otras células fundamentales de la epidermis;

2. Anisocítico (células desiguales): los estomas son normalmente rodeados por 3 o 4 células subsidiarias, siendo una de ellas, nítidamente, menor del que las otras;
3. Diacítico (células transversales): los estomas son acompañados por 2 células subsidiarias, cuyas paredes comunes forman un ángulo recto con las células de guarda de los estomas;
4. Paracítico (células paralelas): los estomas presentan de cada lado una o varias células subsidiarias paralelas al eje longitudinal del ostiolo y a las células de guarda de los estomas.



**Figura 1 - Tipos de estomas. 1. anomocítico; 2. anisocítico; 3. diacítico; 4. paracítico.**

### *Índice estomático*

El índice de estomas es calculado según la ecuación  $100S / (E + S)$ , siendo  $S$  el número de estomas en un área determinada de la superficie de la hoja y  $E$  el número de células epidérmicas, incluyendo los tricomas, existentes en el mismo campo microscópico observado. Para cada muestra de hojas, efectuar y calcular la media de, como mínimo, diez determinaciones.

### ANÁLISIS DEL POLVO (IDENTIFICACIÓN DE MATERIA PRIMA COMERCIALIZADA EN POLVO)

- Colocar 1 o 2 gotas de agua, o glicerol-etanol (1:1) o hidrato de cloral en una lámina;
- añadir un poco del polvo y mezclar con un pincel fino y suave;
- cubrir con cubreobjetos y observar al microscopio;
- otros fluidos pueden ser usados con la misma técnica;
- colorantes o reacciones histoquímicas pueden ser utilizados.

## REACCIONES HISTOQUÍMICAS

Las reacciones pueden ser hechas con material fresco seccionado o material cortado en micrótopo e incluido en parafina o macrogol, adicionándose una gota de los reactivos sobre una lámina con una sección de la muestra.

**Almidón.** Añadir una gota de yodo SR. El almidón adquiere coloración azul o azul violeta.

**Carbonato de calcio.** Añadir ácido acético a 6% (p/v) o ácido clorhídrico a 7% (p/v). Cristales o depósitos de carbonato de calcio se disuelven lentamente, con producción de efervescencia.

**Hidroxiantraquinonas.** Añadir una gota de hidróxido de potasio a 5% (p/v). Las células que contienen 1,8-diidroxiantraquinonas colorean de rojo.

**Inulina.** Añadir 1 gota de 1-naftol SR y ácido sulfúrico. Esferocristales de inulina se colorean de violeta rojizo y se disuelven.

**Lignina.** Añadir 1 gota de floroglucina SR, calentar rápidamente la lámina y añadir una gota de ácido clorhídrico a 25% (p/v). La lignina se torna roja.

**Lípidos.** Añadir Sudan III SR o Sudan IV SR por 10 minutos, lavar rápidamente con etanol a 70% (v/v). Lípidos, cutina y suberina se colorean de naranja rojizo.

**Mucílagos.** Añadir 1 gota de tinta china sobre muestra seca. El mucílago aparece como fragmentos esféricos dilatados y transparentes sobre un fondo negro. La caracterización, también, puede ser realizada por la adición de 1 gota de tionina SR a la muestra seca, dejando reposar por 15 minutos, seguida de lavado en etanol a 20% (v/v). El mucílago se torna violeta rojizo (lignina y celulosa toman color azul o azul violeta).

**Oxalato de calcio.** Cristales de oxalato de calcio son insolubles en ácido acético a 6% (p/v) y solubles en ácido clorhídrico a 7% (p/v), sin producir efervescencia.

**Proteínas.** Añadir ninhidrina a 0,5% (p/v) en etanol absoluto, y mantener a 37 °C por 24 horas. Lavar en etanol absoluto y en agua destilada, añadir fucsina descolorida SR y dejar en contacto por 10 a 30 minutos. Lavar en agua y añadir bisulfito de sodio a 2% (p/v), dejar en contacto por 1 a 2 minutos. Lavar en agua corriente de 10 a 20 minutos, deshidratar y montar la lámina. Las proteínas se colorean de rojo púrpura. Realizar ese procedimiento solamente con material fresco.

**Saponinas.** Añadir una gota de ácido sulfúrico. Ocurre una secuencia de color amarillo, seguida de color rojo y, finalmente, color violeta o azul verdoso.

**Taninos.** Añadir cloruro férrico a 10% (p/v) y una pequeña cantidad de carbonato de sodio, dejar en contacto por 2 a 3 minutos, lavar con agua destilada. Los taninos se colorean de azul verdoso.

## 5.4.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DROGAS VEGETALES

### 5.4.2.1 MUESTREO

Los procedimientos de muestreo especificados tienen en consideración tres aspectos: (a) número de embalajes que contienen la droga; (b) grado de división de la droga y (c) cantidad de droga disponible.

#### NÚMERO DE EMBALAJES

Examinar la integridad de los recipientes de embalaje y la naturaleza de la droga en ellos contenida. Habiendo homogeneidad, tomar muestras conforme especificado en la **Tabla 1**.

**Tabla 2 - Número de embalajes a ser muestreados de acuerdo con el número de embalajes existentes.**

<i>Número de embalajes</i>	<i>Número de embalajes a ser muestreados</i>
1 a 3	Todos
4 a 10	3
11 a 20	5
21 a 50	6
51 a 80	8
81 a 100	10
Más de 100	10% del total de embalajes



## GRADO DE DIVISIÓN Y CANTIDAD DE DROGA

Consistiendo la droga de componentes de dimensiones inferiores a 1 cm o cuando ella se constituye de material finamente fragmentado o pulverizado, emplear aparato de muestreo (tubo provisto de dispositivo de cierre en la base). Recolectar muestras de arriba para abajo y de abajo para arriba (dirección vertical) y lateralmente (dirección horizontal), sumando muestra de, como mínimo, 250 g hasta 100 kg de droga. Habiendo más de 100 kg a muestrear, proceder al muestreo seguida de selección por cuarteamiento, generando muestra de 250 g en el final del proceso.

Para drogas con dimensiones superiores a 1 cm, proceder al muestreo manual. Combinar las muestras retiradas de cada embalaje abierto, tomando la precaución de no aumentar su grado de fragmentación durante la manipulación. Para cantidades de droga hasta 100 kg, a muestra debe constituirse de, como mínimo, 500 g. Habiendo más de 100 kg de droga a muestrear, proceder al muestreo seguida de selección por cuarteamiento, generando muestra de 500 g en el final del proceso.

En ambos los casos, drogas con dimensiones inferiores o superiores a 1 cm, es permitido muestrear cantidades inferiores a las especificadas arriba desde que la cantidad total de droga disponible sea inferior a 10 kg. Todavía, la muestra final no deberá ser inferior a 125 g.

## CUARTEAMIENTO

Distribuir la droga sobre área cuadrada, en cuatro partes iguales. Con la mano distribuir la droga sobre el área de modo homogéneo y rechazar las porciones contenidas en dos cuadrados opuestos, en una de las diagonales del cuadrado. Juntar las dos porciones restantes y repetir el proceso, si necesario. Habiendo diferencia acentuada en dimensiones de fragmentos, ejecutar separación manual y anotar los porcentuales aproximados de los componentes de diferentes grados de división encontrados en la muestra.

### 5.4.2.2 DETERMINACIÓN DE MATERIA EXTRAÑA

Los fármacos vegetales son exentos de hongos, de insectos y de otras contaminaciones de origen animal. Salvo indicación en contrario, el porcentaje de elementos extraños no debe ser superior a 2% m/m. Materia extraña a la droga es clasificada en tres tipos: (a) partes del organismo u organismos de los cuales la droga deriva, exceptuados aquellos incluidos en la definición y descripción de la droga, arriba del límite de tolerancia especificado en la monografía; (b) cualquier organismo, porciones o productos de organismos además de aquellos especificados en la definición y descripción de la droga, en su respectiva monografía; y (c) impurezas de naturaleza, minerales u orgánicas, no-inherentes a la droga.

## PROCEDIMIENTO

Determinar la cantidad de muestra a ser sometida al ensayo conforme especificado a continuación.

- Raíces, rizomas, cascaras, planta entera y partes aéreas: 500 g;
- hojas, inflorescencias, semillas y frutos: 250 g;
- materiales particulados o fraccionados (peso medio inferior a 0,5 g/componente): 50 g;
- polvos: 25 g.

Recoger, por cuarteamiento, la cantidad de muestra especificada, a partir de la muestra obtenida, según el procedimiento descrito anteriormente, y desparramarla en camada fina sobre la superficie plana. Separar, manualmente los materiales extraños a la droga, inicialmente a ojo y, en seguida, con auxilio de lente de aumento (cinco a diez veces). Pesar el material separado y determinar su porcentaje con base en el peso de la muestra sometida al ensayo.

### 5.4.2.3 DETERMINACIÓN DE AGUA EN DROGAS VEGETALES

Tres métodos son empleados para la determinación de agua en drogas vegetales: método gravimétrico (deseccación), método azeotrópico (destilación con tolueno) y método volumétrico (Karl Fischer). El primero, técnicamente más simple y rápido, no es aplicable cuando la droga contiene sustancias volátiles. Los demás requieren equipos especiales y comprenden técnicas más complejas.

## PREPARADO DE LA MUESTRA

Reducir por corte, granulación o fragmentación drogas no pulverizadas o trituradas para limitar la dimensión de sus componentes a, como máximo, 3 mm de espesor. Semillas y frutos, aunque sea de dimensiones inferiores a 3 mm, deben ser quebrados. Evitar moledores de alta velocidad u otros procedimientos que acarreen pérdida de humedad de la muestra.

### *Método gravimétrico*

Transferir cerca de 2 a 5 g, o lo especificado, en la monografía, exactamente pesados, de muestra preparada conforme instrucciones anteriores, para pesafiltro tarado, previamente desecado en las mismas condiciones a ser adoptadas para la muestra, durante 30 minutos. Desecar la muestra a 100/105 °C durante 5 horas, hasta peso constante. Calcular el porcentaje de agua con relación a la droga seca al aire.

### *Método volumétrico*

Proceder conforme descrito en *Determinación de agua (5.2.20.1)*.

### *Método azeotrópico*

Proceder conforme descrito en *Determinación de agua (5.2.20.2)*.

## DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES

Las cenizas totales incluyen cenizas fisiológicas y cenizas no- fisiológicas.



## PROCEDIMIENTO

Pesar, exactamente, cerca de 3 g de la muestra pulverizada, o la cantidad especificada en la monografía, transferir para crisol (de silicio o platino) previamente tarado. Distribuir la muestra uniformemente en el crisol e incinerar aumentando, gradualmente, la temperatura hasta, como máximo,  $600 \pm 25$  °C, hasta que todo el carbón sea eliminado. Un gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C y 90 minutos a 600 °C) puede ser utilizado. Enfriar en desecador y pesar. En los casos en que el carbón no pueda ser eliminado totalmente, enfriar el crisol y humedecer el residuo con cerca de 2 ml de agua o solución saturada de nitrato de amonio. Evaporar hasta sequedad en baño maría y, en seguida, sobre chapa caliente, e incinerar hasta peso constante. Calcular el porcentaje de cenizas con relación a la droga seca al aire.

## DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO

Cenizas, insolubles en ácido, constituyen, el residuo obtenido en la ebullición de cenizas totales, o sulfatadas con ácido clorhídrico diluido después de filtrado; lavado e incineración. El método se destina a la determinación de sílice y constituyentes silícicos de la droga.

## PROCEDIMIENTO

Hervir el residuo obtenido en la determinación de cenizas totales durante 5 minutos con 25 ml de ácido clorhídrico a 7% (p/v) en crisol cubierto con vidrio de reloj. Lavar el vidrio de reloj con 5 ml de agua caliente, juntando el agua de lavado al crisol. Recolectar el residuo, insoluble en ácido, sobre papel de filtro, exento de ceniza, lavándolo con agua caliente hasta que el filtrado se muestre neutro. Transferir el papel de filtro conteniendo el residuo para el crisol original, secar sobre chapa caliente e incinerar a cerca de 500 °C hasta peso constante. Calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido con relación a la droga seca al aire.

## 5.4.2.6 DETERMINACIÓN DE CENIZAS SULFATADAS

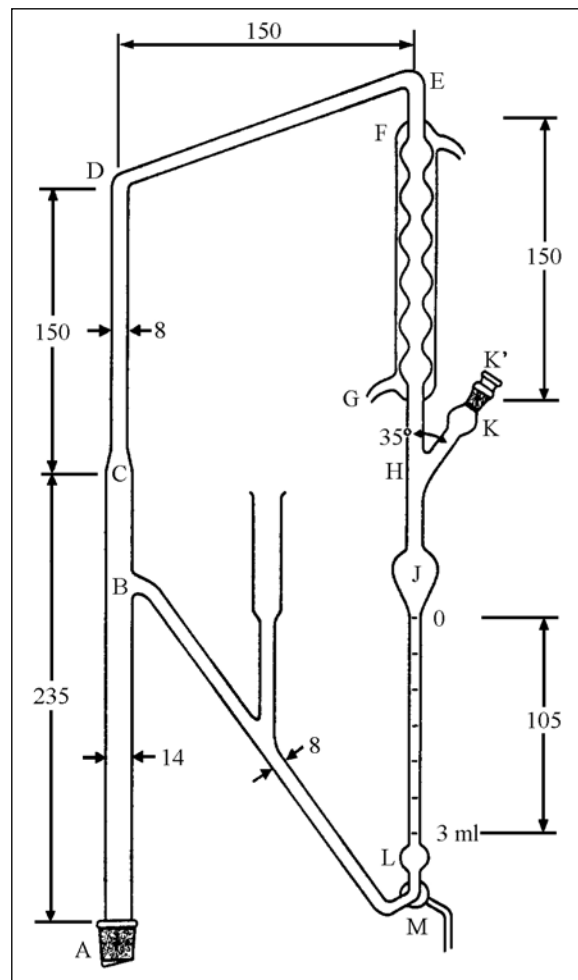
## PROCEDIMIENTO

Calentar al rojo por 10 minutos un crisol de porcelana, dejar enfriar en un desecador y pesar. Colocar exactamente cerca de 1,0 g de la droga en el crisol previamente tarado y humedezca la droga con ácido sulfúrico concentrado y carbonice en mechero de Bunsen. Humedezca nuevamente con ácido sulfúrico concentrado, carbonice e incinere con calentamiento gradual hasta 800 °C. Enfríe, pese nuevamente, incinere por 15 minutos más. Repita ese procedimiento hasta que la diferencia entre dos pesajes sucesivas no sea mayor que 0,5 mg.

## 5.4.2.7 DETERMINACIÓN DE ACEITES VOLÁTILES EN DROGAS VEGETALES

El tenor de aceites volátiles en drogas vegetales es determinado por el proceso de destilación por arrastre de vapor, con auxilio de equipo descrito a continuación.

El equipo (**Figura 1**), confeccionado en vidrio resistente, de calidad apropiada, comprende:



**Figura 1** - aparato para determinación del tenor de aceites volátiles en drogas vegetales por el proceso de destilación por arrastre de vapor.

1. balón de fondo redondo de 500 ml a 1000 ml de capacidad, de cuello corto, provisto de una junta 24/40, hembra;
2. condensador, adaptable al balón por medio de una junta esmerilada 24/40, macho, construido en pieza única de vidrio, comprendiendo las partes descritas a continuación, con las respectivas medidas:
  - 2.1. tubo vertical (AC) de 210 a 260 mm de largo y 13-15 mm de diámetro interno;
  - 2.2. tubo doblado, con segmentos (CD) y (DE) midiendo 145-155 mm de largo cada y diámetro interno de 8 mm;
  - 2.3. condensador de bolas, tipo Allihn (FG), de 145-155 mm de largo y diámetro interno de 15 mm en las bolas y 10 mm en los estrechamientos;

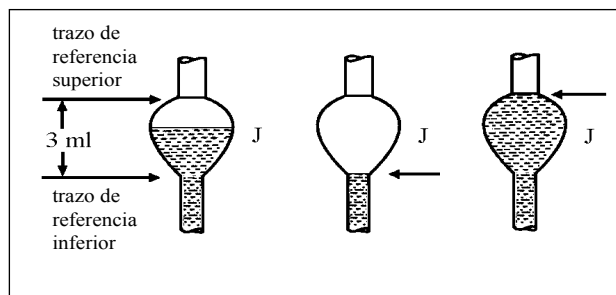
- 2.4. tapón (junta esmerilada 14/20) (K') conteniendo orificio de cerca de 1 mm de diámetro, que obtura una salida lateral (K) provista de junta esmerilada 14/20 hembra, en la extremidad;
  - 2.5. tubo (GH) de 30-40 mm de largo y 7-8 mm de diámetro interno, formando las partes (HK) ángulo (GHK) de 30° a 40°;
  - 2.6. alargamiento en forma de pera (J) de 3 ml de capacidad;
  - 2.7. tubo (JL) provisto de escala graduada de 100-110 mm; de 3 ml de capacidad y subdividida en vigésimos de mililitro;
  - 2.8. alargamiento en forma de bola (L) de aproximadamente 2 ml de capacidad;
  - 2.9. grifo de 3 vías;
  - 2.10. tubo de conexión (BM) de 7-8 mm de diámetro, provisto de tubo de seguridad. El punto de inserción (B) se encuentra a 20-25 mm arriba de la parte más alta de la escala graduada;
3. fuente de calor que puede ser calentador eléctrico o quemador de gas dotado de regulación fina de la llama;
  4. soporte vertical adecuado.

Antes de la utilización, el aparato debe ser limpiado por lavados repetidos y sucesivos con acetona, agua, mezcla sulfocrómica y nuevamente agua. Después de seco, debe ser montado en local protegido de corrientes de aire. La escala graduada debe ser medida y, si necesario, establecer factor de corrección para cada aparato.

#### PROCEDIMIENTO

Introducir en el balón el volumen del líquido indicado en la monografía y fragmentos de porcelana porosa o cuentas de vidrio para regularizar la ebullición. Adaptar el condensador al balón. Retirar el tapón esmerilado (K') y, por la abertura (K), introducir el agua hasta que esta comience a escurrir en (B). Usando pipeta volumétrica, introducir xileno, en la cantidad prescrita, apoyándose la punta de la pipeta en el fondo de la salida lateral (K). Calentar el líquido en el interior del balón hasta el inicio de la ebullición y destilar en la razón de 2 a 3 ml por minuto, o conforme prescrito en la monografía.

Para determinar la velocidad de la destilación, drenar el agua con auxilio de grifo de tres vías, hasta que el menisco esté en el nivel del trazo de referencia inferior (**Figura 2**). Cerrar el grifo y cronometrar el tiempo necesario para llenar el volumen comprendido entre los trazos de referencia inferior y superior (3 ml). Abrir el grifo y continuar la destilación por 30 minutos. Desligar el calentamiento, dejar enfriar por 10 minutos y hacer la lectura del volumen de xileno en el tubo graduado.



**Figura 2** - Indicación para determinar la velocidad de destilación.

Introducir en el balón a cantidad de droga prescrita en la monografía y destilar por arrastre de vapor, como descrito arriba, por el tiempo y en la velocidad indicada en la monografía. Terminada la operación, dejar enfriar por 10 minutos y leer el volumen del aceite esencial recogido en el tubo graduado. Sustraer de la lectura el volumen del xileno determinado anteriormente. La diferencia representa la cantidad de aceite esencial contenido en la muestra. Calcular el resultado en mililitros de aceite esencial por 100 g de la droga.

#### 5.4.2.8 DETERMINACIÓN DE ACEITES FIJOS

La determinación de aceites fijos se basa en su extracción por solvente que, después de evaporado, deja como residuo el aceite cuya cantidad es determinada por pesaje.

En el caso de que la muestra contenga tenor elevado de componentes hidrosolubles (carbohidratos, urea, ácido láctico, entre otros), cabe pretratamiento de la muestra a fin de evitar interferencia en la determinación de materias grasas. Para tanto, transferir la porción de ensayo para embudo conteniendo papel de filtro, lavar con agua y secar el residuo en estufa a 105 °C durante 2 horas.

Emplear el aparato de Soxhlet (**Figura 1**). El equipo, confeccionado en vidrio resistente, de calidad apropiada, comprende balón de fondo redondo (A), con 500 ml a 1000 ml de capacidad, conectado al extractor Soxhlet (B) y condensador de reflujo (C).

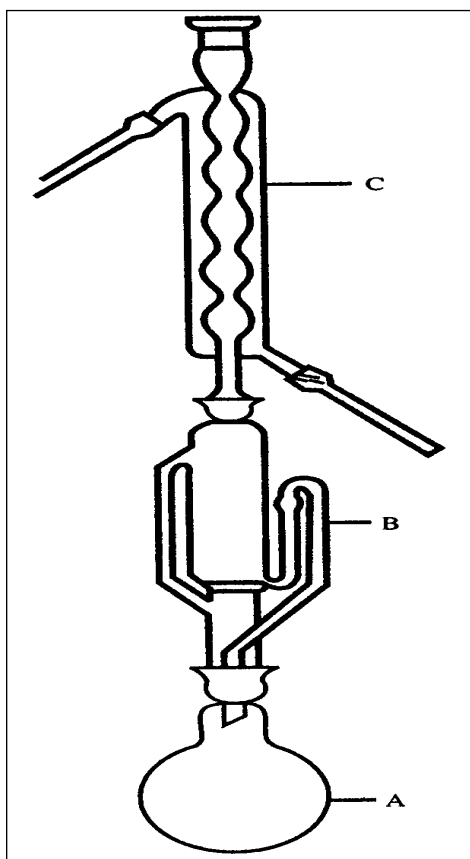


Figura 3 - Aparato de Soxhlet.

Antes de la utilización, el aparato debe ser limpiado por lavados repetidos y sucesivos con acetona, agua, mezcla sulfocrómica y, nuevamente, agua. Después de seco, debe ser montado en local protegido de corrientes de aire.

#### PROCEDIMIENTO

Transferir, exactamente, cerca de 10 g de droga previamente desecada conforme descrito en *Determinación de agua en drogas vegetales (5.4.2.3), Método gravimétrico*, y transferir para aparato extractor de Soxhlet (B), cubriéndola con algodón desengrasado. Pesar el balón (A) limpio y seco (conteniendo fragmentos de porcelana o cuentas de vidrio) y montarlo en el aparato sobre baño maría, tomando la precaución de asegurar sellado en la junta esmerilada del balón (se recomienda operación en campana). Transferir para el extractor éter de petróleo en cantidad suficiente para realizar tres sifonajes y encajar el condensador de reflujo (C). Proceder a la extracción bajo calentamiento suficiente para mantener el solvente en ebullición moderada durante 4 horas.

Concluida la extracción, aguardar enfriamiento, transferir el contenido del cartucho para mortero de porcelana y juntar cantidad aproximadamente igual de arena lavada y seca. Pulverizar la droga y transferirla nuevamente, en el interior del cartucho, para el extractor. Reiniciar y mantener a extracción en las condiciones arriba por período adicional de 2 horas. Desligar el balón del aparato y evaporar el solvente (de preferencia por destilación bajo corriente de dióxido de carbono). Transferir el balón para estufa a 105 °C, enfriar y pesar. Repetir la operación hasta peso constante. Calcular el

porcentaje de aceites fijos en la droga con base en la masa de droga pesada y en la masa de aceite obtenida.

#### 5.4.2.9 DETERMINACIÓN DE 1,8-CINEOL EN ACEITES ESSENCIAIS

La determinación de cineol comprende la determinación de la temperatura de congelamiento (criometría) del compuesto de combinación molecular entre cineol y *el*-cresol-cresineol. Siendo esa temperatura proporcional al contenido de cineol en el compuesto, es posible establecerse su tenor por el análisis de los datos registrados en la **Tabla 1**.

El método es empleado en la dosificación de cineol en esencias de eucalipto y niaouli. Determinaciones en otras esencias no son recomendadas sin comprobación previa de exactitud en vista de que algunos constituyentes del aceite esencial solubilicen el cresineol (mismo en la esencia de eucalipto, hay riesgos de error cuando el contenido de alfa-terpineol es superior a 12,5%).

Errores, también, vienen de la presencia de humedad, sea en la esencia o en el *el*-cresol. El *el*-cresol empleado debe ser puro y seco, presentando punto de fusión superior a 30 °C. Debe ser conservado en frasco hermético, por ser higroscópico.

#### PROCEDIMIENTO

Secar la muestra del aceite esencial en ensayo, agitándola en mezcla con sulfato de sodio o con cloruro de calcio, anhidros, en tubo de ensayo o en Matraz provisto de tapa esmerilada. Dejar en contacto durante 24 horas y filtrar. Transferir para tubo de ensayo (cerca de 15 mm de diámetro y 80 mm de altura) 3,0 g de aceite esencial, exactamente, pesados y añadir 2,1 g de *o*-cresol en sobrefusión. Agitar la mezcla con bulbo de termómetro (0 – 60 °C, graduado en décimos de grado) suspenso sobre el tubo de modo que la extremidad del bulbo no exceda el límite de 5 mm de la base del tubo y sin tocar en sus paredes, hasta inducción de cristalización. Anotar la temperatura máxima observada en el termómetro durante la cristalización. Calentar el tubo a cerca de 5-10 °C arriba de la temperatura leída e introducirlo en otro tubo mayor (cerca de 60 mm de diámetro y 100 mm de altura) para crear camada de aire. Fijar el tubo menor dentro del otro con auxilio de placas de corcho adaptadas o por cualquier otro medio y sumergir el conjunto en baño de agua con temperatura controlada, manteniendo la temperatura cerca de 5 °C abajo del punto de congelamiento previamente anotado para el cresineol. Agitar la mezcla con movimientos verticales del termómetro y, al iniciarse la cristalización (turbación del líquido), observar a estabilización de la temperatura. Habiendo fluctuaciones durante la cristalización, considerar siempre la temperatura máxima leída durante el período de congelamiento.

Repetir la determinación cuantas veces sea necesario para que dos lecturas sucesivas den una variación máxima de 0,1 °C.

**Tabla 3 - Tenor de 1,8-cineol en aceites esenciales en función de la temperatura de congelamiento.**

Temperatura (°C)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
24	45,6	45,7	45,9	46,0	46,1	46,3	46,4	46,5	46,6	46,8
25	46,9	47,0	47,2	47,3	47,4	47,6	47,7	47,8	47,9	48,1
26	48,2	48,3	48,5	48,6	48,7	48,9	49,0	49,1	49,2	49,4
27	49,5	49,6	49,8	49,9	50,0	50,2	50,3	50,4	50,5	50,7
28	50,8	50,9	51,1	51,2	51,3	51,5	51,6	51,7	51,8	52,0
29	52,1	52,2	52,4	52,5	52,6	52,8	52,9	53,0	53,1	53,3
30	53,4	53,5	53,7	53,8	53,9	54,1	54,2	54,3	54,4	54,6
31	54,7	54,8	55,0	55,1	55,2	55,4	55,5	55,6	55,7	55,9
32	56,0	56,1	56,3	56,4	56,5	56,7	56,8	56,9	57,0	57,2
33	57,3	57,4	57,6	57,7	57,8	58,0	58,1	58,2	58,3	58,5
34	58,6	58,7	58,9	59,0	59,1	59,3	59,4	59,5	59,6	59,8
35	59,9	60,0	60,2	60,3	60,4	60,6	60,7	60,8	60,9	61,1
36	61,2	61,3	61,5	61,6	61,7	61,9	62,0	62,1	62,2	62,4
37	62,5	62,6	62,8	62,9	63,0	63,2	63,3	63,4	63,5	63,7
38	63,8	63,9	64,1	64,2	64,4	64,5	64,6	64,8	64,9	65,1
39	65,2	65,4	65,5	65,7	65,8	66,0	66,2	66,3	66,5	66,6
40	66,8	67,0	67,2	67,3	67,5	67,7	67,9	68,1	68,2	68,4
41	68,6	68,8	69,0	69,2	69,4	69,6	69,7	69,9	70,1	70,3
42	70,5	70,7	70,9	71,0	71,2	71,4	71,6	71,8	71,9	72,1
43	72,3	72,5	72,7	72,9	73,1	73,3	73,4	73,6	73,8	74,0
44	74,2	74,4	74,6	74,8	75,0	75,2	75,3	75,5	75,7	75,9
45	76,1	76,3	76,5	76,7	76,9	77,1	77,2	77,4	77,6	77,8
46	78,0	78,2	78,4	78,6	78,8	79,0	79,2	79,4	79,6	79,8
47	80,0	80,2	80,4	80,6	80,8	81,1	81,3	81,5	81,7	81,9
48	82,1	82,3	82,5	82,7	82,9	83,2	83,4	83,6	83,8	84,0
49	84,2	84,4	84,6	84,8	85,0	85,3	85,5	85,7	85,9	86,1
50	86,3	86,6	86,8	87,1	87,3	87,6	87,8	88,1	88,3	88,6
51	88,8	89,1	89,3	89,6	89,8	90,1	90,3	90,6	90,8	91,1
52	91,3	91,6	91,8	92,1	92,3	92,6	92,8	93,1	93,3	93,6
53	93,8	94,1	94,3	94,6	94,8	95,1	95,3	95,6	95,8	96,1
54	96,3	96,6	96,9	97,2	97,5	97,8	98,1	98,4	98,7	99,0
55	99,3	99,7	100,0							

#### 5.4.2.10 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ESPUMA

Pesar, exactamente, 1 g del material vegetal reducido a polvo fino (malla de 180  $\mu\text{m}$ , 5.2.11) y transferir para matraz conteniendo 50 ml de agua hirviendo. Mantener bajo ebullición moderada durante 30 minutos. Enfriar, filtrar para balón volumétrico de 100 ml. Completar el volumen, a través del filtro, hasta 100 ml.

Distribuir el decocto obtenido, en 10 tubos de ensayo con tapa (16 mm de diámetro por 16 cm de altura), en serie sucesiva de 1, 2, 3, hasta 10 ml, y ajustar el volumen del líquido en cada tubo a 10 ml con agua. Tapar los tubos y agitarlos con movimientos verticales por 15 segundos, con dos agitaciones por segundo. Dejar en reposo por 15 minutos y medir la altura de la espuma.

Si la altura de la espuma de todos los tubos es inferior a 1 cm, el índice de espuma es menor que 100.

Si, en cualquiera de los tubos, la altura de la espuma medida es 1 cm, la dilución del material vegetal en ese tubo (A) es el índice observado. Si ese tubo es el primero o segundo en la serie, es necesario hacer una dilución intermedia, por el mismo método descrito anteriormente, para obtener un resultado más preciso.

Si la altura de la espuma es mayor que 1 cm en todos los tubos, el índice de espuma es mayor del que 1000. En ese caso, la determinación precisa ser hecha con una nueva serie de diluciones del decocto para obtenerse un resultado preciso.

El índice de espuma es calculado según a ecuación  $1000/A$ , siendo  $A$  el volumen, en mililitros, del decocto usado para preparación de la dilución en el tubo donde la espuma fue observada.

### 5.4.2.11 DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS EXTRAIBLES POR ALCOHOL (EXTRACTO ALCOHÓLICO)

#### MÉTODO A: EXTRACCIÓN POR SOXHLET

Pesar, exactamente, cerca de 2 g de la droga y transferir para cartucho del extractor de Soxhlet, previamente tarado y seco. Introducir en el balón del extractor 0,2 g de hidróxido de sodio y etanol absoluto en cantidad suficiente. Extraer por 5 horas, retirar el cartucho con el residuo y secarlo en estufa a 105 °C por 30 minutos. Pesar el residuo seco y calcular el tenor de sustancias extraíbles por etanol por diferencia entre el peso de la muestra y el peso del residuo seco. Referir el resultado con relación a la droga seca (*Determinación de agua en drogas vegetales*, 5.4.2.3).

#### MÉTODO B: EXTRACCIÓN EN CALIENTE

Pesar un Matraz de 250 ml, con boca esmerilada, transferir hacia él, exactamente, cerca de 4,0 g de droga

vegetal seca, finamente, pulverizada. Añadir 100 ml de agua y pesar para obtener el peso total, incluyendo el frasco. Tapar, agitar bien y dejar descansar por 1 h. Acoplar un condensador de reflujo y calentar por 1 h, enfriar y pesar. Después del reflujo, corrija el peso original con solvente especificado en el ensayo para la droga vegetal. Mezclar bien y filtrar, rápidamente, por medio de un filtro seco. Transferir 25 ml del filtrado para una cápsula de porcelana tarada y evaporar hasta sequedad en baño de agua. Secar 105 °C por 6 h, enfriar en desecador por 30 min y pesar, inmediatamente. Calcular el porcentaje de materiales extraídos en mg/g de material seco.

#### MÉTODO C: EXTRACCIÓN A FRÍO

Pesar un matraz de 250 ml, con boca esmerilada y transferir hacia él, exactamente, cerca de 4,0 g de droga vegetal seca, finamente, pulverizada. Macerar, con 100 ml de solvente especificado, durante 6 h, agitando frecuentemente, y dejar en reposo por 18 h. Filtrar, rápidamente, sin dejar perder cualquier cantidad de solvente; transferir 25 ml del filtrado para una cápsula de porcelana tarada y evaporar hasta sequedad en baño de agua. Secar a 105 °C por 6 h, enfriar en desecador por 30 min y pesar inmediatamente. Calcular el porcentaje de materiales extraídos en mg/g de material vegetal seco.

Para materiales extraíbles con etanol, use la concentración especificada para el solvente en la prueba para cada droga vegetal. Para los materiales extraíbles con agua, use el agua como solvente. Use otros solventes, especificados en cada monografía.

### 5.4.2.12 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE AMARGOR

Las propiedades amargas de los materiales vegetales son determinadas por la comparación de la concentración del umbral de amargor de un extracto con una solución diluida de clorhidrato de quinina. El valor del índice de amargor está expresado en términos de unidades, equivalentes a una solución de clorhidrato de quinina a 0,05% (p/v).

Para la extracción de los materiales vegetales y para el lavado de la boca después de cada degustación, se debe utilizar agua potable como vehículo. La dureza del agua raramente tiene influencia significativa sobre el amargor.

La sensibilidad al amargor puede variar de individuo para individuo o, inclusive para un individuo en situaciones diferentes (cansancio, humo, ingestión de alimentos). Por lo tanto, la determinación de la concentración umbral de amargor del material a ser probado con clorhidrato de quinina debe ser hecha por la misma persona, dentro de un corto espacio de tiempo. La sensación de amargor no es percibida por toda la superficie de la lengua, pero es restringida a las partes superior y lateral de la base de la lengua. La determinación de la concentración limiar de la solución requiere entrenamiento del analista. Primeramente, es hecha la determinación de la concentración umbral del clorhidrato de quinina y, en seguida, la del material a ser probado. Individuos insensibles a la sensación amarga inducida por una solución conteniendo 0,058 mg de clorhidrato de quinina en 10 ml de agua no son indicados para la realización de la prueba.

La preparación de la solución-stock de material vegetal a ser probado (*ST*) debe ser especificada en la monografía correspondiente. En series únicas de prueba, la determinación siempre inicia con la menor concentración (a menos que otra orden sea especificada en la monografía) para mantener la sensibilidad de las papilas gustativas.

#### PREPARADO DE LAS SOLUCIONES

*Solución stock y solución diluida de clorhidrato de quinina*

**Tabla 1 - Diluciones de clorhidrato de quinina para la prueba inicial en la obtención del índice de amargor.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ST (b) (ml)	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8
Agua potable (ml)	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2
Clorhidrato de quinina (mg/10 mL) (c)	0.042	0.044	0.046	0.048	0.050	0.052	0.054	0.056	0.058



*Solución stock y solución diluida del material vegetal*

Preparar la solución stock como especificado en la monografía (ST). Utilizar 10 tubos de ensayo para la dilución en serie, como indicado en la **Tabla 2** para la segunda prueba.

**Tabla 2 - Diluciones de la solución stock para la segunda prueba en la obtención del índice de amargor.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ST (b) (ml)	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,0
Agua potable (ml)	9,00	8,00	7,00	6,00	5,00	4,00	3,00	2,00	1,00	-

**PROCEDIMIENTO**

Después de enjuagar la boca con agua potable, probar 10 ml de la dilución, girándola en la boca, principalmente cerca de la base de la lengua por 30 segundos. Siempre comenzar con la solución menos concentrada de la serie, excepto cuando prescrito de manera diferente en la monografía. Si la sensación de amargor no es más sentida, retirar la solución y esperar 1 minuto para asegurarse que no haya sensibilidad retardada. Enjuagar la boca con agua. Aguardar, por lo menos, 10 minutos para probar la próxima dilución. La concentración umbral de amargor es la dilución de menor concentración en que el material además provoca sensación de amargor. Después de la primera serie de pruebas, enjuagar bien la boca con agua, hasta que el amargor no sea más percibido y esperar, como mínimo, 10 minutos antes de hacer la segunda serie de pruebas.

En esa serie de pruebas, para mayor rapidez, es aconsejable asegurar que la solución en el tubo número 5 (conteniendo 5 ml de ST en 10 ml de solución) provoque sensación de amargor. Si es percibida, encontrar la concentración de amargor del material, probando las diluciones en los tubos de números 1 a 4. Si la solución en el tubo de número 5 no provoca sensación de amargor, encontrar la concentración umbral de amargor en los tubos de números 6 a 10.

Todas las soluciones y el agua deben estar en una temperatura entre 20 °C y 25 °C.

El índice de amargor es calculado según a ecuación:

$$V = \frac{2000 \times c}{(a \times b)}$$

**Tabla 1 - Dilución en serie del extracto vegetal para determinación de la actividad hemolítica.**

<i>Tubo</i>	1	2	3	4
Extracto vegetal (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampón fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	-
Suspensión de sangre (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

en que

$V$  = valor de amargor, en unidades/g;

$a$  = cantidad de material, en mg/ml, en la ST;

$b$  = volumen de ST en 10 ml de la dilución de la concentración umbral de amargor;

$c$  = cantidad de clorhidrato de quinina, en mg/10 ml, en la dilución de la concentración umbral de amargor.

**5.4.2.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA**

La actividad hemolítica de extractos vegetales, o de una preparación conteniendo saponinas, es determinada por comparación con la actividad de una referencia de saponina con actividad hemolítica de 1000 unidades por gramo. Una suspensión de eritrocitos es mezclada con volúmenes iguales de una dilución en serie del extracto. La menor concentración a provocar hemólisis completa es determinada después de dejar el sistema en reposo por un período específico de tiempo. Una prueba similar es hecha simultáneamente con solución de referencia de saponina.

**PROCEDIMIENTO**

Para la preparación de la suspensión de sangre, colocar citrato de sodio a 3,65% (p/v) en un frasco con tapa hasta 1/10 de su capacidad. Agitar para mojar totalmente las paredes del frasco y añadir sangre bovina fresco, con nueva agitación.

La sangre, con citrato de sodio, así preparado puede ser almacenada por 8 días a una temperatura entre 2 °C y 4 °C.

Logo que los tubos sean preparados, invertirlos cuidadosamente para mezclar, evitando la formación de la espuma. Después de 30 minutos, agitar nuevamente y dejar descansar por 6 horas a temperatura ambiente. Examinar los tubos y anotar en cual diluición ocurrió hemólisis total, lo que será constatado en el líquido, límpido, rojo y sin depósito de eritrocitos.

Si la hemólisis total es observada apenas en el tubo de número 4, usar el extracto vegetal original directamente para la prueba principal.

Si la hemólisis total es observada en los tubos 3 y 4, diluir dos veces el extracto original con tampón fosfato.

Si la hemólisis total es observada en los tubos 2, 3 y 4, preparar una solución diluida cinco veces, como descrito arriba.

Si, después de 6 horas, todos los tubos convierten un líquido límpido y rojo, preparar una solución diluida 10 veces y hacer la prueba preliminar, como descrito arriba.

Si la hemólisis total no es observada en ninguno de los tubos, repetir la prueba preliminar, usando un extracto más concentrado.

#### *Prueba principal*

Preparar la diluición en serie del extracto vegetal, diluyendo o no, como consta en la prueba preliminar, con tampón fosfato pH 7,4 y suspensión de sangre (2%), utilizando 13 tubos de ensayo, conforme especificado en la **Tabla 2**.

Hacer las diluiciones y evaluaciones como en la prueba preliminar, observando los resultados después de 24 horas. Calcular la cantidad de material vegetal en gramos, o proporción en g/ml que produce hemólisis total (b).

**Tabla 2 - Diluición en serie del extracto vegetal con tampón fosfato y suspensión de sangre para la prueba principal**

<i>Tubos</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	<i>10</i>	<i>11</i>	<i>12</i>	<i>13</i>
Extracto vegetal (o diluición) (ml)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1,00
Tampón fosfato (ml)	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	-
Suspensión de sangre 2% (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

#### *Prueba para saponinas*

Para eliminar el efecto de variaciones individuales en la resistencia de suspensión de sangre a la solución de saponina, preparar una serie de diluiciones de saponina de la misma manera descrita anteriormente para el extracto vegetal. Calcular la cantidad de saponinas (g) que produce hemólisis total (a).

#### *Actividad hemolítica*

La actividad hemolítica es calculada según a ecuación

$$1000 a / b$$

en que

1000 = actividad hemolítica de la saponina, en relación a la sangre bovina;

*a* = cantidad, en gramos, de saponina;

*b* = cantidad, en gramos, de material vegetal.

#### **5.4.2.14 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE INTUMESCENCIA**

El índice de intumescencia o índice de entumecimiento es la medida del volumen ocupado por el entumecimiento de 1 g de la droga, por la adición de agua u otro agente intumescente, bajo condiciones definidas.

Conducir, simultáneamente, en el mínimo, tres determinaciones. Pesar, exactamente, 1 g de la droga vegetal pulverizada y colocar en probeta de 25 ml con tapa esmerilada. El largo de la parte graduada debe ser de, aproximadamente, 125 mm y el diámetro, interno, próximo a 16 mm, subdividido en 0,2 ml, marcado de 0 a 25 ml, de forma ascendente. Añadir 25 ml de agua, u otro agente definido, y agitar cada 10 minutos, por una hora. Dejar la mezcla reposar por 3 horas, a la temperatura ambiente. Medir el volumen, en mililitros, ocupado por el material vegetal acrecentado de la mucílago o cualquier otro material adherido sustraído del volumen inicial de la droga. Calcular el valor promedio obtenido a partir de las varias determinaciones individuales realizadas y relacionar a 1 g de material vegetal.

## 5.4.3 MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE EXTRACTOS VEGETALES

### 5.4.3.1 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

#### 5.4.3.1.1 Extractos fluidos (*Extracta fluida*)

##### DEFINICIÓN

Extractos fluidos son preparaciones líquidas en las cuales, excepto cuando especificado de manera diferente, una parte del extracto, en masa o volumen, corresponde a una parte, en masa, de la droga seca, utilizada en su preparación. Si necesario, los extractos fluidos pueden ser estandarizados, en términos de concentración del solvente, tenor de constituyentes o residuo seco. Si necesario, pueden ser añadidos de conservantes inhibidores del crecimiento microbiano.

##### OBTENCIÓN

Los extractos fluidos pueden ser obtenidos por percolación, maceración o por disolución de extractos secos o blandos utilizando como solvente únicamente etanol, agua o mezclas etanol/agua de proporción adecuada. Si necesario, el extracto obtenido puede ser filtrado. Cualquiera que sea el proceso de obtención, los extractos fluidos presentan composición y características comparables. La formación de un ligero sedimento durante el almacenamiento es aceptable, siempre que la composición del extracto no sufra modificaciones significativas.

##### ENSAYOS DE PUREZA

**Densidad relativa (5.2.5).** Cuando sea el caso, los extractos fluidos deben cumplir con los límites prescritos en la monografía.

**Determinación de etanol (5.3.3.8).** Determinar tenor de etanol en extractos fluidos obtenidos con etanol o mezclas etanol/agua. El tenor de etanol debe cumplir lo especificado en la monografía.

**Determinación de metanol y 2-propanol (5.4.3.2.1).** A menos que especificado de manera diferente, los extractos fluidos deben contener no más de 0,05% (v/v) de metanol y no más de 0,05% (v/v) de 2-propanol.

**Determinación del residuo seco (5.4.3.2.2).** El residuo seco debe cumplir con lo especificado en la monografía.

##### EMBALAJE Y ALMACENAMIENTO

En recipientes bien cerrados, al abrigo de la luz.

##### ETIQUETADO

El rótulo debe contener las siguientes informaciones:

- nomenclatura botánica de la droga que dio origen al extracto;
- si el extracto fue preparado con planta fresca (cuando sea el caso);
- composición del solvente y el tenor de etanol en porcentaje (v/v) en el solvente utilizado en la preparación;
- cuando sea el caso el tenor de etanol en porcentaje (v/v) en el producto final;
- tenor de principios activos y/o relación droga/extracto final;
- nombre y concentración de conservantes antimicrobianos añadidos.

#### 5.4.3.1.2 Extractos blandos (*Extracta spissa*)

##### DEFINICIÓN

Los extractos blandos son preparaciones de consistencia pastosa obtenida por evaporación parcial del solvente utilizada en su preparación. Son obtenidos utilizándose como solvente únicamente etanol, agua o mezclas etanol/ agua en la proporción adecuada. Presentan, como mínimo, 70% de residuo seco (p/p). En extractos blandos pueden ser añadidos conservantes para inhibir el crecimiento microbiano.

##### OBTENCIÓN

Los extractos blandos son obtenidos a partir de extractos fluidos preparados empleando únicamente etanol, agua o mezclas etanol/agua en la proporción adecuada; después de evaporación parcial del solvente. Presentan como mínimo 70 % de residuo seco (p/p).

##### ENSAYOS DE PUREZA

**Residuo seco (5.4.3.2.2).** El residuo seco debe cumplir con lo especificado en la monografía.

##### EMBALAJE Y ALMACENAMIENTO

En recipientes bien cerrados, al abrigo de la luz.

##### ETIQUETADO

El rótulo debe contener las siguientes informaciones:

- nomenclatura botánica de la droga que dio origen al extracto;
- nombre y cantidad del material inerte utilizado;
- si el extracto fue preparado con planta fresca (cuando sea el caso);
- composición del solvente y el tenor de etanol en porcentaje (v/v) en el extracto líquido que le dio origen; tenor de principios activos y/o relación droga/extracto final;
- nombre y concentración de conservantes antimicrobianos añadidos.

### 5.4.3.1.3 Extractos secos (*Extracta sicca*)

#### DEFINICIÓN

Extractos secos son preparaciones sólidas obtenidas por la evaporación del solvente utilizado en su preparación. Presentan, como mínimo, 95% de residuo seco, calculados como porcentaje de masa. Los extractos secos pueden ser añadidos de materiales inertes adecuados.

Los extractos secos estandarizados tienen el tenor de sus constituyentes ajustado por la adición de materiales inertes adecuados o por la adición de extractos secos obtenidos con la misma droga utilizada en la preparación.

Cuando necesario, la monografía podrá prescribir realización de ensayo límite para el solvente utilizado en la preparación.

#### OBTENCIÓN

Extractos secos son preparaciones sólidas obtenidas por evaporación o vaporización del solvente. Independiente de la técnica de secado, deben presentar en el mínimo 95 % de residuo seco, calculados como porcentaje de masa.

#### ENSAYOS DE PUREZA

**Residuo seco (5.4.3.2.3).** El residuo seco debe cumplir con lo especificado en la monografía.

#### EMBALAJE Y ALMACENAMIENTO

En recipientes herméticamente cerrados, al abrigo de la luz.

#### ETIQUETADO

El rótulo debe contener:

- nomenclatura botánica de la droga que dio origen al extracto;
- nombre y cantidad del material inerte utilizado;
- si el extracto fue preparado con planta fresca (cuando sea el caso);
- nombre del solvente y el tenor de etanol en porcentaje (v/v) en el solvente utilizado en la preparación;
- tenor de principios activos y/o relación droga / extracto final.

### 5.4.3.1.3 Extractos secos (*Extracta sicca*)

#### DEFINICIÓN

Extractos secos son preparaciones sólidas obtenidas por la evaporación del solvente utilizado en su preparación. Presentan, como mínimo, 95% de residuo seco, calculados como porcentaje de masa. Los extractos secos pueden ser añadidos de materiales inertes adecuados.

Los extractos secos estandarizados tienen el tenor de sus constituyentes ajustado por la adición de materiales inertes

adecuados o por la adición de extractos secos obtenidos con la misma droga utilizada en la preparación.

Cuando necesario, la monografía podrá prescribir realización de ensayo límite para el solvente utilizado en la preparación.

#### OBTENCIÓN

Extractos secos son preparaciones sólidas obtenidas por evaporación o vaporización del solvente. Independiente de la técnica de secado, deben presentar como mínimo 95 % de residuo seco, calculados como porcentaje de masa.

#### ENSAYOS DE PUREZA

**Residuo seco (5.4.3.2.3).** El residuo seco debe cumplir con lo especificado en la monografía.

#### EMBALAJE Y ALMACENAMIENTO

En recipientes herméticamente cerrados, al abrigo de la luz.

#### ETIQUETADO

El rótulo debe contener:

- nomenclatura botánica de la droga que dio origen al extracto;
- nombre y cantidad del material inerte utilizado;
- si el extracto fue preparado con planta fresca (cuando sea el caso);
- nombre del solvente y el tenor de etanol en porcentaje (v/v) en el solvente utilizado en la preparación;
- tenor de principios activos y/o relación droga / extracto final.

### 5.4.3.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE EXTRACTOS VEGETALES

#### 5.4.3.2.1 Determinación de metanol y 2-propanol en extractos fluidos

Proceder a la destilación del extracto conforme descrito en *Determinación de etanol (5.3.3.8.1)*. Examinar el destilado por *Cromatografía a gas (5.2.17.5)*, utilizando cromatógrafo provisto de detector de ionización de llama, columna cromatográfica de vidrio con 2 m de largo y 2 mm de diámetro interno, empaquetada con copolímero de etilvinilbenceno / divinilbenceno, partículas de 125 µm a 150 µm, y nitrógeno para cromatografía como gas de arrastre, con flujo de 30 ml/min. Mantener la temperatura de la columna en 130 °C, la temperatura del inyector en 200 °C y la temperatura del detector en 220 °C.

*Solución estándar interna:* solución de 1-propanol a 2,5% (v/v) en agua.

*Solución muestra:* añadir a un volumen determinado del destilado 2 ml de la *solución estándar interna*. Diluir para

50 ml con agua o etanol a 90% (v/v), ajustando el tenor de etanol para 10% (v/v).

*Solución estándar:* preparar 50 ml de solución conteniendo 2 ml de *solución estándar interno*, 10% de etanol (v/v), 0,05% de 2-propanol (v/v) y 0,05% de metanol anhidro (v/v).

*Procedimiento:* inyectar, separadamente, 1  $\mu\text{L}$  de la *Solución estándar* y de la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las áreas de los picos. Calcular los contenidos de metanol y 2-propanol con relación a la muestra sometida a la destilación a partir de las respuestas obtenidas con la *Solución estándar* y la *Solución muestra*.

#### 5.4.3.2.2 Determinación de residuo seco en extractos fluidos y blandos

Transferir 2 ml o 2 g de extracto para pesafiltros o placa de Petri, midiendo, aproximadamente, 50 mm en diámetro y 30 mm de altura. Evaporar hasta secar en baño maría y desecar en estufa a 100 – 105 °C, por 3 horas. Dejar enfriar en desecador, sobre pentóxido de fósforo y pesar. Calcular el residuo seco en porcentaje sobre la masa o sobre el volumen.

#### 5.4.3.2.3 Determinación de residuo seco en extractos secos

Pesar, en placa de Petri midiendo, aproximadamente, 50 mm en diámetro y 30 mm de altura, 0,50 g de extracto seco finamente pulverizado. Desecar en estufa a 100 – 105 °C por 3 horas. Dejar enfriar en desecador, sobre pentóxido de fósforo y pesar. Calcular el residuo seco en porcentaje sobre la masa.

## 5.5 MÉTODOS BIOLÓGICOS, ENSAYOS BIOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS

### 5.5.1 MÉTODOS BIOLÓGICOS

#### 5.5.1.1 DETERMINACIÓN DE LA HEPARINA EN LOS FACTORES DE LA COAGULACIÓN

La heparina es determinada bajo la forma de un complejo a la antitrombina III (AT) vía inhibición de la actividad del Factor Xa de la coagulación. En la mezcla reactiva es mantenido un exceso de AT para garantizar una concentración constante del complejo heparina-AT. El Factor Xa es neutralizado por el complejo heparina-AT y el Factor Xa residual hidroliza un sustrato cromogénico peptídico específico liberando un cromóforo. La cantidad del cromóforo es inversamente proporcional a la actividad de la heparina.

*Sustrato cromogénico para el Factor Xa:* sustrato cromogénico específico del Factor Xa tal como: el clorhidrato de N-a-benzoil-L-isoleucil-L-glutamil-glicil-L-arginina-4-

nitro-anilida. Reconstituya de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

*Tampón de dilución:* solución de trometamina a 0,605% (p/v). si necesario, ajuste para pH 8,4 con ácido clorhídrico.

*Solución problema:* diluir la muestra con el *Tampón de dilución* para obtener una solución que supuestamente contenga 0,1 UI de heparina por mililitro.

*Solución de referencia:* diluir la preparación de referencia de la heparina con el *Tampón de dilución* para obtener una solución que contenga 0,1 UI de heparina por mililitro. Las condiciones descritas son aplicables a las placas de microtitulación. Si el ensayo es realizado en tubos, ajustar los volúmenes para mantener las proporciones en la mezcla. Poco tiempo antes del ensayo, colocar todas las soluciones a 37 °C en baño maría. Distribuir en una serie de pozos, 20  $\mu\text{L}$  de plasma humano normal y 20  $\mu\text{L}$  de antitrombina III SR. Juntar a los pozos una serie de volúmenes (20  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  y 140  $\mu\text{L}$ ) de la *Solución problema* o de la *Solución de referencia* y completar el volumen de cada pozo con 200  $\mu\text{L}$  utilizando el *Tampón de dilución* (0,02 – 0,08 UI de heparina por mililitro en la mezcla reactiva final).

#### MÉTODO DEL PUNTO DE EQUIVALENCIA

Transferir 40  $\mu\text{L}$  de cada pozo para una segunda serie de pozos, juntar 20  $\mu\text{L}$  de la solución del Factor Xa bovino e incubar a 37 °C durante 30 segundos. Juntar 40  $\mu\text{L}$  de solución del *Sustrato cromogénico para el Factor Xa* a 1 mmol/L e incubar a 37 °C, durante 3 minutos. Parar la reacción disminuyendo el pH con un reactivo apropiado, tal como una solución de ácido acético glacial a 20% (v/v) y medir la absorbancia a 405 nm (5.2.14). El tiempo de reacción es generalmente de 3 minutos a 15 minutos, pero son toleradas ciertas variaciones si ellas permiten mejorar la linealidad de la curva dosis/respuesta.

#### MÉTODO CINÉTICO

Transferir 40  $\mu\text{L}$  de cada pozo para una segunda serie de pozos, juntar 20  $\mu\text{L}$  de la solución del Factor Xa bovino e incubar a 37 °C durante 30 segundos. Juntar 40  $\mu\text{L}$  de la solución del *Sustrato cromogénico para el Factor Xa* a 2 mmol/L, incubar a 37 °C y determinar la velocidad de clivaje del sustrato procediendo a la lectura continua de la variación de absorbancia a 405 nm (5.2.14) posibilitando, así, calcular la velocidad inicial de clivaje del sustrato. Esa velocidad debe ser proporcional a la concentración residual del Factor Xa. Verificar la validez del ensayo y calcular la actividad de la heparina de la muestra por los procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (8).

#### 5.5.1.2 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND HUMANO

La potencia del Factor de Von Willebrand humano es determinada por la comparación, en condiciones obligatoriamente dadas, de su actividad en colágeno o como cofactor de ristocetina con la misma actividad, y calibrada utilizándose un estándar de referencia internacional, en unidades



internacionales, cuando aplicable. La Unidad Internacional es la actividad de un monto declarado del estándar de referencia internacional para el Factor de Von Willebrand existente en el concentrado de Factor VIII de la coagulación de la sangre humana. La equivalencia en unidades internacionales del estándar de referencia internacional es indicada por la Organización Mundial de Salud (OMS).

#### DOSIFICACIÓN DE LA CONEXIÓN AL COLÁGENO

La conexión al colágeno es determinada por técnica de inmunoensayo enzimático en placas de micro titulación, revestidas por colágeno. El método se basa en la conexión específica del Factor de Von Willebrand a las fibras de colágeno y de la subsiguiente conexión de un anticuerpo policlonal anti- Factor de Von Willebrand conjugado a una enzima. Después de la adición de un sustrato cromogénico hay formación de un producto cuantificable espectrofotométricamente. En condiciones apropiadas, hay una relación lineal entre el colágeno, Factor de Von Willebrand y la absorbancia indicada.

#### MATERIALES

*Colágeno*: usar fibrillas de colágeno de equino nativo, o humanas, tipo I o III. Para facilitar la manipulación, pueden ser usadas las soluciones de colágeno.

*Diluyente de colágeno*: disolver 50 g de glucosa en agua. Ajustar el pH en 2,7 a 2,9 con ácido clorhídrico *M* y diluir en agua a 1000 ml.

*Tampón de cloruro-fosfato*: disolver 8 g de cloruro de sodio, 1,05 g de fosfato de sodio dibásico, dihidratado, 0,2 g de fosfato de sodio monobásico dihidratado y 0,2 g de cloruro de potasio en agua. Ajustar el pH en 7,2 con hidróxido de sodio *M* o ácido clorhídrico *M*. Diluir a 1000 ml con agua.

Solución de lavado tamponada: *solución de polisorbato 20 a 0,1% (p/v) en Tampón de cloruro fosfato*.

*Reactivo de neutralización*: preparar el *Tampón de cloruro fosfato* conteniendo polisorbato 20 a 0,1% (p/v) y albúmina bovina a 1% (p/v).

*Tampón para dilución*: preparar el *Tampón de cloruro fosfato* conteniendo polisorbato 20 a 0,1% (p/v) y albúmina bovina a 5% (p/v).

*Conjugación*: suero de conejo del anti-Factor de Von Willebrand humano conjugado a la peroxidasa del rábano silvestre, un marcador histoquímico. Seguir las recomendaciones del fabricante.

*Solución de sustrato*: disolver, inmediatamente antes de su uso, un comprimido de clorhidrato de *el*-fenilendiamina y un comprimido de peróxido de carbamida en 20 ml de agua, o usar un volumen adecuado de agua oxigenada. Proteger de la luz.

*Placas de microtitulación*: deben poseer fondo plano, placas de polietileno con propiedades de superficie optimiza-

das para ensayo inmunoenzimático y proteína de alta capacidad de conexión.

#### PROCEDIMIENTO

*Solución prueba*: reconstituir la preparación a ser analizada como indicado en el rótulo. Diluir con *Tampón para dilución para* preparar una solución conteniendo cerca de 1 UI/ml de Factor de Von Willebrand. Preparar dos series independientes con por lo menos tres diluciones mediante el uso del *Tampón para dilución*.

*Soluciones de referencia*: reconstituir la preparación de referencia como indicado. Diluir con *Tampón para dilución para* preparar una solución conteniendo cerca de 1 UI/ml de Factor de Von Willebrand. Preparar dos series independientes con por lo menos tres diluciones mediante el uso del *Tampón para dilución*.

Posibilitar que la solución de colágeno alcance la temperatura ambiente. Diluir con *Diluyente de colágeno* para obtener una solución conteniendo 30 a 75 mg/ml de colágeno. Mezclar, suavemente, para producir una suspensión uniforme de las fibras de colágeno y enseguida pipetear 0,1 ml y transferir para cada pozo de la microplaca. Cubrir la placa con película plástico e incubar a 37 °C de un día para el otro. Vaciar los pozos de la placa revestida con el colágeno por inversión y drenaje en una servilleta de papel. Añadir 0,25 ml de *Solución de lavado tamponada*. Vaciar los pozos de la placa por inversión y drenar en una servilleta de papel, repitiendo esa operación tres veces. Añadir, cada pozo, 0,25 ml de *Reactivo de neutralización*, cubrir la placa con película plástico e incubar a 37 °C por 1 hora. Los pozos de la placa deben ser vaciados por inversión y drenaje en servilleta de papel. Añadir 0,25 ml de *Solución de lavado tamponada*. Vaciar los pozos de la placa por inversión y drenar en una servilleta de papel. Repetir esa operación tres veces.

Añadir 0,1 ml de cada una de las *Soluciones prueba* o *referencia* a los pozos. Añadir 0,1 ml de *Tampón para dilución* a una serie de pozos para obtenerse el control negativo. Cubrir la placa con película plástico e incubarla a 37 °C por 2 horas. Los pozos de la placa deben ser vaciados por inversión y drenaje en servilleta de papel. Añadir 0,25 ml de *Solución de lavado tamponada*. Vaciar los pozos de la placa por inversión y drenaje en una servilleta de papel, repitiendo esta operación por tres veces.

Preparar una dilución adecuada de *Conjugación* con *Tampón de cloruro fosfato* conteniendo albúmina bovina a 0,5% (p/v) y añadir 0,1 ml cada pozo. Cubrir la placa con película plástico e incubar a 37 °C por 2 horas. Vaciar los pozos de la placa por inversión y drenaje en una servilleta de papel. Añadir 0,25 ml de *Solución de lavado tamponada*. Vaciar los pozos de la placa por inversión y drenar en una servilleta de papel. Repetir esta operación tres veces.

Añadir 0,1 ml de *Solución de sustrato* a cada uno de los pozos e incubar a la temperatura ambiente por 20 minutos en lo oscuro. Añadir 0,1 ml de ácido clorhídrico *M* a cada uno de los pozos. Medir la absorbancia a 492 nm (5.2.14). Utilizar los valores de absorbancia para estimar la potencia de la pre-

paración a ser analizada mediante el empleo de los procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (8).

El ensayo es válido si las absorbancias medidas para los controles negativos fuesen mayores que 0,05.

### 5.5.1.3 DETERMINACIÓN DEL FACTOR II DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA

La determinación del Factor II de la coagulación humana es realizada después de activación específica en Factor IIa. El Factor IIa es calculado comparando su actividad en un sustrato cromogénico peptídico específico con la misma actividad del estándar internacional o de una preparación estándar calibrada en Unidades Internacionales (UI). La Unidad Internacional del Factor II corresponde a la actividad de una dada cantidad del estándar internacional, que es constituido por un concentrado liofilizado del Factor II de la coagulación sanguínea. La correspondencia entre la Unidad Internacional y el Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de Salud.

El método de la determinación cromogénica incluye dos etapas sucesivas: activación del Factor II por acción del veneno de cobra y el clivaje enzimática de un sustrato cromogénico por el Factor IIa que libera un cromóforo cuantificable por espectrofotometría. En condiciones de dosificación apropiadas, existe una relación lineal entre la actividad del Factor IIa y el clivaje del sustrato cromogénico.

#### REACTIVOS

*Activador específico del Factor II proveniente del veneno de la víbora (Ecarina):* proteína obtenida a partir del veneno de la víbora *Echis carinatus*, activa específicamente el Factor II. Reconstituir la preparación siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez reconstituida, conservar a 4 °C y utilizar en el tiempo de 1 mes.

*Sustrato cromogénico para el Factor IIa:* sustrato cromogénico específico del Factor IIa como: clorhidrato de H-D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida, 4-toluenosulfonil-glicil-prolil-L-arginina-4-nitroanilida, H-D-ciclohexilglicil-a-aminobutiril-L-arginina-4-nitroanilida, D-ciclohexilglicil-L-alanilarginina-4-nitroanilida-diacetato. Reconstituir siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Tampón de dilución:* solución conteniendo 0,606% (p/v) de trometamina, cloruro de sodio a 1,753% (p/v), ácido edético a 0,279% (p/v) y albúmina bovina o de albúmina humana a 0,1% (p/v). Ajustar, si necesario, el pH para 8,4 con ácido clorhídrico.

#### PROCEDIMIENTO

*Solución prueba:* diluir la muestra en el *Tampón de dilución* para obtener una solución conteniendo 0,015 UI de Factor II por mililitro. Preparar, por lo menos, tres diluciones más de esa solución en *Tampón de dilución*.

*Solución estándar:* diluir el estándar en el *Tampón de dilución* para obtener una solución conteniendo 0,015 UI de Factor II por mililitro. Preparar, por lo menos, más tres diluciones de esa solución en el *Tampón de dilución*. Colocar todas las soluciones en baño maría a 37 °C, poco tiempo antes del ensayo. Las condiciones descritas se aplican a las placas de microtitulación. Si la determinación es realizada en tubos, ajustar los volúmenes para mantener las proporciones en la mezcla. Introducir 25 µL de las diferentes diluciones de la *Solución muestra* y de la *Solución estándar*, en una serie de pozos de la placa de microtitulación mantenida a 37 °C. Juntar en cada pozo 125 µL del *Tampón de dilución* y 25 µL de *Activador específico del Factor II proveniente del veneno de la víbora* e incubar durante exactamente 2 minutos. Juntar en cada pozo 25 µL de *Sustrato cromogénico para el Factor IIa*.

Proceder a la lectura de la velocidad de variación de la absorbancia en 405 nm (5.2.14) y continuar durante tres minutos de modo obtener la velocidad promedio de variación de la absorbancia. Se no es posible una lectura continua, determinar la absorbancia en 405 nm en intervalos consecutivos apropiados, por ejemplo, de 40 en 40 segundos. Construir el gráfico lineal de los valores de absorción en función del tiempo y calcular la velocidad promedio de variación de la absorbancia. A partir de los valores individuales encontrados para cada dilución del estándar y de la muestra, calcular la actividad de la muestra y verificar la validez de la dosificación por los métodos estadísticos habituales (8).

### 5.5.1.4 DETERMINACIÓN DEL FACTOR IX DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA

Se determina la actividad de la muestra, comparando la cantidad de la muestra necesaria para reducir el tiempo de coagulación de una mezcla de prueba que contiene las sustancias, además del Factor IX, necesarias para la coagulación de la sangre; con la cantidad de una preparación de referencia, evaluada en unidades internacionales, necesarias para obtener el mismo efecto.

La Unidad Internacional corresponde a la actividad de una determinada cantidad del Estándar Internacional constituido por un concentrado liofilizado del Factor IX de la coagulación sanguínea. La equivalencia en unidades internacionales del estándar internacional es establecida por la Organización Mundial de Salud.

Reconstituir, respectivamente, la muestra y la preparación de referencia de acuerdo con las indicaciones del rótulo y utilice inmediatamente. Cuando aplicable, determinar la cantidad de heparina presente y neutralícela juntando sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizan 1,0 UI de heparina). Diluya la muestra y la preparación de referencia con tampón de imidazol de pH 7,3 para obtener soluciones con 0,5 a 2,0 UI por mililitro. Con una mezcla de citrato de sodio a 3,8% (p/v) y tampón de imidazol de pH 7,3 (1:5), preparar una serie de diluciones comprendiendo 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80. Esas diluciones deberán ser preparadas con precisión y son utilizadas inmediatamente.

Utilizar, por ejemplo, tubos de incubación mantenidos en baño maría a 37 °C. Introducir en cada tubo 0,1 ml de sustrato de plasma y 0,1 ml de cada una de las diluciones de la preparación de referencia y de la muestra. Juntar en cada tubo 0,1 ml de una dilución apropiada de cefalina SR o sustituto de plaquetas y 0,1 ml de una suspensión de 0,5 g de caolín leve en 100 ml de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) y dejar en reposo durante cerca de 10 min, inclinando los tubos regularmente. Juntar cada tubo 0,1 ml de solución de cloruro de calcio a 0,74% (p/v). Con el auxilio de un cronómetro, determine el tiempo de coagulación, eso es, el intervalo de tiempo entre el momento de la adición del cloruro de calcio y la primera indicación de la formación de fibrina que se observa visualmente o con aparatos apropiados. Calcular la actividad utilizando el procedimiento estadístico aplicables a los ensayos biológicos (8).

Para asegurar que no existe contaminación apreciable del sustrato de plasma por el Factor IX, realizar un ensayo en blanco utilizando, en vez de la muestra, un volumen correspondiente de una mezcla de citrato de sodio a 3,8% (p/v) y tampón de imidazol de pH 7,3 (1:5). El ensayo sólo es válido si el tiempo de coagulación determinado en el ensayo en blanco está comprendido entre 100 y 200 segundos.

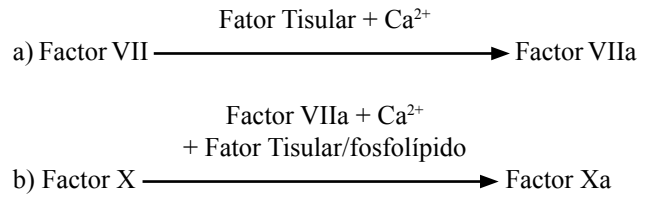
### 5.5.1.5 DETERMINACIÓN DEL FACTOR VII DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA

La determinación del Factor VII de la coagulación es realizada por la determinación de su actividad biológica como un cofactor en la activación del Factor X por el Factor VIIa/Factor Tisular en presencia de iones de calcio y de fosfolípidos. La actividad de una preparación del Factor VII es calculada por comparación de las cantidades respectivas de esa preparación y del estándar internacional o de una preparación de referencia determinada en unidades internacionales que son necesarias para obtener una velocidad de formación del Factor Xa en un medio de reacción conteniendo las diferentes sustancias que intervienen en la activación del Factor X.

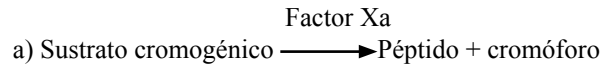
La Unidad Internacional de la actividad del Factor VII corresponde a la actividad de una dada cantidad del estándar internacional que es actualmente constituido por un plasma liofilizado. La correspondencia entre la Unidad Internacional y el Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de Salud.

El método de la determinación cromogénica comporta dos etapas sucesivas: la activación del Factor X, bajo la acción del Factor VIIa, en una mezcla reactiva conteniendo el Factor Tisular/fosfolípido y el ion calcio y la lisis enzimática de un sustrato cromogénico por el Factor Xa que libera un cromóforo cuantificable por espectrofotometría. En condiciones apropiadas de dosificación, existe una relación lineal entre la velocidad de formación del Factor Xa y la concentración del Factor VII. El esquema siguiente resume el principio de la determinación:

#### Etapa 1



#### Etapa 2



Las dos etapas utilizan reactivos disponibles en el mercado, originario de diversos proveedores. A pesar de que la composición de esos reactivos pueda variar, ligeramente, sus características esenciales son descritas en las especificaciones que se siguen.

#### REACTIVOS

La mezcla reactiva de factores de la coagulación contiene, especialmente, proteínas purificadas de origen humana, o bovina, específicamente el Factor X, la tromboplastina y Factor Tisular/fosfolípido y un activador del Factor VII. Esas proteínas son, parcialmente, purificadas y no contienen impurezas capaces de interferir en la activación del Factor VII o del Factor X. El Factor X está presente en cantidad tal que su concentración final, fuera de la etapa de activación, sea de 10 – 350 nmol/L, de preferencia de 14 – 70 nmol/L. La tromboplastina utilizada puede ser de origen natural (cerebro de buey o conejo) o sintética. La tromboplastina utilizada para la determinación del tiempo de Quick es diluida de 5 a 50 veces en una solución tampón de manera que la concentración final de  $\text{Ca}^{2+}$  sea de 15-25 nmol/L. La etapa final de formación del Factor Xa es conducida en una solución conteniendo albúmina humana o albúmina bovina a una concentración en que no ocurren pérdidas en la adsorción y, convenientemente, tamponada a pH comprendido entre 7,3 y 8,0. El Factor VII es el único Factor que limita la formación del Factor Xa en la mezcla de incubación final y ninguno de los constituyentes reactivos de la mezcla tiene el poder de inducir por sí sólo la formación del Factor Xa.

La segunda etapa consiste en la cuantificación del Factor Xa formado en la etapa precedente, en el medio de un sustrato cromogénico específico del Factor Xa. Ese sustrato es generalmente un péptido corto derivado de 3 a 5 ácidos aminados ligados a un agrupamiento cromóforo. La acción de ese agrupamiento y del sustrato peptídico promueve un desplazamiento de la actividad cromofórica para un largo de onda que posibilita su cuantificación por espectrofotometría. El sustrato es generalmente disuelto en agua y utilizado en una concentración final de 0,2 – 2 nmol/L. Puede igualmente comprender los inhibidores apropiados impidiendo el proseguir de la formación del Factor Xa (adición de yoduro).

## PROCEDIMIENTO

Reconstituir, separadamente, el contenido de una ampolla de la preparación de referencia y de la muestra adicionando una cantidad de agua pretendida y una vez reconstituidas utilícelas en el tiempo de una hora. Añadir a las preparaciones reconstituidas las cantidades de prediluyente necesarias para obtener soluciones a 0,5 – 2,0 UI del Factor VII por mililitro.

Preparar las diluciones siguientes de la preparación de referencia y de la muestra con una solución tampón isotónica sin agente de quelación, conteniendo albúmina humana o bovina a 1% (p/v), y de preferencia tamponada para pH 7,3 – 8,0. Hacer de cada una de las dos preparaciones por lo menos tres diluciones separadas independientes, de preferencia, en duplicado. Las concentraciones de esas diluciones en Factor VII son ajustadas de modo que la concentración final sea inferior a 0,005 UI/ml.

Preparar, igualmente, una solución control conteniendo el conjunto de los constituyentes de la mezcla reactiva con excepción del Factor VII.

Todas las diluciones son preparadas en tubos de plástico y utilizadas durante la primera hora.

*Etapas 1.* A cada una de las diluciones, obtenidas a partir de la preparación de referencia y de la muestra, añadir un volumen apropiado del reactivo de coagulación precalentado (o de una mezcla de sus constituyentes separados), mezclar e incubar a 37 °C en tubos de plástico o pozos de una microplaca. La concentración de los diferentes constituyentes durante la formación del Factor Xa es como la especificada en reactivos. Dejar desarrollar la reacción de activación del Factor X durante un tiempo apropiado; el término de la reacción acontece, de preferencia, antes que la concentración en Factor Xa haya alcanzado su nivel máximo, a fin de que la curva dosis-respuesta presente una linealidad satisfactoria. El tiempo de reacción es igualmente escogido de modo que la condición de linealidad de la curva de producción del Factor Xa en función del tiempo sea satisfactoria. Es generalmente de la orden de 2 a 5 minutos, pero son admisibles ciertas variaciones para posibilitar mejorar la linealidad de la curva dosis-respuesta.

*Etapas 2.* Parar la reacción de activación por adición de una mezcla reactiva conteniendo el sustrato cromogénico. La velocidad de clivaje del sustrato, que es proporcional a la concentración del Factor Xa es determinada con el auxilio de un espectrofotómetro por la variación de la absorbancia en un largo de onda apropiado. Puede determinarse la absorbancia, continuamente, lo que posibilita calcular la velocidad inicial de clivaje del sustrato, interrumpiendo la reacción de hidrólisis al final de un tiempo apropiado, bajando el pH con un reactivo apropiado tal como el ácido acético a 50% (p/v) o una solución de citrato de sodio *M* en pH 3,0. Ajustar el tiempo de hidrólisis de modo que la condición de linealidad de formación del cromóforo en función del tiempo sea satisfactoria. Este tiempo es generalmente de los 3 a 15 minutos, pero son toleradas ciertas variaciones si posibilitan mejorar la linealidad de la curva

dosis-respuesta. Verifique la validez de la titulación y calcule la actividad de la preparación de la muestra por los procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (8).

### 5.5.1.6 DETERMINACIÓN DEL FACTOR X DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA

La determinación del Factor X de la coagulación sanguínea humana es realizada después de activación específica en Factor Xa, que es calculada por comparación de su actividad en clivar un sustrato cromogénico peptídico específico con la misma actividad del Estándar Internacional o de una preparación de referencia medida en Unidades Internacionales.

La Unidad Internacional del Factor X corresponde a la actividad de una dada cantidad del Estándar Internacional que es constituido por un concentrado liofilizado del Factor X de la coagulación sanguínea humana.

La correspondencia entre la Unidad Internacional y el Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de Salud.

El método de la determinación cromogénica incluye dos etapas: activación del Factor X bajo acción del veneno de cobra, seguida de clivaje enzimático de un sustrato cromogénico por el Factor Xa que libera un cromóforo cuantificable por espectrofotometría. En condiciones de dosificación apropiadas, existe una relación lineal entre la actividad del Factor Xa y el clivaje del sustrato.

#### REACTIVOS

*Activador específico del Factor X proveniente del veneno de la víbora de Russell (VVR):* proteína obtenida a partir del veneno de la víbora de Russell (*Vipera russelli*) que activa, específicamente, el Factor X. Reconstituir la preparación siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez reconstituida, conservar a 4 °C y utilizar en el espacio de 1 mes.

*Sustrato cromogénico para el Factor Xa:* sustrato cromogénico específico del Factor Xa tal como: clorhidrato de N-a-benciloxycarbonil-D-arginil-L-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, clorhidrato de Nbenzoilo-L-isoleucil-L-glutamyl-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, metanosulfonil-D-leucil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida, acetato de metoxycarbonil-D-ciclo-hexilalanil-glicil-L-arginina-4-nitroanilida. Reconstituir siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Tampón de dilución:* solución conteniendo trometamina a 0,37% (p/v), cloruro de sodio a 1,8% (p/v), imidazol a 0,21% (p/v), bromato de hexadimetrina a 0,002% (p/v) y albúmina bovina, o de albúmina humana a 0,1% (p/v). Si necesario, ajustar para pH 8,4 con ácido clorhídrico.



## PROCEDIMIENTO

*Solución prueba:* diluir la muestra en el *Tampón de dilución* para obtener una solución conteniendo 0,18 UI del Factor X por mililitro. Preparar, por lo menos, tres diluciones más de esa solución en el *Tampón de dilución*.

*Solución estándar:* diluir la preparación estándar en el *Tampón de dilución* para obtener una solución conteniendo 0,18 UI del Factor X por mililitro. Preparar, por lo menos, tres diluciones más de esa solución en el *Tampón de dilución*.

Poco tiempo antes del ensayo, colocar todas las soluciones en baño maría a 37 °C.

Las condiciones descritas se aplican a las placas de microtitulación. Si la determinación es realizada en tubos, ajustar los volúmenes para mantener la proporción en las mezclas.

Transferir 12,5 µL de las diferentes diluciones de la *Solución prueba* o de la *Solución estándar* para una serie de pozos de una placa de microtitulación mantenida a 37 °C. Añadir en cada pozo 25 µL de *VVR*. Incubar durante exactamente 90 segundos. Añadir cada pozo, 150 µL *Sustrato cromogénico para el Factor Xa*, diluido seis veces en el *Tampón de dilución*. Proceder a la lectura de la variación de absorbancia en 405 nm (5.2.14) y continuar durante tres minutos para obtener la velocidad promedio de variación de la absorbancia. Se no es posible una lectura continua, determinar la absorbancia en 405 nm con intervalos consecutivos apropiados, por ejemplo, de 40 en 40 segundos. Construir el gráfico lineal de los valores de absorbancia en función del tiempo y calcular la velocidad media de variación de la absorbancia. A partir de los valores individuales encontrados para cada dilución del estándar y de la muestra, calcular la actividad de la muestra y verificar la validez de la medida por los métodos estadísticos habituales (8).

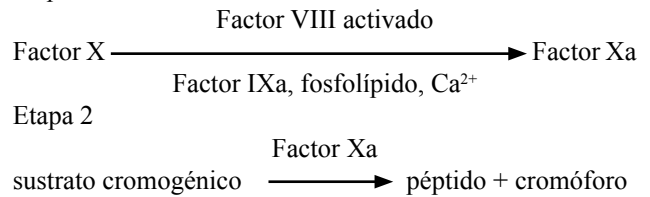
### 5.5.1.7 DETERMINACIÓN DEL FACTOR VIII DE LA COAGULACIÓN SANGUÍNEA HUMANA, LIOFILIZADO

Es realizado por la determinación de la actividad biológica del Factor VIII como un cofactor en la activación del Factor X por el Factor IX activado (IXa) en presencia de iones calcio y de fosfolípidos. La actividad de una preparación del Factor VIII es calculada por comparación de las cantidades respectivas de esa preparación y del Estándar Internacional; o de una preparación de referencia medida en unidades internacionales que son necesarias para obtener una determinada velocidad de formación del Factor Xa en un medio de reacción conteniendo las diferentes sustancias que participan en la activación del Factor X.

La Unidad Internacional de la actividad del Factor VIII corresponde a la actividad de una determinada cantidad del Estándar Internacional que consiste en un concentrado liofilizado del Factor VIII de la coagulación sanguínea humana. La equivalencia del Estándar Internacional con Unidades Internacionales es establecida por la Organización Mundial de Salud (OMS). El concentrado de Factor VIII

de la coagulación sanguínea humana es medido en unidades internacionales en relación al Estándar Internacional. El método de medición colorimétrica consiste en dos etapas sucesivas: la activación del Factor X bajo a acción del Factor VIII en una mezcla reactiva de factores de coagulación compuestos de sustancias purificadas y el clivaje enzimático de un sustrato cromogénico por el Factor Xa que libera un cromóforo cuantificable por espectrofotometría. En condiciones apropiadas de medición hay una relación lineal entre la velocidad de formación del Factor Xa y la concentración del Factor VIII. En el esquema siguiente se resume el principio de la medición:

#### *Etapas*



Las dos etapas utilizan reactivos que pueden ser obtenidos comercialmente. A pesar de que la composición de esos reactivos pueda estar sujeta a alguna variación, sus características esenciales son descritas en las presentes especificaciones. Pueden ser permitidos desvíos con relación a tales especificaciones desde que sea demostrado, mediante el uso del Estándar Internacional, que los resultados obtenidos no difieren significativamente. Los embalajes comerciales son utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante; es importante asegurar que el embalaje escogido es adecuado.

Los conjuntos usados deben ser debidamente validados, pudiendo ser utilizada en ese caso, la verificación del tiempo de generación del Factor Xa, a fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar 50% de formación máxima de Factor Xa.

#### REACTIVOS

La mezcla reactiva de factores de la coagulación corresponde a las proteínas purificadas, de origen humana, o bovina, específicamente, el Factor X, el Factor IXa y un activador del Factor VIII, generalmente la trombina. Esas proteínas son parcialmente purificadas, preferencialmente, como mínimo a 50% y no contienen impurezas capaces de interferir en la activación del Factor VIII, o Factor X. La trombina puede estar presente bajo la forma de su precursor, la protrombina, siempre que su activación en la mezcla reactiva sea suficientemente rápida para posibilitar una activación completa y casi instantánea del Factor VIII en el ensayo. La mezcla reactiva debe contener fosfolípidos que pueden ser de origen natural (por ejemplo: cerebro, medula espinal bovina y extracto de soja) u obtenida artificialmente, siendo constituida, por cerca de 15 a 31% de fosfatidilserina. La concentración final en fosfolípidos durante la etapa de formación del Factor Xa es de, aproximadamente, 10 a 35 µmol/L. La mezcla reactiva contiene, también, iones calcio en cantidad tal que su concentración final sea de 5 a 15 mmol/L. La etapa final de formación del Factor Xa es conducida en una solución que debe contener,



como mínimo, 1 mg/ml de albúmina humana, o bovina, convenientemente tamponada (pH 7,3 a 8,0). Los diferentes constituyentes del medio reactivo son generalmente reunidos en dos preparaciones separadas, que no deberán inducir por sí solas a la formación de Factor Xa. Después de la reconstitución esas dos preparaciones pueden ser reunidas con la condición de que no se formen cantidades de Factor Xa en la ausencia del Factor VIII. El Factor VIII es el único factor que limita la formación del Factor Xa en la mezcla de incubación final. La segunda etapa consiste en la cuantificación del Factor Xa formado en la etapa anterior en el medio de un sustrato cromogénico específico del Factor Xa. Ese sustrato es generalmente un péptido corto derivado de 3 a 5 aminoácidos ligados a un agrupamiento cromóforo. La cisión de ese agrupamiento y del sustrato peptídico promueve un desplazamiento de la actividad cromofórica para un largo de onda que posibilita su cuantificación por espectrofotometría. El sustrato, generalmente disuelto en agua y utilizado en una concentración final de 0,2 a 2 mmol/L, debe contener los inhibidores apropiados al impedimento de la formación adicional del Factor Xa y suprimir toda la actividad trombínica, lo que posibilita mejorar la selectividad de la dosificación en presencia del Factor Xa.

## PROCEDIMIENTO

Debe ser reconstituido todo contenido de una ampolla de la preparación de referencia y de la muestra adicionando la cantidad de agua; usar inmediatamente. Añadir cantidades de prediluyentes necesarios para obtener soluciones entre 0,5 a 2,0 UI/ml. El prediluyente es constituido por plasma proveniente de un donante portador grave de la hemofilia A, o de un reactivo preparado artificialmente, dando resultados equivalentes a los obtenidos con plasma hemofílico y con las mismas preparaciones estándar y muestra. Las soluciones prediluidas deben presentar buena estabilidad para además del tiempo necesario a la determinación (por lo menos 30 minutos) a 20 °C, y deben ser utilizadas dentro de 15 minutos. Realizar las diluciones siguientes de la preparación estándar y de la muestra por medio de una solución tampón isotónica sin agente de quelación, y conteniendo 1% de albúmina humana o bovina; la solución puede contener, por ejemplo, trometamina o imidazol y es de preferencia tamponada (pH 7,3 a 8,0). Preparar, como mínimo, tres diluciones adicionales independientes, de preferencia en duplicado. Las soluciones deben ser preparadas de modo que la concentración final en Factor VIII, fuera de la etapa de formación del Factor Xa, sea inferior a 0,03 UI/ml y de preferencia a 0,01 UI/ml. Preparar un estándar conteniendo el conjunto de los constituyentes de la mezcla reactiva, con excepción del Factor VIII. Preparar las diluciones en tubos plásticos y usar inmediatamente.

*Etapa 1.* A cada una de las diluciones precalentadas, obtenidas a partir de la preparación estándar y de la muestra, juntar un volumen apropiado del reactivo de coagulación precalentado (o de una mezcla de sus constituyentes separados), mezclar e incubar a 37 °C en tubos plásticos o pozo de una microplaca. Dejar correr la reacción de activación del Factor X durante tiempo apropiado; el fin de la reacción acontece de preferencia antes que la concentración en

Factor X haya alcanzado su nivel Máximo, a fin de que la curva dosis-respuesta presente una linealidad satisfactoria. El tiempo de reacción es igualmente escogido de modo que la condición de linealidad de la curva de producción del Factor Xa en función del tiempo sea satisfactoria. Y generalmente de la orden de 2 a 5 minutos no siendo admisibles ciertas variaciones que posibiliten mejorar la linealidad de la curva dosis-respuesta.

*Etapa 2.* Interrumpir la reacción de activación por adición de una mezcla reactiva conteniendo el sustrato cromogénico. La velocidad de clivaje del sustrato, que es proporcional a concentración del Factor Xa, es determinada en un espectrofotómetro, por la variación de la absorbancia en un largo de onda apropiado. Determinar la absorbancia, continuadamente, para posibilitar el cálculo de la velocidad inicial de clivaje del sustrato, interrumpiendo la reacción de hidrólisis al final de un tiempo apropiado bajando el pH, con un reactivo apropiado tal como el ácido acético (50% v/v de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) o tampón citrato M pH 3,0. Ajustar el tiempo de hidrólisis de modo que la condición de linealidad de la formación del cromóforo en función del tiempo sea satisfactoria. Ese tiempo es generalmente de los 3 a 15 minutos, siendo toleradas ciertas variaciones, siempre que posibiliten el mejoramiento de la linealidad de la curva dosis-respuesta. Verificar la validez del ensayo y calcular la actividad de la muestra por procedimientos estadísticos aplicados a los ensayos biológicos (8).

### 5.5.1.8 DETERMINACIÓN DE FACTORES DE LA COAGULACIÓN ACTIVADOS

Si la muestra contiene heparina, determine la cantidad existente y neutralícela juntando sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizan 1 UI de heparina). Con el tampón tris-cloruro de sodio pH 7,5, prepare diluciones a 1/10 y 1/100. Coloque una serie de tubos de polietileno en baño maría a 37 °C. Introduzca en cada tubo 0,1 ml de plasma pobre en plaquetas y 0,1 ml de una dilución apropiada de cefalina SR o de una preparación fosfolipídica que actúe como sustituto de plaquetas. Deje en reposo durante 60 segundos y junte cada tubo 0,1 ml de una de las diluciones y para el tubo de ensayo en blanco 0,1 ml de la solución tampón.

Junte, inmediatamente, cada tubo 0,1 ml de una solución de cloruro de calcio a 0,37% (p/v), previamente calentada a 37 °C, y determine el intervalo de tiempo entre la adición de la solución de cloruro de calcio y la formación del coágulo, esa determinación es realizada en los 30 minutos que siguen a la primera dilución. El ensayo sólo es válido si el tiempo de coagulación del ensayo en blanco es de 200 a 350 segundos.

### 5.5.1.9 DETERMINACIÓN DE TÍTULO DE HEMAGLUTININAS ANTI-A Y ANTI-B (MÉTODO INDIRECTO)

Preparar una dilución seriada en duplicado de la preparación a ser examinada en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Para cada dilución de una serie, añadir volumen igual a 5% (v/v) de la suspensión de eritrocitos del

grupo A1. Los eritrocitos deben ser previamente lavados tres veces en solución de cloruro de sodio. Para cada dilución de la otra serie añadir volumen igual de 5% (v/v) de la suspensión de eritrocitos del grupo B. Los eritrocitos deben ser previamente lavados tres veces en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Incubar las series de dilución a 37 °C por 30 minutos y entonces lavar tres veces con cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Dejar los eritrocitos en contacto con el reactivo antiglobulina humano polivalente por 30 minutos. Sin centrifugar, examinar cada suspensión para aglutinación en microscopio.

### 5.5.1.10 TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### INTRODUCCIÓN

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos fueron establecidas con base en dos principios diferentes:

- a) amplificación de una secuencia blanco de ácidos nucleicos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), o la amplificación isotérmica de una secuencia de ácido ribonucleico (RNA);
- b) amplificación de una señal de hibridación para el ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante el empleo del método del ADN ramificado (bADN), por ejemplo. En ese caso, la amplificación de la señal se realiza sin someter el ácido nucleico a ciclos repetitivos de amplificación.

En líneas generales, el método PCR es descrito como la técnica de referencia. Pueden ser utilizados métodos alternativos, siempre que satisfagan los requisitos de calidad y sean debidamente validados.

#### CAMPO DE APLICACIÓN

Establecer los requisitos de preparación de la muestra, de la amplificación de secuencias del ADN y de la detección específica del producto de la reacción PCR. La PCR posibilita detección y amplificación de secuencias definidas de ADN y de RNA (después de su transcripción reversa en ADN complementario – cADN).

#### PRINCIPIO DEL MÉTODO

La PCR es el fundamento de un método que posibilita la amplificación específica *in vitro* de segmentos de ADN o RNA. Después de la desnaturalización de la cadena doble de ADN en cadenas simples de ADN, de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores, de polaridad opuesta, se hibridan con sus respectivas secuencias complementarias, en el ADN a ser amplificado. En ese caso, la actividad de los iniciadores posibilita que sea completada la cadena simple del ADN, dando lugar a secuencias cortas, bi-cuaternarias que rodean el fragmento del ADN a ser amplificado; sirviendo así como punto de partida de la síntesis del ADN. Señalándose que tal proceso es realizado mediante la acción de un ADN polimerasa termoestable.

La amplificación del ADN ocurre en ciclos que consisten en:

- desnaturalización del ácido nucleico por el calor (secuencia blanco a ser amplificada) en dos cadenas mono-cuaternarias;
- hibridación específica de los iniciadores con la secuencia a ser amplificada, bajo condiciones adecuadas de reacción;
- alargamiento, mediante la acción del ADN polimerasa, de los iniciadores ligados cada una de las dos cadenas simples, a una temperatura adecuada (favorable al proceso de síntesis de ADN).

Los ciclos repetidos de desnaturalización por el calor, a hibridación de los iniciadores y la síntesis de ADN dan lugar a una amplificación exponencial del fragmento de ADN entonces delimitado por los iniciadores.

El producto específico de la reacción de PCR, conocido como amplicon, puede ser detectado por medio de una variedad de métodos de especificidad y sensibilidad apropiadas.

El ensayo de PCR Multiplex usa varios pares de iniciadores, destinados a amplificación simultánea para diferentes objetivos de una reacción.

#### MATERIAL PARA EL ENSAYO

Debido a la gran sensibilidad de la PCR, las muestras deben ser protegidas de la incidencia de luz y de cualquier contaminación externa. El muestreo, conservación y transporte del material a ser ensayado deben ser desarrollados en condiciones que posibilitan reducir al mínimo los riesgos de degradación de la secuencia a ser amplificada. En el caso de las secuencias de RNA marcado, deben ser tomadas precauciones especiales ya que el RNA es mucho sensible a la degradación por ribonucleasa, como también, a algunos aditivos (anticoagulantes y conservantes) que pueden interferir en los ensayos.

#### PROCEDIMIENTO

##### *Prevención de los contaminantes*

El riesgo de contaminación requiere la existencia de áreas restringidas, según la naturaleza de los materiales y tecnología utilizados. Los puntos a ser considerados incluyen: el movimiento de personal, el flujo de trabajo, el movimiento de materiales, sistemas de ventilación y los procedimientos de descontaminación.

Conviene realizar una subdivisión del sistema en áreas, como:

- área de preparación primaria (local donde se manipulan exclusivamente los materiales no contenidos en la matriz, por ejemplo, los iniciadores y tampones);
- área pre-PCR (donde son manipulados los reactivos, las muestras y los controles);
- área de amplificación (donde el material amplificado es manipulado en sistema cerrado);
- área de detección polvos-PCR (única área en que los productos de la amplificación son manipulados en sistema abierto).

### Preparado de las muestras

La preparación de las muestras consiste en la extracción o en la liberación de la secuencia blanco a ser amplificada a partir del material a examinar. El método utilizado para tal fin debe ser eficaz, tener reproductibilidad y compatibilidad con la realización de la amplificación en las condiciones de reacción seleccionadas. Puede ser utilizada una variedad de métodos físico químicos para extracción y/o de enriquecimiento.

Posibles aditivos en el material en análisis pueden interferir en el método PCR. Deben ser utilizados los procedimientos descritos en el ítem de *Control Interno*, con objetivo de verificar la ausencia de factores de inhibición en el material a ser examinado.

Cuanto a los modelos de RNA, deben ser tomadas precauciones para que haya ausencia de actividad del tipo ribonucleasa.

### Amplificación

La amplificación de una secuencia blanco por la técnica de PCR requiere, como mínimo, un par de iniciadores, los cuatro tipos de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), iones de magnesio ( $MgCl_2$ ), y un ADN polimerasa termoestable para síntesis del ADN.

La amplificación de la secuencia blanco por PCR es conducida bajo condiciones cíclicas definidas: perfil de temperatura para desnaturalización de la doble-hélice de ADN; anillado y extensión de los iniciadores y tiempos de incubación en temperaturas seleccionadas dentro de una banda de variación.

Deben ser considerados los siguientes parámetros:

- el largo y la composición base del iniciador y de la secuencia blanco;
- el tipo de ADN polimerasa, la composición del tampón y el volumen de reacción usado en la amplificación;
- el tipo de termociclador usado y la tasa de conductividad térmica entre el equipo, el tubo de reacción y el medio de reacción.

La amplificación ocurre en ciclos que consisten en:

- desnaturalización de la secuencia blanco del ácido nucleico por calentamiento de las dos hélices simples; reacción es calentada entre 92 – 96 °C;
- anillado específico de los iniciadores a la secuencia blanco que será sintetizada, bajo condiciones adecuadas de reacción. La temperatura normalmente es de 55 °C, dependiendo de la homología de los iniciadores por la secuencia blanco a ser amplificada, de la composición de los iniciadores y de la cantidad de bases citosina y guanina;
- extensión de los iniciadores que están ligados a las hélices simples, por medio de la acción de la ADN polimerasa termoestable, a una temperatura adecuada a la síntesis de ADN. Normalmente a 72 °C;
- después del término del ciclo se tiene el enfriamiento a 4 °C y conservación.

### Detección

La secuencia amplificada generada puede ser identificada: por su tamaño, por su secuencia, por modificación química o por la combinación de esos parámetros. La detección y caracterización por medio del tamaño puede ser realizada por electroforesis en gel (utilizando placas de gel de agarosa, o de gel de poliacrilamida, o por electroforesis capilar), o además por cromatografía de columna (por ejemplo, HPLC – *High performance liquid chromatography*). La detección y caracterización mediante la composición de la secuencia puede ser realizada por hibridación específica con sondas complementarias de la secuencia blanco o por fragmentación del material amplificado mediante una enzima de restricción en los sitios específicos de la secuencia a ser amplificada. La caracterización por medio de la modificación química puede ser realizada por incorporación de un fluoróforo en las secuencias marcadas y posterior excitación y detección de la fluoresceína. Pueden ser, también, utilizadas sondas marcadas que posibilitan una detección posterior radioisotópica o inmunoenzimático.

### EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El resultado de un ensayo sólo es válido si el (los) control(es) positivo(s) es (son), inequívocamente positivo(s) y el control(es) negativo(s) es (son), inequívocamente negativo(s). Debido a la alta sensibilidad del método PCR y a los riesgos inherentes de contaminación, es necesario confirmar los resultados positivos realizando el ensayo en duplicado o, cuando hay posibilidad, con una nueva alícuota de la muestra. La muestra se considera positiva si al menos uno de los ensayos repetidos presenta resultado positivo.

### GARANTÍA DE CALIDAD

#### *Validación del sistema de ensayo de la PCR*

El programa de validación debe incluir los equipos y el método PCR utilizado. Como referencias deben ser utilizadas las recomendaciones del ICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Q2B, *Validación del Método Analítico*), o referencia alternativa equivalente.

Es indispensable efectuar esa validación mediante estándares biológicos de referencia oficiales, adecuadamente calibrados por medio de Estándares Internacionales para las secuencias blanco utilizadas en el ensayo.

La validación debe incluir la determinación del umbral de respuesta positiva, o sea, el número mínimo de secuencias marcadas por unidad de volumen que se pueden detectar en por lo menos 95% de los ensayos. Ese valor depende de varios factores inter-relacionados, como: el volumen de la muestra sometida a la extracción y de la eficacia del método de extracción; de la transcripción del RNA marcado en ADN complementario; del procedimiento de amplificación y del sistema de detección. Para definir el límite de detección del sistema utilizado, conviene considerar el umbral de respuesta positiva para cada secuencia a ser amplificada y las caracte-

terísticas de funcionamiento del ensayo con los respectivos límites máximos y mínimos de la respuesta positiva.

#### *Control de calidad de los reactivos*

Todos los reactivos cruciales usados en la metodología puesta en práctica deben ser objeto de control antes de su uso en rutina. La aceptación/rechazo debe estar basada en criterios de calidad predefinidos.

Los iniciadores constituyen un de los componentes esenciales del método PCR exigiendo así, atención particular cuanto a su concepción; pureza y validación de su uso en el ensayo. Cada nuevo lote de iniciadores debe ser controlado cuanto a la especificidad; eficacia de la amplificación y ausencia de impurezas inhibitoras. Los iniciadores pueden ser modificados (por ejemplo, por conjugación con un fluoróforo, o un antígeno) para posibilitar la utilización de un método específico de detección de la secuencia blanco a ser amplificada; desde que aquellas modificaciones no inhiban la precisión y la eficacia de la amplificación de la secuencia blanco.

#### *Controles del ensayo*

##### *Controles externos*

Para detectar eventuales contaminaciones y asegurar la sensibilidad adecuada, conviene incluir en todos los ensayos de PCR los siguientes controles externos:

- un control positivo con un número definido de copias de la secuencia blanco, siendo ese número determinado, específicamente, para cada sistema de ensayo y expresado como un múltiplo del umbral de respuesta positiva del sistema en cuestión;
- un control negativo constituido por una muestra de matriz que demostró estar exenta de secuencias blanco.

##### *Control interno*

El control interno es formado por secuencias nucleotídicas definidas conteniendo los locales de conexión del iniciador. El control interno debe ser amplificado con eficacia definida y los productos deben ser claramente discernibles. Ese control interno debe pertenecer al mismo tipo de ácido nucleico (ADN/RNA) de la muestra. El control interno es preferencialmente adicionado a la muestra antes del aislamiento del ácido nucleico y, por tanto, actúa como un control global (extracción, transcripción reversa, amplificación y detección).

#### *Evaluación externa de la calidad*

Para cada laboratorio y cada operador, la participación en programas externos de la evaluación de calidad constituye un aspecto importante de la garantía de calidad en materia de PCR.

La sección siguiente (**5.5.1.10.1**) está dada a título de información.

### **5.5.1.10.1** Recomendaciones para la validación de las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos para la detección del RNA del virus de la hepatitis c (HCV) en las mezclas de plasma

#### INTRODUCCIÓN

Este capítulo es suministrado a título de información.

La mayoría de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos corresponde a ensayos analíticos cuantitativos destinados a detectar su presencia. Hay algunos ensayos cuantitativos comercializados o desarrollados internamente por los propios laboratorios. Para detectar la contaminación de RNA del HCV en las mezclas de plasma, son adecuados los ensayos cualitativos, pudiendo, inclusive, ser considerados como ensayos límite para control de impurezas. En esas recomendaciones están descritos los métodos de validación de las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos aplicables apenas a los ensayos cualitativos destinados a detectar el RNA del VHC en las mezclas de plasma. Por consiguiente, los dos parámetros de validación considerados los más importantes son la especificidad y el límite de detección. La robustez es, también, evaluada. Sin embargo, ese documento puede, también, ser utilizado como base de validación general de las técnicas de amplificación.

En ese documento está definida la técnica analítica como el conjunto de operaciones realizadas después de extracción del ácido nucleico, seguido de detección de los productos amplificados. Señalándose que en casos de uso de conjuntos comerciales, como parte del procedimiento analítico completo, las consideraciones de validación documentadas ya realizadas por el fabricante pueden sustituir la validación por el operador. No obstante, el desempeño del conjunto comercializado con respecto al uso al cual se destina tiene que ser demostrado por el usuario (ej: límite de detección, robustez y contaminación cruzada).

#### ESPECIFICIDAD

La especificidad es la capacidad para evaluar, inequívocamente, el ácido nucleico en presencia de componentes de presencia no esperada.

La especificidad de los procedimientos analíticos de amplificación del ácido nucleico es dependiente de la elección de los iniciadores, de la elección de la sonda (para análisis del producto final) y el rigor de las condiciones de prueba (para ambas etapas de amplificación y detección).

En la concepción de los iniciadores y de las sondas, uno de los aspectos a ser considerado es su especificidad en la detección del RNA del HCV; para ese hecho es conveniente comparar las secuencias blanco con las secuencias publicadas en bancos de datos. Para el HCV, los iniciadores y sondas son, normalmente, escogidos a partir de las áreas de la región 5' no codificante (5'NCR) del genoma del HCV, compuesta por 341 nucleótidos, que son las más conservadas entre los diferentes aislados del HCV.



El producto amplificado debe ser identificado, inequívocamente, por el uso de métodos como: amplificación con iniciadores entrelazados, análisis de enzimas de restricción, secuenciamiento, o hibridación con sonda específica.

Para validación de la especificidad de la técnica analítica, es conveniente probar, como mínimo, 100 mezclas de plasma negativo para el RNA del HCV, y que todos los resultados obtenidos sean negativos. La Organización Mundial de Salud (OMS) dispone de muestras apropiadas de plasmas no reactivos.

La capacidad de la técnica en la detección de todos los genotipos del HCV dependerá de la elección de los iniciadores, de las sondas y de los parámetros operacionales. Es conveniente que esa capacidad sea demostrada por medio del uso de una colección de preparaciones de referencia caracterizadas.

Tiene sido sugerido que el estándar de distribución de los genotipos del HCV en Brasil es semejante al encontrado en muchos países europeos, con la prevalencia de los tipos 1 y 3. Se observa un comportamiento epidemiológico típico de una propagación exponencial en los últimos años, probablemente como consecuencia de transfusiones sanguíneas. En ese contexto, los genotipos 1 y 3 deben ser detectados en niveles apropiados.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección de una técnica individual es la menor cantidad de ácido nucleico que puede ser detectada, pero, no, necesariamente, cuantificada, con un valor exacto en la muestra.

El proceso de amplificación utilizado para la detección del RNA del HCV en las mezclas de plasmas da, generalmente, resultados cualitativos. El número de resultados posibles se limita a dos respuestas: positivo o negativo. A pesar de que sea recomendada la determinación del límite de detección, por razones prácticas, es determinado el umbral de la respuesta positiva para las técnicas de amplificación del ácido nucleico. El umbral de la respuesta positiva es el número mínimo de secuencias blanco por unidad de volumen que puede ser detectado en 95% de los ensayos. Ese umbral de la respuesta positiva es influenciado por la distribución de los genomas virales en las muestras individuales ensayadas y por factores tales como a eficacia de la enzima, que pueden llevar a diferencias de 95% en los umbrales de la respuesta positiva obtenidos en las análisis individuales.

Para determinar el umbral de respuesta positiva, es indispensable ejecutar la técnica en días diferentes con una serie de diluciones de un reactivo de trabajo o del virus de la Hepatitis C (estándar biológico de referencia), calibrado por comparación con el Estándar Internacional del HCV 96/790 OMS, a fin de evaluar entre los ensayos. Son probadas, como mínimo, tres series de diluciones separadas con un número suficiente de repeticiones de cada dilución para obtener un número total de 24 resultados por dilución y posibilitar, así, el análisis estadístico de los resultados.

Por ejemplo, en un laboratorio se testean tres series de diluciones con ocho repeticiones para cada dilución en días diferentes; cuatro series de dilución con seis repeticiones para cada dilución en días diferentes, o seis series de diluciones con cuatro repeticiones para cada dilución en días diferentes.

Para que el número de diluciones utilizadas se mantenga igual, es indispensable efectuar un ensayo preliminar (como, por ejemplo, diluciones logarítmicas en la muestra de la mezcla de plasma para obtener un valor preliminar del umbral de respuesta positiva, o sea, la mayor dilución en que ocurre una señal positiva).

La distribución de las diluciones puede entonces ser realizada con base en ese valor preliminar precalculado (utilizando, por ejemplo, un factor de dilución de 0,5 log), o inferior a una mezcla de plasma negativo como matriz de dilución. El tenor en RNA del HCV que puede ser detectado es de 95% en los ensayos y puede ser calculado utilizando un método estadístico apropiado.

Esos resultados, también, sirven para demostrar la variación interna del ensayo y la variación en los varios días del método analítico.

#### ROBUSTEZ

La robustez de un método analítico es la medida de su capacidad de permanecer inalterable cuando sujeto a pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros operacionales y da una indicación de la viabilidad de la técnica en las condiciones normales de utilización. La evaluación de la robustez es uno de los aspectos a ser considerado durante la fase de desarrollo. Posibilita establecer la viabilidad de la técnica frente a las variaciones deliberadas en los parámetros operacionales. En las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos, pequeñas variaciones en los parámetros operacionales pueden tener una importancia especial. Sin embargo, la robustez de esta puede ser demostrada durante el desarrollo del método, cuando son ensayadas pequeñas variaciones en la concentración de reactivos (por ejemplo:  $MgCl_2$ , iniciadores, o dNTPs). Para demostrar la robustez durante la validación, deben examinarse, como mínimo, veinte mezclas de plasma (escogidos por casualidad) negativos para RNA del HCV a las cuales es adicionada una concentración, típica final, que corresponde al umbral de la respuesta positiva, previamente, determinada. Todos los resultados obtenidos son positivos.

Pueden surgir problemas con la robustez en el caso de métodos en que se usan, en su fase inicial, la ultra-centrifugación previamente a la extracción del RNA viral. Por consiguiente para probar la robustez de esos métodos. Son ensayadas, como mínimo, veinte mezclas de plasma conteniendo concentraciones variadas de RNA del HCV, pero exentas de anticuerpos específicos del HCV. Todos los resultados obtenidos son positivos.

Es conveniente demostrar la ausencia de contaminación cruzada por la detección exacta de un conjunto de, por lo menos veinte muestras, alternando muestras de mezclas



de plasma negativas y de mezclas de plasma negativos a las cuales fue adicionada una alta concentración del HCV (como mínimo, 102 veces 95% del umbral de respuesta positiva, o, como mínimo, 104 UI/ml).

#### GARANTÍA DE CALIDAD

Los métodos de ensayos biológicos tales como la técnica de amplificación de los ácidos nucleicos, pueden presentar problemas específicos que interfieren en la validación e interpretación de los resultados.

Los procedimientos deben ser descritos precisamente en la forma de procedimientos operacionales estándar (sigla en portugués POPs), que deben incluir:

- modo de muestreo (tipo de recipientes, etc.);
- preparación de las mini-mezclas (se fuera el caso);
- condiciones de conservación antes del análisis;
- descripción exacta de las condiciones operacionales (incluyendo precauciones que deben ser tomadas, a fin de evitar contaminación cruzada o destrucción del RNA viral) así como de los reactivos y preparaciones de referencia utilizadas;
- fórmulas detalladas del cálculo de los resultados, incluyendo a evaluación estadística.

El uso de un control apropiado (por ejemplo, una dilución apropiada del virus de la hepatitis C, estándar biológico de referencia; o de plasma al cual fue adicionada una muestra del HCV calibrada por comparación con el Estándar Internacional del HCV 96/790 de la OMS) puede ser considerado un medio estable satisfactorio de control del sistema y de asegurar y mantener la viabilidad de la técnica en cada utilización.

**Calificación técnica.** Para cada elemento crítico del equipo utilizado es criada una instalación apropiada y un programa de calificación operacional. Después de cualquier modificación de un equipo crítico (por ejemplo, los termocicladores) es indispensable reconfirmar la aceptabilidad de la técnica procediendo en paralelo el examen de ocho muestras de una mezcla de plasma al cual se adicionó una concentración tripla de RNA del HCV de aquella que corresponde al umbral de respuesta positiva previamente determinada; todos los resultados obtenidos son positivos.

**Calificación de los operadores.** Es desarrollado un programa apropiado de calificación para el conjunto de operadores involucrados en el ensayo. Para ese efecto, es conveniente que cada operador examine por lo menos ocho muestras de una mezcla de plasma a la cual fue adicionada una concentración triple de RNA del HCV que corresponde al umbral de respuesta positiva, previamente determinada. Ese ensayo (ocho muestras) es repetido dos veces en días diferentes en un total de veinticuatro análisis realizados en tres días diferentes. Todos los resultados obtenidos son positivos.

### 5.5.1.1 DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DEL ACTIVADOR DE LA PRECALICREÍNA

El activador de la precalicreína (APC) transforma la precalicreína en calicreína y puede ser titulado por presentar la capacidad de separar un cromóforo de un sustrato peptídico sintético, determinándose la velocidad de la reacción por espectrofotometría. La concentración en APC es calculada por comparación con la preparación estándar cuya actividad está expresada en unidades internacionales. La Unidad Internacional corresponde a la actividad de una determinada cantidad de Estándar Internacional constituida por activador de la precalicreína liofilizada. La correspondencia entre la Unidad Internacional y el Estándar Internacional es establecida por la Organización Mundial de Salud.

#### REACTIVOS

##### *Tampón A*

Trometamina	6,055 g
Cloruro de sodio	1,17 g
Bromato de hexadimetrina	50 mg
Azida Sódica	0,100 g

Disolver los reactivos en agua, ajustar el pH para 8,0 con ácido clorhídrico 2 M y completar a 1000 ml con agua.

##### *Tampón B*

Trometamina	6,055 g
Cloruro de sodio	8,77 g

Disolver los reactivos en agua, ajustar el pH para 8,0 con ácido clorhídrico 2 M y completar a 1000 ml con agua.

#### PREPARACIÓN DEL SUSTRATO DE PRECALICREÍNA.

La sangre o el plasma usado en la preparación de la precalicreína debe ser recolectado y manipulado apenas en materiales de plástico o de vidrio siliconado para evitar la activación de la precalicreína resultante de la coagulación. Mezclar 9 volúmenes de sangre humana con 1 volumen de solución anticoagulante (ACD, CPD o una solución de citrato de sodio a 38 g/L) adicionada de 1 mg por mililitro de bromato de hexadimetrina. Centrifugar a 3600 g durante 5 minutos. Separar el plasma y centrifugar a 6000 g durante 20 minutos para separar las plaquetas. Separar el plasma pobre en plaquetas y proceder a la diálisis contra 10 volúmenes de *Tampón A* durante 20 horas. Después de la diálisis, depositar el plasma en una columna de cromatografía conteniendo dos veces su volumen de agarosa-DEAE para cromatografía de cambio iónico previamente equilibrada con *Tampón A*. Proceder a elución con *Tampón A* (débito de 20 ml/cm<sup>2</sup>/hora). Recolectar el eluato por fracciones y registrar la absorbancia en 280 nm (5.2.14). Reunir las fracciones que contienen el primer pico de proteínas para obtener un volumen de cerca de, 1,2 veces el del plasma pobre en plaquetas.

Para verificar que el sustrato no presenta calicreína activa, mezclar 1 volumen con 20 volúmenes de solución de sustrato cromogénico que será utilizado en la dosificación, previamente calentado a 37 °C, y mantener la mezcla a 37 °C durante 2 minutos. El sustrato es apropiado si la absorbancia no aumenta más de 0,001 por minuto. Añadir a la solución de sustrato 7 g por litro de cloruro de sodio y filtrar por membrana (0,45 µm). Congelar el filtrado después de partirlo en alícuotas y conservar a -25 °C; se puede, también, liofilizar el filtrado antes de la conservación. Realizar las operaciones comprendidas entre la cromatografía y la congelación de las alícuotas en el mismo día.

## TITULACIÓN

De preferencia, la titulación es realizada en un analizador enzimático automático, a 37 °C. Ajustar los volúmenes, la concentración de los sustratos y los tiempos de incubación para que la velocidad de la reacción sea lineal por lo menos hasta 35 UI por mililitro. Si necesario, se puede diluir los estándares, las muestras y el sustrato de precalicreína con *Tampón B*.

Incubar los estándares o las muestras diluidas con el sustrato de precalicreína durante 10 minutos; el volumen del estándar o de la muestra antes de la dilución no excede 1/10 del volumen total de la mezcla a ser incubada para evitar errores resultantes de las diferencias de fuerza iónica o de pH. Incubar la mezcla o una parte de la mezcla con un volumen igual o superior de una solución de un sustrato cromogénico sintético, reconocidamente específico, para la calicreína (por ejemplo, acetato de N-benzoílo-L-prolil- L-fenilalanil- L-arginina 4-nitroanilida o diclorhidrato de D-propil- L-fenilalanil- L-arginina 4-nitroanilida ) y disuelto en *Tampón B*. Registrar la variación de la absorbancia por minuto (AA/min) durante 2 a 10 minutos en el largo de onda apropiado para el sustrato utilizado. Para cada mezcla del estándar o de la muestra, preparar un blanco sustituyendo el sustrato de precalicreína por *Tampón B*. Corregir la variación de la absorbancia por minuto sustrayendo el valor obtenido con el blanco correspondiente. Trazar una curva de calibración a partir de los valores de la variación de la absorbancia por minuto, obtenidos con el estándar y las respectivas concentraciones y determinar el tenor en APC de la muestra.

### 5.5.1.12 DETERMINACIÓN DE LA ANTITROMBINA III HUMANA

El tenor de antitrombina III de la muestra es determinado comparándose a su capacidad de inactivación de la trombina en presencia de un exceso de heparina con la capacidad de una preparación estándar de concentrado de antitrombina III humana de concentración en unidades internacionales. Cantidades variables de la muestra son adicionadas a una trombina y la actividad trombina residual es determinada con un sustrato cromogénico apropiado.

La Unidad Internacional corresponde a la actividad de una cantidad determinada del Estándar Internacional de concentrado de antitrombina III humana. La equivalencia de

la Unidad Internacional con el Estándar Internacional es indicada por la Organización Mundial de Salud.

## PROCEDIMIENTO

Para la muestra y para el estándar preparar con tampón de tris-EDTA ASB de pH 8,4 conteniendo 15 UI de heparina por mililitro, dos series independientes de tres o cuatro diluciones comprendidas entre 1/75 y 1/200 a partir de 1 UI/ml. Calentar a 37 °C durante 1 a 2 minutos 200 µL de cada dilución. Añadir a cada dilución 200 µL de una solución de trombina bovina conteniendo 2 UI/ml en tampón de tris-EDTA ASB de pH 8,4. Mezclar y mantener a 37 °C durante, exactamente, 1 minuto. Añadir 500 µL de un sustrato cromogénico apropiado (por ejemplo, D-fenilalanil-L-pipecolil-L-arginina-4-nitroanilida; disolver ese sustrato en agua para obtener una solución conteniendo 4 mmol/L y diluir con tampón de tris-EDTA ASB de pH 8,4 sin albúmina hasta una concentración apropiada para el ensayo de titulación). Determinar, inmediatamente, la absorbancia en 405 nm (5.2.14) por lo menos por 30 segundos. Calcular la variación de la absorbancia (AA/min). Se puede utilizar igualmente una titulación de punto final parando la reacción con ácido acético y determinando la absorbancia en 405 nm. La variación de la absorbancia (AA/min) es inversamente proporcional a la actividad de la antitrombina III humana. Verificar la validez del ensayo y calcular la actividad de la muestra por los procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (8).

### 5.5.1.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DE LA INMUNOGLOBULINA

La determinación de la actividad anticomplementaria (AAC) de la inmunoglobulina es realizada por incubación de una muestra de inmunoglobulina (10 mg) con una determinada cantidad de complemento de cobaya (20 CH<sub>50</sub>). Sigue la titulación del complemento restante: la actividad anticomplementaria está expresada por la proporción del complemento consumido, tomando el complemento estándar como 100%.

La unidad hemolítica de actividad complementaria (CH<sub>50</sub>) es la cantidad de complemento que, en las estipuladas condiciones de reacción, provoca la lisis de 2,5 x 10<sup>8</sup> de un número total de 5 x 10<sup>8</sup> eritrocitos debidamente sensibilizados

## REACTIVOS

*Solución madre de magnesio y de calcio.* Disolver 1,103 g de cloruro de calcio y 5,083 g de cloruro de magnesio en agua y completar 25 ml con el mismo solvente.

*Solución madre de tampón de barbital.* Disolver 207,5 g de cloruro de sodio y 25,48 g de barbital sódico en 4000 ml de agua y ajustar el pH para 7,3 con ácido clorhídrico *M*. Añadir 12,5 ml de *Solución madre de magnesio y de calcio* y completar 5000 ml con agua. Filtrar por membrana (0,22 µm) y conservar a 4 °C en recipiente de vidrio.

**Solución de gelatina.** Disolver 12,5 g de gelatina en cerca de 800 ml de agua y calentar a ebullición en baño maría. Enfriar hasta 20 °C y completar 10 litros con agua. Filtrar por membrana (0,22 µm) y conservar a 4 °C. Utilizar, únicamente, una solución límpida.

**Solución citratada.** Disolver 8 g de citrato de sodio, 4,2 g de cloruro de sodio y 20,5 g de glucosa en 750 ml de agua. Ajustar a pH 6,1 con solución de ácido cítrico a 10% (p/v) y completar 1000 ml con agua.

**Tampón de gelatina-barbital.** Juntar 4 volúmenes de *Solución de gelatina* a 1 volumen de *Solución madre de tampón barbital* y mezclar. si necesario, ajustar el pH para 7,3 con ácido clorhídrico *M* o hidróxido de sodio *M* y conservar a 4 °C. Preparar, diariamente, una nueva solución.

**Sangre de carnero estabilizada.** Recolectar 1 volumen de sangre de carnero en 1 volumen de *Solución citratada* y mezclar. Conservar la sangre estabilizada a 4 °C durante, por lo menos, 7 días y, como máximo, durante 28 días. La sangre de carnero o los eritrocitos de carnero estabilizados pueden ser obtenidos, comercialmente, en diversos proveedores.

**Hemolisina.** Suero anti-hemáties de carnero, preparado en conejo. Tales sueros pueden ser obtenidos, comercialmente, en diversos proveedores.

**Complemento de cobaya.** Mezclar los sueros obtenidos a partir de, por lo menos, 10 cobayas. Separar el suero de la sangre coagulada por centrifugación a una temperatura cerca de 4 °C. Conservar el suero, en pequeñas porciones, a una temperatura inferior a -70 °C.

## PROCEDIMIENTO

Estandarización de la solución de eritrocitos de carnero a 5%.

Separar los eritrocitos de carnero por centrifugación de un volumen apropiado de sangre de carnero estabilizada; lavar las células, por lo menos tres veces, con el *Tampón gelatina- barbital* y preparar una suspensión a 5% (v/v) en el mismo tampón. Determinar la concentración celular por el siguiente método: añadir 0,2 ml de la suspensión a 2,8 ml de agua y centrifugar el lisado durante 5 minutos a 1000 g. La concentración celular es adecuada si la absorbancia (5.2.14) del sobrenadante, determinada en 541 nm, es de 0,62 ± 0,01. Corregir la concentración celular por adición de *Tampón de gelatina-barbital*, de acuerdo con la fórmula:

$$V_f = \frac{V_i \times A}{0,62}$$

en que

$V_f$  = volumen final,

$V_i$  = volumen inicial,

A = absorbancia determinada en 541 nm para la suspensión original.

Una vez ajustada la concentración celular, la suspensión contiene cerca de 1 x 10<sup>9</sup> células por mililitro.

Titulación de hemolisina

Preparar las diluciones de hemolisina de acuerdo con la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Diluciones de hemolisina.**

<b>Dilución de hemolisina a preparar</b>	<b>Tampón de gelatina-barbital</b>		<b>Hemolisina</b>
	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Dilución (1/...)</b>	<b>Volumen (ml)</b>
7,5	0,65	no diluido	0,1
10	0,90	no diluido	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0
1200	1,00	600	1,0
1600	1,00	800	1,0
2400	1,00	1200	1,0
3200(*)	1,00	1600	1,0
4800(*)	1,00	2400	1,0

(\*) Rechace 1,0 ml de la mezcla.

Juntar 1 ml de la suspensión a 5% de eritrocitos de carnero en cada uno de los tubos de la serie de diluciones de hemolisina a partir de la dilución a 1/75 y mezclar. Incubar los tubos a 37 °C durante 30 minutos. Transferir 0,2 ml de cada

mezcla incubada de dilución de hemolisina para nuevos tubos y añadir 1,1 ml de *Tampón de gelatina-barbital* y 0,2 ml de una dilución de complemento de cobaya (por ejemplo, 1/150). Realizar esas manipulaciones en duplicado.

Preparar tres tubos control de células no hemolizadas transfiriendo para cada uno de ellos 1,4 ml de *Tampón gelatina-barbital* y 0,1 ml de la suspensión de eritrocitos de carnero a 5%.

Preparar tres tubos control de células totalmente hemolizadas transfiriendo para cada uno de ellos 1,4 ml de agua y 0,1 ml de la suspensión de eritrocitos de carnero a 5%.

Incubar todos los tubos a 37 °C durante 60 minutos y centrifugar a 1000 g durante 5 minutos. Determinar la absorbancia (5.2.14) de los sobrenadantes en 541 nm y calcular el porcentaje de hemólisis ocurrido en cada tubo, usando la fórmula:

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1} \times 100$$

en que

$A_a$  = absorbancia de los tubos hemolisina,

$A_b$  = absorbancia promedio de los tres tubos con hemólisis total,

$A_1$  = absorbancia promedio de los tres tubos control sin hemólisis.

Construir un gráfico conteniendo los porcentuales de hemólisis en el eje de las ordenadas y los inversos de las diluciones de hemolisina en el eje de las abscisas. Determinar la dilución óptima de hemolisina a partir del gráfico, eligiendo una dilución tal que un aumento de la cantidad de hemolisina no produzca una variación apreciable en el grado de hemólisis. Esa dilución se considera como conteniendo 1 unidad de hemólisis mínima (1 UHM) en 1,0 ml. Para la preparación de los eritrocitos de carnero sensibilizados, la dilución de hemolisina correspondiente a la hemólisis óptima contiene 2 UHM por mililitro.

La titulación de hemolisina sólo es válida si el porcentaje de hemólisis total está comprendido entre 50 y 70%.

En el caso que el porcentaje de hemólisis total no pueda ser determinado a partir de la dilución utilizada, repetir la titulación utilizando una solución de complemento más o menos diluida.

*Preparación óptima de eritrocitos de carnero sensibilizada (sistema hemolítico).*

Preparar una cantidad apropiada de hemolisina diluida conteniendo 2 UHM por mililitro y un volumen igual de suspensión estandarizada de eritrocitos de carnero a 5%. Añadir la dilución de hemolisina a la suspensión estandarizada de células y mezclar. Incubar a 37 °C durante 15 minutos, conservar la temperatura de 2 a 8 °C y utilizar dentro del período de 6 horas.

*Titulación del complemento*

Preparar una dilución apropiada de complemento (por ejemplo, 1:250) utilizando a *Tampón de gelatina-barbital* y realizar la titulación, en duplicado, de acuerdo con las informaciones registradas en la **Tabla 2**.

A cada tubo, añadir 0,2 ml de eritrocitos de carnero sensibilizados, mezclar bien e incubar todos los tubos a 37 °C durante 60 minutos. Enfriar los tubos en agua con hielo y centrifugar a 1000 g durante 5 minutos. Determinar la absorbancia de los sobrenadantes en 541 nm y calcular el grado de hemólisis (Y), usando la fórmula:

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1} \times 100$$

en que

$A_c$  = absorbancia de los tubos 1 a 12,

$A_b$  = absorbancia promedio de los tubos con 100% de hemólisis,

Construir un gráfico inscribiendo los valores en abscisas, y el correspondiente volumen en mililitros de complemento diluido en ordenadas.

**Tabla 2 - Dilución del complemento**

<i>Número del tubo</i>	<i>Volumen del complemento diluido en mililitros (por ejemplo, 1:250)</i>	<i>Volumen de Tampón de gelatina-barbital en mililitros</i>
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1
3 tubos control con 0% de hemólisis	-	1,3
3 tubos control con 110% de hemólisis	-	1,3 ml de agua

Construir un gráfico inscribiendo los valores en abscisas, y el correspondiente volumen en mililitros de complemento diluido en ordenadas.

A partir de los puntos, trazar la recta ideal y determinar la ordenada de la dosis hemolítica a 50% del complemento en el punto donde  $Y/(1-Y) = 1,0$ . Calcular la actividad en términos de unidades hemolíticas ( $CH_{50}/ml$ ) de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{C_d}{C_a} \times 5$$

en que

$C_d$  = valor inverso de la dilución de complemento,

$C_a$  = volumen en mililitros de complemento diluido que produce 50% de hemólisis, 5 = Factor de escala para tener en cuenta el número de eritrocitos.

El ensayo sólo es válido si, entre 15 y 85% de hemólisis, la curva obtenida es una recta cuya inclinación se sitúa entre 0,15 y 0,40, de preferencia, entre 0,18 y 0,30.

#### Determinación de actividad anticomplementaria

Diluir el complemento de cobaya titulado con el *Tampón de gelatina-barbital* para obtener 100  $CH_{50}/ml$ . si necesario, ajustar la muestra para pH 7,0. Para una inmunoglobulina conteniendo 50 mg/ml, preparar las mezclas de incubación (**Tabla 3**)

**Tabla 3 - Tabla 3 – Mezclas de incubación.**

	<i>Muestra</i>	<i>Complemento control</i>
Inmunoglobulina(50 mg/ml)	0,2 ml	
Tampón de gelatina-barbital	0,6 ml	0,8 ml
Complemento	0,2 ml	0,2 ml

Realizar la determinación en la muestra y preparar el control de la AAC negativo y positivo a partir de un estándar internacional de inmunoglobulina humana, de acuerdo con las instrucciones suministradas en el rótulo que acompaña la preparación estándar. Si la muestra no contiene 50 mg/ml de inmunoglobulina, ajustar los volúmenes de la preparación y del *Tampón de gelatina-barbital*; por ejemplo, pipetear 0,33 ml de una preparación que contienen 30 mg/ml de inmunoglobulina y añadir 0,47 ml de *Tampón de gelatina-barbital* para obtener el mismo volumen total de 0,8 ml. Cerrar los tubos e incubarlos a 37 °C durante 60 minutos. Añadir 0,2 ml de cada mezcla de incubación a 9,8 ml de *Tampón de gelatina-barbital* para diluir el complemento. En cada tubo, realizar las titulaciones del complemento tal como descrito arriba para determinar a actividad anticomplementaria residual (**Tabla 2**). Calcular la actividad anticomplementaria de la muestra, por referencia al control del complemento considerado como 100%, de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{a-b}{a} \times 100$$

en que

$a$  = actividad complementaria promedio ( $CH_{50}/ml$ ) de los controles,

$b$  = actividad complementaria ( $CH_{50}/ml$ ) de la muestra.

El ensayo sólo es válido si:

- las actividades anticomplementares encontradas para el control AAC negativo y control AAC positivo se sitúan dentro de los límites indicados en el rótulo que acompaña la preparación estándar;
- la actividad complementaria del control del complemento ( $a$ ) es de 80 a 120  $CH_{50}/ml$ .

### 5.5.1.14 DOSIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

#### MÉTODO 1

Las proteínas en solución absorben la luz ultravioleta en el largo de onda de 280 nm, debido a la presencia en su estructura de aminoácidos aromáticos (especialmente tirosina y triptófano), propiedad que puede ser utilizada para la dosificación de proteínas. El uso de un tampón como líquido de compensación puede remediar la interferencia producida en el caso de que el tampón utilizado para disolución de la proteína posea absorbancia elevada, lo que podría comprometer los resultados. En bajas concentraciones, la proteína adsorbida sobre la curva puede provocar una disminución significativa del tenor proteico de la solución. Es posible prevenir ese fenómeno preparando muestras de tenor elevado o utilizando un detergente no iónico durante la preparación.

*Solución muestra.* Disolver una cantidad apropiada de la muestra en el tampón escogido para obtener una solución cuya concentración proteica se sitúe entre 0,2 mg/ml y 2 mg/ml.

*Solución estándar.* Preparar una solución de la sustancia de referencia apropiada correspondiente a la proteína a dosificar, en el mismo tampón que se usa para la solución de la muestra y para obtener la misma concentración.

*Procedimiento.* Mantener la solución de la muestra, la solución estándar y el líquido de compensación a la misma temperatura durante todo el ensayo. Determinar la absorbancia (**5.2.14**) de la solución muestra y de la solución estándar en 280 nm en cubetas de cuarzo, utilizando el tampón específico como líquido de compensación. Para exactitud de los resultados, la respuesta es lineal en el intervalo de las concentraciones proteicas a dosificar.



*Difusión de la luz.* La difusión de la luz por la muestra puede afectar la exactitud de la dosificación de las proteínas. Si las proteínas en solución forman partículas cuyo tamaño es de la misma grandeza del largo de onda del haz de medida (250 – 300 nm), la difusión del haz luminoso se traduce por un aumento de la absorbancia aparente de la muestra. Para calcular la contribución de ese efecto de difusión en la absorbancia lida en 280 nm, determinar la absorbancia de la solución de la muestra en varios largos de onda (320 nm, 325 nm, 330 nm, 335 nm, 340 nm, 345 nm y 350 nm). Construir un gráfico del logaritmo de la absorbancia leída en función del logaritmo del respectivo largo de onda y determinar, por análisis de regresión lineal, la curva de calibración que mejor se ajuste a los diferentes puntos inscritos en el gráfico.

Determinar por extrapolación el logaritmo de la absorbancia en 280 nm. La absorbancia debido al efecto de difusión es el antilogaritmo de ese valor. Corregir los valores observados sustrayéndose la absorbancia total en 280 nm de la absorbancia debido al efecto de difusión para obtener el valor de la absorbancia debido a la proteína en solución. Es posible realizar una filtración usando un filtro de 0,2  $\mu$  que no absorba las proteínas, o una clarificación por centrifugación, a fin de que sean reducidos los efectos de la difusión de la luz en caso de solución.

*Cálculos.* Utilizar los valores corregidos para los cálculos. Calcular el tenor en proteína de la solución de la muestra ( $C_u$ ), usando la expresión:

$$C_u = C_s \left( \frac{A_u}{A_s} \right)$$

en que

$C_s$  = tenor en proteína de la solución estándar;

$A_u$  = valor de la absorbancia corregida de la solución de la muestra;

$A_s$  = valor de la absorbancia corregida de la solución estándar.

## MÉTODO 2

Ese método fue concebido con base en la propiedad que las proteínas poseen de reducir ácidos fosfomolibdenotungsténico contenidos en el reactivo fosfomolibdeno y tungsteno; esa reacción es cromogénica y se traduce por la existencia de un pico de absorción en 750 nm.

El reactivo fosfomolibdeno y tungsteno reaccionan primeramente con los residuos de la tirosina de la proteína. El desarrollo de la coloración alcanza un máximo al final de 20 – 30 minutos de incubación a temperatura ambiente; se produce enseguida una descoloración progresiva. Siendo el método sensible a sustancias interferentes, puede utilizarse un tratamiento que produzca la precipitación de las proteínas de la muestra. La mayor parte de las sustancias interferentes reduce la intensidad de la coloración obtenida, pero algunos detergentes la aumentan, ligeramente. Una fuerte concentración salina puede provocar la formación de un precipitado. Dado que la intensidad de la coloración obtenida puede variar según la especie proteica considerada, la

proteína a dosificar y la proteína estándar son las mismas. Si es necesario, separar las sustancias interferentes de la proteína de la muestra, proceder como es indicado a continuación en sustancias interferentes antes de preparar la solución de la muestra. Es posible minimizar el efecto de las sustancias interferentes por dilución, siempre que el tenor en proteína a dosificar se mantenga suficientemente elevado para posibilitar una determinación exacta.

Utilizar el agua destilada para la preparación de todos los tampones y reactivos utilizados en ese método.

*Solución muestra.* Disolver una cantidad apropiada de la muestra en el tampón especificado para obtener una concentración comprendida en el intervalo alcanzado por la curva de calibración. El pH de una solución preparada con un tampón apropiado está comprendido entre 10,0 y 10,5.

*Soluciones estándar.* Disolver la sustancia de referencia correspondiente a la proteína a dosificar en el tampón especificado. Tomar muestras de esa solución y completarlas con el mismo tampón para obtener, por lo menos, cinco soluciones estándar de diferentes concentraciones comprendidas entre 5  $\mu$ g/ml y 100  $\mu$ g/ml y uniformemente repartidas en el intervalo escogido.

*Solución en blanco.* Utilizar el mismo tampón que fue utilizado para preparar la *Solución muestra* y las *Soluciones estándar*.

*Reactivo de sulfato de cobre.* Disolver 100 mg de sulfato de cobre y 0,2 g de tartarato de sodio en agua destilada y completar 50 ml con el mismo diluyente. Disolver 10 g de carbonato de sodio anhidro en agua destilada y completar 50 ml con el mismo diluyente. Verter, lentamente, la solución de carbonato de sodio en la solución de sulfato de cobre, mezclando siempre. Esa solución es utilizada en las 24 horas siguientes a su preparación.

*Reactivo alcalino de cobre.* Preparar una mezcla de 1 volumen de *Reactivo de sulfato de cobre*, 2 volúmenes de laurilsulfato de sodio a 5% (p/v) con 1 volumen de hidróxido de sodio a 3,2% (p/v). Conservar esa mezcla a temperatura ambiente. La mezcla es utilizada en las 2 semanas que siguen a su preparación.

*Reactivo fosfomolibdeno y tungsteno diluido.* Mezclar 5 ml de reactivo fosfomolibdeno y tungsteno con 55 ml de agua destilada. Conservar el reactivo a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar.

*Procedimiento.* A 1 ml de cada *Solución estándar*, de la *Solución muestra* y de la *Solución en blanco* añadir 1 ml del *Reactivo alcalino de cobre* y mezclar. Dejar en reposo durante 10 minutos. Añadir 0,5 ml del *Reactivo fosfomolibdeno y tungsteno diluido*, mezclar y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Determinar la absorbancia (5.2.14) de las soluciones en 750 nm, utilizando la solución en blanco para ajuste del cero.

**Cálculos.** La relación entre la absorbancia y el tenor en proteína no es lineal; no obstante, si el intervalo de concentración alcanzado por la curva de calibración es suficientemente estrecho, la curva obtenida será sensiblemente lineal. Construir un gráfico de la absorbancia de las soluciones estándar en función del tenor en proteína de esas soluciones y determinar la curva de calibración por análisis de regresión lineal. A partir de la curva de calibración y de la absorbancia de la solución de la muestra, determinar el tenor en proteína de la solución muestra.

**Sustancias interferentes.** En ese método se añade desoxicolato de sodio y ácido tricloroacético a la muestra para precipitar las proteínas y separarlas de las sustancias interferentes, antes de dosificar. Esa técnica puede igualmente ser utilizada para concentrar las proteínas contenidas en una solución muy diluida. A 1 ml de una solución de la muestra adicione 0,1 ml de desoxicolato de sodio a 0,15% (p/v). Agitar con un agitador tipo vortex y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. Añadir 0,1 ml de ácido tricloroacético a 72% (p/v). Agitar con un agitador tipo vortex y centrifugar a 3000 g durante 30 minutos. Rechazar el sobrenadante líquido y eliminar el líquido residual con una pipeta. Disolver el coágulo en 1 ml del *Reactivo alcalino de cobre*.

### MÉTODO 3

Este método fue basado en la propiedad que las proteínas poseen de desplazar de 470 nm para 595 nm el máximo de absorción del azul ácido 90 cuando se ligan al colorante. El colorante azul ácido 90 presenta una afinidad marcada para los residuos de arginina y de lisina en la proteína lo que puede provocar variaciones de la respuesta a la dosificación de diferentes proteínas. La proteína utilizada como sustancia de referencia debe, por tanto, ser la misma que la proteína a ser dosificada. Existen, relativamente, pocas sustancias interferentes, pero es preferible evitar los detergentes y los analitos en la muestra a ser dosificada. Muestras muy alcalinas pueden provocar interferencias con el reactivo ácido.

Utilizar el agua destilada para la preparación de todos los tampones y reactivos a ser usados en ese método.

**Solución muestra.** Disolver una cantidad apropiada de la muestra en el tampón indicado para obtener una concentración comprendida en el intervalo cubierto por la curva de calibración.

**Soluciones estándar.** Disolver la sustancia de referencia correspondiente a la proteína a dosificar en el tampón indicado. Tomar muestras de esa solución y completar con el mismo tampón para obtener por lo menos cinco soluciones estándar de concentraciones proteicas comprendidas entre 0,1 mg/ml y 1 mg/ml y uniformemente repartidas en el intervalo escogido.

**Solución en blanco.** Utilizar el mismo tampón que fue utilizado para preparar la solución de la muestra y las soluciones estándar.

**Reactivo azul ácido 90.** Disolver 0,10 g de azul ácido 90 en 50 ml de etanol. Añadir 100 ml de ácido fosfórico, completar 1000 ml con agua destilada y mezclar. Filtrar la solución y conservarla a temperatura ambiente en frasco de vidrio ámbar. Se produce una lenta precipitación del colorante durante el almacenamiento. El precipitado es eliminado por filtración antes de utilizar el reactivo.

**Procedimiento.** A 0,100 ml de cada *Solución estándar*, de la *Solución muestra* y de la *Solución en blanco* añadir 5 ml del *Reactivo azul ácido 90*. Homogeneizar la mezcla por rotación, evitando la formación de espuma que puede crear problemas de reproductibilidad. Determinar la absorbancia (5.2.14) de las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra* en 595 nm, utilizando la *Solución en blanco* para ajuste del cero. Se evita el uso de cubetas de cuarzo (sílice) ya que el colorante se liga a ese material.

**Cálculos.** La relación entre la absorbancia y el tenor en proteína no es lineal. No obstante, si el intervalo de concentración cubierto por la curva de calibración fuese suficientemente estrecho, la curva obtenida será sensiblemente lineal. Construir un gráfico de la absorbancia de las *Soluciones estándar* en función del tenor en proteína de esas soluciones y determinar la curva de calibración por análisis de regresión lineal. A partir de la curva de calibración y de la absorbancia de la *Solución muestra* determinar el tenor en proteína de la *Solución muestra*.

### MÉTODO 4

Ese método, también, conocido como método del ácido bicinónico (BCA), fue elaborado con base en la propiedad que las proteínas poseen de reducir el ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a ion cuproso ( $\text{Cu}^{+}$ ). El reactivo de ácido bicinónico sirve para detectar los iones cuprosos. Existen pocas sustancias interferentes. Se existiesen sustancias interferentes, es posible minimizar sus efectos por dilución, siempre que el tenor en proteínas a ser dosificadas se mantenga suficientemente elevado para posibilitar una determinación exacta. La técnica de precipitación de las proteínas descrita en el *Método 2* puede ser utilizada para eliminar las sustancias interferentes. La intensidad de la coloración obtenida por la reacción con el reactivo puede variar de un tipo de proteína para otro y, por eso, a proteína a ser dosificada y la proteína de referencia son las mismas.

Utilizar el agua destilada para la preparación de todos los tampones y reactivos a ser usados en ese método.

**Solución muestra.** Disolver una cantidad apropiada de la muestra en el tampón indicado para obtener una concentración comprendida en el intervalo de la concentración de las *Soluciones estándar*.

**Soluciones estándar.** Disolver la sustancia de referencia correspondiente a la proteína a ser dosificada en el tampón indicado. Tomar muestras de esa solución y completar con el mismo tampón para obtener por lo menos cinco soluciones estándar de concentraciones comprendidas entre 10  $\mu\text{g/ml}$  y 1200  $\mu\text{g/ml}$  y uniformemente repartidas en el intervalo escogido.

*Solución en blanco.* Utilizar el mismo tampón que fue utilizado para preparar la *Solución de la muestra* y las *Soluciones estándar*.

*Reactivo BCA.* Disolver 10 g de bicinconinato disódico, 20 g de carbonato de sodio monohidratado, 1,6 g de tartarato de sodio, 4 g de hidróxido de sodio y 9,5 g de bicarbonato de sodio en agua destilada. Si necesario, ajustar el pH para 11,25 con solución de hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio. Completar para 1000 ml con agua destilada y mezclar.

*Reactivo de cobre-BCA.* Mezclar 1 ml de sulfato de cobre a 4% (p/v) con 50 ml de *Reactivo BCA*.

*Procedimiento.* Mezclar 0,1 ml de cada *Solución estándar*, de la *Solución muestra* y de la *Solución en blanco* con 2 ml de *Reactivo de cobre-BCA*. Incubar las soluciones a 37 °C durante 30 minutos, tomar nota de la hora y dejar enfriar hasta la temperatura ambiente. En los 60 minutos a continuación al período de incubación, determinar la absorbancia (5.2.14) en 562 nm de las *Soluciones estándar* y de la *Solución muestra* en cubetas de cuarzo, utilizando la *Solución en blanco* para ajuste del cero. Cuando la temperatura de las soluciones retorne para la temperatura ambiente, la intensidad de la coloración continúa aumentando, progresivamente.

*Cálculos.* La relación entre la absorbancia y el tenor en proteína no es lineal. No obstante, si el intervalo de concentración cubierto por la curva de calibración es suficientemente estrecho, la curva obtenida será sensiblemente lineal. Registrar en un gráfico la absorbancia de las soluciones estándar en función del tenor en proteína de esas soluciones y determinar la curva de calibración por análisis de regresión lineal. A partir de la curva de calibración y de la absorbancia de la solución de la muestra determine el tenor en proteína de la solución de la muestra.

## MÉTODO 5

Ese método, también, conocido como método del biuret, elaborado con base en la propiedad que las proteínas poseen de interactuar con el ion cúprico (Cu<sup>2+</sup>), en medio alcalino, dando un producto de reacción que presenta absorbancia en 545 nm. La utilización de ese método posibilita obtener un desvío mínimo entre muestras equivalentes de IgG y de albúmina. Por el contrario, la adición simultánea de hidróxido de sodio y del reactivo de biuret (en la forma de mezcla), una homogeneización insuficiente después de la adición del hidróxido de sodio o un intervalo de tiempo muy largo entre la adición del hidróxido de sodio y del reactivo de biuret conduce a la obtención de una respuesta más elevada con muestras de IgG que con muestras de albúmina. El tratamiento con ácido tricloroacético utilizado para reducir las interferencias puede igualmente permitir cuantificar la proteína cuando su concentración en la muestra sea inferior a 0,5 mg/ml.

Utilizar el agua destilada para la preparación de todos los tampones y reactivos a ser usados en ese método.

*Solución muestra.* Disolver una cantidad apropiada de la muestra en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) para obtener una concentración comprendida en el intervalo de la concentración de las soluciones estándar.

*Soluciones estándar.* Disolver la sustancia de referencia correspondiente a la proteína a ser dosificada en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Tomar muestras de esa solución y completar con solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) para obtener por lo menos tres soluciones estándar de concentraciones comprendidas entre 0,5 mg/ml y 10 mg/ml, uniformemente, repartidas en el intervalo escogido.

*Solución en blanco.* Utilizar solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v).

*Reactivo de biuret.* Disolver 3,46 g de sulfato de cobre en 10 ml de agua destilada caliente y deje enfriar (solución A). Disolver 34,6 g de citrato de sodio y 20 g de carbonato de sodio anhidro en 80 ml de agua destilada caliente y dejar enfriar (solución B). Mezclar las soluciones A y B y completar 200 ml con agua destilada. Ese reactivo es utilizado dentro de los 6 meses que siguen a su preparación; no es utilizado si desarrolla turbación o precipitado.

*Procedimiento.* A un volumen de la *Solución muestra* añadir un volumen igual de solución de hidróxido de sodio a 6% (p/v) y mezclar. Añadir, inmediatamente, 0,4 volumen (calculado con relación a la solución de la muestra) de *Reactivo de biuret* y mezclar rápidamente. Mantener las muestras durante, por lo menos, 15 minutos a una temperatura comprendida entre 15 °C y 25 °C. En los 90 minutos que siguen a la adición del reactivo, determinar la absorbancia (5.2.14), como máximo en 545 nm, de las *Soluciones estándar* y de la *Solución de la muestra*, usando la *Solución en blanco* como líquido de compensación. Si en las soluciones surge turbación o precipitado, no son usadas para el cálculo del tenor en proteína.

*Cálculos.* La relación entre la absorbancia y el tenor en proteína es, sensiblemente, lineal en el intervalo de concentraciones indicado para las *Soluciones estándar*. Construir un gráfico de la absorbancia de las *Soluciones estándar* en función del tenor en proteína de esas soluciones y determinar la curva de calibración por análisis de regresión lineal. Calcular el coeficiente de correlación para la curva de calibración. El sistema satisface si obtiene una reta cuyo coeficiente de correlación sea, por lo menos, de 0,99. A partir de la curva de calibración y de la absorbancia de la *Solución muestra* determinar el tenor en proteína de la *Solución muestra*.

*Sustancias interferentes.* Es posible limitar el efecto de las sustancias interferentes precipitando, como se indica a continuación, la proteína de la muestra: junte 0,1 volumen de solución de ácido tricloroacético a 50% (p/v) a 1 volumen de *Solución de la muestra*, eliminar el sobrenadante y disolver el precipitado en un pequeño volumen de hidróxido de sodio 0,5 M. Utilizar la solución así obtenida para preparar la solución de la muestra.

## MÉTODO 6

Ese método fluorimétrico fue elaborado con base en una derivación de la proteína por el *o*-ftalaldehído que reacciona con las aminas primarias de la proteína, eso es, el aminoácido N-terminal y la función  $\alpha$ -amina de los residuos de lisina. La sensibilidad de la dosificación puede ser mejorada por una hidrólisis previa de la proteína, antes de la adición del *o*-ftalaldehído. La hidrólisis libera la función  $\alpha$ -amina de los aminoácidos constituyentes de la proteína y que le posibilita reaccionar con el reactivo de ftalaldehído. Ese método es aplicable a diminutas cantidades de proteína.

Las aminas primarias contenidas, por ejemplo, en los tampones de trometamina y en los tampones de aminoácidos reaccionan con el ftalaldehído y son, por tanto, de evitar o eliminar. El amoníaco en elevada concentración reacciona igualmente con el ftalaldehído. La fluorescencia resultante de la reacción amina ftalaldehído puede ser inestable. El empleo de procesos automatizados para estandarizar el método puede posibilitar mejorarle la exactitud y la viabilidad.

Utilice el agua destilada para la preparación de todos los tampones y reactivos a ser usados en ese método.

*Solución muestra.* Disolver una cantidad apropiada de la muestra en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) para obtener una concentración comprendida en el intervalo de la concentración de las *Soluciones estándar*. Ajustar el pH de la solución para 8 – 10,5 antes de juntar el *Reactivo de ftalaldehído*.

*Soluciones estándar.* Disolver la sustancia de referencia correspondiente a la proteína a ser dosificada en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Tomar muestras de esa solución y completar con solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) para obtener por lo menos cinco soluciones estándar de concentraciones comprendidas entre 10  $\mu$ g/ml y 200  $\mu$ g/ml y uniformemente repartidas en el intervalo escogido. Ajustar el pH de las soluciones para 8-10,5 antes de añadir el *Reactivo de ftalaldehído*.

*Solución en blanco.* Utilizar solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v).

*Tampón de borato.* Disolver 61,83 g de ácido bórico en agua destilada y ajuste el pH para 10,4 con solución de hidróxido de potasio. Completar a 1000 ml con agua destilada y mezclar.

*Solución madre de ftalaldehído.* Disolver 1,20 g de ftalaldehído en 1,5 ml de metanol, añadir 100 ml de *Tampón de borato* y mezclar. Añadir 0,6 ml de solución de éter láurico de macrogol 23 a 30% (p/v) y mezclar. Conservar la solución a temperatura ambiente y utilizar, dentro de las 3 semanas siguientes de su preparación.

*Reactivo de ftalaldehído.* A 5 ml de la *Solución madre de ftalaldehído* junte 15  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol. Preparar el reactivo 30 minutos, por lo menos, antes de utilizar y dentro de las 24 horas después de su preparación.

*Técnica.* Mezclar 10  $\mu$ L de la solución muestra y de cada una de las soluciones estándar con 0,1ml de *Reactivo de*

*Ftalaldehído* y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Añadir 3 ml de hidróxido de sodio 0,5 M y mezclar. Determinar la intensidad de la fluorescencia (5.2.15) de las muestras de la *Solución estándar* y de la *Solución muestra* en el largo de onda de excitación de 340 nm y en el largo de onda de emisión de 440 nm a 455 nm. Determinar la intensidad de la fluorescencia de una muestra una sola vez porque la irradiación provoca una disminución de la intensidad de la fluorescencia.

*Cálculos.* La relación entre la intensidad de fluorescencia y el tenor en proteína es lineal. Registrar en un gráfico las intensidades de fluorescencia obtenidas con las *Soluciones estándar* en función del tenor en proteína de esas soluciones y determine la curva de calibración por análisis de regresión lineal. A partir de la curva de calibración y de la intensidad de fluorescencia de la *Solución muestra*, determine el tenor en proteína de la *Solución muestra*.

## MÉTODO 7

Ese método fue elaborado con base en la cuantificación de las proteínas por dosificación del nitrógeno. La presencia en la muestra de otras sustancias nitrogenadas puede afectar el resultado de la dosificación de las proteínas. Las técnicas utilizadas para dosificar el nitrógeno conducen a la destrucción de la muestra durante el análisis, pero no se limitan a la determinación de las proteínas en medio acuoso.

*Técnica A.* Proceder como indicado para la dosificación del nitrógeno después de mineralización por el ácido sulfúrico (5.3.3.2) o utilizar instrumentos disponibles en el mercado adaptados a la dosificación del nitrógeno por el método de Kjeldahl.

*Técnica B.* Existen en el mercado instrumentos adaptados para la dosificación del nitrógeno. La mayor parte de ellos utiliza la pirolisis (combustión de la muestra en presencia del oxígeno a temperaturas próximas de 1000 °C), que provoca la formación de monóxido de nitrógeno (NO) y otros óxidos de forma NO<sub>x</sub> a partir del nitrógeno existente en la muestra. Ciertos instrumentos convierten esos óxidos de nitrógeno en nitrógeno gaseoso que es cuantificado por conductimetría térmica. Otros mezclan el monóxido de nitrógeno (NO) con ozono (O<sub>3</sub>) para producir dióxido de nitrógeno en el estado excitado (NO<sub>2</sub>) que emite una radiación luminosa cuando de su reducción y es cuantificado por quimioluminiscencia. Un producto de referencia, relativamente puro, y semejante, como su composición, a la proteína a ser dosificada es utilizado para atomizar los parámetros de inyección y de pirolisis y para evaluar la reproductibilidad del análisis.

*Cálculos.* El tenor en proteína se calcula dividiendo el tenor en nitrógeno de la muestra por el tenor en nitrógeno (conocido) de la proteína que puede ser determinada o a partir de la estructura química de la proteína, o por comparación con una sustancia de referencia apropiada.



### 5.5.1.15 DETERMINACIÓN DE LA INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-D

La actividad de la inmunoglobulina humana anti-D es evaluada por comparación de la cantidad necesaria para producir a aglutinación de eritrocitos D-positivos y la de una preparación de referencia, medida en unidades internacionales, necesarias para producir el mismo efecto. La Unidad Internacional corresponde a la actividad de una determinada cantidad de la preparación internacional de referencia. La correspondencia entre unidades internacionales y la preparación de referencia internacional es indicada por la Organización Mundial de Salud.

Utilizar una mezcla de eritrocitos D-positivos, con menos de 7 días y conservados en las condiciones adecuadas, obtenida a partir de, por lo menos, cuatro donantes del grupo  $OR_1R_1$ . A un volumen apropiado de eritrocitos, lavados, previamente, tres veces con solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v), juntar un volumen igual de bromelina SR, dejar en reposo a 37 °C durante 10 minutos. Centrifugar, eliminar el líquido sobrenadante y lavar tres veces los eritrocitos con solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Suspender 20 volúmenes de los eritrocitos en una mezcla de 15 volúmenes de suero inerte, 20 volúmenes de solución de albúmina bovina a 30% (p/v) y 45 volúmenes de solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). Colocar la suspensión en agua con hielo bajo agitación continua.

Con un aparato automático de dilución calibrado preparar diluciones de la muestra y de la preparación de referencia en una solución de albúmina bovina a 0,5% (p/v) y solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v).

Utilizar un aparato apropiado para análisis automático continuo; mantenga la temperatura en los estuches a 15 °C con excepción de los espirales de incubación. Aspirar para los estuches de admisión del aparato a suspensión de eritrocitos con un débito de 0,1 ml por minuto y una solución de metilcelulosa 450 a 0,3% (p/v) con un débito de 0,05 ml por minuto.

Introducir las diluciones de la muestra y de la preparación de referencia con un débito de 0,1 ml por minuto durante 2 minutos y después el diluyente a la razón de 0,1 ml por minuto durante 4 minutos antes de introducir la dilución siguiente. Introducir aire a la razón de 0,6 ml por minuto. Incubar a 37 °C durante 18 minutos y después dispersar los espirales por introducción, con un débito de 1,6 ml por minuto, de una solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) que contiene un agente humectante apropiado (por ejemplo, polisorbato 20 en una concentración final de 0,2 g/L) para evitar alterar la continuidad de las burbujas. Dejar depositar los aglutinados y decantar 2 veces, la primera vez a 0,4 ml por minuto y la segunda vez a 0,6 ml por minuto. Proceder a lisis del residuo de los eritrocitos no aglutinados con la ayuda de una solución de octoxinol 10 a 0,5% (p/v), de ferricianuro de potasio a 0,02% (p/v), de bicarbonato de sodio a 0,1% (p/v) y de cianuro de potasio a 0,005% (p/v), con un débito de 2,5 ml por minuto. Es introducida una serpentina de ralentización de 10 minutos para permitir la transformación de la hemoglobina.

Realizar el registro continuo de la absorbancia (5.2.14) del hemolizado en el largo de onda de 540 a 550 nm.

Determinar las concentraciones de anticuerpos para las cuales existe una relación lineal entre la concentración y la modificación de la absorbancia ( $\Delta A$ ). Con base en los resultados, construir una curva de calibración y utilizar la parte lineal de la curva para determinar la actividad de la muestra. Calcular la actividad de la muestra en unidades internacionales por mililitro usando la fórmula:

$$\frac{a \times d}{D}$$

en que

$a$  = actividad de la preparación referencia en unidades internacionales por mililitro para una dilución de 1 en  $D$ ,  
 $d$  = factor de dilución de la muestra que corresponde a un dado valor de  $\Delta A$ ,

$D$  = factor de dilución de la preparación de referencia que corresponde al mismo valor de  $\Delta A$ .

### 5.5.1.16 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN $F_c$ DE LA INMUNOGLOBULINA

#### REACTIVOS

*Sangre humana estabilizada.* Hacer una flebotomía para recoger la sangre humana del grupo O en solución anticoagulante conservadora y preservadora del tipo ACD. Conservar la sangre humana estabilizándola a 4 °C, durante 3 semanas, como máximo.

*Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2.* Disolver 1,022 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, 0,336 g de fosfato de sodio monobásico y 8,766 g de cloruro de sodio en 800 ml de agua y completar 1000 ml con el mismo diluyente.

*Solución madre de magnesio y de calcio.* Disolver 1,103 g de cloruro de calcio y 5,083 g de cloruro de magnesio en agua y completar 25 ml con el mismo diluyente.

*Solución madre de tampón de barbital.* Disolver 207,5 g de cloruro de sodio y 25,48 g de barbital sódico en 4000 ml de agua y ajustar para pH 7,3 con ácido clorhídrico  $M$ . Juntar 12,5 ml de la *Solución madre de magnesio y de calcio* y completar 5000 ml con agua. Filtrar por membrana (0,22  $\mu$ m) y conservar a 4 °C en recipiente de vidrio.

*Tampón de albúmina-barbital.* Disolver 0,150 g de albúmina bovina en 20 ml de *Solución madre de tampón de barbital* y completar 100 ml con agua.

*Solución de ácido tánico.* Disolver 10 mg de ácido tánico en 100 ml de *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2*. Preparar inmediatamente antes del uso.

*Complemento de cobaya.* Mezclar los sueros obtenidos a partir de, por lo menos, 10 cobayas. Separar el suero de la sangre coagulada por centrifugación a una temperatura de



aproximadamente de 4 °C. Conservar el suero, en pequeñas porciones, a una temperatura inferior a -70 °C. Inmediatamente antes de iniciarse la hemólisis por acción del complemento, diluir para 125 – 200 CH<sub>50</sub> por mililitro con *Tampón de albúmina-barbital* y, durante el ensayo, mantener la solución diluida en un baño de hielo.

*Antígeno de la rubéola.* Antígeno de rubéola apropiado para las titulaciones de la inhibición de hemaglutinación. Título > 256 unidades HA.

## PROCEDIMIENTO

*Tratamiento de los eritrocitos humanos con ácido tánico.* Separar los eritrocitos por centrifugación de un volumen apropiado de sangre humana estabilizada. Lavar los eritrocitos, por lo menos tres veces, con *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2* y después suspender a 2% (v/v) en *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2*. Tomar 0,1 ml de la *Solución de ácido tánico* y completar 7,5 ml con *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2* (concentración final 1,3 mg/L); mezclar 1 volumen de la dilución recientemente preparada con 1 volumen de la suspensión de eritrocitos e incubar a 37 °C durante 10 minutos. Recolectar los eritrocitos tratados con ácido tánico por centrifugación (400 – 800 g, durante 10 minutos), rechazar el sobrenadante y lavar los eritrocitos una vez con *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2*. Suspender a 1% (v/v) los eritrocitos tratados con ácido tánico en la *Solución salina tamponada de fosfato de pH 7,2*.

*Adición de los antígenos a los eritrocitos.* Tomar un volumen apropiado (v) de eritrocitos tratados con ácido tánico, junte 0,2 ml de antígeno de la rubéola por 1,0 ml de eritrocitos e incubar a 37 °C durante 30 minutos. Recolectar los eritrocitos por centrifugación (400-800 g, durante 10 minutos) y rechazar el sobrenadante, dejando un volumen de 200 µL. Juntar un volumen de *Tampón de albúmina-barbital* igual al volumen del sobrenadante rechazado, agitar hasta suspensión de los eritrocitos, recolectar estos como arriba es descrito y repetir el lavado. Completar el volumen remanente obtenido de 0,2 ml hasta tres-cuartos de v<sub>s</sub>, obteniendo así el volumen inicial (v<sub>i</sub>).

Mezclar 900 µL de *Tampón de albúmina-barbital* con 100 µL de v<sub>r</sub>, que es así reducido al volumen residual y determinar la absorbancia inicial en 541 nm (A). Diluir v<sub>r</sub> por un factor igual a A utilizando *Tampón de albúmina-barbital*. Se obtiene, así, el volumen final ajustado v<sub>f</sub> = v<sub>r</sub> x A de eritrocitos humanos sensibilizados y un valor para A de 1,0 ± 0,1 en el caso de una dilución a 1/10.

*Conexión de los anticuerpos a los eritrocitos con ácido tánico y cubiertos de antígeno.* Preparar, en duplicado y, sucesivamente, las siguientes soluciones utilizando para cada solución, en separado, una cubeta semimicro (por ejemplo, placas descartables) o un tubo de ensayo para cada solución:

*Soluciones problema.* si necesario, ajustar la muestra a pH 7 adicionando, por ejemplo, hidróxido de sodio M. Tomar

volúmenes de la muestra conteniendo, respectivamente, 30 y 40 mg de inmunoglobulina y completar 900 µL con

*Tampón de albúmina-barbital.*

*Solución estándar.* Preparar la solución tal como se describe para la *Solución problema* a partir de un estándar de referencia para inmunoglobulina humana.

*Testigo del Complemento.* 900 µL de *Tampón de albúmina-barbital*. A cada cubeta/tubo de ensayo juntar 100 µL de eritrocitos humanos sensibilizados y mezclar cuidadosamente. Dejar en reposo durante 15 minutos, juntar 1000 µL de *Tampón de albúmina-barbital*, recolectar los eritrocitos por centrifugación (1000 g durante 10 minutos) de la cubeta/tubo de ensayo y retirar 1900 µL del sobrenadante. Sustituir este volumen con 1900 µL de *Tampón de albúmina-barbital* y repetir el procedimiento del lavado dejando un volumen final de 200 µL. Las muestras pueden ser conservadas en cubetas/tubos de ensayo cerrados a 4 °C durante 24 horas.

*Hemólisis por acción del complemento.* Para la determinación de la hemólisis añadir 600 µL de *Tampón de albúmina-barbital* calentada a 37 °C a la muestra, suspender, cuidadosamente, los eritrocitos pipeteándolos, repetidamente, (por lo menos cinco veces) y colocar la cubeta en el porta muestra de un espectrofotómetro con termostato. Después de 2 minutos, juntar 200 µL de *Complemento de cobaya* diluido para 125 – 200 CH<sub>50</sub>/ml, mezclar, cuidadosamente, pipeteando la mezcla dos veces e inicie inmediatamente después de la segunda pipeteada el registro de la absorbancia en 541 nm en función del tiempo, utilizando el *Tampón de albúmina-barbital* como líquido de compensación. Parar el registro si la curva de la absorbancia en función del tiempo pasa nítidamente el punto de inflexión.

*Dosificación.* Determinar el declive (S) de la curva de hemólisis en el punto aproximado de la inflexión segmentando la curva en la región de mayor declive por intervalos de tiempo apropiados (por ejemplo, Δt = 1 minuto) y calculando S, expresado en ΔA por minuto entre los puntos de intersección adyacentes. El valor más elevado de S corresponde a (S<sub>exp</sub>). Determinar, también, la absorbancia en el inicio de la curva (A<sub>s</sub>) por extrapolación de la curva, la cual es casi siempre lineal y paralela al eje del tiempo en los primeros minutos del registro. Corregir S<sub>exp</sub> de acuerdo con la fórmula:

$$S' = \frac{S_{exp}}{A_s}$$

Para cada preparación, calcular el promedio aritmético de los valores de S'. Calcular el índice de la función Fc (I<sub>Fc</sub>) a partir de la fórmula:

$$I_{Fc} = 100 \times \frac{S' - S'_c}{S'_s - S'_c}$$

S' = media aritmética del declive corregido para la muestra; S'<sub>s</sub> = media aritmética del declive corregido para el estándar; S'<sub>c</sub> = media aritmética del declive corregido para el testigo del complemento.

Calcular el índice de la función  $F_c$  para la muestra. El valor no es inferior al indicado por el fabricante del estándar.

## 5.5.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 5.5.2.1 PIRÓGENOS

La prueba de pirógenos se fundamenta en la medida del aumento de la temperatura corporal de conejos, después de inyección intravenosa de la solución estéril en análisis.

Para productos bien tolerados por los animales, utilizar una dosis que no exceda 10 ml/kg, inyectada en tiempo no superior a 10 minutos.

Para los productos que necesiten preparación preliminar o condiciones especiales de administración, seguir las recomendaciones establecidas en la monografía.

#### *Condiciones generales*

Usar conejos del mismo sexo, adultos, sanos, preferencialmente de la misma raza, pesando, como mínimo, 1,5 kg.

Después de la selección, mantener los animales en jaulas individuales en sala con temperatura uniforme entre 20 y 23 °C libre de perturbaciones que puedan estresarlos. La temperatura seleccionada puede variar hasta  $\pm 3$  °C.

Realizar condicionamiento para determinación de la temperatura de los animales, por lo menos una vez, hasta siete días antes de iniciar la prueba. Los animales deberán ser condicionados según el mismo procedimiento de la prueba apenas sin inoculación del producto. Animales que presenten elevación de temperatura igual o superior a 0,5 °C, con relación a la temperatura inicial, no deberán ser utilizados en la prueba.

Cuando se realice la prueba, usar apenas animales con temperatura igual o inferior a 39,8 °C y que no presenten, de uno para el otro, variación superior a 1,0 °C.

#### *Registro de la temperatura*

Usar termómetro clínico calibrado con precisión de  $\pm 0,1$  °C o cualquier otro dispositivo de registro de temperatura calibrado de igual sensibilidad.

Introducir el termómetro en el recto del animal en profundidad aproximada de 6 centímetros. Se es utilizado dispositivo registrador, que deba permanecer en el recto durante el período de la prueba, contener los conejos de manera que se queden en postura natural de reposo. Cuando se emplea termómetro clínico, dejar pasar el tiempo necesario (previamente determinado) para que alcance la temperatura máxima, antes de proceder a la lectura.

#### *Material*

Las jeringas, agujas y elementos de vidrios estériles y pirogénicos. Los diluyentes y soluciones extractoras o de lavado deben, también, ser estériles y pirogénicos.

#### *Procedimiento*

Ejecutar la prueba en área especialmente destinada para la prueba, bajo condiciones ambientales controladas, libre de perturbaciones que puedan estresar los conejos. En las dos horas precedentes y durante la prueba, suprimir la alimentación. El acceso a agua está permitido, pero puede ser restringido durante la prueba.

Como máximo 40 minutos antes de la inyección de la dosis del producto a ser probado, registrar la temperatura de cada animal mediante dos lecturas efectuadas con intervalo de 30 minutos. El promedio de las dos lecturas será adoptado como temperatura de control necesaria para evaluar cualquier aumento individual de temperatura subsiguiente a la inyección de la muestra.

Preparar el producto a ser probado conforme especificado en la monografía y calentar a  $37 \pm 2$  °C. Para la prueba de pirógenos de materiales de uso hospitalario lavar, con solución fisiológica estéril, las superficies del material que entran en contacto con el producto, local de inyección o tejido interno del paciente. Efectuar los procedimientos asegurándose de que la solución no sea contaminada.

Inyectar por la vena marginal de la oreja de tres conejos no menos que 0,5 ml ni más que 10 ml de la solución por kg de peso corporal o la cantidad indicada en la monografía. La inyección no debe durar más que 10 minutos, a menos que en la monografía se especifique tiempo diferente.

Registrar la temperatura de cada animal en intervalos de 30 minutos durante 3 horas después de la inyección.

#### *Interpretación*

No considerar las disminuciones de temperatura presentados por los animales durante la prueba. El aumento de temperatura es verificado por la diferencia entre la mayor temperatura presentada por el conejo durante la prueba y su temperatura de control.

Si ninguno de los tres conejos presenta aumento individual de la temperatura igual o superior a 0,5 °C, con relación a sus respectivas temperaturas control, el producto cumple con los requisitos de la prueba de pirógenos.

Si algún conejo presenta aumento de la temperatura igual o superior a 0,5 °C, repetir la prueba utilizando otros cinco animales.

El producto en examen cumple los requisitos para ausencia de pirógenos si como máximo tres de los ocho conejos presentan aumentos individuales de temperatura iguales o superiores a 0,5 °C, y si la suma de los aumentos individuales de todos los conejos no excede a 3,3 °C.

### 5.5.2.2 ENDOTOXINAS BACTERIANAS

La prueba de endotoxina bacteriana es usada para detectar o cuantificar endotoxinas de bacterias gram negativas presentes en muestras para cual la prueba es solicitada. Se

utiliza el extracto acuoso de los amibocitos circulantes de *Limulus polyphemus* o de *Tachypleus tridentatus* preparado y caracterizado como reactivo LAL.

Hay dos técnicas con sensibilidad diferente para esta prueba:

1. MÉTODO DE COAGULACIÓN EN GEL: basado en la formación de coágulo o gel (método semi-cuantitativo)
2. MÉTODOS FOTOMÉTRICOS cuantitativos que incluyen:

El MÉTODO TURBIDIMÉTRICO, (basado en el desarrollo de turbidez después de quiebra de un sustrato endógeno);

El MÉTODO CROMOGÉNICO (basado en el desarrollo de color después de quiebra de un complejo péptido sintético cromógeno).

Cualquiera de estos procedimientos puede ser realizado, a menos que sea indicado lo contrario en la monografía.

En el método de coagulación en gel, la determinación del punto final de la reacción está hecha a partir de diluciones de la sustancia bajo prueba en comparación directa con diluciones paralelas de la endotoxina estándar. Las cantidades de endotoxinas están expresadas en unidades de endotoxina (UE) definidas.

**Nota:** 1 UE es igual a 1 UI (unidad internacional).

El reactivo LAL (lisado de amebocito de *Limulus sp.*) es preparado para las lecturas turbidimétricas o colorimétricas y estos procedimientos pueden ser utilizados si cumplen los requisitos de los métodos. Para su calibración es necesaria la elaboración de una curva estándar obteniéndose su regresión lineal, en la cual se determina, por interpolación, la concentración de endotoxina de la sustancia bajo prueba.

El procedimiento incluye incubación de la endotoxina estándar para obtención de una curva de calibración y de las soluciones control con reactivo LAL, por tiempo predeterminado y lectura espectrofotométrica en el largo de onda adecuado.

En el caso del procedimiento del método turbidimétrico, la lectura está hecha inmediatamente después de período final de incubación, y para el procedimiento colorimétrico la reacción enzimática es interrumpida en el final del tiempo predeterminado por la adición del reactivo, antes de las lecturas. Para los procedimientos cinéticos turbidimétricos y colorimétricos los valores de absorbancia medida durante el período de la reacción y valores de velocidades son determinados para aquellas lecturas.

#### ELEMENTOS DE VIDRIO Y DESCARTABLES.

Todos los elementos de vidrio deben ser higienizados en estufa usando un proceso validado. Utilice un tiempo y

temperatura mínimos de 250 °C por 30 minutos. Si utilizar descartables plásticos, como punteras y pipetas usen solamente los certificados que indican ser libres de endotoxinas para no haber interferencia en la prueba.

#### PREPARACIÓN DE LA ENDOTOXINA ESTÁNDAR DE REFERENCIA Y DEL ESTÁNDAR DE ENDOTOXINA

El estándar de endotoxina de referencia tiene una potencia definida de 10.000 UE (unidades de endotoxina) por frasco. Reconstituya el frasco con 5 ml de agua grado reactivo LAL (libre de pirógenos) y agite en vortex intermitentemente por 30 minutos. Use esta solución concentrada (conservada en refrigerador por no más que 14 días) para hacer diluciones seriadas. Agite vigorosamente antes del uso por lo menos por 3 minutos y proceda a las diluciones seriadas, agitando como mínimo 30 segundos antes de las próximas diluciones. Después del uso descartar las diluciones debido a la pérdida de actividad por adsorción. Para la preparación del estándar de endotoxina (siga las orientaciones del proveedor, certificados en el laudo de endotoxina).

#### Preparación para la prueba

Usar reactivo LAL con sensibilidad declarada confirmada.

La validez de los resultados de la prueba para endotoxinas bacterianas requiere la demostración de que las muestras, soluciones de lavados o extractos bajo prueba no inhiben o potencializan la reacción y tampoco interfieren con la prueba. La validación es realizada por medio de prueba de inhibición o potencialización descrito para cada una de las técnicas indicadas. Están incluidos controles negativos apropiados. La validación debe ser repetida si hubiere cambio en el origen del reactivo LAL, en el método de producción o en la formulación de la sustancia bajo prueba.

#### Preparación de la muestra

Prepare la solución de muestra disolviendo la misma en agua grado reactivo LAL. Si necesario ajuste el pH de la solución de la muestra para que la mezcla reactiva LAL más muestra caiga en la banda de pH de 6 a 8. El pH puede ser ajustado usando un tampón adecuado recomendado por el proveedor. Ácidos y bases pueden ser preparados con agua grado reactivo LAL y ser validados para ser libres de endotoxinas y factores de interferentes.

#### DETERMINACIÓN DE LA MÁXIMA DILUICIÓN VALIDA (MDV)

La máxima dilución válida es la máxima dilución permitida de la muestra en análisis donde el límite de endotoxina puede ser determinado. Ella se aplica para inyecciones o soluciones de administración parenteral en la forma reconstituida o diluida para administración, cantidad de fármaco por peso, si el volumen de la forma de la dosificación fuese variable.

La fórmula para el cálculo de la MDV es la siguiente:

$$\text{MDV} = \frac{\text{límite de endotoxina}}{\lambda}$$

en que:

$\lambda$  = es la sensibilidad rotulada del reactivo de LAL

Observación: fórmula usada para cuando el límite de endotoxina del fármaco especificado en la monografía esté en volumen (UE/ml)

Cuando límite de endotoxina del fármaco especificado en la monografía esté en peso (UE/mg) o en unidad del fármaco activo (UE/unidades) el MDV es calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{MDV} = \frac{\text{límite de endotoxina} \times \text{concentración de la muestra en la solución}}{\lambda}$$

en que:

$\lambda$  = es la sensibilidad rotulada del reactivo de LAL

El MDV obtenido es el factor de dilución límite para que la prueba sea validada.

#### ESTABLECIMIENTO DEL LÍMITE DE ENDOTOXINA

La fórmula para establecer límite de endotoxina para drogas parenterales es:

$$LE = \frac{K}{M}$$

en que:

LE es el límite de endotoxina

K es la dosis límite humana de endotoxina por quilo de peso corpóreo;

M es igual a la máxima dosis del producto por kg de peso en un periodo de una hora.

El límite de endotoxina es especificado en las monografías individuales de las drogas parenterales en UE/ml, UE/mg o UE/unidad de actividad biológica.

#### TÉCNICA DE COAGULACIÓN EN GEL

La técnica de la coagulación en gel permite la detección y cuantificación de endotoxinas basada en la reacción de gelificación del reactivo LAL

La sensibilidad del LAL rotulada es la concentración de endotoxina necesaria para causar una gelificación del reactivo LAL

Para garantizar la precisión y validez de la prueba son necesarios pruebas para confirmar la sensibilidad del LAL rotulada así como pruebas para verificación de factores interferentes, como descrito en la preparación de la muestra para la prueba.

#### Prueba para confirmación de sensibilidad del LAL

Confirmar la sensibilidad declarada del LAL usando como mínimo 01 frasco de reactivo LAL y preparar una serie de diluciones de endotoxina usando el estándar de Endotoxina de referencia (RSE) o el estándar de Endotoxina (CSE), con razón geométrica igual a 2 para obtener las concentraciones de  $0,25 \lambda$ ,  $0,5 \lambda$ ,  $\lambda$  y  $2 \lambda$ s, donde  $\lambda$  es la sensibilidad declarada del LAL en UE/ml. Ejecutar la prueba con las cuatro concentraciones del estándar de endotoxina en cuadruplicado e incluir controles negativos. El promedio geométrico de la concentración del punto final cuyo cálculo e interpretación se encuentran a continuación debe ser mayor o igual a  $0,5 \lambda$  y menor o igual a  $2 \lambda$ . La confirmación de la sensibilidad del LAL debe ser realizada para cada nuevo lote de LAL.

*Cálculo e interpretación.* El punto final de gelificación es la última prueba de la serie decreciente de concentración de endotoxina estándar que formó gel. Calcule el promedio geométrico logarítmico de los puntos finales de gelificación y el antilog del promedio por la fórmula:

$$\text{Promedio geométrico de concentración del punto final} = \text{antilog} \left( \frac{Ee}{f} \right)$$

en que

Ee es la suma de los log de las concentraciones del punto final de la serie de diluciones utilizada

f – es el número de réplicas.

La sensibilidad del reactivo LAL en UE/ml es calculada por la fórmula arriba y no debe ser menor que  $0,5 \lambda$  y mayor que  $2 \lambda$ .

#### Pruebas de interferencias en el método coagulación en gel (Inhibición/Potencialización)

Realizar la prueba en alícuotas de la muestra en la cual no hay endotoxina detectable y en diluciones que no exceda el MDV (máxima dilución válida). Ejecutar la prueba, como en el procedimiento de la prueba, en la muestra sin adición de endotoxina (solución A) y en la muestra con endotoxina adicionada (solución B), en las concentraciones de  $1/4 \lambda$ ,  $1/2 \lambda$ ,  $1 \lambda$  y  $2 \lambda$ , en cuadruplicatas, y testando también en paralelo las mismas concentraciones de endotoxina en agua (solución C) y control negativo en agua grado reactivo LAL (solución D) en duplicado.

Calcular el promedio geométrico de la concentración de endotoxina del punto final de gelificación de la muestra como descrito en el procedimiento de la prueba arriba (prueba para confirmación de la sensibilidad del LAL).

La prueba es válida para la muestra bajo análisis si el promedio geométrico de esta concentración es mayor o igual a  $0,5 \lambda$  y menor o igual a  $2 \lambda$ . Si el resultado obtenido en las muestras en las cuales fueron adicionadas endotoxina está fuera del límite especificado, la prueba de inhibición o potencialización de endotoxina deberá ser repetida después de neutralización, inactivación o eliminación de las sustancias interferentes o después de la dilución de la muestra por factor que no exceda la MDV. Repetir la prueba en



una diluición mayor no excediendo la MDV o usar un LAL de sensibilidad mayor para que la interferencia pueda ser eliminada en la muestra analizada.

Interferencias pueden ser eliminadas por un tratamiento adecuado como filtración, neutralización, diálisis o calentamiento.

#### COAGULACIÓN EN GEL – PRUEBA LÍMITE

Esta prueba es usada cuando la monografía contiene requisitos para límite de endotoxina.

*Procedimiento.* Realice las pruebas en duplicatas con las soluciones A, B, C, D como sigue. Prepare solución de muestra diluida sin adición de endotoxina (solución A); con adición de endotoxina (control positivo del producto) a  $2\lambda$  (solución B); agua grado reactivo LAL con adición de endotoxina a  $2\lambda$  (solución C) y agua grado reactivo LAL sin adición de endotoxina (solución D – control negativo). La diluición de la solución A y B no debe pasar la MDV.

*Interpretación.* La prueba solamente será válida si las réplicas de los controles positivos de las soluciones B y C forman gel, y las réplicas de los controles negativos de las soluciones A y C no forman gel. Resultados contrarios, no serán válidos y deberán ser repetidos.

#### *Ensayo de la prueba por la coagulación en gel*

Mezcle un volumen (ej. 100  $\mu$ L) de LAL con igual volumen de las soluciones arriba, muestra, estándares, y control negativo de la prueba en tubos de ensayo 10 x 75mm, en duplicatas. Incubar los tubos por 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , evitando vibraciones. Después de este período retire los tubos uno a uno, girando a 180 grados y verificando la integridad del gel; si el gel permanece firme después de la inversión de los tubos considere el resultado como positivo, y si no hubiere formación de gel o el mismo no se presenta firme considere como negativo.

La prueba solamente será válida si las siguientes condiciones son obedecidas:

Si ambas réplicas del control negativo (D) presentan reacciones negativas;

Si ambas réplicas del control positivo del producto (B) presentan reacciones positivas;

Si el promedio geométrico de la solución C está dentro de la banda de  $0,5\lambda$  a  $2\lambda$ .

Para calcular la concentración de endotoxina de la solución A, calcule la concentración del punto final de cada réplica de la serie de diluiciones, multiplicando cada factor de diluición del punto final por la sensibilidad rotulada del reactivo LAL ( $\lambda$ )

La concentración de endotoxina en la solución prueba es el promedio geométrico de la concentración del límite de las réplicas.

Si la prueba es realizada en la muestra diluida, determina la concentración de endotoxina en la solución original multiplicando el resultado por el factor de diluición de la muestra. Si ninguna de las diluiciones de la muestra prueba es positiva, exprese el resultado de la concentración de endotoxina como menor que la sensibilidad del LAL ( $\lambda$ ) o menor del que a sensibilidad del LAL multiplicado por el menor factor de diluición de la muestra.

Si todas las diluiciones de la muestra presentan reacciones positivas, la concentración de endotoxina es expresa como igual o mayor que  $\lambda$  multiplicado por el más alto factor de diluición de la muestra.

La muestra encuentra los requisitos de la prueba si la concentración de endotoxina es menor que el límite individual especificado en la monografía.

#### TÉCNICAS FOTOMÉTRICAS

Los métodos fotométricos cuantitativos incluyen:

- Método cinético turbidimétrico: basado en el desarrollo de turbidez después de quiebra de un sustrato endógeno.
- Método cinético cromogénico: basado en el desarrollo de color después de quiebra de un complejo péptido sintético cromógeno.
- Método cromogénico límite (endpoint).
- Método turbidimétrico límite (endpoint).

#### *Técnica turbidimétrica*

Esta técnica se basa en la medida de aumento de turbidez, y dependiendo del principio empleado, puede ser clasificado en 2 tipos:

- Límite Turbidimétrico: basado en la relación entre la concentración de endotoxina y la turbidez (absorbancia o transmisión) de la reacción
- Cinético Turbidimétrico: método basado en el tiempo de reacción (onset time) necesario para la mezcla que la reacción alcance una absorbancia predeterminada o en la relación de desarrollo de turbidez.

La prueba es realizada en una temperatura de incubación recomendada de  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### *Técnica cromogénica*

Esta técnica es basada en la medida de un cromóforo liberado por un péptido cromogénico por la reacción de la endotoxina con el lisado y dependiendo del principio empleado puede ser clasificado en dos tipos:

- Prueba cromogénica límite- está basada en la relación entre la concentración de endotoxina y la cantidad del cromóforo liberado en el final de un período de incubación.
- Prueba cinética cromogénica: basada en la medida del tiempo de reacción (onset time) necesaria para que la



mezcla de la reacción alcance una predeterminada absorbancia o en la velocidad de desarrollo de color.

La prueba es realizada en una temperatura de incubación recomendada de  $37 \pm 1$  °C.

#### *Preparación de la prueba*

Para asegurar la precisión y validez de las pruebas turbidimétricas y cromogénicas, pruebas preparatorias son realizadas para asegurar que los criterios para la curva estándar son satisfactorios y la muestra en prueba no interfiere con la prueba.

La validación del método es requerida cuando cualquier cambio en las condiciones experimentales es realizado y puede interferir en la prueba.

#### *Criterios para la curva estándar*

Prepare una curva estándar utilizando tres concentraciones de endotoxina, usando una solución preparada de estándar de endotoxina, y realice la prueba, como mínimo en triplicado de cada concentración, como recomendado por el proveedor del LAL (relación de volumen, tiempo de incubación, temperatura y pH, etc.)

Si se desea una banda mayor que 2 logs, una concentración estándar deberá ser adicionada para aumentar la banda de la curva estándar.

El valor absoluto de correlación lineal R deberá ser mayor o igual a 0,980 para la banda. De concentración de endotoxina indicada por el proveedor de LAL.

#### *Prueba para factores de interferencia para las técnicas fotométricas*

Prepare soluciones de muestra diluida sin exceder la MDV (máxima dilución válida) sin endotoxina (solución A) y con endotoxina adicionada (solución B) en la concentración igual o próxima del punto medio de la curva estándar. Prepare también una serie de control positivo con soluciones de endotoxina (solución C) con tres concentraciones diferentes, y también el control negativo con agua pirogénica (solución D) y realizar las pruebas adicionando reactivo LAL, como mínimo en duplicado (siga las orientaciones del reactivo utilizado con relación al volumen de muestra y del reactivo, tiempo de incubación), el punto más bajo de la curva es considerado  $\lambda$ .

Calcule el promedio de recuperación de la endotoxina adicionada a la muestra sustrayéndose el promedio de la concentración de endotoxina en la solución prueba (solución A) (si hubiere) de la media de la solución cuya endotoxina fue adicionada (solución B).

La solución prueba es considerada libre de interferentes si la medida de la concentración de endotoxina adicionada a la solución prueba (solución B) está en la banda de 50 a 200% de recuperación, después de sustracción de cual-

quier endotoxina detectada en la solución sin adición de endotoxina.

Cuando la recuperación de endotoxina está en la banda de especificación, factores interferentes deben ser retirados conforme descritos en la sección de la técnica de coagulación en gel.

#### *Procedimiento*

Siga los procedimientos descritos arriba en los ítems:

Preparación para la prueba y Pruebas para factores interferentes.

#### *Cálculos para técnicas fotométricas*

Calcule la concentración de endotoxina para cada réplica de la solución A, usando la curva estándar generada por la serie de control positivo solución C.

La prueba solamente es válida si los tres requisitos abajo son encontrados:

El resultado obtenido de la solución D (control negativo) no excede el límite del valor del blanco requerido en la descripción del lisado empleado;

El resultado obtenido con la serie de control positivo, solución C, está de acuerdo con los requisitos para validación definidos en los criterios para curva estándar.

La recuperación de endotoxina, calculada a partir de la endotoxina encontrada en la solución B después de sustracción de la concentración de endotoxina encontrada en la solución A está dentro de la banda de 50 a 200%.

#### *Interpretación de los resultados en ensayos fotométricos*

La solución de muestra a ser examinada estará de acuerdo con la prueba si el promedio de la concentración de endotoxina encontrada en las réplicas (solución A), después de corrección para dilución y concentración es menor que el límite de endotoxina del producto probado.

#### REACTIVOS

##### *Lisado de Amebocito*

El lisado de amebocito es un liofilizado obtenido del lisado de amebocitos de crustáceo en forma de herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*) Este reactivo se refiere apenas al producto manufacturado de acuerdo con las reglamentaciones de autoridad competente.

El lisado reacciona también con algunos B-Glucanos además de endotoxinas.

Preparado del lisado que no reacciona con B-Glucanos también están disponibles; ellos son preparados o por eliminación o por inhibición del factor G, que reacciona con

los glucanos. Estos preparados pueden ser utilizados para prueba de endotoxina en la presencia de glucanos.

*Reconstitución del reactivo.* Disuelva el lisado de amebocito (LAL) en agua grado reactivo para BET (prueba de endotoxina bacteriana) o tampón, sin agitación y almacene el mismo en refrigerador o freezer de acuerdo con la recomendación del proveedor.

#### *Agua para prueba de endotoxina bacteriana*

El agua para prueba y agua para inyección o producida para otros procedimientos que demuestre no tener ninguna reacción con el lisado empleado en el límite de detección del reactivo.

### 5.5.2.3 TOXICIDAD

La prueba de toxicidad posibilita detectar reactividad biológica inesperada y no aceptable de fármacos y medicamentos. Esa prueba *in vivo* es sugerida para la evaluación de la seguridad de productos biológicos y derivados de biotecnología.

#### PRUEBA GENERAL

##### *Selección de los animales*

Usar ratones sanos, de ambos los sexos, de especímenes conocidos, no utilizados previamente en pruebas biológicas. Mantenerlos a dieta uniforme, agua a gusto y en temperatura ambiente constante de  $21 \pm 3$  °C. En el día de la prueba, seleccionar ratones con peso entre 17 g y 22 g.

##### *Preparación de la muestra*

La muestra debe ser preparada conforme especificado en la respectiva monografía y administrada inmediatamente.

##### *Procedimiento*

Usar jeringas, agujas y elementos de vidrio estériles. Administrar, en cinco ratones, volumen de la preparación muestra indicada en la monografía, por una de las vías descritas a continuación.

*Intravenosa* – Inyectar la dosis en la vena caudal, manteniéndose la velocidad constante de 0,1 ml por segundo o la indicada en la monografía.

*Intraperitoneal* – Inyectar la dosis en la cavidad peritoneal.

*Subcutánea* – Inyectar la dosis en la región cervical o abdominal.

*Oral* – Administrar la dosis por medio de sonda u otro dispositivo adecuado.

##### *Interpretación*

Mantener los animales en observación durante 48 horas después de la administración o por el tiempo indicado en la mo-

nografía. La muestra cumple la prueba si todos los animales sobreviven y no más de uno presenta síntomas anormales en el intervalo de tiempo establecido. Si uno o dos animales mueren, o más de uno presenta síntomas anormales o de toxicidad inesperada, repetir la prueba utilizando otros cinco o más ratones, con peso entre 19 g y 21 g. La muestra cumple los requisitos de la prueba si el número de ratones muertos no excede 10% del total de animales probados, incluyendo la prueba original, y ningún animal del segundo grupo presenta síntomas indicativos de toxicidad anormal.

#### PRUEBA PARA PRODUCTOS BIOLÓGICOS, SUEROS Y VACUNAS

##### *Selección de los animales*

Usar, por lo menos, cinco ratones con peso entre 17 g y 22 g y, por lo menos, dos cobayos sanos con peso entre 250 g y 350 g.

##### *Procedimiento*

Pesar los animales y registrar en formulario propio antes de inyectar la muestra. A menos que especificado de otra forma en la monografía, inyectar intraperitonealmente en cada animal el equivalente a una dosis humana de la preparación, sin pasar de 1,0 ml para ratones y de 5,0 ml para cobayos. La dosis humana es definida en el rótulo de la preparación a prueba o en la bula que la acompaña.

##### *Interpretación*

Por un período de, como mínimo, 7 días, observar los animales cuanto a señales de enfermedad, pérdida de peso, anormalidades o muerte. Si, durante el período de observación, todos los animales sobreviven, no manifiestan respuestas que no son específicas o esperadas para el producto y no sufren reducción de peso, la preparación cumple la prueba. De lo contrario, la prueba debe ser repetida para las especies en las cuales los requisitos no fueron cumplidos. La preparación cumple la prueba si todos los animales del segundo grupo cumplen los criterios especificados para la prueba inicial.

Si, después de la segunda prueba, la preparación no cumple los requisitos, pero no son observadas muertes en porcentaje igual o superior a 50% del número total de animales probados, una segunda prueba puede ser realizada, en las especies en las cuales se observó el no cumplimiento de los requisitos. Utilizar el doble de animales de la prueba inicial. Si los animales cumplen los criterios especificados para la prueba inicial, la preparación cumple la prueba.

### 5.5.2.4 SUSTANCIAS VASOPRESORAS

##### *Preparación estándar de referencia*

Como preparación estándar, emplear bitartrato de epinefrina. Esa preparación debe ser conservada en frascos herméticos y opacos y desecada sobre gel de sílice durante 18 horas antes del uso.

### *Solución estándar de referencia*

Disolver 91 mg de bitartrato de epinefrina (equivalente a 50 mg de epinefrina base  $C_9H_{13}NO_3$ ) en solución reciente de bisulfito de sodio 0,4% (p/v). Completar 50 ml con agua y homogeneizar. La solución final tendrá 1,0 mg de epinefrina (base libre) por mililitro. Conservar, bajo refrigeración, en frasco hermético ámbar. Usar, como máximo, durante seis meses. Descartar la solución cuando está presente alguna señal de deterioro, tal como cambio de color.

### *Diluición del estándar*

Diluir la solución estándar de referencia de epinefrina, en solución fisiológica, de modo que la administración de dosis entre 0,1 ml y 0,5 ml produzca aumento de 20 mm a 70 mm de mercurio en la presión arterial.

### *Método propuesto*

Seleccionar rata con peso entre 275 g y 325 g y anestesiar con anestésico que posibilite el mantenimiento de la presión arterial constante. (Exento de efecto sobre presión arterial). Inmovilizar el animal y mantenerlo caliente para prevenir la pérdida de calor corporal. Quirúrgicamente proceder a la intubación traqueal, si necesario, y exponer la vena femoral o yugular, preparándola, para inyecciones intravenosas. Administrar 200 unidades de heparina por 100 g de peso corporal. Quirúrgicamente exponer la arteria carótida y canular, conectándola al manómetro ajustado para el registro continuo de la presión arterial.

Inyectar, intravenosamente, solución de sulfato de atropina 0,1% (p/v) en la proporción de 1 ml por quilogramo de peso corporal. Considerar el receptor muscarínico suficientemente bloqueado solamente si inyecciones subsiguientes de la solución reciente de cloruro de acetilcolina 0,001% (p/v) en la dosis de 1 ml por quilogramo de peso no produce caída transitoria en la presión arterial. Si ese mecanismo no está suficientemente paralizado, inyectar dosis de 0,5 ml de la solución de sulfato de atropina hasta parálisis completa.

### *Procedimiento*

Seleccionar dosis de la diluición estándar que produzca aumento entre 2,7 kPa y 9,3 kPa (20 mm a 70 mm de mercurio) en la presión arterial. Inyectar la dosis en intervalos constantes de, como mínimo, cinco minutos para posibilitar el retorno de la presión arterial al nivel basal. Después de cada inyección administrar, inmediatamente, 0,2 ml de solución fisiológica para lavar la cánula. Asegurarse de la reproductibilidad de la respuesta, repitiendo la dosis dos o más veces. Administrar nueva dosis de la diluición del estándar para obtener respuesta hipertensora aproximadamente 20% mayor que el promedio de las respuestas de la dosis menor. Considerar el animal apto para la prueba si (1) las respuestas para la primera dosis seleccionada fueron reproducibles entre 2,7 kPa y 9,3 kPa (20 mm a 70 mm de mercurio) y (2) significativamente menores con relación a la respuesta de la dosis mayor.

Manteniendo constante el intervalo de tiempo establecido, inyectar serie de cinco dosis en la cual se alternen la dosis seleccionada de la diluición estándar y dosis de igual volumen de la sustancia a prueba, diluida convenientemente. Después de cada una de las cinco inyecciones, medir la variación en la presión arterial.

Calcular la diferencia entre cada respuesta de la muestra y el promedio de las respuestas de las dosis de la diluición estándar, inmediatamente anterior y posterior. La muestra cumple los requisitos de la prueba si el promedio de esas diferencias significa que las respuestas obtenidas con solución de la muestra no son mayores que aquellas de la diluición estándar. Los resultados deben corresponder al límite de actividad presora especificado para esta prueba en la monografía correspondiente.

## 5.5.2.5 HISTAMINA

Someter a eutanasia una cobaya con peso entre 250 g y 350 g, en ayuno de aproximadamente 24 horas. Retirar aproximadamente 10 cm de la porción distal del íleon. Lavar internamente con solución nutritiva. Seleccionar porción con cerca de dos o tres centímetros de largo y amarrar dos líneas finas en las extremidades. Efectuar pequeña incisión en la porción central del tejido. Transferirlo para cuba de órgano aislado, de 10 ml a 20 ml de capacidad, en temperatura controlada entre 34 °C a 36 °C bajo corriente de aire o mezcla de 95% de oxígeno y 5% de  $CO_2$ . Fijar una de las líneas en el fondo de la cuba y amarrar la otra en la palanca destinada a registrar las contracciones musculares en el quimógrafo u otro sistema de registro adecuado. Ajustar la palanca para el registro de las contracciones del íleon con grado de amplificación de la orden de 20 veces. Lavar la preparación con solución y dejarla en reposo por 10 minutos.

Añadir volúmenes conocidos – de 0,2 ml a 0,5 ml de solución estándar de referencia de histamina (1 g/ml) – para obtener respuesta submáxima (dosis mayor). Lavar el íleon tres veces con solución nutritiva. Efectuar las adiciones sucesivas en intervalos regulares de aproximadamente 2 minutos. Añadir nuevas dosis de solución estándar de referencia de histamina – obtenida por diluición de la solución original, para mantener los volúmenes de dosis siempre iguales – estableciendo la dosis responsable de respuesta cuya intensidad sea la mitad de la dosis mayor (dosis menor).

Proseguir la prueba adicionando secuencias de tres dosis: dosis estándar de referencia menor, dosis de solución de la sustancia bajo prueba y dosis estándar de referencia mayor. Ajustar la diluición de la muestra para que, ocurriendo contracción del íleon, esta sea menor que la producida por la dosis estándar de referencia mayor.

Establecer la reproductividad de la contracción por repeticiones sucesivas de las secuencias de dosis.

Calcular la actividad de la sustancia bajo prueba en términos de su equivalente en microgramo por mililitro de histamina (base libre), tomando por base las diluciones

efectuadas. El valor encontrado no debe exceder el límite establecido en la monografía.

No ocurriendo contracción en dicha prueba por efecto de la muestra ensayada, preparar nueva solución de la muestra, adicionado cantidad de histamina correspondiente al límite máximo especificado en la monografía y observar si la contracción producida es proporcional a la cantidad de histamina adicionada. Considerar la prueba válida si esa respuesta es proporcional y si confirma la reproducibilidad de las contracciones inducidas por la secuencia de dosis: dosis estándar de referencia menor, dosis de solución de la sustancia a prueba y dosis estándar de referencia mayor. Caso contrario, realizar la prueba para sustancias vasodepresoras.

*Solución nutritiva (preparar en el momento de la utilización)*

Solución A*	50 ml
Sulfato de atropina	0,5 mg
Bicarbonato de Sodio	1,0 g
Dextrosa anhidra (para uso parenteral)	0,5 g
Agua para inyectables suficiente para	1000 ml

*Solución A*

Cloruro de sodio	160,0 g
Cloruro de potasio	4,0 g
Cloruro de calcio anhidro	2,0 g
Cloruro de magnesio anhidro	1,0 g
Fosfato de sodio dibásico	0,05 g
Agua para inyectables suficiente para	1000 ml

### 5.5.2.6 SUSTANCIAS VASODEPRESORAS

*Preparación del estándar de referencia*

Emplear diclorhidrato de histamina, conservando en frasco hermético y opaco, desecado sobre gel de sílice durante dos horas, antes del uso.

*Solución estándar de referencia*

Disolver, en agua para inyectable estéril, cantidad suficiente y exactamente pesada de diclorhidrato de histamina para obtener solución conteniendo el equivalente a 1 mg/ml de histamina (base libre). Conservar bajo refrigeración en recipiente de vidrio ámbar dotado de tapa esmerilada, al abrigo de la luz, durante un mes. En el día de la prueba, preparar solución estándar de referencia conteniendo el equivalente a 1 µg/ml de histamina (base libre), en solución fisiológica.

*Solución de muestra*

Preparar a solución de muestra conforme a especificación de la monografía respectiva.

*Método sugerido*

Realizar la prueba usando un gato con peso mínimo de 2 kg (pesar gato adulto y sano) (en el caso de hembras, que no estén preñadas) y anestesiario por medio de inyección de cloralosa o barbitúrico que posibilite el mantenimiento de presión arterial uniforme. Inmovilizar el animal y protegerlo para prevenir pérdida de calor corporal, hacer el monitoreo rectal de la temperatura para mantenimiento de los límites fisiológicos.

Disecar la vena femoral, o yugular, preparándola por inserción de cánula repleta de heparina (1000 unidades/ml de solución fisiológica) para la administración de las soluciones estándar de referencia y muestra.

Exponer, quirúrgicamente, la arteria carótida, disecándola completamente de las estructuras circundantes, inclusive el nervio vago. Insertar una cánula conectándola directamente al manómetro de mercurio u otro dispositivo apropiado para el registro continuo de presión arterial.

Evaluar la sensibilidad del gato a histamina, inyectando en intervalos uniformes de, como mínimo cinco minutos, dosis correspondientes a 0,05 µg (dosis A); 0,10 µg (dosis B) y 0,15 µg (dosis C) de histamina (base libre) por quilogramo de peso corporal. Después de cada administración, lavar inmediatamente a cánula por inyección de aproximadamente 0,5 ml de solución fisiológica, para retirar actividad residual. Repetir tres veces la administración de la dosis B a fin de observar la uniformidad de respuesta a la misma dosis. El animal es considerado apto a la realización de la prueba si las respuestas a los tres niveles de dosificación fueren nítidamente diferenciadas y las respuestas a la secuencia de dosis B fueren aproximadamente similares, correspondiendo a caídas de presión arterial no inferiores a 2,7 kPa (20 mm de mercurio).

Inyectar dos series de cuatro dosis, consistiendo cada serie de dos inyecciones de la dosis especificada en la monografía de la muestra, intercaladas con la dosis B, siempre con intervalo uniforme de, como mínimo, cinco minutos.

Medir la alteración de la presión arterial después de cada una de las inyecciones. En el análisis de los resultados, se considera que la muestra cumple los requisitos de la prueba si el promedio de sus respuestas depresoras es inferior a aquella de la dosis B.

Terminar la prueba administrando una dosis C del estándar para comprobar que la respuesta se mantiene superior a la dosis B: caso esto no ocurra, la prueba no es válida.

El animal puede ser usado mientras permanezca estable y responda, adecuadamente, a la administración de la solución estándar de referencia.

## 5.5.3 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

### 5.5.3.1 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUCTOS NO ESTÉRILES

La contaminación microbiana de un producto puede provocar alteraciones en sus propiedades físicas y químicas y además caracteriza riesgo de infección para el usuario. Así, productos farmacéuticos de uso oral y tópico (cápsulas, comprimidos, suspensiones, cremas, adhesivos, etc.) que no tienen como requerimiento ser estériles deben estar sujetos al control de contaminación microbiana.

La garantía de calidad y el control de fabricación previstos en las buenas prácticas deben garantizar que el producto cumpla las especificaciones determinadas, esto es, que atiendan además de otros parámetros, a los límites aceptables para microorganismos.

Para la realización de la prueba deben ser considerados los límites microbianos, el tipo de contaminación más probable en las diferentes categorías de productos y la vía de administración.

La naturaleza y la frecuencia de la prueba varían de acuerdo con el producto. Ciertas categorías deben ser probadas reiteradamente cuanto a la contaminación total microbiana, tales como: productos de origen vegetal, mineral y/o animal así como productos con elevado tenor de agua (soluciones orales acuosas, cremas, etc). Para las demás categorías como comprimidos, polvos, cápsulas, productos líquidos no acuosos, pomadas y supositorios, la frecuencia de la prueba puede ser establecida con base en datos históricos de las pruebas de monitoreo microbiológico tanto el ambiental como el de equipos. Otros criterios a ser considerados serían la carga microbiana de la materia prima, el proceso de fabricación, la formulación del producto y los resultados de determinación de la actividad de agua, cuando aplicable. Resultados de baja actividad de agua (igual o inferior a 0,75 medidos a la 25 °C), así como bajo o alto pH, ausencia de nutrientes y adición de conservantes ayudan a prevenir la contaminación microbiana.

#### 5.5.3.1.1 Condiciones generales

Para los ensayos microbiológicos en productos no estériles, se debe utilizar técnicas asépticas en el muestreo y en la ejecución de la prueba. La prueba debe ser realizada, preferentemente, en campana de flujo laminar y emplear, cuando posible, la técnica de filtración por membrana.

Si la muestra posee actividad antimicrobiana, esa debe ser convenientemente retirada o neutralizada.

La eficacia y la ausencia de toxicidad del agente inactivante para los microorganismos considerados debe ser demostrada. Si se usan sustancias tensoactivas en la preparación de la muestra, también, debe ser demostrada la ausencia de toxicidad para los microorganismos y compatibilidad con

el agente inactivante, conforme descrito en *Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)*.

#### SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Las soluciones y los medios de cultivos descritos son considerados satisfactorios para realizar los ensayos límite de contaminación microbiana prescritos. Sin embargo, pueden ser utilizados otros medios que posean propiedades nutritivas y selectivas similares para las especies microbianas analizadas.

##### *Solución Tampón cloruro de sodio-peptona, pH 7,0*

Fosfato de potasio monobásico	3,6 g
Fosfato disódico dihidratado	7,2 g
Cloruro de sodio	4,3 g
Peptona (carne o caseína)	1,0 g
Agua purificada	1000 ml

Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

##### *Tampón Fosfato pH 7,2 – Solución stock*

Fosfato de potasio monobásico	34,0 g
Hidróxido de sodio 4% Añadir aproximadamente	175 ml
Agua purificada	1000 ml

Disolver el fosfato de potasio monobásico en 500 ml de agua, acertar el pH para  $7,2 \pm 0,2$  con hidróxido de sodio 4%. Completar el volumen con agua, esterilizar y conservar bajo refrigeración. En ocasión de la utilización diluir la solución stock con agua en la proporción de 1 para 800 (v/v) y esterilizar.

##### *Fluido de lavado*

Peptona de carne digestión péptica	1,0 g
Polisorbato 80	1,0 g (si necesario)
Agua	1000 ml

Pesar y disolver el ingrediente en el agua destilada agitando constantemente. Calentar si necesario. Ajustar el pH de forma que sea  $7,1 \pm 0,2$ . Esterilización en autoclave usando ciclo validado.

##### *Diluyente Universal*

Fosfato de potasio monobásico	3,6 g
Fosfato disódico Dihidratado	7,2 g
Cloruro de sodio	4,3 g
Peptona de carne o de caseína	1,0 g
Lecitina de gema de huevo	3,0 g
L-histidina	1,0 g
Polisorbato 80	30,0 g
Agua purificada	1000 ml

Pesar y disolver los ingredientes en el agua destilada agitando constantemente. Calentar si necesario. Ajustar el pH de forma que sea  $6,8 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.



*Caldo neutralizante DEY-ENGLEY*

Caseína enzimática hidrolizada	5,0 g
Púrpura Bromocresol	20,0 mg
Extracto de Levadura	2,50 g
Tiosulfato de Sodio	6,00 g
Tioglicolato de Sodio	1,0 g
Bisulfito de sodio	2,50 g
Polisorbato 80	5,00 g
Dextrosa	10,0 g
Lecitina	7,0 g
Agua	1000 ml

Pesar y disolver los ingredientes en el agua destilada agitando constantemente. Calentar si necesario. Ajustar el pH de forma que sea  $7,6 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

*Caldo Caseína-soja*

Peptona de Caseína pancreática	17,0 g
Harina de soja obtenida por digestión papaínica	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato de potasio dibásico	2,5 g
Glucosa monohidratada	2,5 g
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,3 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

*Agar Caseína-soja*

Peptona de caseína pancreática	15,0 g
Harina de soja obtenida por digestión papaínica	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,3 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

*Agar Violeta Rojo Neutro Glucosa*

Extracto de levadura	3,0 g
Peptona de gelatina pancreática	7,0 g
Sales Biliares	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Glucosa monohidratada	10,0 g
Agar	15,0 g
Rojo neutro	30,0 mg
Cristal violeta	2,0 mg
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,4 \pm 0,2$ . Calentar hasta ebullición. No esterilizar en autoclave.

*Caldo de Enriquecimiento para Enterobacterias Mossel*

Hidrolizado de pancreático de gelatina	10,0 g
Glucosa monohidratada	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	20,0 g
Fosfato de potásico monobásico	2,0 g
Fosfato disódico dihidratado	8,0 g
Verde brillante	15,0 mg
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,2 \pm 0,2$ . Calentar a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Enfriar inmediatamente.

*Caldo MacConkey*

Hidrolizado de pancreático de gelatina	20,0 g
Lactosa monohidratada	10,0 g
Bilis de buey deshidratada	5,0 g
Púrpura de bromocresol	10,0 mg
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,3 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

*Agar MacConkey*

Hidrolizado de pancreático de gelatina	17,0 g
Peptona (carne o caseína)	3,0 g
Lactosa monohidratada	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Bilis de buey deshidratada	1,5 g
Rojo neutro	30,0 mg
Cristal violeta	1,0 mg
Agar	13,5 g
Agua purificada	1000 ml

pH  $7,1 \pm 0,2$ . Hervir 1 minuto con constante agitación. Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

*Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato*

Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0 g
Lactosa monohidratada	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Rojo fenol	80,0 mg
Agar	13,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Citrato de amonio férrico	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Agua purificada	1000 ml

Ajustar de forma que después de calentamiento sea pH  $7,4 \pm 0,2$ . Calentar hasta la ebullición. No esterilizar en autoclave.

*Caldo Enriquecimiento Salmonela Rappaport Vassiliadis*

Peptona de soja	4,5 g
Cloruro de magnesio hexahidratado	29,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato de potasio dibásico	0,4 g
Fosfato de potasio monobásico	0,6 g
Verde malaquita	36,0 mg
Agua purificada	1000 ml

pH  $5,2 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave en temperatura que no exceda  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Agar Cetrimida*

Hidrolizado de pancreático de gelatina	20,0 g
Cloruro de magnesio	1,4 g
Sulfato dipotásico	10,0 g

Cetrimida 0,3 g  
 Agar 13,6 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 Glicerol 10,0 ml  
 Hervir 1 minuto con constante agitación. Ajustar el pH de forma que sea  $7,2 \pm 0,2$ . Esterilización en autoclave usando ciclo validado.

#### Agar Manitol Salado

Hidrolizado de pancreático de caseína 5,0 g  
 Peptona péptica de tejido animal 5,0 g  
 Extracto de carne 1,0 g  
 D-manitol 10,0 g  
 Cloruro de sodio 75,0 g  
 Agar 15,0 g  
 Rojo fenol 25,0 mg  
 Agua purificada 1000 ml  
 Hervir 1 minuto con constante agitación. Ajustar el pH de forma que sea  $7,4 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

#### Agar Papa-dextrosa

Infusión de papa 200,0 g  
 Dextrosa 20,0 g  
 Agar 15,0 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 Suspender 39 g en 1000 ml de agua. pH  $5,6 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado. Si pretende pH 3,5, añadir aproximadamente 14 ml de solución estéril de ácido tartárico 10% (p/v) al medio enriado a 45-50 °C.

#### Agar Sabouraud-dextrosa 4%

Dextrosa 40,0 g  
 Peptonas 10,0 g  
 Agar 15,0 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 pH  $5,6 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

#### Caldo Sabouraud-dextrosa

Dextrosa 20,0 g  
 Peptonas 10,0 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 pH  $5,6 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

#### Agar Selectivo para *Candida* según Nickerson

Extracto de levadura 1,0 g  
 Peptona harina de soja 2,0 g  
 Glicina 10,0 g  
 Glucosa 10,0 g  
 Indicador bismuto-sulfito 2,0 g  
 Agar 15,0 g  
 Agua purificada 1000 ml

Disolver 40 g en 1000 ml de agua. pH  $6,5 \pm 0,2$ . Esterilizar bajo vapor fluente.

#### Medio Reforzado para *Clostridium*

Extracto de carne 10,0 g  
 Peptona 10,0 g  
 Extracto de levadura 3,0 g  
 Almidón soluble 1,0 g  
 Glucosa monohidratada 5,0 g  
 Clorhidrato de cisteína 0,5 g  
 Cloruro de sodio 5,0 g  
 Acetato de sodio 3,0 g  
 Agar 0,5 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 Dejar entumecer el Agar y disolver calentando a ebullición, agitando constantemente. Si necesario ajustar el pH de forma que sea  $6,8 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado.

#### Agar Columbia

Hidrolizado de pancreático de caseína 10,0 g  
 Peptona de carne digestión 5,0 g  
 Digesto pancreático de corazón 3,0 g  
 Extracto de levadura 5,0 g  
 Almidón de maíz 1,0 g  
 Cloruro de sodio 5,0 g  
 Agar, de acuerdo con el poder gelificante 10,0 – 15,0 g  
 Agua purificada 1000 ml  
 Dejar entumecer el agar y disolver calentando hasta ebullición, agitando constantemente. Si necesario ajustar el pH de forma que sea  $7,3 \pm 0,2$ . Esterilizar en autoclave usando ciclo validado. Enfriar para 45 a 50 °C y añadir, si necesario, sulfato de gentamicina correspondiente a 20 mg de gentamicina base, verter en placas de Petri.

#### 5.5.3.1.2 Conteo del número total de microorganismos mesófilos

Con esta prueba es posible determinar el número total de bacterias mesófilas y hongos en productos y materias primas no estériles y es aplicado para determinar si el producto satisface las exigencias microbiológicas farmacopeicas. Cuando usado para ese propósito, se debe seguir las indicaciones dadas, incluyendo el número de muestras tomas e interpretación de los resultados. La prueba no es aplicada para productos que contienen microorganismos viables como ingrediente activo.

Esa prueba consiste en el conteo de la población de microorganismos que presentan crecimiento visible, en hasta 5 días, en Agar caseína-soja a  $32,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$  y en hasta 7 días, en Agar Sabouraud-dextrosa a  $22,5 \text{ °C} \pm 2,5 \text{ °C}$ .

Métodos microbiológicos alternativos, inclusive los automatizados, pueden ser utilizados desde que su equivalencia con el método farmacopeico haya sido debidamente validada.

## PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

*Productos hidrosolubles*

Transferir 10 g o 10 ml de la mezcla de muestra para 90 ml de solución tampón cloruro de sodio-peptona – pH 7,0 o solución tampón fosfato – pH 7,2, Caldo Caseína-soja u otro diluyente adecuado. Si necesario, ajustar el pH para 6,0 a 8,0 con solución HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente.

*Productos de naturaleza no lipídica insolubles en agua*

Preparar una suspensión de 10 g o 10 ml de la mezcla de muestra en solución tampón cloruro de sodio-peptona, pH 7,0 o caldo de caseína-soja u otro diluyente adecuado. En general, la proporción de diluyente y muestra es de 10:1, pero las características del producto pueden exigir que sea alterada esa relación. Puede ser adicionado agente tensoactivo como polisorbato 80, en la concentración de 1 g/L, para facilitar la dispersión. Si necesario, ajustar el pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente.

*Productos de naturaleza lipídica*

Método de filtración por membrana – Disolver 1 g o 1 ml de la mezcla de muestra en 100 ml de miristato de isopropilo esterilizado por filtración en membrana (y su extracto acuoso debe presentar pH no inferior a 6,5) y calentado a 40 – 45 °C. Puede ser utilizado polisorbato 80 estéril u otro agente tensoactivo no inhibitorio;

Método de conteo en placa – Transferir 10 g o 10 ml de la mezcla de muestra para frasco conteniendo no más que 5 g de polisorbato 20 o 80 estéril u otro agente tensoactivo no inhibitorio. Calentar si necesario, a una temperatura entre 40 – 45 °C.

Homogeneizar, cuidadosamente, manteniendo, si necesario, la temperatura 40 – 45 °C. Añadir diluyente adecuado entre los presentados en **5.5.3.1.1** – Soluciones y Medios de Cultivo, previamente calentado, en la cantidad necesaria para obtener una dilución a 1:10 del producto inicial.

Mezclar, cuidadosamente, manteniendo la temperatura máxima de 40 – 45 °C durante el tiempo necesario para la formación de una emulsión, en cualquier caso no más que 30 minutos. Si necesario, ajustar el pH para 6,5 – 7,5. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente acrecido de polisorbato 20 o 80.

*Cremas y pomadas insolubles en miristato de isopropilo*

Transferir 10 g de la mezcla de muestra para obtener una dilución a 1:10 en caldo caseína-soja conteniendo 0,1 de tetradecil sulfato de sodio, calentado a 40 – 45 °C. Agitar hasta mezcla homogénea.

Mezclar, cuidadosamente, manteniendo siempre la temperatura durante el tiempo mínimo necesario para la formación de una emulsión, en cualquier caso no más que 30

minutos. Si necesario, ajustar el pH para 6,5 – 7,5. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente acrecido de 0,1% de tetradecil sulfato de sodio.

*Aerosoles*

Enfriar por lo menos 10 recipientes del producto en mezcla de alcohol y hielo seco durante una hora. Abrir los recipientes y dejarlos a temperatura ambiente para que el propelente sea eliminado. Retirar 10 g o 10 ml de los recipientes y transferir el producto para equipo de filtración o para frasco conteniendo solución tampón fosfato pH 7,2 u otro diluyente adecuado para obtener dilución 1:10. Si necesario, ajustar el pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente.

*Cápsulas vacías*

Transferir 10 g de cápsulas vacías para 90 ml de solución tampón fosfato pH 7,2 calentados a 40 – 45 °C y agitar como máximo durante 30 minutos. Completar el volumen para 100 ml (dilución 5:10). Si necesario, ajustar el pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente.

*Gelatinas*

Transferir 10 g de la mezcla de muestra para frasco conteniendo agua estéril calentada a 40 – 45 °C y dejar en reposo durante una hora (dilución 1:10). Enseguida transferir el frasco para baño maría a 45 °C, agitando vigorosamente en intervalos frecuentes. Si necesario, ajustar el pH para 6,0 a 8,0. Preparar diluciones decimales sucesivas en agua estéril.

*Dispositivo transdérmico*

Con pinzas estériles, retirar la película protectora de 10 dispositivos transdérmicos y colocarlos con el frente adhesivo para arriba, en placas estériles y cubrir el frente adhesivo con gaza esterilizada. Transferir los 10 dispositivos para 500 ml, en el mínimo, de solución tampón cloruro de sodio-peptona – pH 7,0 conteniendo agente inactivante apropiado como polisorbato 80 o lecitina de soja. Agitar vigorosamente durante como máximo de 30 minutos.

*Relacionados*

*Algodón y gaza* – transferir tres porciones de 3,3 g de las partes más internas de las muestras para solución tampón cloruro de sodio-peptona – pH 7,0 conteniendo agente inactivante apropiado. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente.

*Otros relacionados* – transferir 10 unidades cuya forma y dimensión permita su fragmentación o inmersión total en no más que 1000 ml de solución tampón cloruro de sodio-peptona – pH 7,0 u otro diluyente adecuado. Dejar en contacto entre 10 – 30 minutos. Preparar diluciones decimales sucesivas con el mismo diluyente. Para aquellos que no pueden ser fragmentados o inmersos, introducir asépticamente, en el recipiente 100 ml de solución tampón cloruro

de sodio-peptona – pH 7,0. Agitar. Utilizar método de filtración por membrana de 0,45 µm.

El método para preparación depende de las características físicas del producto a ser probado. Si ninguno de los procedimientos descritos son satisfactorios, desarrollar un procedimiento adecuado<sup>1</sup>.

## ANÁLISIS DEL PRODUCTO

### *Cantidad de muestra*

Salvo indicación contraria, utilizar mezcla de muestras conteniendo 10 g o 10 ml del producto a examinar. Tomar 10 unidades para aerosol – forma líquida o sólida y para dispositivos transdérmicos.

La cantidad a ser probada podrá ser reducida en el caso de sustancias activas que son formuladas en las siguientes condiciones: la cantidad por dosis unitaria (ejemplo: comprimido, cápsula) es menor o igual a 1 mg. En ese caso, la cantidad de muestra a ser probada no debe ser menor que la cantidad presente en 10 dosis unitarias.

Para productos en que el tamaño del lote es extremadamente pequeño (eso es, menor que 1000 ml o 1000 g), la cantidad a ser probada debe ser 1% del lote o menor cuando justificado o autorizado.

Para productos donde el número total de unidades en el lote es menor que 200, usar dos unidades o una unidad si el lote fuese menor o igual a 100 unidades.

En el muestreo de productos en procesamiento, recoger 3 muestras del inicio, 4 del medio y 3 del final del proceso. Ejecutar la prueba en la mezcla de esas muestras.

## PROCEDIMIENTOS

La determinación puede ser efectuada por el Método de filtración por membrana, Método en placa o Método de los Tubos Múltiples (MNP). Ese último es reservado para las determinaciones bacterianas que no puedan ser realizadas por uno de los otros métodos y cuando se espera que el producto presente baja densidad bacteriana.

La elección del método es determinada por factores tales como la naturaleza del producto y el número esperado de microorganismos. Cualquier método escogido debe ser debidamente validado.

### *Filtración por membrana*

Utilizar equipo de filtración que posibilite la transferencia de la membrana para los medios de cultivo. Las membranas de nitrato de celulosa, por ejemplo, pueden ser utilizadas

<sup>1</sup> Algunos productos pueden requerir una calefacción mayor en la Preparación de la muestra, pero esta no debe pasar los 48 °C.

para soluciones acuosas, oleosas o levemente alcohólicas y las membranas de acetato de celulosa para soluciones fuertemente alcohólicas. Preparar la muestra usando el método más adecuado previamente determinado.

Transferir 10 ml, o la cantidad de dilución que represente 1 g o 1 ml de la muestra a ser probada, para dos membranas y filtrar inmediatamente. Si necesario, diluir la muestra para obtener conteo de colonias entre 10 y 100 UFC. Lavar las membranas por lo menos tres veces con aproximadamente 100 ml del fluido de lavado adecuado. Transferir una de las membranas para la superficie de una placa conteniendo agar caseína-soja, incubar a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3-5 días, para determinación del número de microorganismos aeróbicos totales. Transferir la otra membrana para la superficie de una placa conteniendo agar Sabouraud-dextrosa e incubar a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5-7 días, para la determinación de mohos y levaduras.

Calcular el número de UFC por gramo o mililitro del producto.

Cuando se analicen dispositivos transdérmicos y productos médicos, filtrar, separadamente, 10% del volumen de la preparación, conforme procedimiento de adecuación del producto, y proceder al lavado e incubación conforme descrito anteriormente.

### *Conteo en placa*

*Método de profundidad* – Añadir 1 ml de la muestra preparada como descrito en *Preparación de las muestras*, en placa de Petri y verter, separadamente, 15 – 20 ml de agar caseína soja y, agar Sabouraud-dextrosa mantenidos a 45 – 50 °C. Utilizar dos placas para cada medio y dilución. Incubar las placas conteniendo agar caseína-soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 – 5 días y las placas conteniendo agar Sabouraud- dextrosa a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5-7 días para determinación del número de microorganismos aeróbicos totales y mohos y levaduras, respectivamente. Solamente las placas que presenten número de colonias inferior a 250 (bacterias) y 50 (mohos y levaduras) por placa deberán ser consideradas para el registro de los resultados. Tomar el promedio aritmético de las placas de cada medio y calcular el número de UFC por gramo o ml del producto.

*Método de superficie* – añadir en placas de Petri, separadamente, 15 – 20 ml de agar caseína soja y agar Sabouraud-dextrosa y dejar solidificar. Secar las placas. Añadir a la superficie de cada medio de cultivo, 0,1 ml de la muestra preparada como descrito en *Preparación de las muestras*. Incubar las placas conteniendo agar caseína-soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3-5 días y las placas conteniendo agar Sabouraud-dextrosa a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 5 – 7 días para determinación del número de microorganismos aeróbicos totales y mohos y levaduras, respectivamente. Tomar el promedio aritmético de las placas de cada medio y calcular el número de UFC por gramo o ml del producto.

Ejemplo de cálculo:

<i>Dilución</i>	<i>Colonias por placas</i>	<i>UFC/g, o ml</i>
1:100	293	2,93 x 10 <sup>4</sup>
1:100	100	1,00 x 10 <sup>4</sup>
1:1000	41	4,10 x 10 <sup>4</sup>
1:1000	12	1,20 x 10 <sup>4</sup>

$$\text{Promedio} = \frac{(2,93+1,00+4,10+1,20)}{4} \times 10^4 = 2,30 \times 10^4$$

#### *Número Más Probable*

Preparar la muestra conforme procedimientos de adecuación del producto. Preparar diluciones 1:10; 1:100;

1:1000. Transferir 1 ml de cada una de las diluciones, para 3 tubos, conteniendo cada uno, 9 ml de caldo caseína-soja. Incubar todos los tubos a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 3 – 5 días. Anotar el número de tubos positivos y el número de tubos negativos.

Si la naturaleza de la muestra torna la lectura difícil, como, por ejemplo, una suspensión, efectuar subcultivo para el mismo caldo o para agar caseína-soja por 2 días en la misma temperatura.

Determinar el número más probable de microorganismos viables por gramo o mililitro del producto, de acuerdo con las informaciones descritas en la **Tabla 1**.



Tabla 1 - Valor del Número Más Probable de Microorganismos – NMP.

Número de tubos positivos			NMP por g, o ml del producto	Límite de confianza a 95%
Número de g, o ml del producto por tubo				
$10^{-1}$ (0,1)	$10^{-2}$ (0,01)	$10^{-3}$ (0,001)		
0	0	0	<3	0,0 – 9,4
0	0	1	3	0,1 – 9,5
0	1	0	3	0,1 – 10
0	1	1	6,1	1,2 – 17
0	2	0	6,2	1,2 – 17
0	3	0	9,4	3,5 – 35
1	0	0	3,6	0,2 – 17
1	0	1	7,2	1,2 – 17
1	0	2	11	04 – 35
1	1	0	7,4	1,3 – 20
1	1	1	11	04 – 35
1	2	0	11	04 – 35
1	2	1	15	05 – 38
1	3	0	16	05 – 38
2	0	0	9,2	1,5 – 35
2	0	1	14	04 – 35
2	0	2	20	05 – 38
2	1	0	15	04 – 38
2	1	1	20	05 – 38
2	1	2	27	09 – 94
2	2	0	21	05 – 40
2	2	1	28	09 – 94
2	2	2	35	09 – 94
2	3	0	29	09 – 94
2	3	1	36	09 – 94
3	0	0	23	05 – 94
3	0	1	38	09 – 104
3	0	2	64	16 – 181
3	1	0	43	09 – 181
3	1	1	75	17 – 199
3	1	2	120	30 – 360
3	1	3	160	30 – 380
3	2	0	93	18 – 360
3	2	1	150	30 – 380
3	2	2	210	30 – 400
3	2	3	290	90 – 990
3	3	0	240	40 – 990
3	3	1	460	90 – 1980
3	3	2	1100	200 – 4000
3	3	3	>1100	

### 5.5.3.1.3 Búsqueda de microorganismos patógenicos

Ese método posibilita verificar la presencia o a ausencia de microorganismos específicos en medios selectivos. Los procedimientos experimentales deben incluir etapas de pre-enriquecimiento para garantizar la recuperación de los microorganismos, si presentes en el producto.

Métodos microbiológicos alternativos, inclusive los automatizados, pueden ser utilizados desde que su equivalencia al método farmacopeico haya sido debidamente validada

### PROCEDIMIENTO

#### *Bacterias gram-negativas bilis tolerantes*

*Preparado de la muestra y pre-incubación* – Preparar la muestra usando la dilución 1:10 de no menos que 1 g o 1 ml del producto a ser probado, conforme descrito en *Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)*, usando caldo caseína-soja (Dilución A) como diluyente. Homogeneizar e incubar a  $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  por 2 horas y no más de 5 horas (tiempo necesario para reactivar la bacteria, pero no el suficiente para estimular la multiplicación del microorganismo).

**Prueba de ausencia** – Homogeneizar la Diluición A y transferir volumen correspondiente a 1 g o 1 ml del producto para el Caldo de Enriquecimiento de Enterobacterias según Mossel (*Aeromonas* y *Pseudomonas* también pueden crecer en este medio, así como otros tipos de bacterias). Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  por 24 a 48 horas. Preparar subcultivo en placas conteniendo Agar Violeta Rojo Neutro Bilis Glucosa. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas. El producto cumple la prueba si no hubiere crecimiento de colonias.

**Prueba cuantitativa (selección y subcultivo)** – Diluir cantidad apropiada de la Diluición A para el Caldo de Enriquecimiento de Enterobacterias según Mossel, para obtener diluciones conteniendo 0,1; 0,01 y 0,001 g (o 0,1; 0,01 y 0,001 ml) del producto a ser probado. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 24 a 48 horas. Para cada tubo positivo, realizar subculturas en Agar Violeta Rojo Neutro Bilis Glucosa. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

**Interpretación** – El crecimiento de colonias bien desarrolladas de bacterias Gram-negativas, generalmente rojas o rojizas, indica contaminación (resultado positivo). Anotar los resultados positivos y negativos. Determinar el número más probable de bacterias por gramo o mililitro del producto según **Tabla 1**.

**Tabla 1** – Interpretación de los resultados de la prueba cuantitativa para bacterias gram-negativas bilis tolerantes.

Resultados para cantidad de producto de			Número probable de bacterias por gramo, o mililitro del producto
0,1 g, o 0,1 ml	0,01 g, o 0,01 ml	0,001 g, o 0,001 ml	
+	+	+	Más de $10^3$
+	+	-	Menos de $10^3$ y más de $10^2$
+	-	-	Menos de $10^2$ y más de 10
-	-	-	Menos de 10

#### *Escherichia coli*

**Preparado de la muestra y pre-incubación** – Preparar la muestra usando la diluición 1:10 de no menos que 1 g del producto a ser examinado conforme descrito en **Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)**.

Utilizar 10 ml de la diluición para 90 ml de Caldo de Enriquecimiento (Caldo Caseína-soja), o cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml. Homogeneizar e incubar  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

**Selección y subcultivo** – Agitar y transferir 1 ml de la muestra enriquecida para 100 ml de Caldo MacConkey. Incubar a  $43\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  durante 24 – 48 horas. Realizar subcultivo en placa de Agar MacConkey e incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 72 horas.

**Interpretación** – El crecimiento de colonias rojas, generalmente no mucosas, con micromorfología característica de bacilo Gram-negativo, indica presencia probable de *E.coli* que debe ser confirmada por pruebas de identificación mi-

crobiana. El producto cumple la prueba se no es observado crecimiento de tales colonias o si las pruebas microbianas fueren negativas.

#### *Salmonella*

**Preparación de la muestra y pre-incubación** – Preparar la muestra usando la diluición 1:10 de no menos que 10 g, o 10 ml del producto a ser examinado, conforme descrito en **Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)**. Homogeneizar e incubar  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

**Selección y subcultivo** – Agitar y transferir 0,1 ml del contenido para 10 ml de Caldo Enriquecimiento Salmonella Rappaport Vassiliadis. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas. Realizar subcultivo en placa conteniendo Agar Xilosa Lisina Desoxicolato e incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 48 horas.

**Interpretación** – El crecimiento de colonias bien desarrolladas, rojas con o sin centro negro indica presencia probable de *Salmonella* que debe ser confirmada por pruebas de identificación microbiana. El producto cumple la prueba se no es observado crecimiento de tales colonias o si las pruebas microbianas fueren negativas.

#### *Pseudomonas aeruginosa*

**Preparación de la muestra y pre-incubación** – Preparar la muestra usando la diluición 1:10 de no menos que 1 g del producto a ser examinado, conforme descrito en **Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)**. Utilizar 10 ml de la diluición para 90 ml de Caldo de Caseína-soja o cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml. Homogeneizar e incubar  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

Cuando se pruebe el dispositivo transdérmico, filtrar 50 ml de Caldo Caseína-soja por membrana estéril y transferir la membrana para 100 ml de Caldo Caseína-soja. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

**Selección y subcultivo** – Agitar y transferir una ansa para placa conteniendo Agar Cetrímida. Incubar a  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 – 72 horas. El crecimiento de colonias indica presencia probable de *Pseudomonas aeruginosa* que debe ser confirmada por pruebas de identificación microbiana. El producto cumple la prueba se no es observado crecimiento de tales colonias o si las pruebas de identificación fueren negativas.

#### *Staphylococcus aureus*

**Preparación de la muestra y pre-incubación** – Preparar la muestra usando la diluición 1:10 de no menos que 1 g del producto a ser examinada conforme descrito en **Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)**. Utilizar 10 ml de la diluición para 90 ml de Caldo de Enriquecimiento (Caldo Caseína-soja) o cantidad correspondiente a 1 g o 1 ml. Homogeneizar e incubar  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  durante 18 a 24 horas.

Cuando se pruebe el dispositivo transdérmico, filtrar 50 ml de Caldo de Enriquecimiento por membrana estéril y transferir la membrana para 100 ml de Caldo Caseína-soja. Incubar a  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas.

*Selección y subcultivo* – Agitar y transferir una ansa para placa conteniendo Agar Manitol Salado. Incubar a  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 – 72 horas.

*Interpretación* – El crecimiento de colonias amarillas o blancas rodeada por una zona amarilla indica presencia probable de *S. aureus* que debe ser confirmada por pruebas de identificación microbiana.

El producto cumple la prueba se no es observado crecimiento de tales colonias o si las pruebas de identificación fueron negativas.

#### *Clostridium*

*Preparación de la muestra y pre-incubación* – Preparar la muestra conforme descrito en *Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)*. Utilizar dos fracciones iguales correspondientes a no menos que 1 g o ml del producto a ser examinado. Calentar una de las porciones a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos y enfriar inmediatamente. Inocular 10 ml de cada fracción homogeneizada en 2 frascos conteniendo 100 ml de medio Caldo Reforzado para Clostridium. Incubar en anaerobiosis a  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

*Selección y subcultivo* – Transferir una ansa de cada frasco para placa conteniendo Agar Columbia. Incubar en anaerobiosis a  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

*Interpretación* – El crecimiento de colonias catalasa- negativas, con micromorfología de bacilo Gram-positivo (con o sin endosporas) indica presencia probable de Clostridium. El producto cumple la prueba se no es observado crecimiento de microorganismo anaerobio o si la prueba de catalasa es negativa.

#### *Candida albicans*

*Preparación de la muestra y pre-incubación* – Preparar la muestra usando la diluición 1:10 de no menos que 1 g, o ml del producto a ser examinado conforme descrito en *Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)*. Utilizar 10 ml de la diluición para 90 ml de Caldo Sabouraud Dextrosa. Incubar  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 a 5 días.

*Selección y subcultivo* – Transferir una ansa para placa conteniendo Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Nickerson. Incubar a  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 – 48 horas.

*Interpretación* – El crecimiento de colonias blancas en Agar Sabouraud o colonias marrón/negra en Agar Nickerson indica presencia probable de *C. albicans* que debe ser confirmada por pruebas de identificación microbiana.

El producto cumple la prueba se no es observado el crecimiento de las colonias.

#### 5.5.3.1.4 Adecuación de los métodos farmacopeicos

Para adecuación de los métodos farmacopeicos a los productos no estériles debe ser demostrada la eliminación de cualquier propiedad antimicrobiana antes de la verificación de la existencia de contaminación microbiana en los productos.

El protocolo de la prueba de adecuación debe mimetizar la prueba de límite microbiano – preparación de la muestra, tipo de medio de cultivo y soluciones tampón, número y tipo de la solución de lavados de las membranas así como las condiciones de incubación. Ese protocolo requiere el uso de microorganismos para la prueba de recuperación microbiana.

Durante la adecuación, demostrar que la elección del método para estimativa cualitativa y/o cuantitativa de los microorganismos viables es sensible, exacta y confiable y que es capaz eliminar cualquier interferencia o inhibición durante la recuperación de los microorganismos viables.

Revalidar el método de adecuación si fuesen modificadas las condiciones de ensayo y/u ocurriesen alteraciones en el producto que puedan afectarlo.

Con la finalidad de indicación, fueron listados los microorganismos disponibles en la ATCC. Los mismos microorganismos pueden, también, ser obtenidos de otras fuentes: INCQS, CIP, NBRC, NCIMB, NCPF, NCTC, NCYC, IMI y IP. La correspondencia entre los microorganismos y las direcciones de las entidades que los proveen se encuentra indicada en *Microorganismos empleados en pruebas y ensayos (5.5.3.5)*.

#### CONTEO DEL NÚMERO TOTAL DE MICRORGANISMOS MESÓFILOS

##### *Mantenimiento y preparación de los microorganismos prueba*

Los cultivos liofilizados deben ser rehidratados de acuerdo con las instrucciones de proveedores y mantenidos por transferencias para medios de cultivo recién preparados o por proceso de congelamiento o de refrigeración por período de almacenamiento que mantenga las características originales de la cultivo.

Usar suspensiones estandarizadas de los microorganismos conforme establecido a continuación. Utilizar técnica de mantenimiento de forma que el inóculo no rebase 5 pasajes del cultivo original. Realizar subculturas de cada microorganismo (bacteria y hongo) separadamente como descrito en la **Tabla 1**.

Tabla 1 - Preparación y uso de los microorganismos.

Microorganismo	Medios de cultivo para mantenimiento	Medios de cultivo para enriquecimiento		Medios de cultivo para adecuación del método de conteo en la presencia del producto	
		Conteo total de bacterias aeróbicas	Conteo total de mohos y levaduras	Conteo Total de bacterias aeróbicas	Conteo total de mohos y levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	Agar Caseína-soja o Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Agar Caseína-soja y Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-	Agar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Agar Caseína-soja o Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Agar Caseína-soja y Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-	Agar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	Agar Caseína-soja o Caldo de Caseína-soja 32,5 °C ± 2,5 °C, 18-24 horas	Agar Caseína-soja y Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-	Agar Caseína-soja /MNP Caldo de Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 3 días	-
<i>Cándida albicans</i> (ATCC 10231)	Agar Sabouraud-dextrosa o Caldo Sabouraud  22,5 °C ± 2,5 °C 2-3 días	Agar Caseína-Soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días	Agar Sabouraud-dextrosa  ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días	Agar Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días  NMP: no se aplica	Agar Sabouraud-dextrosa  ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Agar Sabouraud-dextrosa o Agar Papa-dextrosa  22,5 °C ± 2,5 °C 5-7 días, o hasta esporulación evidente	Agar Caseína-Soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días	Agar Sabouraud-dextrosa  ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días	Agar Caseína-soja  ≤ 100 UFC 32,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días  NMP: no se aplica	Agar Sabouraud-dextrosa  ≤ 100 UFC 22,5 °C ± 2,5 °C, ≤ 5 días

Usar solución tampón cloruro de sodio-peptona pH – 7,0 o solución tampón fosfato pH 7,2 para preparar las suspensiones. Al preparar la suspensión de esporas de *A. brasiliensis*, añadir a la solución tampón 0,05% de polisorbato 80. Usar las suspensiones dentro de 2 horas o dentro de 24 horas si mantenidas a la temperatura de 2- 8 °C. Tiempos mayores podrán ser utilizados desde que validados.

### Capacidad nutritiva de los medios de cultivo

Para los medios indicados en la **Tabla 3**, inocular una pequeña cantidad de microorganismo, inferior a 100 UFC. Usar una placa o tubo para cada microorganismo.

Probar cada lote de medio de cultivo cuanto a su capacidad nutritiva conforme descrito a continuación:

- Medio de cultivo líquido: inocular menos que 100 UFC del microorganismo prueba en el medio de cultivo indicado. Incubar a temperatura adecuada y observar el crecimiento visible comparando con un control (blanco) del mismo medio de cultivo.
- Medio de cultivo sólido: inocular cada placa conteniendo el medio de cultivo indicado con menos que 100 UFC del microorganismo prueba. Incubar a temperatura adecuada y comparar el crecimiento obtenido que no debe ser inferior a 50% en relación al inóculo estandarizado.

Control negativo – Para verificar la esterilidad de los medios de cultivo, colocarlos en incubación por, como mínimo, 72 horas, en la temperatura adecuada. No debe haber crecimiento de microorganismos.

### Inoculación de los microorganismos prueba en la muestra

Añadir a la muestra diluida y al control (diluyente sin muestra) conforme descrito en *Preparación de la muestra*, en *Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2)*, cantidad suficiente del microorganismo para obtener una concentración de no más que 100 UFC/ml. El volumen de la suspensión del inóculo no debe exceder 1% del volumen del producto diluido.

Debe ser demostrada la capacidad del medio de cultivo para detectar microorganismos en la presencia y en la ausencia de la muestra.

Para demostrar la recuperación del microorganismo en el producto, usar el menor factor de dilución posible. Si la recuperación no es adecuada debe ser realizado un método alternativo como neutralización, dilución o filtración.

#### a) Neutralización/eliminación de la actividad antimicrobiana

El número de microorganismos recuperados en la muestra diluida es comparable con el número de microorganismos en el control.

Si el crecimiento fuese inhibido (reducción menor que 50%), se debe hacer modificaciones en el procedimiento de conteo para asegurar la validez de los resultados. Las modificaciones incluyen las relacionadas a continuación.

- Aumentar el volumen del diluyente o medio de cultivo, manteniendo constante la cantidad del producto.
- Incorporar un agente neutralizante específico o agente neutralizante universal.
- Asociar ambos procedimientos arriba.
- Realizar filtración por membrana.

Si las modificaciones en el método de neutralización fuesen ineficaces, es posible atribuir que la falla sea debido a la actividad antimicrobiana del producto, que no permite el desarrollo del microorganismo control probado.

#### b) Agentes neutralizantes

Agentes neutralizantes para inhibición de la actividad antimicrobiana deben ser añadidos al diluyente escogido o al medio de cultivo preferencialmente antes de la esterilización (**Tabla 2**). Demostrar su eficacia y ausencia de toxicidad a los microorganismos prueba utilizando diluyente con neutralizante y producto y realizando un blanco con diluyente y neutralizante, respectivamente.



Tabla 2 - Agentes conservantes y neutralizantes

Conservantes	Agente neutralizante/método de neutralización
Alcohol	Diluición
Aldehídos	Diluición, Tiosulfato, Glicina
Bis-biguanidas	Lecitina
Cloruro de mercurio y otros compuestos mercuriales	Tioglicolato*; Tiosulfato de sodio
Clorhexamida	Polisorbato y Lecitina
Compuestos amonio cuaternarios	Lecitina, Polisorbato 80
Compuestos Fenólicos	Diluición y Polisorbato 80
EDTA	Iones de Mg <sup>++</sup> y Ca <sup>++</sup>
Glutaraldehído	Glicina y Bisulfito de sodio
Halógenos	Tiosulfato
Hipoclorito de sodio	Tiosulfato de sodio
Ácidos orgánicos y sus ésteres	Diluición y Polisorbato 80
Parabenos	Polisorbato 80 y Lecitina
Sorbato	Diluición
Antibiótico beta-lactámico	Beta-lactamasa
Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferasa
Sulfonamida	Ácido p-aminobenzoico
Trimetoprima	Timidina

\* Tioglicolato puede ser tóxico para ciertos microorganismos, especialmente esporas y estafilococos; tiosulfato puede ser tóxico para estafilococos.

Utilizar Caldo Neutralizante Day-Engley o Neutralizante Universal.

Si la neutralización no fuese adecuada, puede admitirse que la falla en recuperar el microorganismo inoculado sea atribuida a la actividad antimicrobiana del producto. Esta información sirve para indicar que el producto no es susceptible a la contaminación por los microorganismos probados, sin embargo no puede inhibir otros no incluidos en la lista, los cuales no son representativos y podrán ser empleados en la sustitución de aquellos preconizados.

5

#### Recuperación de los microorganismos en el producto

Realizar las pruebas separadamente para cada microorganismo prueba listada en la Tabla 3. Utilizar la muestra conforme preparada en *Inoculación de los microorganismos prueba en la muestra*.

##### a) Filtración por membrana

Usar membrana filtrante con 0,45 µm de diámetro de porosidad y eficacia comprobada de retención. Las membranas de nitrato de celulosa, por ejemplo, pueden ser utilizadas para soluciones acuosas, oleosas o levemente alcohólicas y las de acetato de celulosa para soluciones fuertemente alcohólicas. Para cada microorganismo prueba, utilice una membrana.

De la muestra preparada, conforme descrito en *Inoculación de los microorganismos prueba en la muestra*, transferir 10 ml para equipo de filtración por membrana y filtrar inmediatamente. Lavar la membrana con volumen apropiado de líquido de lavado.

Para determinación del conteo de microorganismo aeróbico y conteo de mohos y levaduras, transferir las membranas para agar Caseína-soja y Agar Sabouraud-dextrosa, respectivamente. Incubar en las condiciones descritas en la **Tabla 3** y realizar el conteo de las colonias.

##### b) Conteo en placa

Método de profundidad – Utilizar placas con 9 cm de diámetro. Añadir 1 ml de la muestra preparada como descrito en *Inoculación de los microorganismos prueba en la mues-*

tra y añadir 15 – 20 ml de agar Caseína-soja o agar Sabouraud-dextrosa mantenidos a 45 – 50 °C. Para cada microorganismo probado, utilizar dos placas para cada medio y cada diluición. Incubar en las condiciones descritas en la **Tabla 1**. Tomar la media aritmética de las placas con cada medio de cultivo y calcular el número de UFC.

Método de superficie – Para cada placa de Petri de 9 cm, añadir 15 – 20 ml de agar caseína soja o agar Sabouraud-dextrosa y dejar solidificar. Secar las placas. Añadir a la superficie del medio de cultivo 0,1 ml de la muestra preparada como descrito en *inoculación del microorganismo en la muestra*. Para cada microorganismo probado utilizar dos placas. Realizar el conteo y calcular el número de UFC.

##### c) Método del Número Más Probable

A partir de la muestra preparada conforme descrito en *Inoculación de los microorganismos prueba en la muestra* (1:10), preparar diluciones 1:100 y 1:1000. Transferir 1 ml de cada diluición para 3 tubos conteniendo cada uno 9 ml de caldo Caseína-soja. Si necesario añadir agente inactivante.

Incubar todos los tubos a 32,5 °C ± 2,5 °C no más que 5 días. Anotar el número de tubos positivos. Si la naturaleza de la muestra torna la lectura difícil, efectuar subcultivo para otros tubos conteniendo el mismo medio de cultivo o para agar Caseína-soja por 2 días en la misma temperatura. Determinar el número más probable de microorganismo por gramo o mililitro del producto de acuerdo con informaciones en la **Tabla 3**.

### Resultados e interpretación

Cuando se utiliza el método de filtración por membrana y los métodos de conteo en placas, el número de colonias obtenido no debe ser menor que 50% (factor 2) del inóculo inicial para cada microorganismo en la ausencia del producto y, el número de colonias obtenido en el diluyente no debe ser menor que 50% (factor 2) del inóculo estándar.

Cuando se utiliza el método de NMP el valor calculado está comprendido en el intervalo de confianza de 95% de los resultados obtenidos.

### INVESTIGACIÓN DE MICROORGANISMOS PATOGENICOS

#### Condiciones generales

Neutralizar convenientemente la muestra si esta posee actividad antimicrobiana. Se es utilizado agente tensoactivo, para la preparación de la muestra, demostrar ausencia de toxicidad para los microorganismos y su compatibilidad con el agente inactivante, como descrito en *Neutralización/eliminación de la actividad antimicrobiana* del ítem *Conteo del número total de microorganismos mesófilos* de este método general.

Microorganismos aislados del ambiente u otras especies pueden ser incluidos en las pruebas de desafíos, especialmente, se ellos representan contaminantes que puedan ser introducidos durante la fabricación o durante el uso del producto.

#### Mantenimiento y preparación de los microorganismos prueba

Los cultivos liofilizados deben ser rehidratados de acuerdo con las instrucciones de proveedores y mantenidos por transferencias para medios frescos o por proceso de congelamiento o refrigeración por períodos de almacenamiento debidamente calificados.

Usar suspensiones estandarizadas de las cepas pruebas conforme establecido abajo. Utilizar técnica de mantenimiento de forma que el inóculo no rebase 5 pasajes del cultivo original. Cultivar cada microorganismo (bacteria y hongo) separadamente.

Usar solución tampón cloruro de sodio-peptona pH – 7,0 o solución tampón fosfato pH 7,2 para preparar las suspensiones de los microorganismos. Al preparar la suspensión de esporas de *A. brasiliensis*, añadir a la solución tampón 0,05% de polisorbato 80. Usar las suspensiones dentro de 2 horas o dentro de 24 horas si mantenidas a temperatura de 2 – 8 °C.

### Microorganismos

#### a) Microorganismos aeróbicos:

- *Staphylococcus aureus* – ATCC 6538 P
- *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 9027
- *Escherichia coli* – ATCC 8739
- *Salmonella enterica* ssp serotipo typhimurium – ATCC 14028
- *Candida albicans* – ATCC 10231

Realizar subcultivos separadamente en tubos conteniendo medio de cultivo Caldo Caseína-soja o Agar Caseína Soja a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 18 a 24 horas. Cultivar *Candida albicans* en Agar Sabouraud-dextrosa a 22,5 °C ± 2,5 °C durante 2 – 3 días. Utilice solución tampón cloruro de sodio-peptona pH 7,0 o solución tampón fosfato pH7,2 para preparar las suspensiones. Usarlas dentro de 2 horas o dentro de 24 horas si almacenadas a 2 – 8 °C.

#### b) Microorganismo anaeróbico

- *Clostridium sporogenes* – ATCC 11437

Cultivar la cepa *Clostridium sporogenes* bajo condiciones anaeróbicas en *Medio Reforzado para Clostridium* a 32,5 °C ± 2,5 °C durante 24 – 48 horas. Como método alternativo, realizar diluciones de una suspensión de células vegetativas de *Clostridium sporogenes*. Esta suspensión de esporas puede ser utilizada como inóculo se mantenida a 2 – 8 °C por un período adecuado.

#### Capacidad nutritiva y selectiva de los medios de cultivo

Para los medios de cultivo indicados en la **Tabla 3**, inocular una pequeña cantidad de microorganismo prueba (no más que 100 UFC). Usar una placa de Petri o tubo para cada microorganismo.

Probar cada lote de medio de cultivo utilizado en los ensayos cuanto a su capacidad nutritiva o selectiva conforme descrito a continuación.

Medio de cultivo líquido – Inocular menos que 100 UFC del microorganismo prueba en el medio de cultivo indicado. Incubar a temperatura adecuada y observar el crecimiento visible comparando con un control (blanco) del mismo medio de cultivo.

Medio de cultivo sólido – Inocular cada placa conteniendo el medio de cultivo indicado con menos que 100 UFC del microorganismo prueba. Incubar a temperatura. El crecimiento obtenido debe poseer las características estándares del microorganismo en el medio utilizado.

#### Control negativo

Para verificar las condiciones del ensayo, realizar prueba de esterilidad de los medios de cultivos. No debe haber crecimiento de microorganismos.

**Tabla 3 - Promoción del crecimiento, propiedades inhibitorias e indicativas del medio de cultivo**

<i>Medio de cultivo</i>	<i>Propiedad</i>	<i>Microorganismo prueba</i>
<b>Bacteria Gram-negativa bilis tolerante</b>		
Caldo de Enriquecimiento de Enterobacterias según Mossel	Promoción de crecimiento Inhibitorio	<i>Escherichia coli</i>
Agar Bilis, Violeta, Rojo y Glucosa	Inhibitorio Crecimiento presuntivo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i>
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
Caldo MacConkey	Promoción de crecimiento Inhibitoria	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>
Agar MacConkey	Crecimiento presuntivo	<i>E. coli</i>
<b><i>Salmonela</i></b>		
Caldo Enriquecimiento Salmonela, según Rappaport Vassiliadis	Promoción de crecimiento	Salmonela enterica ssp serotipo typhimurium
Agar Xilosa Lisina Desoxicolato	Inhibitorio Crecimiento presuntivo	o <i>S. entérica</i> ssp serotipo abony <i>S. aureus</i> <i>S. enterica</i> ssp serotipo typhimurium
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>		
Agar Cetrimida	Crecimiento presuntivo Inhibitorio	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>		
Agar Manitol Salado	Crecimiento presuntivo Inhibitorio	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>
<b><i>Clostridium</i></b>		
Medio Reforzado para Clostridium	Promoción de crecimiento	<i>Clostridium sporogenes</i>
Agar Columbia	Promoción de crecimiento	<i>C. sporogenes</i>
<b><i>Candida albicans</i></b>		
Caldo Sabouraud	Promoción de crecimiento	<i>Candida albicans</i>
Agar Sabouraud-dextrosa	Crecimiento presuntivo	<i>C. albicans</i>
Agar Nickerson	Crecimiento presuntivo	<i>C. albicans</i>

#### Recuperación de los microorganismos en el producto

Para cada producto a ser analizado realice la prueba conforme descrito en *Procedimiento*, en *Método general para investigación de microorganismos patogénicos (5.5.3.1.3)*.

Al homogeneizar, añadir cada cepa descrita en la promoción de crecimiento. Inocular los microorganismos individualmente en inóculos conteniendo no más que 100 UFC. La realización de la prueba debe ocurrir en el menor período de tiempo.

Los microorganismos deben ser detectados por las reacciones indicadas en los párrafos correspondientes, descritos en *Procedimiento*, en *Método general para investigación de microorganismos patogénicos (5.5.3.1.3)*.

Si el producto posee actividad antimicrobiana y es necesario modificar la metodología, proceda como en *Neutra-*

*lización/eliminación de actividad antimicrobiana* de este capítulo utilizando Caldo de Caseína-soja como diluyente

#### 5.5.3.1.5 Límites microbianos

La contaminación microbiana de un producto no estéril (especialidad y materia prima farmacéutica) puede conducir no solamente a su deterioro, con los cambios físicos y químicas asociadas, pero también, al riesgo de infección para el usuario. Consecuentemente, los productos farmacéuticos orales y tópicos (cápsulas, comprimidos, suspensiones, cremas, etc.), que no son estériles, deben ser sometidos a los controles de la contaminación microbiana.

La garantía de calidad y los controles de producción deben ser tales que los microorganismos capaces de proliferar y contaminar el producto, estén dentro de los límites. Los límites microbianos deben ser adecuados a las varias categorías de productos que reflejen el tipo de contaminación más probable introducida durante la fabricación, así como

la vía de administración, el consumidor final (neonatos, niños, ancianos, debilitados), el uso de agentes inmunosupresores, corticosteroides y otros factores. Al evaluar los resultados de las pruebas microbiológicas, el número y los tipos de microorganismos presentes deben ser considerados en el contexto del uso del producto propuesto.

La prueba microbiológica de productos no estériles y de materia prima para uso farmacéutico es realizada según

la metodología descrita en *Ensayos microbiológicos para productos no estériles (5.5.3.1)*.

Los límites de aceptación están descritos en la **Tabla 1** y son interpretados del siguiente modo:

- 101 UFC: valor máximo aceptable = 20
- 102 UFC: valor máximo aceptable = 200
- 103 UFC: valor máximo aceptable = 2000 y, así sucesivamente

Tabla 4 - Tabla 1 - Límites microbianos para productos no estériles.

Vía de administración*	Conteo total de bacterias aerobias UFC/g o ml	Conteo total de Hongos/levaduras UFC/g o ml	Investigación de Patógenos
<b>Productos sintéticos y biológicos<sup>a</sup></b>			
Preparación acuosa para uso oral	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g, o ml
Preparación no acuosa para uso oral	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> en 1 g, o ml
Preparación para uso rectal	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	-
Preparación uso tópico (oromucosal, nasal, gingival, cutáneo, auricular)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 1 g, o ml
Inhalatorios	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y Bacteria Gram negativa bilis tolerante b en 1 g, o ml
Preparación vaginal	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Candida albicans</i> en 1 g, o ml
Dispositivo Transdérmico (límite por unidad)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa/dispositivo</i>
<b>Productos de origen vegetal, mineral y/o animal<sup>a</sup></b>			
Preparación para uso oral conteniendo materia prima de origen natural	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g, o ml. Ausencia de <i>Salmonela</i> en 10 g, o 10 ml. Límite máximo de 102 bacterias Gram negativa bilis tolerante b en 1 g, o ml.
Drogas vegetales que serán sometidas a procesos extractivos en caliente	10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>	Límite máximo de 102 <i>Escherichia coli</i> en 1 g. Límite máximo de 104 bacterias Gram negativa bilis tolerante b en 1 g, o ml. Ausencia de <i>Salmonela</i> en 10 g
Drogas vegetales que serán sometidas a procesos extractivos en frío	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	Límite máximo de 101 <i>Escherichia coli</i> en 1 g. Límite máximo de 103 bacterias Gram negativa bilis tolerante b en 1 g, o ml. Ausencia de <i>Salmonela</i> en 10 g
Extracto seco	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	Ausencia de <i>Salmonela</i> spp y <i>Escherichia coli</i> en 10 g
Tintura, Extracto fluido	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	-
<b>Sustancias para uso farmacéutico</b>			
Materia prima, base galénica	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en 1 g, o ml. Ausencia de <i>Salmonela</i> spp en 10 g, o 10ml

(a) para productos que se enquadren em mais de uma situação prevalecerão os limites mais restritivos

(b) outras enterobactérias



Con base en datos históricos de las pruebas de monitoreo microbiológico, de la baja carga microbiana de la materia prima, de los ingredientes acuosos, del proceso de fabricación, de la formulación, la frecuencia de la prueba para la determinación del límite microbiano puede ser alterada para las formas farmacéuticas si presentan actividad de agua ( $A_w$ ) inferior a 0,75 medida a 25 °C. Para los relacionados, considerar como límite microbiano aquellos expresados de acuerdo con la vía de aplicación.

### 5.5.3.2 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS PARA PRODUCTOS ESTÉRILES

#### 5.5.3.2.1 Prueba de esterilidad

Las pruebas de esterilidad se aplican a insumos farmacéuticos, medicamentos y productos para salud que, de acuerdo con la Farmacopea, deben ser estériles, siendo adecuados para revelar la presencia de bacterias y hongos. Sin embargo, un resultado satisfactorio indica que no fue encontrado microorganismo contaminante solamente en la muestra examinada.

La extensión de ese resultado a lo restante del lote requiere la seguridad de que todas las unidades del mismo lote hayan sido preparadas para garantizar gran probabilidad de que todo el lote pasaría por la prueba. Obviamente, eso depende de las precauciones tomadas durante los procesos operacionales de fabricación, de acuerdo con las Buenas Prácticas de Fabricación.

#### PRECAUCIONES DURANTE LA PRUEBA

Para la realización de la prueba de esterilidad es importante que las personas sean adecuadamente entrenadas y calificadas.

Las pruebas deben ser realizadas bajo condiciones asépticas, utilizando, por ejemplo, campana de flujo laminar clase II tipo A (máximo 3520 partículas  $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ ), que debe estar instalada en sala limpia clase B – ISO 7 (máximo 352 000 partículas  $\geq 0,5 \mu\text{m}/\text{m}^3$ ). Para pruebas de esterilidad de fármacos oncogénicos, mutagénicos, antibióticos, hormonas, esteroides y otros, las pruebas deben ser realizadas en la campana clase II tipo B2, que posee sistema de extracción externa al ambiente del laboratorio.

No deben ser realizadas pruebas bajo exposición directa de luz ultravioleta o en áreas bajo tratamiento con aerosoles. Las condiciones deben ser adecuadas para evitar contaminación accidental de la muestra durante la prueba y, también, no afectar la detección de posibles contaminantes. Controles ambientales de las áreas de trabajo deben ser realizados regularmente (control del aire y de superficies, conteos de partículas, determinación de velocidad y dirección del flujo de aire, entre otros).

#### MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados para pruebas de esterilidad son el *Medio fluido de tioglicolato* y el *Caldo de caseína-soja*. El primero es utilizado primariamente para

cultivo de bacterias anaeróbicas, a pesar de que, también, pueda detectar el crecimiento de bacterias aeróbicas. El segundo es adecuado para el cultivo de levaduras, hongos y bacterias aeróbicas. Los medios utilizados deben cumplir con los requisitos de las *Pruebas de promoción de crecimiento de los medios de cultivo*. Preparar los medios de cultivo conforme descrito a continuación. Formulaciones deshidratadas, también, pueden ser utilizadas, debiéndose demostrar que, después de reconstitución conforme indicaciones del fabricante, los requisitos de las *Pruebas de promoción de crecimiento de los medios de cultivo* sean cumplidos. Los medios de cultivo deben ser esterilizados por proceso validado.

#### Medio fluido de tioglicolato

L-Cistina	0,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Dextrosa	5,5 g
Agar granulado (humedad no superior a 15%)	0,75 g
Extracto de levadura (soluble en agua)	5,0 g
Caseína obtenida por digestión pancreática	15,0 g
Tioglicolato de sodio (o ácido tioglicólico)	0,5 g (0,3 ml)
Resazurina sódica a 0,1% (p/v) recientemente preparada	1,0 ml
Agua purificada	1000 ml
pH del medio después de esterilización	7,1 $\pm$ 0,2

Mezclar la L-cistina, cloruro de sodio, dextrosa, extracto de levadura y caseína de digestión pancreática con 1000 ml de agua purificada y calentar hasta disolución total. Disolver el tioglicolato de sodio o ácido tioglicólico en esa solución y ajustar el pH con hidróxido de sodio M de modo que, después de la esterilización, el pH de la solución sea de 7,1  $\pm$  0,2. Si hubiere necesidad de filtración, calentar la solución nuevamente, sin dejar alcanzar la ebullición y filtrar, todavía caliente, en papel de filtro. Añadir la solución de resazurina sódica, mezclar y distribuir en frascos adecuados. El medio debe presentar una coloración rosa en su superficie que no exceda un tercio de la altura de su masa líquida. En el caso de se obtenga un medio con coloración rosa en más de un tercio de su masa líquida, restaurar el medio por un único calentamiento en baño maría o en vapor fluyente.

Esterilizar utilizando proceso validado. Si no fuese a utilizar inmediatamente, estocar en temperatura entre 2 °C y 25 °C conforme orientación del fabricante. No utilizar el medio por un periodo de almacenamiento superior a aquel para el cual él fue validado.

El *Medio líquido de tioglicolato* debe ser incubado a 32,5 °C  $\pm$  2,5 °C bajo condiciones aeróbicas.

#### *Medio alternativo del fluido tioglicolato*

Proceder conforme descrito para Mediofluido de tioglicolato sin la adición del agar y de la resazurina sódica. El pH después de esterilización es 7,1  $\pm$  0,2.

El Medio alternativo del fluido tioglicolato debe ser incubado a 32,5 °C  $\pm$  2,5 °C bajo condiciones anaeróbicas.

*Caldo de caseína soja*

Caseína de digestión pancreática	17,0 g
Harina de soja de digestión papaínica	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato de potasio dibásico	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Agua purificada	1000 ml
pH del medio después de esterilización	7,3 ± 0,2

Disolver todos los componentes en agua purificada, calentando suavemente. Enfriar a temperatura ambiente y ajustar el pH con hidróxido de sodio *M* de modo que, después de la esterilización, el pH de la solución sea de 7,3 ± 0,2. Si necesario, filtrar para clarificación del medio. Distribuir en frascos adecuados y esterilizar utilizando proceso validado. Se no fuese utilizar inmediatamente, estocar en temperatura entre 22,5 °C ± 2,5 °C, conforme orientación del fabricante. No utilizar el medio por un período de almacenamiento superior a aquel para el cual él fue validado.

El Caldo de caseína soja debe ser incubado a 22,5 °C + 2,5 °C bajo condiciones aeróbicas.

*Medios para penicilinas y cefalosporinas*

En los casos en que los medios de cultivo sean utilizados para la prueba de esterilidad de penicilinas y cefalosporinas por el método de Inoculación directa, la preparación del *Medio fluido de tioglicolato* y del Caldo de caseína soja debe ser modificada conforme descrito a continuación. Transferir, asépticamente, para los frascos esterilizados conteniendo cada medio, cantidad de β-lactamasa suficiente para inactivar el antibiótico presente en la muestra. Número representativo de frascos conteniendo medio con β-lactamasa sin muestra deben ser incubados durante el período de la prueba (control negativo). Controles positivos, también, deben ser incluidos para verificar si toda penicilina o cefalosporina fue inactivada. Proceder a la prueba de validación para bacteriostasis y fungistasis, utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 / INCQS 00039) como microorganismo prueba. La observación de crecimiento microbiano típico constituye confirmación de que la concentración de β-lactamasa utilizada es apropiada.

## ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Usualmente, son necesarios ajustes para obtener densidad específica de células microbianas viables (no más que 100 UFC) en el medio de cultivo. Para establecer un volumen que contenga la densidad recomendada de células, diluciones en serie deben ser realizadas a partir de una suspensión stock, procediéndose a conteo en placas para determinar la densidad microbiana obtenida con cada dilución.

Si el procedimiento está bien estandarizado, es posible reproducir los resultados con la misma cepa microbiana.

Es recomendable la utilización de subcultivos de microorganismos hasta como máximo 5 transferencias, a partir del cultivo original.

**Nota:** los medios de cultivo utilizados en la estandarización del inóculo son aquellos descritos en el capítulo Conteo del número total de microorganismos mesófilos (5.5.3.1.2) para cada microorganismo.

*Procedimiento*

Usando ansa de cultivo, transferir el crecimiento del microorganismo específico para tubo de ensayo conteniendo agar inclinado indicado para su crecimiento. Sembrar el cultivo sobre la superficie del agar inclinado, para obtener película uniforme de crecimiento. Incubar en las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo prueba.

Como sugerencia de diluciones para el inóculo, después del período de incubación lavar el crecimiento del microorganismo con 1 ml de solución estéril de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) o agua peptonada 0,1% (p/v) estéril y transferir para frasco conteniendo 99 ml de solución estéril de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) o agua peptonada 0,1% (p/v) estéril – (suspensión stock). Homogeneizar la suspensión manualmente o en agitador de tubos del tipo vórtex.

Preparar diluciones en serie (1:100, 1:10000 y 1:1000000) a partir de la suspensión stock utilizando solución estéril de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) o agua peptonada 0,1% (p/v) estéril como diluyente. Incorporar 1 ml de cada dilución en medio sólido adecuado para el microorganismo, previamente fundido y enfriado a aproximadamente 45 °C. Homogeneizar e incubar.

Proceder al conteo del número de colonias que se desarrollaron en el medio sólido y escoger, a partir de los resultados, la dilución a ser utilizada para obtenerse, como máximo, 100 UFC por frasco de medio de cultivo.

Repetir el procedimiento para cada microorganismo utilizado.

Para el preparado de suspensión fúngica, la solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) estéril puede ser sustituida por agua purificada estéril.

## PRUEBAS DE ADECUACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo utilizados deben cumplir con las pruebas descritas a continuación, realizadas antes de la prueba de esterilidad de la muestra.

*Esterilidad*

Confirmar la esterilidad de cada lote de medio esterilizado incubando todos los frascos de los medios en las condiciones especificadas por 14 días. No debe ocurrir crecimiento microbiano.

La ocurrencia de crecimiento microbiano inutiliza el lote de medio para la prueba de esterilidad.

*Promoción de crecimiento*

Cada lote de medio de cultivo esterilizado debe ser probado cuanto a su capacidad en promover el crecimiento de microorganismos. Inocular, separadamente, en duplicado, tubos de cada medio con volumen de inóculo conteniendo no más que 100 UFC de cada cepa microbiana listada en la

**Tabla 1** e incubar conforme las condiciones especificadas para cada medio. La prueba de promoción de crecimiento es considerada válida si hubiere evidencia de crecimiento microbiano, visualizado por la turbación y/o por métodos microscópicos, después de 3 días de incubación de los medios inoculados con bacterias y después de 5 días de incubación de los medios inoculados con hongos.

**Tabla 1 - Microorganismos indicados para utilización en pruebas de promoción de crecimiento y de validación.**

<i>Medio</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Cepa</i>
Medio fluido de tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCTC 10788, NCIMB 9518, CIP 4.83, NBRC 13276, INCQS 00039
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275, INCQS 00230
	<i>Clostridium sporogenes</i> *	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3, INCQS 00352 o ATCC 11437, NCIMB 14239, CIP 100651, NBRC 14293
Alternativo del tioglicolato	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, NCTC 532, CIP 79.3, INCQS 00352 o ATCC 11437, NCIMB 14239, CIP 100651, NBRC 14293
Caldo de caseína-soja	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, NBRC 3134, INCQS 00001
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, NBRC 1594, INCQS 40006
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, NBRC 9455, INCQS 40036

*Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482, NCTC 11154, INCQS 00059) puede ser utilizado alternativamente a *Clostridium sporogenes*, cuando no sea necesario el uso de un microorganismo esporulado.

Una alternativa a *Staphylococcus aureus* es el *Bacillus subtilis* (INCQS 00001, ATCC 6633, CIP 52.62, NBRC 3134, NCIMB 8054, NCTC 10400).

Un microorganismo alternativo para *Pseudomonas aeruginosa* es la *Kocuria rhizophila* (INCQS 00010, ATCC 9341, CIP 53.65, NCTC 8340).

#### ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS

Si los medios preparados fueren estocados en frascos no herméticamente cerrados, podrán ser utilizados por 1 mes, siempre que sean probados para promoción de crecimiento dentro de 15 días a partir del tiempo de uso y que cumplan el requisito para el indicador de color.

Si los medios fueren estocados en frascos herméticamente cerrados, podrán ser usados por 1 año, siempre que sean probados para promoción de crecimiento dentro de 3 meses a partir del tiempo de uso y que cumplan el requisito para el indicador de color.

#### FLUIDOS DE DILUICIÓN Y LAVADO

##### *Fluido I*

Peptona de Carne	1,0 g
Agua purificada	1000 ml
pH después de esterilización	7,1 ± 0,2

Disolver la peptona de carne en agua purificada, filtrar o centrifugar para clarificación del medio, si necesario y ajustar el pH en 7,1 ± 0,2. Distribuir en frascos adecuados y esterilizar utilizando proceso validado.

*Preparación para penicilinas o cefalosporinas.* Para la realización del ensayo de esterilidad de penicilinas o cefalosporinas por el método de filtración en membrana, añadir, asépticamente, al Fluido I esterilizado, cantidad de β-lactamasa suficiente para inactivar cualquier actividad antibiótica residual en la membrana después de la filtración de la muestra.

##### *Fluido II*

Para cada litro de *Fluido I*, añadir 1 ml de polisorbato 80 antes de la esterilización. Ajustar el pH en 7,1 ± 0,2. Distribuir en frascos adecuados y esterilizar utilizando proceso validado.

Usar ese fluido para productos que contienen lecitina o aceite y para productos para salud.

### Fluido III

Peptona de carne	5,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Polisorbato 80	10,0 g
Agua purificada q.s.p.	1000 ml
pH después de esterilización	6,9 ± 0,2

Mezclar todos los componentes y calentar, suavemente, hasta disolución. Filtrar, si necesario, y ajustar el pH para obtener, después de la esterilización, el valor de 6,9 ± 0,2. Distribuir en frascos adecuados y esterilizar utilizando proceso validado.

### PRUEBA DE VALIDACIÓN PARA BACTERIOSTASIS Y FUNGISTASIS

Antes de establecer un procedimiento para la prueba de esterilidad de insumos farmacéuticos, medicamentos o productos para salud, se debe garantizar que cualquier actividad bacteriostática o fungistática inherente al producto no tenga influencia adversa sobre la confiabilidad de la prueba, demostrándose que el procedimiento utilizado es adecuado para el producto bajo examen.

La prueba de validación para bacteriostasis y fungistasis debe ser realizada cuando la prueba de esterilidad sea realizada por la primera vez para un producto y siempre que hubiere modificaciones en la formulación del producto y/o en las condiciones experimentales de la prueba. La validación debe ser hecha previamente a la prueba de esterilidad del producto bajo examen.

#### Procedimiento

Para realizar la prueba de validación, proceder conforme descrito en *Procedimientos para la prueba de Esterilidad*, empleando exactamente los mismos métodos, excepto para las modificaciones que siguen.

**Nota:** para ambos métodos descritos a continuación, utilizar los microorganismos previamente especificados (**Tabla 1**). Realizar pruebas de Promoción de crecimiento como control positivo. Incubar todos los frascos conteniendo los medios por no más que 5 días.

**Método de filtración en membrana.** Después de transferencia del contenido del(de los) frasco(s) a ser probado(s) (conforme especificado en la **Tabla 3**) para el dispositivo de filtración, añadir no más que 100 UFC del microorganismo prueba a la última alícuota del fluido estéril utilizado para el lavado de la membrana.

**Método de inoculación directa.** Después de transferencia del contenido del(de los) frasco(s) a ser probado(s) (conforme especificado en la **Tabla 3**) para frascos conteniendo

los medios de cultivo, añadir no más que 100 UFC de los microorganismos pruebas a los medios.

### Interpretación

Si el crecimiento de microorganismos obtenido después de la incubación es visiblemente comparable a aquel obtenido en el control positivo (frasco sin adición de muestra), la muestra no presenta actividad antimicrobiana bajo las condiciones de la prueba o tal actividad fue satisfactoriamente eliminada. La prueba de esterilidad puede, entonces, ser conducida sin necesidad de modificaciones.

Si el crecimiento de microorganismos no es obtenido en la presencia de la muestra, o si él no es visiblemente comparable a aquel obtenido en los controles positivos, la muestra presenta actividad antimicrobiana que no fue satisfactoriamente eliminada, bajo las condiciones de la prueba. En ese caso, deben ser hechas modificaciones en las condiciones de la prueba para eliminar la actividad antimicrobiana, tales como dilución, uso de sustancias neutralizantes, aumento del número de lavados en el método de filtración en membrana o una combinación de ellas. La prueba de validación debe ser repetida para verificar si la actividad antimicrobiana fue eliminada por la modificación propuesta.

### PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE ESTERILIDAD

La prueba de esterilidad puede ser realizada utilizando los métodos de filtración en membrana o de inoculación directa conforme la naturaleza del producto, excepto cuando uno de los métodos es especificado en la monografía individual. En ambos casos, controles negativos apropiados deben ser incluidos.

Antes de proceder a la prueba, efectuar asepsia de las superficies externas de los frascos y ampollas, sumergiéndolos en solución antiséptica adecuada, o utilizando otros procedimientos de desinfección externa de los embalajes como por ejemplo, vapores de peróxido de hidrógeno. En el caso de artículos cuyos embalajes no resisten a ese tratamiento, hacer asepsia de las muestras por medio de tejido no liberador de partículas embebido en solución antiséptica.

#### Muestreo

A menos que especificado de forma diferente en la monografía individual, probar el número de unidades de la muestra especificado en la **Tabla 2**. Si las unidades de la muestra presentan contenido en cantidad suficiente (**Tabla 3**), el contenido de cada unidad puede ser dividido en dos porciones iguales para cada tipo de medio de cultivo utilizado. Si las unidades de la muestra no presentan contenido en cantidad suficiente para cada medio, separar el doble del número de unidades especificado en la **Tabla 2** para realización de la prueba.

**Tabla 2 - Número mínimo de unidades a ser probadas en función del tamaño del lote.**

<i>Número de unidades del lote</i>	<i>Número mínimo de unidades a ser probadas<sup>a, b</sup></i>
<b>Preparaciones parenterales</b>	
Hasta 100	10% o 4 unidades (lo que sea mayor)
Arriba de 100 hasta 500	10 unidades
Arriba de 500	2% o 20 unidades (lo que sea menor)
Parenterales de gran volumen	2% o 10 unidades (lo que sea menor)
<b>Antibióticos sólidos</b>	
Frascos con capacidad < 5 g	20 unidades
Frascos con capacidad ≥ 5 g	6 unidades
<b>Oftálmicos y otras preparaciones no inyectables</b>	
Hasta 200	5% o 2 unidades (lo que sea mayor)
Arriba de 200	10 unidades
Producto presentado en embalaje de dosis única	aplicar lo mismo recomendado para preparaciones parenterales
<b>Productos para salud</b>	
Hasta 100	10% o 4 unidades (lo que sea mayor)
Arriba de 100 hasta 500	10 unidades
Arriba de 500	2% o 20 unidades (lo que sea menor)
<b>Productos sólidos a granel</b>	
Hasta 4	cada unidad
Arriba de 4 hasta 50	20% o 4 unidades (lo que sea mayor)
Arriba de 50	2% o 10 unidades (lo que sea mayor)
<b>Dispositivos médicos quirúrgicos</b>	
Catgut y otras suturas	2% o 5 embalajes (lo que sea mayor) como máximo 20 embalajes
Hasta 100	10% o 4 unidades (lo que sea mayor)
Arriba de 100 hasta 500	10 unidades
Arriba de 500	2% o 20 unidades (lo que sea mayor)

a. muestreo especificado considerándose que el contenido de un recipiente es suficiente para inocular ambos medios de cultivo.

b. para materias primas, el muestreo satisfactorio puede ser basado en la raíz cuadrada del número total de recipientes del lote



Tabla 3 - Cantidades mínimas a ser utilizadas para cada medio de cultivo.

<i>Cantidad por recipiente</i>	<i>Volumen mínimo a ser inoculado en cada medio (ml)</i>
<b>Líquidos (no antibióticos)</b>	
menos de 1 ml de 1 a 40 ml	todo el contenido
de 1 a 40 ml	mitad del contenido, pero no menos que 1
arriba de 40 ml hasta 100 ml	20mL
arriba de 100 ml	10% del contenido del producto, pero no menos que 20 ml
Antibióticos (líquidos)	1 ml
Otras preparaciones solubles en agua o en solvente del tipo contenido total, pero no menos que 0,2 g miristato de isopropila	
Cremas y pomadas insolubles a ser suspendidos o contenido total, pero no menos que 0,2 g emulsificados	
<b>Sólidos</b>	
menos de 0,05 g	todo el contenido
arriba de 0,05g hasta 0,3 g	mitad del contenido pero no menos que 0,05g
arriba de 0,3 g hasta 5 g	0,15 g
arriba de 5 g	0,5 g
<b>Productos para salud</b>	
suturas quirúrgicas	3 partes del hilo (30 cm de largo cada)
cinta quirúrgica / gaza / algodón en embalaje múltiple	0,1 g por embalaje
suturas y otros materiales en embalajes individuales	todo el material
otros relacionados médicos	todo el material cortado en pedazos, o desmontado

5

## MÉTODO DE FILTRAÇÃO EN MEMBRANA

Utilizar membranas filtrantes con porosidad nominal no superior a 0,45 µm cuya eficiencia en retener microorganismos haya sido establecida. Filtros de nitrato de celulosa, por ejemplo, son utilizados para soluciones acuosas, oleosas y suavemente alcohólicas y filtros de acetato de celulosa, por ejemplo, para soluciones fuertemente alcohólicas. Filtros especialmente adaptados pueden ser requeridos para determinados productos, como antibióticos.

Para productos oncológicos extremadamente agresivos – sustituir a membrana de éster de celulosa por difluoruro de polivinilideno (PVDF) o politetrafluoroetileno (PTFE).

Los procedimientos descritos a continuación se aplican a membranas con diámetro de aproximadamente 50 mm. Si filtros con diámetros diferentes son utilizados, los volúmenes de las diluciones y lavados deben ser ajustados conforme el diámetro de la membrana empleada. El dispositivo de filtración y la membrana son esterilizados por proceso adecuado. El dispositivo presenta configuración tal que la solución a ser examinada pueda ser introducida y filtrada bajo condiciones asépticas. El dispositivo de filtración debe posibilitar, además, la eliminación aséptica de la membrana para su transferencia al medio de cultivo o ser adecuado para proceder a la incubación después de adición del medio de cultivo al propio dispositivo. El tipo de fluido utilizado en el lavado de la membrana depende de la naturaleza del producto, siendo especificado en la monografía individual, cuando sea el caso.

Controles negativos, o blancos deben ser incluidos para los fluidos y solventes utilizados, para los cuales no se debe observar crecimiento microbiano. Se debe verificar, además, si los fluidos utilizados no presentan actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba.

*Líquidos miscibles en vehículos acuosos*

Transferir pequeña cantidad de diluyente estéril, como el *Fluido I*, para la membrana y filtrar. El diluyente puede contener sustancias neutralizantes y o inactivantes, como en el caso de antibióticos. Transferir para la membrana los contenidos de los recipientes a ser probados o la dilución apropiada (previamente definida en la prueba de validación para bacteriostasis y fungistasis) en cantidades no inferiores a las recomendadas en las **Tablas 2 y 3** y filtrar inmediatamente. Si el producto presenta actividad antimicrobiana, lavar la membrana, como mínimo, tres veces filtrando, cada vez, el volumen del diluyente estéril establecido en la prueba de validación para bacteriostasis y fungistasis. La cantidad de fluido de lavado utilizada no debe ser superior a cinco porciones de 200 ml, incluso si durante la prueba de validación haya sido demostrado que tal ciclo de lavados no elimina completamente la actividad antimicrobiana. Transferir la membrana entera para medios seleccionados. Utilizar los mismos volúmenes de medio empleados en la prueba de validación. Incubar los medios por lo menos por 14 días.

*Aceites y soluciones oleosas*

Utilizar, para cada medio de cultivo la cantidad de muestra especificada en las **Tablas 2 y 3**. Aceites y soluciones oleosas de baja viscosidad pueden ser filtradas sin dilución a través de la membrana seca. Aceites viscosos deben ser diluidos en solvente estéril adecuado como, por ejemplo, miristato de isopropilo, siempre que demostrado no poseer actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba. Dejar el aceite penetrar en la membrana, filtrar utilizando vacío gradualmente. Lavar la membrana con, como mínimo, tres porciones del *Fluido III*. Proseguir conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

### *Pomadas y cremas*

Utilizar, para cada medio de cultivo, cantidad de muestra especificada en las **Tablas 2 y 3**. Pomadas de base oleosa y emulsiones del tipo agua en aceite pueden ser diluidas para 1% en solvente adecuado (miristato de isopropilo, u otro) como descrito en el ítem anterior, calentando, si necesario, a 40 °C (en casos excepcionales, calentar como máximo hasta 44 °C). Filtrar, lo más rápidamente posible, y proseguir conforme descrito en *Aceites y soluciones oleosas*. En el caso de utilización del miristato de isopropilo como diluyente, siempre que demostrado no poseer actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba, este debe ser esterilizado antes del uso, por filtración en membrana, y su extracto acuoso debe presentar pH no inferior a 6,5.

### *Sólidos solubles (no antibióticos)*

Utilizar, para cada medio de cultivo, cantidad de muestra especificada en las **Tablas 2 y 3**. Disolver el producto en fluido adecuado, como el *Fluido I*, y proseguir conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

### *Sólidos para preparaciones inyectables (no antibióticos)*

Reconstituir el producto como descrito en el rótulo y proceder conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*, o *Aceites y soluciones oleosas*, dependiendo del caso. Si necesario, puede ser utilizado un exceso de diluyente para auxiliar en la reconstitución y filtración del producto.

### *Antibióticos sólidos para preparaciones inyectables*

Para embalajes con menos de 5 g retirar, asépticamente, de cada uno de los 20 frascos recomendados, cerca de 0,3 g de muestra, disolver en 200 ml de *Fluido I* y mezclar. Alternativamente, reconstituir el producto conforme descrito en el rótulo, transferir el equivalente, en líquido, a 0,3 g de muestra y diluir para 200 ml con *Fluido I*. Para embalajes con 5 g o más transferir, asépticamente, de cada seis recipientes, 1 g de muestra para frasco adecuado, disolver en 200 ml de *Fluido I* y mezclar.

Alternativamente, reconstituir los seis frascos del producto como recomendado por el fabricante, transferir cantidad de líquido, equivalente a 1 g de la muestra, para frasco adecuado, diluir para 200 ml con *Fluido I* y mezclar. Proseguir conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

### *Aerosoles estériles*

Para productos líquidos presurizados, congelar el contenido en mezcla de etanol y hielo seco a por lo menos -20 °C, por aproximadamente 1 hora. Si posible, antes de la abertura de la embalaje, dejar el propelente escapar y transferir asépticamente el contenido para frasco adecuado estéril. Añadir 100 ml de *Fluido II* y homogeneizar suavemente. Proseguir conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos* o *Aceites y soluciones oleosas*, conforme el caso.

### *Jeringas ya llenadas con o sin aguja acoplada*

Expeler el contenido de cada jeringa directamente sobre la(s) membrana(s) o en frascos separados y después filtrar. Proseguir conforme descrito para *Líquidos miscibles en vehículos acuosos*.

### *Dispositivos estériles*

Pasar asépticamente un volumen de *Fluido II* no inferior a 10% del volumen de cada unidad del total de dispositivos a ser probados conforme establecido en las **Tablas 2 y 3**. Recolectar el fluido en un recipiente adecuado estéril y proceder conforme indicado para líquidos miscibles en vehículos acuosos o soluciones acuosas de aceites y soluciones oleosas, conforme el caso. En el caso de las jeringas vacías, estériles, extraer el diluyente estéril del recipiente a través de la aguja estéril, si está acoplada, o a través de una aguja estéril acoplada para proceder al ensayo, y expulsar el contenido en un recipiente estéril. Proceder como indicado anteriormente.

## MÉTODO DE INOCULACIÓN DIRECTA EN MEDIO DE CULTIVO

Transferir, directa y asépticamente, para los medios de cultivo la cantidad del producto especificada en las **Tablas 2 y 3**, de tal forma que el volumen del producto no sea mayor que 10% del volumen del medio de cultivo, a menos que especificado de manera diferente en la monografía individual o en esa sección. Si la muestra presenta actividad antimicrobiana, realizar la prueba después de la neutralización de la actividad con una sustancia neutralizante adecuada o por dilución en cantidad suficiente de medio de cultivo. Cuando sea necesario el uso de grandes volúmenes del producto, puede trabajarse con medio de cultivo concentrado, preparado teniendo en cuenta la dilución subsiguiente a la adición del producto. Si el recipiente sirve, el medio concentrado puede ser adicionado directamente a la muestra.

### *Líquidos*

Transferir el volumen indicado de cada muestra conforme **Tabla 3** para tubos conteniendo los medios fluidos de tioglicolato y caldo de caseína-soja, utilizando pipeta estéril o jeringa y aguja estériles. Mezclar el líquido con el medio, sin airear excesivamente. Incubar en las condiciones especificadas para cada medio durante 14 días.

### *Líquidos oleosos*

Utilizar medio de cultivo conteniendo agente emulsionante apropiado en concentración que se haya mostrado adecuado en la validación, por ejemplo, polisorbato 80 a 1% (p/v).

### *Pomadas y cremas*

Preparar dilución de la muestra a 10% utilizando un agente emulsionante adecuado adicionado a un diluyente estéril como el *Fluido I*. Transferir a muestra diluida para medios de cultivo sin emulsionante. Incubar los medios inoculados por, como mínimo, 14 días. Observar los medios durante todo el período de incubación. Agitar, suavemente, los

frascos de medio de cultivo conteniendo aceite, diariamente, durante todo el período de incubación. Los frascos conteniendo *Medio líquido de tioglicolato* u otro medio similar deben ser agitados para no perjudicar las condiciones de anaerobiosis.

#### Sólidos

Transferir la cantidad de muestra especificada en las **Tablas 2 y 3** o preparar una solución o suspensión del producto adicionando volumen no superior a 20 ml de diluyente estéril al recipiente. Transferir el material así obtenido para 200 ml de *Medio fluido de tioglicolato*. Del mismo modo, transferir la misma cantidad del material para 200 ml de *Caldo de caseína-soja* y mezclar. Proseguir conforme descrito para *Líquidos*.

#### Catgut y otras suturas quirúrgicas

Para cada medio, utilizar la cantidad de muestra especificada en las **Tablas 2 y 3**. Abrir el embalaje asépticamente y retirar tres porciones del hilo para cada medio de cultivo. Esas porciones deben ser retiradas en el inicio, en el medio y en el final y tener 30 cm de largo. Cubrir cada parte del hilo con volumen suficiente de los medios (20 ml a 150 ml).

#### Algodón purificado, gaza, vendaje y material relacionado

De cada embalaje de algodón, gaza en rollo o gaza en vendaje a ser analizado, retirar, con instrumentos estériles, dos porciones de 0,1 g a 0,5 g de las partes más internas de la muestra. Para materiales en embalaje individual, tales como copo de gaza, retirar dos porciones individuales de 0,25 g a 0,5 g, o dos unidades totales, en el caso de unidades pequeñas (ej.: vendaje menores que 25 mm a 75 mm). Transferir una porción para tubo con 40 ml de *Medio fluido de tioglicolato* y otra para tubos con 40 ml de *Caldo de caseína-soja*. Proseguir conforme descrito para *Líquidos*.

#### Aparatos parenterales

Para aparatos de formas y dimensiones que permitan su inmersión en volumen de medio que no rebase 1000 ml, hacer su inmersión utilizando las cantidades especificadas en las **Tablas 2 y 3** y proceder conforme descrito en *Líquidos*. Para aparatos muy grandes, hacer la inmersión de partes que entren en contacto con el paciente en volumen de medio suficiente para la inmersión de todas las partes. Para catéteres cuyos lúmenes, interno y externo, deban ser estériles, pasar el medio dentro del lumen o llenar el lumen con el medio y promover la inmersión del aparato entero.

#### OBSERVACIONES E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Durante el período de incubación y hasta su término, examinar los medios cuanto a las evidencias macroscópicas de crecimiento microbiano. Si la muestra bajo examen provoca turbación de los medios de cultivo, para impedir la observación del crecimiento microbiano, transferir porciones adecuadas de cada frasco (no menos que 1 ml) para

frascos nuevos de los mismos medios 14 días después del inicio de la incubación. Incubar los frascos originales y los frascos nuevos por un período adicional de no menos que 4 días. Si, al final del período de incubación, no hubiere evidencias de crecimiento microbiano, la muestra en examen cumple con el requisito de esterilidad. Si fuese evidenciado crecimiento de microorganismos, la muestra no cumple con el requisito de esterilidad, a no ser que se evidencie falla durante la ejecución de la prueba como, por ejemplo, contaminación no relacionada con el producto en análisis.

La prueba de esterilidad puede ser considerada inválida si una o más de las siguientes condiciones fueren observadas.

- los datos de monitoreo microbiológico del área de realización de la prueba demuestran falla;
- una revisión de los procedimientos analíticos utilizados durante la prueba revela falla;
- crecimiento microbiano es observado en los controles negativos;
- después de la identificación del microorganismo(s) aislado(s) a partir de la prueba, el crecimiento de esa especie(s) puede ser atribuido, inequívocamente, a fallas relacionadas al material utilizado y/o a técnicas utilizadas en la ejecución de la prueba de esterilidad.

Si fuese considerada inválida, la prueba de esterilidad debe ser repetida con el mismo número de unidades de la prueba inicial. Si, después de la repetición de la prueba, no es observado crecimiento microbiano, la muestra cumple con el requisito de esterilidad. Si es observado crecimiento microbiano después de la repetición de la prueba, la muestra bajo examen no cumple con el requisito de esterilidad.

Técnicas microbiológicas/bioquímicas convencionales son generalmente satisfactorias para identificación de los microorganismos recuperados en una prueba de esterilidad. En el caso de considerarse solamente que, después de la determinación de la identidad de los microorganismos aislados en la prueba, el crecimiento de esa(s) especie(s) pueda ser atribuido inequívocamente a fallas con respecto al material y/o técnica utilizados en el procedimiento del ensayo de esterilidad, puede ser necesario emplear técnicas más sensibles para demostrar que el microorganismo aislado en el producto es idéntico al aislado en materiales o en el ambiente. Mientras las técnicas de identificación microbiológicas / bioquímicas de rutina pueden demostrar que dos aislados no son idénticos, esos métodos pueden no ser suficientemente sensibles o confiables para suministrar evidencia inequívoca de que dos aislados son provenientes de una misma fuente. Métodos moleculares pueden ser empleados para determinar si dos microorganismos pertenecen a un mismo clon y poseen origen en común.

#### APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD A PREPARACIONES PARENTERALES, OFTÁLMICAS Y OTRAS PREPARACIONES NO-INYECTABLES CON REQUERIMIENTO PARA ESTERILIDAD

Al emplear la técnica de filtración por membrana, utilizar, siempre que posible, todo el contenido del recipiente, pero no menos que la cantidad indicada en las **Tablas 2 y 3**, di-

luyendo, cuando necesario, para aproximadamente 100 ml con una solución estéril adecuada, como el *Fluido I*.

Al emplear la técnica de inoculación directa, utilizar las cantidades indicadas en las **Tablas 2 y 3**, a menos que de otra forma autorizada y justificada. Las pruebas para bacterias y hongos sean realizados con una misma unidad de la muestra bajo examen. Cuando el volumen o la cantidad en un único recipiente es insuficiente para la realización de la prueba, los contenidos de dos o más recipientes son utilizados para inocular los diferentes medios.

#### APLICACIÓN DE LA PRUEBA DE ESTERILIDAD A PRODUCTOS FARMACÉUTICOS RADIOACTIVOS

Debido al rápido decaimiento radioactivo, no es practicable atrasar la liberación de algunos productos farmacéuticos radioactivos por cuenta de la prueba de esterilidad.

En tales casos, los resultados de las pruebas de esterilidad dan apenas evidencia retrospectiva confirmatoria para la garantía de la esterilidad, y por tanto dependen de los métodos iniciales establecidos en la fabricación y en los procedimientos de validación / certificación.

#### 5.5.3.3 ENSAYO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS

Se determina la potencia o actividad de un producto que contiene antibiótico comparando la dosis que inhibe el crecimiento de un microorganismo susceptible con relación a la dosis de una sustancia estándar o preparación biológica de referencia del antibiótico que produce inhibición similar.

#### UNIDAD INTERNACIONAL Y PREPARACIÓN ESTÁNDAR

Unidad Internacional es la actividad específica contenida en una cantidad (masa) de Estándar Biológico Internacional o Preparación de Referencia Biológica Internacional. La cantidad equivalente de unidades para uso internacional es establecida, siempre que necesario, por la Organización Mundial de la Salud.

Sustancias Químicas de Referencia Internacional no presentan unidades de actividad biológica definidas. Cuando son necesarios ensayos biológicos, la potencia de esos productos es en términos de masa equivalente a la de la sustancia pura.

El número de unidades, o la masa equivalente de la sustancia pura, en microgramos, contenidos en 1 mg de sustancia antibiótica, está indicado en la monografía de cada uno de los productos inscritos en la Farmacopea.

Para los ensayos microbiológicos registrados en la Farmacopea, Preparaciones Estándar (Estándares Primarios) son los Estándares Internacionales y Preparaciones de Referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud y por la Farmacopea Europea o los Estándares y Preparaciones de Referencia brasileños. Otras preparaciones adecuadas, de uso internacional corriente, en las cuales la potencia haya sido determinada con relación a las preparaciones

estándar de la Organización Mundial de la Salud, poseen valor legal idéntico.

Se recomienda que sean preparados y empleados estándares de trabajo (secundarios); todavía, es imprescindible que la potencia haya sido determinada por número adecuado de ensayos comparativos con relación a un estándar primario o farmacopeico, validados por análisis estadística apropiada y que los datos y resultados sean archivados a disposición de la fiscalización competente por plazo idéntico al de la validez de los productos ensayados.

Para el ensayo de lotes de sustancias antibióticas para las cuales existan Preparaciones Estándar nacionales, refrendadas por organizaciones internacionales, es obligatorio el uso de esas preparaciones.

#### SOLUCIONES

**Solución 1 (tampón fosfato de potasio a 1%, estéril, pH 6,0)** – Disolver 2,0 g de fosfato de potasio dibásico y 8 g de fosfato de potasio monobásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH para 5,9 – 6,1 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

**Solución 2 (tampón fosfato de potasio 0,1 M, estéril, pH 8,0)** – Disolver 16,73 g de fosfato de potasio dibásico y 0,523 g de fosfato de potasio monobásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH para 7,9 – 8,1 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

**Solución 3 (tampón fosfato de potasio 0,1 M, estéril, pH 4,5)** – Disolver 13,6 g de fosfato de potasio monobásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH para 4,4 – 4,5 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

**Solución 4 (tampón fosfato de potasio a 10%, estéril, pH 6,0)** – Disolver 20,0 g de fosfato de potasio dibásico y 80,0 g de fosfato de potasio monobásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH 5,9 – 6,1 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

**Solución 5 (tampón fosfato de potasio 0,2 M, estéril, pH 10,5)** – Disolver 35,0 g de fosfato de potasio dibásico y añadir 2,0 ml de hidróxido de potasio 10 M en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH para 10,4 – 10,6 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

**Solución 6 (ácido clorhídrico metanólico 0,1 M)** – Diluir 10,0 ml de ácido clorhídrico 1,0 M en metanol suficiente para alcanzar 1000 ml.



**Solución 7 (solución de alcohol isopropílico a 80%)** – Diluir 800 ml de alcohol isopropílico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml.

**Solución 8 (tampón fosfato de potasio 0,1 M, estéril, pH 7,0)** – Disolver 13,6 g de fosfato de potasio dibásico y 4,0 g de fosfato de potasio monobásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. Esterilizar la solución por 20 minutos en autoclave a 121 °C y, si necesario, ajustar el pH para 6,8 – 7,2 con ácido fosfórico 6 M o hidróxido de potasio 10 M.

#### MEDIOS DE CULTIVO

Pueden ser empleados medios de cultivo deshidratado, disponible en el comercio que, al ser reconstituídos con agua purificada, conforme las especificaciones del fabricante, posean la misma composición que el medio producido con los ingredientes individualmente indicados para su obtención.

**Medio de cultivo n° 1** – Disolver 6,0 g de peptona seca, 4,0 g de caseína de digestión pancreática, 3,0 g de extracto de levadura, 1,0 g de dextrosa y 15,0 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 6,6.

**Medio de cultivo n° 2** – Disolver 6,0 g de peptona seca, 3,0 g de extracto de levadura, 1,5 g de extracto de carne y 15,0 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 6,6.

**Medio de cultivo n° 3** – Disolver 5,0 g de peptona seca, 1,5 g de extracto de levadura, 1,5 g de extracto de carne, 2,5 g de cloruro de sodio, 1,0 g de dextrosa, 3,68 g de fosfato de potasio dibásico y 1,32 g de fosfato de potasio monobásico, en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,0.

**Medio de cultivo n° 4** – Disolver 6,0 g de peptona seca, 3,0 g de extracto de levadura, 1,5 g de extracto de carne, 1,0 g de D-glucosa y 15,0 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 6,6.

**Medio de cultivo n° 5** – Usar el medio de cultivo n° 2, sin embargo, el pH, después de esterilización, deberá ser 7,8.

**Medio de cultivo n° 6** – Disolver 40,0 g de dextrosa y 10,0 g de peptona seca en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 5,6.

**Medio de cultivo n° 7** – Usar el medio de cultivo n° 1, esterilizado y enfriado a 50 °C. Preparar solución acuosa conteniendo 10 mg de neomicina por ml y esterilizar por filtración en membrana con porosidad de 0,22 µm. Añadir, asépticamente, solución estéril de sulfato de neomicina, para obtener concentración final con potencia de 100 µg de neomicina por ml de medio.

**Medio de cultivo n° 8** – Usar el medio de cultivo n° 2, sin embargo, el pH, después de esterilización, deberá ser ajustado para 5,8 – 6,0.

**Medio de cultivo n° 9** – Disolver 17,0 g de caseína de digestión pancreática, 3,0 g de soja de digestión papaínica, 5,0 g de cloruro de sodio, 2,5 g de fosfato de potasio dibásico, 2,5 g de dextrosa y 20,0 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,3.

**Medio de cultivo n° 10** – Usar el medio de cultivo n° 9, adicionando, sin embargo, en lugar de 20,0 g, 12,0 g de agar y 10,0 ml de polisorbato 80 (ese último adicionado después de calentar el medio para disolver el agar, diluyendo inmediatamente, con agua para alcanzar 1000 ml). El pH, después de esterilización, deberá ser 7,3.

**Medio de cultivo n° 11** – Usar el medio de cultivo n° 1, pero el pH, después de esterilización, deberá ser ajustado para 8,0.

**Medio de cultivo n° 12** – Preparar como el medio de cultivo n° 1, adicionando, sin embargo, 300 mg de sulfato de manganeso hidratado (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) para cada 1000 ml de medio.

**Medio de cultivo n° 13** – Disolver 10,0 g de peptona seca y 20,0 g de dextrosa en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 5,6.

**Medio de cultivo n° 14** – Disolver 10,0 g de glicerol, 10,6 g de peptona seca, 10,6 g de extracto de carne y 3,0 g de cloruro de sodio en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,0.

**Medio de cultivo n° 15** – Preparar como el medio de cultivo n° 14, adicionando, sin embargo, 17,0 g de agar para cada 1000 ml de medio.

**Medio de cultivo n° 16** – Disolver 15,0 g de caseína de digestión pancreática, 5,0 g de soja de digestión papaínica, 5 g de cloruro de sodio y 15,0 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,3.

**Medio de cultivo n° 17** – Disolver 17,0 g de caseína de digestión pancreática, 3,0 g de peptona de soja, 2,5 g de dextrosa, 5,0 g de cloruro de sodio y 2,5 g de fosfato de potasio dibásico en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,3.

**Medio de cultivo n° 18** – Usar el medio de cultivo n° 11, pero, después de calentar la solución para disolver los ingredientes, añadir 20,0 ml de polisorbato 80. El pH, después de esterilización deberá ser 8,0.

**Medio de cultivo n° 19** – Disolver 9,4 g de peptona seca, 4,7 g de extracto de levadura, 2,4 g de extracto de carne, 15,0 g de cloruro de sodio, 10,0 g de dextrosa y 23,5 g de agar en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 6,1.

**Medio de cultivo n° 20** – Disolver 40,0 g de dextrosa, 10,0 g de peptona seca, 15,0 g de agar y 0,05 g de cloranfenicol



(en potencia) en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 5,6.

**Medio de cultivo n° 21** – Usar el medio de cultivo n° 20, esterilizado y enfriado a 50 °C. Añadir, asépticamente, 2,0 ml de solución estéril de cicloheximida para cada 100 ml de agar fundido. Preparar solución conteniendo 10,0 mg de cicloheximida por ml, en agua purificada, y esterilizar, por filtración en membrana con porosidad de 0,22 µm.

**Medio de cultivo n° 22** – Disolver 15,0 g de peptona seca, 5,0 g de harina de soja de digestión papaínica, 4,0 g de cloruro de sodio, 0,2 g de sulfito de sodio, 0,7 g de L-cistina, 5,5 g de dextrosa y 15,0 g de agar, en agua purificada suficiente para alcanzar 1000 ml. El pH, después de esterilización, deberá ser 7,0.

## PREPARACIÓN DEL INÓCULO

### Microorganismos recomendados

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 7468)
- *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341)
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)
- *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763)
- *Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617)
- *Bacillus cereus* var. *mycoides* (ATCC 11778)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031)
- *Escherichia coli* (ATCC 10536)
- *Enterococcus hirae* (ATCC 10541)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 10240)
- *Microsporium gypseum* (ATCC 14683)
- *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 14452)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619)
- *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607)

Con la finalidad de indicación, fueron listados los microorganismos disponibles en la ATCC. Los mismos microorganismos pueden, también, ser obtenidos de otras fuentes: INCQS, CIP, NBRC, NCIMB, NCPF, NCTC, NCYC, IMI y IP. La correspondencia entre los microorganismos y las direcciones de las entidades que los proveen se encuentran indicadas en *Microorganismos empleados en pruebas y ensayos (5.5.3.5)*.

**Procedimiento 1** – *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Preparación de la suspensión – Transferir el microorganismo de un cultivo stock para tubos que contengan 10 ml de medio de cultivo n° 1 inclinado. Incubar el tubo a 32 – 35 °C, por 24 horas. Después de incubación, lavar el crecimiento del microorganismo con 50 ml de solución fisiológica estéril.

Estandarización de la suspensión – Diluir la suspensión preparada, con solución fisiológica estéril, para obtener la

transmitancia de 25% en el largo de onda de 580 nm, empleando espectrofotómetro adecuado y tubos de ensayo con 13 mm de diámetro como cuba de absorción. Determinar la cantidad de suspensión a ser adicionada cada 100 ml de agar o caldo nutriente para producir zonas de inhibición claras y definidas o relación satisfactoria dosis- respuesta en el método turbidimétrico. Las suspensiones de los microorganismos sometidos al procedimiento 1 pueden ser estocadas a una temperatura de 4 °C, respectivamente, por los siguientes períodos: 1 semana, 2 semanas, 2 semanas, 2 semanas, 2 semanas, 6 meses, 1 semana, 2 semanas y 2 semanas.

*Micrococcus luteus* ATCC 14452. Efectuar como indicado en el Procedimiento 1. Emplear, no obstante, en el tubo con medio inclinado y en el frasco de Roux, medio de cultivo n° 7, incubando el frasco por período de 48 horas. La suspensión puede ser estocada por dos semanas, a una temperatura no superior a 4 °C.

### Procedimiento 2 – *Bacillus subtilis*.

Efectuar como indicado en el Procedimiento 1. En la preparación de la suspensión, sin embargo, emplear medio de cultivo n° 12, cuyo período de incubación es de 5 días. En la estandarización de la suspensión, proceder a choque térmico y estandarizar la suspensión de la siguiente manera: centrifugar y decantar el líquido sobrenadante. Resuspender el sedimento con 50 a 70 ml de solución fisiológica estéril y calentar la suspensión por 30 minutos a 70 °C. Ejecutar pruebas en placas, para asegurar la viabilidad de las esporas y determinar la cantidad que deberá ser adicionada cada 100 ml de medio, para obtener zonas de inhibición adecuadas. La suspensión puede ser estocada, por 6 meses, en temperatura no superior a 4 °C.

### Procedimiento 3 – *Bacillus cereus*.

Efectuar como indicado en el Procedimiento 1. No obstante, incubar el tubo con el microorganismo por una semana. En la estandarización de la suspensión, proceder a choque térmico y estandarizar la suspensión de la siguiente manera: calentar la suspensión por 30 minutos, a 80 °C. Lavar tres veces la suspensión de esporas con 20 a 25 ml de agua estéril. Resuspender los microorganismos en 50 a 70 ml de agua estéril y promover nuevo choque térmico por 30 minutos a 70 °C. Ejecutar pruebas en placas para asegurarse de la viabilidad de las esporas y determinar la cantidad de los que deberán ser añadidos cada 100 ml de agar, para obtener zonas de inhibición adecuadas. La suspensión puede ser estocada, por 6 meses, a una temperatura no superior a 4 °C.

### Procedimiento 4 – *Microsporium gypseum*.

Incubar el microorganismo, por 6 a 8 semanas a 25 °C, en frascos de Matraz de 3 litros, conteniendo 200 ml de medio de cultivo n° 6. Verificar el crecimiento por esporulación. Cuando a esporulación sea 80% o más, recolectar los conidióforos de la capa micelial con espátula estéril u otro instrumento adecuado. Los conidióforos estarán en la parte superior de la capa fluctuante. Mantener los conidióforos en 50 ml de solución fisiológica. Determinar, experimen-

almente, la cantidad de conidióforos para el ensayo. La suspensión puede ser estocada, por dos meses, a una temperatura no superior a 4 °C.

**Procedimiento 5 – *Enterococcus hirae*.**

Transferir el microorganismo de una cultivo stock para medio n° 33 e incubar, por 16 a 18 horas, a 37 °C. Determinar, experimentalmente, la cantidad de microorganismos para el ensayo. Mantener ese cultivo bajo refrigeración por plazo no superior a 24 horas.

**Procedimiento 6 – *Saccharomyces cerevisiae*. (ATCC 9763).**

Mantener el microorganismo en tubos conteniendo 10 ml de medio de cultivo n° 19 inclinado. Incubar los tubos a 32 – 35 °C, durante 24 horas. Inocular 100 ml de caldo nutriente – medio de cultivo n° 13 – e incubar, por 16 a 18 horas, a 37 °C. Estandarizar la suspensión conforme descrito en el Procedimiento 1. La suspensión puede ser estocada, por 4 semanas, a una temperatura no superior a 4 °C.

**Procedimiento 7 – *Saccharomyces cerevisiae*. (ATCC 9763 y ATCC 2601).**

Seguir lo indicado en el Procedimiento 1. Incubar, sin embargo, el tubo inclinado con el medio de cultivo n° 19, a 30 °C, el último por período de 48 horas. La suspensión puede ser estocada, por 4 semanas, a una temperatura no superior a 4 °C.

**Procedimiento 8 – *Mycobacterium smegmatis*.**

Mantener el microorganismo en tubos con medio inclinado conteniendo 10 ml del medio de cultivo n° 16 y efectuar repiques semanalmente. Incubar el tubo a 37 °C, por 48 horas. Usando 3 ml de solución fisiológica estéril, transferir las cultivos que crecerán en el agar inclinado para frasco matraz de 500 ml, conteniendo 100 ml de medio de cultivo n° 14 y 50 g de perlas de vidrio. Agitar el cultivo por rotación a una velocidad de 130 ciclos por minuto, en un radio de 3,5 cm y a una temperatura de 27 °C, por período de cinco días. Determinar la cantidad de suspensión a ser adicionada cada 100 ml de agar por medio de ensayo en placas. La suspensión puede ser estocada, por dos semanas, a una temperatura no superior a 4 °C.

*Método 1*

Transferir quantidade suficiente de padrão para pesa-filtro tarado provido de tampa esmerilhada. Pesar o frasco e colocá-lo em estufa sob pressão reduzida, inclinando a tampa sobre a boca do frasco para assegurar que permaneça aberto durante a dessecação. Dessecar a 60 °C, sob pressão de 0,67 kPa ou menos, durante três horas. Concluído o processo, introduzir ar seco na estufa, submetendo-o a agente dessecante como ácido sulfúrico ou sílica-gel. Repor a tampa e colocar o pesa-filtro em dessecador contendo agente dessecante como pentóxido de fósforo ou sílica-gel. Deixar esfriar à temperatura ambiente e pesar, calculando a perda porcentual de massa do padrão.

*Método 2*

Proceder conforme el Método 1. Emplear, sin embargo, pesafiltro tarado provisto de tapa con tubo capilar de diámetro interno de la orden de 0,20 a 0,25 mm, y desecar sin retirar la tapa.

*Método 3*

Proceder conforme el Método 1. Desecar, sin embargo la muestra a 110 °C, bajo presión de 0,67 kPa o menos, durante tres horas.

*Método 4*

Proceder conforme el Método 1. Desecar, sin embargo la muestra a 40 °C, bajo presión de 0,67 kPa o menos, durante dos horas.

*Método 5*

Proceder conforme el Método 1. Desecar, sin embargo la muestra a 100 °C, bajo presión de 0,67 kPa o menos, durante cuatro horas.

*Método 6*

Proceder conforme el Método 1. Desecar, sin embargo la muestra a 40 °C, bajo presión de 0,67 kPa o menos, durante tres horas.

*Método 7*

Proceder conforme el Método 1. Desecar, sin embargo la muestra a 25 °C, bajo presión de 0,67 kPa o menos, durante tres horas.

*Método 8*

La sustancia antibiótica no es sometida a la desecación. PROCEDIMIENTO

Todo material debe ser adecuado para el uso pretendido y debe ser minuciosamente limpiado, después de cada utilización, para retirar cualquier vestigio de antibiótico. El material debe permanecer cubierto cuando no esté en uso. Todos los elementos de vidrio utilizados en contacto con el microorganismo deben ser esterilizados en estufa, en temperatura entre 200 °C y 220 °C por 2 horas. En la dilución de la solución estándar y muestra emplear balones volumétricos, pipetas o equipos cuidadosamente calibrados.

**5.5.3.3.1 Ensayo microbiológico por difusión en agar**

PROCEDIMIENTO

Para cada antibiótico relacionado en la **Tabla 1**, verificar el medio de cultivo (conforme la relación de los medios de cultivo), la cantidad de medio a ser usada en la capa base y en la capa inoculada y el microorganismo de ensayo. El

volumen de inóculo a ser adicionado cada 100 ml de medio de cultivo debe ser determinado experimentalmente.

No obstante, como referencia inicial, se sugiere cantidad de inóculo a ser adicionada por 100 ml de medio.

Preparar la capa base por medio de la adición de cantidad apropiada de agar fundido en las placas de Petri las cuales deben ser, especialmente seleccionadas, tener fondo plano, poseer dimensiones de 20 x 100 mm y tapa de material apropiado. Distribuir el agar uniformemente en las placas, que deben ser colocadas en superficie nivelada para que la capa de medio tenga profundidad uniforme. Colocar la tapa de cada placa al lado de esa; se fuese utilizada tapa no porosa, dejarla levemente entreabierta para evitar la acumulación de humedad condensada a partir de la capa de agar caliente. Después del endurecimiento del agar, tapar las placas. Para preparar la capa inoculada – superficie, añadir el volumen de inóculo determinado para la cantidad apropiada de medio de cultivo que haya sido fundido y enfriado entre 46 °C y 48 °C. Agitar el frasco, por rotación para obtener suspensión homogénea y añadir la cantidad indicada del medio inoculado en cada placa de Petri, que contiene la capa base no inoculada. Esparcir uniformemente la capa, tapar las placas y permitir su endurecimiento sobre superficie plana. Después del endurecimiento del medio, colocar seis cilindros de acero inoxidable, con diámetro externo de 8 mm ± 0,1 mm, diámetro interno de 6 mm ± 0,1 mm y largo de 10 mm ± 0,1 mm, sobre la superficie del agar inoculado, de manera que formen entre sí ángulo de 60° y con radio de 2,8 cm. También, pueden ser utilizados cilindros confeccionados en vidrio, porcelana o aluminio y esterilizados en las condiciones ya descritas. En lugar de los cilindros, pueden ser perforados, en el medio, con perforador estéril, pozos de 5 a 8 mm de diámetro. Pueden, además, ser usados discos de papel, confeccionados con papel de calidad apropiada o moldes de acero inoxidable. Cuando son usados discos de papel, estos deben ser estériles.

Preparación de la solución estándar de trabajo, de la muestra y de la curva estándar

La preparación de las muestras de los antibióticos está indicada en la respectiva monografía.

Las concentraciones del antibiótico utilizadas en el ensayo deben estar en progresión geométrica; por ejemplo, por la preparación de series de dilución en la razón 2:1 u otra determinada experimentalmente desde que sea comprobada la relación lineal entre el logaritmo de la concentración del antibiótico y el diámetro del halo de inhibición.

En la **Tabla 2** está indicada para cada antibiótico, la preparación de la solución estándar de trabajo y de la curva estándar, comprendiendo:

- condiciones de desecación, conforme descrito en el ítem Desecación de sustancias antibióticas (5.5.3.3);
- solvente inicial para disolución del antibiótico, caso sea necesario, y hasta cual concentración es usado;
- solución para dilución hasta la concentración de trabajo, conforme descrito en *Soluciones*;

- concentración de la solución de trabajo, expresada en peso, o Unidades Internacionales por ml de solución;
- plazo de validez de la solución estándar de trabajo bajo refrigeración;
- solución empleada para dilución de la solución de trabajo, por ocasión de la preparación de la curva estándar, conforme *Soluciones*;
- bandas de concentración sugeridas, en peso o Unidades Internacionales por ml, dentro de las cuales pueden ser encontradas las concentraciones adecuadas para la curva estándar.

*Procedimiento para delineamiento rectas paralelas (3 x 3 o 2 x 2)*

Emplear, en el ensayo, por lo menos seis placas de Petri. Disponer las soluciones del estándar y muestra, en cada placa, con 3 concentraciones para ensayo 3 x 3 (baja, media y alta) o 2 concentraciones para ensayo 2 x 2 (baja y alta). Las soluciones deben ser distribuidas de tal forma que las soluciones de la preparación estándar y muestra estén alternadas en la capa inoculada (concentración alta y baja) para evitar la sobreposición de los halos de inhibición.

*Procedimiento para delineamiento 5 x 1*

Para la curva estándar, utilizar un total de 12 placas, 3 para cada una de las soluciones del estándar ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_4$ ,  $P_5$ ), excepto para la concentración media de la curva ( $P_3$ ) que es incluida en todas las placas. En cada conjunto de 3 placas, utilizar 3 cilindros para la concentración media ( $P_3$ ) y alternar 3 cilindros para la concentración baja ( $P_1$ ) y así sucesivamente con las demás soluciones del estándar. De esa manera, se obtienen 36 halos de inhibición para la concentración ( $P_3$ ) y 9 halos de inhibición para cada una de las otras cuatro concentraciones de la curva.

Para cada muestra, emplear 3 placas, donde serán colocados 3 cilindros para la concentración media del estándar ( $P_3$ ) y 3 con la solución de la muestra preparada en la misma concentración del estándar ( $A_3$ ).

Aplicar 0,2 ml de las soluciones en los cilindros o en los moldes de acero inoxidable por medio de pipeta u otro instrumento calibrado. Cuando es usado el sistema de pozos, el volumen de líquido aplicado debe ser suficiente para llenarlos completamente.

Después de realizar los procedimientos adecuados para el delineamiento escogido, incubar las placas a la temperatura indicada, cuya variación no deberá exceder ± 0,5 °C, durante un período de 16 a 18 horas. En seguida, medir el diámetro de los halos de inhibición empleando dispositivo adecuado para medida, como calibrador, o proyector óptico que tenga precisión de 0,1 mm o menos.

Para algunos microorganismos, el procedimiento puede ser mejorado si las placas preparadas permanecen a temperatura ambiente por período de 30 minutos a 2 horas antes de la incubación, período en que ocurre la difusión del antibiótico para el medio.

Tabla 1 - Ensayo microbiológico por difusión en agar.

Antibiótico	Microorganismo	Medio de cultivo		Volumen (ml) del medio aplicado en las capas		Volumen del inóculo ml/100 ml	Temperatura de incubación (°C)
		Base	Superficie	Base	Superficie		
Amoxicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	32 a 35
Ampicilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	32 a 35
Anfomicina	Micrococcus luteus resistente a neomicina (ATCC 14452)	2	1	21	4	0,5	36 a 38
Anfotericina B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	-	19	-	8	1,0	29 a 31
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 7468)	2	1	21	4	0,3	32 a 35
Bacitracina	<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	2	1	21	4	0,3	32 a 35
Bencilpenicilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	1,0	32 a 35
Bleomicina	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 607)	15	15	10	6	1,0	32 a 35
Kanamicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	( <sup>1</sup> )	36 a 38
Carbencilina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	9	10	21	4	( <sup>1</sup> )	36 a 38
Cefacetril	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,5	32 a 35
Cefadroxilo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	36 a 38
Cefalexina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Cefalaglicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,2	32 a 35
Cefaloridina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Cefalotina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Cefapirina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,08	32 a 35
Cefazolina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Cefoxitina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	5	0,1	32 a 35
Cefradina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,05	32 a 35
Ciclacilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	36 a 38
Cicloserina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	10	4	0,04	29 a 31
Clindamicina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	1,5	36 a 38
Cloranfenicol	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	1	1	21	4	2,0	32 a 35
Cloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Colistina	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (ATCC 4617)	9	10	21	4	0,1	36 a 38
Dactinomicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	10	4	( <sup>1</sup> )	36 a 38
Dicloxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,1	32 a 35
Dihidroestreptomina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	( <sup>1</sup> )	36 a 38
Eritromicina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	1,5	32 a 35
Estreptomina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	( <sup>1</sup> )	36 a 38
Feneticilina	<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0,5	32 a 35
Fenoximetilpenicilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	1,0	32 a 35

Tabla 1 - (conclusión)

Antibiótico	Microorganismo	Medio de cultivo		Volumen (ml) del medio aplicado en las capas		Volumen del inóculo ml/100 ml	Temperatura de incubación °C
		Base	Superficie	Base	Superficie		
Griseofulvina	<i>Microsporium gypseum</i> (ATCC 14683)	20	21	6	4	(1)	29 a 31 durante 48 horas
Mitomicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)0,4	8	8	10	4	0,5	36 a 38
Neomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	11	11	21	4	1,0	32 a 35
Neomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	1,0	36 a 38
Nistatina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	-	19	-	8	1,0	29 a 31
Novobiocina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	2	1	21	4	4,0	34 a 36
Oxacilina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	1	21	4	0,3	32 a 35
Paromomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	2,0	36 a 38
Polimixina B	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (ATCC 4617)	9	10	21	4	0,1	36 a 38
Rifampicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	2	2	21	4	0,1	29 a 31
Rifampicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	2	2	21	4	0,1	36 a 38
Sisomicina	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	0,03	36 a 38
Vancomicina	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	8	8	10	4	(1)	36 a 38

(1) Determinar la cantidad de inóculo, en la ocasión del ensayo, a través de difusión en placas.



Tabla 2 - Preparación de la solución estándar y de la curva estándar

Antibiótico	a. Condición de desecación (5.5.3.3)	b. Solvente inicial	c. Solución para dilución (5.5.3.3)	d. Concentración de la solución de trabajo (mg/ml)	e. Plazo de validez de la solución bajo refrigeración	f. Solución para dilución (5.5.3.3)	g. Dosis mediana ( $\mu\text{g}$ o U.I./ml)
Amoxicilina	8	-	Agua estéril	1 mg	1 días	2	0,05 a 0,2 $\mu\text{g}$ 7
Ampicilina	8	-	Agua estéril	0,1 mg	7 días	2	0,05 a 0,2 $\mu\text{g}$ 7
Anfomicina <sup>8</sup>	1	-	2	0,1 mg	14 días	2	5 a 20 $\mu\text{g}$
Anfotericina B	1	-	Dimetilsulfóxido	1 mg2	Usar en el mismo día	5	0,5 a 2 $\mu$ 7
Bacitracina	1	-	HCl0,01 M	100 U.I.	Usar en el mismo día	1	1 a 4 U.I.
Bencipenecilina	8	-	1	1 000 U.I.	4 días	1	0,2 a 2 U.I.
Bleomicina	7	-	8	2 U.I.	14 días	8	0,01 a 0,2 U.I.
Kanamicina B	8	-	2	1 mg	30 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Carbencilina	8	-	1	1 mg	14 días	1	10 a 40 $\mu\text{g}$
Cefacetril	8	-	1	1 mg	7 días	1	5 a 20 $\mu\text{g}$
Cefadroxilo	8	-	1	1 mg	Usar en el mismo día	1	10 a 40 $\mu\text{g}$
Cefalexina	8	-	1	1 mg	7 días	1	10 a 40 $\mu\text{g}$
Cefaloridina	1	-	1	1 mg	5 días	1	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Cefaloglicina	8	-	Agua estéril	100 $\mu\text{g}$	7 días	3	5 a 20 $\mu\text{g}$
Cefalotina	1	-	1	1 mg	5 días	1	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Cefapirina	8	-	1	1 mg	3 días	1	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Cefazolina	8	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en la solución 4	1	1 mg	5 días	1	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Cefoxitina	8	-	1	1 mg	Usar en el mismo día	1	10 a 40 $\mu\text{g}$
Ciclacilina	8	-	Agua estéril	1 mg	1 día	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$ 7
Cefradina	8	-	1	1 mg	5 días	1	5 a 20 $\mu\text{g}$
Cicloserina	1	-	Agua estéril	1 mg	30 días	1	20 a 80 $\mu\text{g}$
Clindamicina	8	-	Agua estéril	1 mg	30 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Cloranfenicol	8	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en alcohol etílico	1	1 mg	30 días	1	20 a 80 $\mu\text{g}$
Cloxacilina	8	-	1	1 mg	7 días	1	2a8 $\mu\text{g}$
Colistina	1	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en alcohol etílico	4	1 mg	14 días	4	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Dactinomicina	1	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en alcohol metílico	2	1 mg	90 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Dicloxacilina	8	-	1	1 mg	7 días	1	2,5 a 10 $\mu\text{g}$
Dihidroestreptomicina	5	-	2	1 mg	30 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Eritromicina <sup>5</sup>	1	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en alcohol metílico	2	1 mg	14 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Estreptomicina	1	-	2	1 mg	30 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Feneticilina	8	-	Agua estéril	1 000 U.I.	7 días	2	0,05 a 0,2 U.I.
Fenoximetilpenicilina	8	-	1	100 U.I.	4 días	1	0,2 a 2 U.I.

Tabla 2 – (conclusión)

Antibiótico	a. Condición de desecación (5.5.3.3)	b. Solvente inicial	c. Solución para dilución (5.5.3.3)	d. Concentración de la solución de trabajo (mg/ml)	e. Plazo de validez de la solución bajo refrigeración	f. Solución para dilución (5.5.3.3)	g. Dosis mediana ( $\mu\text{g}$ o U.I./ml)
Gentamicina	3	-	2	1 mg	30 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Griseofulvina	8	-	Dimetilformamida	1 mg/4	90 días	2	2 a 10 $\mu\text{g}$
Miticicina	8	-	1	1 mg	14 días	1	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Neomicina	1	-	2	1 mg	14 días	2	5 a 20 $\mu\text{g}$ ( <i>S. aureus</i> )
Neomicina	1	-	2	1 mg	14 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$ ( <i>S. epidermidis</i> )
Nistatina	4	-	Dimetilformamida	1 000 U.I./2	Usar en el mismo día	4	10 a 40 U.I./7
Novobiocina	5	10 000 $\mu\text{g}$ por ml en alcohol etílico	2	1 mg	5 días	4	0,2 a 1 $\mu\text{g}$
Oxacilina	8	-	1	1 mg	3 días	1	2 a 10 $\mu\text{g}$
Paromomicina	1	-	2	1 mg	21 días	2	0,5 a 2 $\mu\text{g}$
Polimixina B	1	Agua estéril/3	4	10 000 U.I.	14 días	4	200 a 800 U.I.
Rifampicina	8	-	Alcohol metílico	1 mg	1 día	1	2 a 10 $\mu\text{g}$
Sisomicina <sup>6</sup>	8	-	2	1 mg	14 días	2	0,05 a 0,2 $\mu\text{g}$
Vancomicina	1	-	Agua estéril	1 mg	7 días	2	5 a 20 $\mu\text{g}$

1. Diluir alícuotas de la solución de trabajo con dimetilsulfóxido, para obtener concentración entre 10 y 40 mg por mL conforme los puntos de la curva estándar.
2. Diluir alícuotas de la solución de trabajo con dimetilformamida, para obtener concentraciones entre 10 y 40 unidades por mL conforme los puntos de la curva estándar.
3. Añadir 2 mL de agua estéril para cada 5 mg de estándar.
4. Diluir alícuotas de la solución de trabajo con dimetilformamida, para obtener concentraciones entre 40 y 200 mg por mL conforme los puntos de la curva estándar.
5. Cuando se usa eritromicina bajo la forma de estolato, hidrolizar la solución de trabajo, en baño maría, a 60 °C, durante 2 horas.
6. Sisomicina es higroscópica, tomar cuidado durante el pesado. El estándar de trabajo de permancia a 20 °C, e atmósfera de nitrógeno.
7. Preparar concomitantemente las soluciones del estándar y muestra. Las diluciones de la muestra deben contener la misma cantidad de dimetilformamida que las diluciones del estándar.
8. La solución estándar de trabajo debe permanecer durante una noche a temperatura ambiente para completa disolución.

### 5.5.3.3.2 Ensayo microbiológico por turbidimetría

#### PROCEDIMIENTO

Preparación de la solución de trabajo, de la muestra y de la curva estándar

La preparación de las muestras de los antibióticos está indicada en la respectiva monografía.

En la **Tabla 2**, presentada a continuación, hay indicación, para cada antibiótico, de la preparación de la solución estándar de trabajo y de la curva estándar, comprendiendo:

- condiciones de desecación, conforme descrito en el ítem Desecación de sustancias antibióticas (**5.5.3.3**);
- solvente inicial para disolución del antibiótico, caso sea necesario, y hasta cual concentración es usado;
- solución para dilución del antibiótico hasta la concentración de trabajo, conforme *Soluciones*;
- concentración de solución de trabajo, expresada en peso o Unidades Internacionales por ml de solución;
- plazo de validez de la solución estándar de trabajo bajo refrigeración;
- solución empleada para dilución de la solución de trabajo, en la ocasión de la preparación de la curva estándar, conforme *Soluciones*;
- banda de concentración, en peso o Unidades Internacionales por ml, dentro de la cual las concentraciones adecuadas para la curva estándar pueden ser encontradas.

Emplear para cada antibiótico el microorganismo y el caldo nutritivo relacionados en la **Tabla 1**. Determinar experimentalmente el volumen de inóculo a ser adicionado a 100 ml de caldo a partir de la cantidad sugerida como referencia inicial. El medio inoculado debe ser preparado y utilizado inmediatamente.

*Procedimiento para delineamiento rectas paralelas (3 x 3 o 2 x 2)*

Distribuir, en tubos idénticos, volumen igual de cada una de las soluciones del estándar y de la muestra. Añadir para cada tubo volumen igual de caldo nutriente inoculado, por ejemplo, 1 ml de solución con antibiótico y 9 ml del medio (0,1 ml de solución para gramicidina y tirotricina). Por lo menos dieciocho tubos son usados para ensayo por rectas paralelas 3 x 3 y doce tubos para ensayo por rectas paralelas 2 x 2. El número de réplicas por concentración en cada ensayo debe ser suficiente para asegurar la precisión estadística especificada en la monografía, sin embargo se debe realizar, como mínimo, tres tubos para cada concentración del estándar y de la muestra. Puede ser necesario realizar el ensayo con número mayor de dosis estándar y de la muestra o repetirlo y combinar los resultados para obtener la precisión requerida. Las dosis usadas deben estar en progresión geométrica.

*Procedimiento para delineamiento curva 5 x 1*

Para el delineamiento 5 x 1, prepare diluciones que representen 5 concentraciones del estándar ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$  y

$P_5$ ) y 1 concentración de la muestra ( $A_3$ ). La solución de la muestra debe corresponder a la misma dilución del estándar que corresponde a la concentración media de la curva ( $P_3$ ). Emplear, por lo menos tres tubos para cada concentración del estándar y de la muestra. De esa forma, por lo menos dieciocho tubos son necesarios en el ensayo.

Después de realizar los procedimientos adecuados para el delineamiento escogido, inocular el medio de cultivo recomendado con cantidad conocida de suspensión del microorganismo sensible al antibiótico, de modo que, después de incubación de aproximadamente cuatro horas, la turbidez bacteriana en el medio sea de fácil medida y mantenga correlación entre la dosis y la respuesta de la sustancia en análisis.

En la **Tabla 1** están descritos los antibióticos a ser analizados por el método turbidimétrico con descripción del microorganismo, medio de cultivo, volumen de inóculo estandarizado sugerido como referencia inicial y temperatura de incubación para cada caso.

Incubar en baño maría, por 3 a 4 horas, tomando la precaución de asegurar temperatura adecuada y uniforme para todos los tubos. El tiempo adecuado debe ser verificado por la observación del crecimiento en el tubo conteniendo a concentración media ( $P_3$ ) utilizada en el ensayo. Después del período de incubación, interrumpir la multiplicación de los microorganismos por la adición de 0,5 ml de solución de formaldehído a 12 por ciento, en cada tubo.

Determinar la absorbancia para cada tubo en espectrofotómetro, en el largo de onda de 530 nm. Estandarizar el aparato en absorbancia por medio del blanco conteniendo la misma cantidad de caldo nutriente y formaldehído, a 12%.

En ensayos de rutina, cuando la linealidad del sistema fue comprobada por número adecuado de experimentos usando el ensayo de tres puntos (3 x 3), puede ser empleado ensayo de dos puntos (2 x 2). Será aceptado, igualmente, el delineamiento 5 x 1, adoptado oficialmente por otras farmacopeas de uso internacional corriente. Todavía, en caso de controversia o litigio, debe ser aplicado el ensayo de tres puntos.

#### *Cálculo de la potencia*

A partir de los resultados, calcular la potencia de la muestra y sus límites de confianza, por medio de método estadístico estándar descrito en *Procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos – ensayos indirectos cuantitativos (8.5)*.

#### *Intervalo de confianza (IC)*

La precisión de un ensayo es verificada por el intervalo de confianza el cual garantiza que la verdadera potencia está dentro de los límites especificados.

En la ausencia del IC en la monografía del producto, es recomendable límites de confianza superior e inferior de 5% o menos, con relación a la potencia calculada, siendo aceptados valores límites de hasta 10%.

Tabla 1 - Ensayo microbiológico por turbidimetría.

<i>Antibiótico</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Caldo nutriente</i>	<i>Volumen del inóculo ml/100 ml</i>	<i>Temperatura incubación</i>
Amicacina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Kanamicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,2	37
Candidicina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	13	0,2	28
Capreomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3	0,05	37
Cicloserina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,4	37
Cloranfenicol	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	3	0,7	37
Clortetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	36
Demeclociclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Dihidroestreptomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3	0,1	37
Doxiciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Espectinomicina	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10536)	3	0,1	37
Estreptomicina	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	3	0,1	37
Gramicidina	<i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541)	3	1,0	37
Lincomicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Minociclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,2	37
Oxitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Rolitetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Tetraciclina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,1	37
Tirotricina	<i>Enterococcus hirae</i> (ATCC 10541)	3	1,0	37
Tobramicina	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538p)	3	0,15	37

Tabla 2 - Tabla 2 Preparación de la solución estándar y de la curva estándar- Método turbidimétrico

<i>Antibiótico</i>	<i>a. Condición de disecación (5.5.3.3)</i>	<i>b. Solvente inicial</i>	<i>c. Solución para dilución (5.5.3.3)</i>	<i>d. Concentración de la solución de trabajo (/ml)</i>	<i>e. Plazo de validez de la solución bajo refrigeración</i>	<i>f. Solución para dilución (5.5.3.3)</i>	<i>g. Banda de concentración (/ml)</i>
Amicacina	8	-	Agua estéril	1 mg	14 días	Agua estéril	6 a 14 µg
Kanamicina	8	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	6 a 14 µg
Candimicina I	6	-	Dimetilsulfóxido	1 mg	Usar en el mismo día	Agua estéril	0,02 a 0,14 µg <sup>3</sup>
Capreomicina	5	-	Agua estéril	1 mg	7 días	Agua estéril	60 a 180 µg
Cicloserina	1	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	20 a 80 µg
Cloranfenicol	8	10 000 µg por ml en alcohol etílico	1	1 mg	30 días	1	1 a 4 µg
Clortetraciclina	8	-	HCl 0,01 M	1 mg	4 días	Agua estéril	0,03 a 0,09 µg
Demeclociclina	1	-	HCl 0,1 M	1 mg	4 días	Agua estéril	0,06 a 0,14 µg
Dihidroestreptomicina	5	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	20 a 60 µg
Doxiciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	5 días	Agua estéril	0,06 a 0,14 µg
Espectinomomicina	8	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	20 a 60 µg
Estreptomomicina	1	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	20 a 60 µg
Gramicidina	1	-	Alcohol etílico 95%	1 mg	30 días	Alcohol etílico 95%	0,02 a 0,08 µg
Lincomicina	8	-	Agua estéril	1 mg	30 días	Agua estéril	0,3 a 0,8 µg
Minociclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	2 días	Agua estéril	0,06 a 0,12 µg
Oxitetraciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	4 días	Agua estéril	0,16 a 0,32 µg
Rolitetraciclina	1	-	Agua estéril	1 mg	1 día	Agua estéril	0,16 a 0,32 µg
Tetraciclina	8	-	HCl 0,1 M	1 mg	1 día	Agua estéril	0,16 a 0,32 µg
Tirotricina <sup>2</sup>	1	-	Alcohol etílico 95%	1 mg	30 días	Alcohol etílico 95%	0,02 a 0,08 µg
Tobramicina	8	-	Agua estéril	1 mg	14 días	Agua estéril	1 a 4 µg

<sup>1</sup> No ensaio da candidicina, empregar equipamento estéril em todas as etapas.<sup>2</sup> Para o ensaio de tirotricina, empregar a solução padrão de trabalho e a curva dose-resposta da gramacidina.<sup>3</sup> Preparar, simultaneamente, as soluções padrão e amostra.



### 5.5.3.4 PRUEBA DE EFICACIA ANTIMICROBIANA

#### OBJETIVO

Asegurar, la eficacia de conservantes antimicrobianos añadidos a los productos farmacéuticos.

Conservantes antimicrobianos son sustancias adicionales en formas farmacéuticas no estériles con la finalidad de protegerlas de cualquier crecimiento microbiano. Para las formas farmacéuticas estériles, envasadas en embalajes de dosis múltiples, los conservantes antimicrobianos son añadidos para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes durante el uso repetido de las dosis individuales.

La cantidad de conservante utilizada en una formulación deberá ser la mínima necesaria para la protección del producto sin perjudicar al paciente o consumidor.

La eficacia antimicrobiana, sea ella inherente al producto o debido a la adición de conservantes, precisa ser demostrada para productos tópicos múltiple-dosis; productos orales; oftálmicos; otológicos; nasales; fluidos de diálisis; irrigación, etc.

La prueba y los criterios establecidos se aplican al producto en la forma como es encontrado en el mercado.

#### MICROORGANISMOS UTILIZADOS

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus niger* ATCC 16404
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Los microorganismos utilizados en la prueba no deben tener más que 5 pasajes contados a partir del cultivo ATCC original. Un paso es definido como la transferencia de un cultivo establecido para un medio de cultivo estéril.

En el caso de cultivos mantenidos por técnicas de congelamiento, cada ciclo de congelamiento; descongelamiento y reactivación es considerado un paso.

Los cultivos liofilizados recibidos del ATCC deben ser reconstituidos conforme las instrucciones suministradas con el material.

Recuperar el material en medio de cultivo líquido o sólido. Las condiciones para la preparación del cultivo están registradas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Condiciones para reconstitución de las cepas.**

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Temperatura de incubación</i>	<i>Tiempo de incubación del inóculo</i>	<i>Tiempo de incubación para a recuperación microbiana</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Soybean-Casein Digest Broth / Soybean-Casein Digest Agar	32,5 °C ± 2,50C	18 – 24 horas	3 – 5 días
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Soybean-Casein Digest Broth / Soybean-Casein Digest Agar	32,5 °C ± 2,50C	18 – 24 horas	3 – 5 días
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Soybean-Casein Digest Broth / Soybean-Casein Digest Agar	32,5 °C ± 2,50C	18 – 24 horas	3 – 5 días
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud Dextrosa Broth / Sabouraud Dextrosa Agar	22,5 °C ± 2,50C	44 – 52 horas	3 – 5 días
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	Sabouraud Dextrosa Broth / Sabouraud Agar	22,5 °C ± 2,50C	6 – 10 días	3 – 7 días

Si la recuperación del microorganismo se da en medio de cultivo líquido, después de incubación, centrifugar y descartar el sobrenadante. Suspender el sedimento con una dilución 1/20 del medio de cultivo de mantenimiento estéril y añadir un volumen igual de solución de glicerol estéril 20% v/v en agua.

Si la recuperación del microorganismo se da en medio de cultivo sólido, transferir el crecimiento de la superficie para el medio de cultivo de mantenimiento líquido estéril, añadiéndole 10% de glicerol estéril.

En ambos los casos, dispensar pequeñas alícuotas de la suspensión en tubos criogénicos estériles, apropiados para congelamiento de microorganismos.

Estocar los tubos criogénicos en nitrógeno líquido o ultra-freezer (no más que -50 °C).

Esa cultivo stock puede ser utilizado para inocular una serie de cultivo de trabajo.

## MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Todos los medios de cultivo utilizados en la prueba deben ser probados cuanto a la capacidad de crecimiento

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO

A partir del cultivo stock, inocular la superficie del medio de cultivo sólido especificado en la **Tabla 1**.

Para recolectar el crecimiento de bacterias y levaduras, utilizar solución salina estéril. Recoger la suspensión obtenida en un tubo o frasco estéril apropiado y añadir cantidad suficiente de solución salina estéril para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Para recolectar el crecimiento de *A. niger*, utilizar solución salina estéril conteniendo 0,05% de polisorbato 80. Recoger la suspensión obtenida en un tubo o frasco estéril apropiado y añadir cantidad suficiente de solución salina estéril para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Alternativamente, el cultivo stock puede ser inoculado en medio líquido (**Tabla 1**), incubado y posteriormente centrifugado. Descartar el sobrenadante y suspender el sedimento con cantidad suficiente de solución salina estéril para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

Refrigerar las suspensiones si no se utilizarán en un período de 2 horas.

Determinar el número de UFC's /ml de cada suspensión por turbidimetría o conteo en placa, verificando las condiciones de tiempo y temperatura de incubación y el tiempo de incubación para la recuperación microbiana descritas en la **Tabla 1**, con el objetivo de confirmar el conteo en UFC inicial. Esos valores servirán para calibrar el tamaño del inóculo a ser utilizado en las contaminaciones del producto en prueba.

La suspensión de bacterias y levaduras deberá ser utilizada en 24 horas. La suspensión de mohos puede ser utilizada en hasta 7 días si mantenida bajo refrigeración.

### PROCEDIMIENTO

Cuando el tipo de embalaje permita la introducción de la suspensión de microorganismos y cuando su contenido sea suficiente para la realización de todas las etapas, realizar la prueba en 5 embalajes originales del producto a ser probado. Caso contrario, transferir el contenido de uno o más embalajes originales para un frasco con tapa, previamente

esterilizado y de tamaño adecuado para contener la cantidad necesaria de muestra para la realización de todas las etapas de la prueba.

Inocular cada embalaje original o frasco con tapa estéril, con cada uno de los microorganismos requeridos.

La concentración del inóculo utilizado debe ser suficiente para obtener una concentración final en el producto entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC's / g o ml – aplicable a las categorías 1, 2 y 3 (ver **Tabla 2** – columna “Tipo de Producto”).

Para la categoría 4, la concentración del inóculo deberá ser suficiente para obtener una concentración final en el producto entre  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^4$  UFC's / g o ml.

El volumen de inóculo a ser introducido debe estar entre 0,5% y 1,0% en relación al volumen (muestra líquida) o peso (muestra sólida o semisólida) total del producto.

Incubar las muestras inoculadas en estufa con temperatura entre  $22,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2,5^\circ\text{C}$ .

Muestrear cada embalaje o frasco con muestra inoculada en intervalos de 7, 14 y 28 días.

Determinar por el método de plaqueamiento, el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC's) de cada muestra, en el tiempo inicial y en cada intervalo de tiempo especificado.

Un agente neutralizante específico para el(los) preservativo(s) presentes en la formulación del producto, determinado en el estudio de validación, debe(n) ser incorporado(s) en las placas de conteo o en la dilución de la muestra preparada para el plaqueamiento.

Calcular la concentración de cada microorganismo (UFC/ml) presente en la muestra, comparar con el conteo en el tiempo inicial y expresar el cambio en términos de reducciones logarítmicas.

### CATEGORÍA DE PRODUCTO Y CRITERIOS PARA LA EFICACIA ANTIMICROBIANA

Para el propósito con la prueba, los productos fueron separados en 4 categorías conforme la **Tabla 2**.

Los requisitos para la eficacia antimicrobiana del conservante son cumplidos se atienden a los criterios establecidos para cada categoría conforme **Tabla 2**.

Tabla 2 - Tabla 2 – Categorías de productos y criterios para la eficacia antimicrobiana.

<i>Tipo de producto</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>7º día</i>	<i>14º día</i>	<i>28º día</i>
<b>Categoría 1</b> – Inyectables, otros parenterales incluyendo emulsiones, productos otológicos, nasales estériles, oftálmicos constituidos de base o vehículo acuoso	Bacterias	Debe haber reducción de 1 log del n° de UFC's inicialmente inoculados	Debe haber reducción de 3 logs del n° de UFC's inicialmente inoculados	El conteo no debe aumentar en relación al 14º día
	Mohos y Levaduras	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculado	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculado
<b>Categoría 2</b> – Productos de uso tópico. constituidos de base, o vehículo acuoso, productos nasales no estériles y emulsiones, incluyendo aquellos aplicados en membranas mucosas	Bacterias		Debe haber reducción de 2 logs del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del conteo en relación al 14º día
	Mohos y Levaduras		No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados
<b>Categoría 3</b> – Productos orales constituidos de base o vehículo acuoso, excepto antiácido	Bacterias		No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados
	Mohos y Levaduras		No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados
<b>Categoría 4</b> – Antiácidos constituido de base acuosa	Bacterias		No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados
	Mohos y Levaduras		No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados	No debe haber aumento del n° de UFC's inicialmente inoculados

Nota. El "no aumento" del n° de UFC's inoculados es definido como no más que  $0,5 \log_{10}$  de unidades mayores que el valor previamente obtenido.

### 5.5.3.5 MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN PRUEBAS Y ENSAYOS

Los microorganismos relacionados en la **Tabla 1** son indicados para ensayos y pruebas preconizados en la farmacopea.

Principales proveedores de cultivos de microorganismos:

**ATCC** American Type Culture Collection  
<http://www.atcc.org>

**CIP** Collection de l'Institut Pasteur  
<http://www.pasteur.fr/ip/index.jsp>

**IMI** United Kingdom National Culture Collection (UKNCC)  
<http://www.cabi.org> Email: [cultures@cabi.org](mailto:cultures@cabi.org)

**INCQS** Instituto Nacional de Control de Calidad en Salud Departamento de Microbiologia – Laboratorio de Materiales de Referencia  
Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21.040-900  
<http://www.incqs.fiocruz.br>  
Email: [coleção@incqs.fiocruz.br](mailto:coleção@incqs.fiocruz.br)

**NCIMB** National Collection of Industrial Bacteria  
<http://www.ncimb.com>  
Email: [enquiries@ncimb.com](mailto:enquiries@ncimb.com)

**NBRC** NITE Biological Resource Center  
<http://www.nbrc.nite.go.jp>  
Email: [collection@nbrc.nite.go.jp](mailto:collection@nbrc.nite.go.jp)

**NCPF** National Collection of Pathogenic Fungi  
<http://www.hpacultures.or.uk>  
Email: [hpacultures@hpa.org.uk](mailto:hpacultures@hpa.org.uk)

**NCTC** National Collection of Type Cultures  
<http://www.hpacultures.or.uk>  
Email: [hpacultures@hpa.org.uk](mailto:hpacultures@hpa.org.uk)

**NCYC** National Collection of Yeast Cultures  
<http://www.ncyc.co.uk>  
Email: [ncyc@ncyc.co.uk](mailto:ncyc@ncyc.co.uk)

Tabla 1 - Microorganismos empleados en los pruebas y ensayos

Microorganismo	ATCC	CIP	INCOS	NBRC	NCIMB	NCTC	NCPF	NCYC	IMI	IP
<b>Mohos y levaduras</b>										
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	-	-	9455	-	-	2275	-	149007	1483.83
<i>Candida albicans</i>	10231	-	40006	1594	-	-	3179	1363	-	48.72
<i>Microrporrum gypse un</i>	14683	-	40005	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	-	40001	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9763	1432.83	40002	-	-	10716	-	87	-	-
<b>Bacterias</b>										
<i>Bacillus atrophaens</i>	9372	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus var. mycoides</i>	11778	64.52	003	-	-	10230	-	-	-	-
<i>Bacillus pumilis</i>	27142	77.25	-	-	10692	10327	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	52.62	001	3134	8054	10400	-	-	-	-
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	103717	059	-	-	11154	-	-	-	-
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	53.157	023	-	-	8347	-	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	19404	79.3	-	-	532	532	-	-	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	-	060	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus hirae</i>	10541	-	019	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	8739	53.126	-	3972	8545	12923	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10536	54.127	031	-	8879	10418	-	-	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	7953	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	53.153	030	-	9111	7427	-	-	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>	9341	53.65	010	-	-	8340	-	-	-	-
<i>Micrococcus Intens</i>	7468	-	009	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus Intens</i>	10240	53.160	011	-	8166	7743	-	-	-	-
Micrococcus luteus resistente a neomicina	14452	-	012	-	10418	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	607	-	021	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peudomonas aeruginosa</i>	9027	82.118	-	13275	8626	-	-	-	-	-
<i>Peudomonas aeruginosa</i>	25619	-	026	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonela enterica subsp entérica</i>	-	80.39	-	100797	-	6017	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538p	53.156	013	-	8625	7447	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	4.83	039	13276	9518	10788	-	-	-	-
<i>Staphylococcus epidermides</i>	12228	68.21	016	-	8853	-	-	-	-	-



## 5.6 MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Los métodos inmunoquímicos se basan en una conexión selectiva, reversible y no covalente entre antígenos y anticuerpos. Esos métodos son utilizados para detectar o analizar antígenos y anticuerpos. La detección o dosificación del complejo antígeno-anticuerpo puede ser realizada por varias técnicas. Los requisitos de este método se aplican a los métodos inmunoquímicos utilizados, en el caso de reactivos marcados o no. Los resultados de los métodos inmunoquímicos dependen de las condiciones de la experiencia; de la naturaleza y de la calidad de los reactivos empleados. Es esencial calcular los componentes de un ensayo inmunológico y utilizar Preparaciones Internacionales de Referencia para Inmunoanálisis siempre que disponibles. Los reactivos necesarios a muchos de los métodos inmunoquímicos están disponibles en el mercado bajo la forma de conjuntos que incluyen reactivos (especialmente el antígeno o el anticuerpo) y los materiales destinados a la evaluación *in vitro* de una determinada sustancia; así como las instrucciones necesarias para su correcta utilización. Los conjuntos deben ser utilizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante, siendo importante asegurar que ellos son adecuados al análisis de la muestra, especialmente, en lo que se refiere a la selectividad y sensibilidad. Los requisitos relativos a los conjuntos para inmunoanálisis son suministrados por la Organización Mundial de Salud (Serie de Reports Techniques 658, 1981).

### MÉTODOS EN QUE SON UTILIZADOS ANTÍGENOS, O ANTICUERPOS MARCADOS

Las técnicas que utilizan sustancias marcadas deben emplear marcadores apropiados, tales como enzimas y radioisótopos. Cuando el marcador es un radioisótopo llamamos a la técnica de *ensayo radioinmunológico*. Todas las técnicas realizadas con sustancias radioactivas deben ser hechas en conformidad con la legislación nacional e internacional para protección contra el riesgo de radiaciones.

### MÉTODOS EN QUE SON UTILIZADOS ANTÍGENOS, O ANTICUERPOS NO MARCADOS

*Métodos de Inmunoprecipitación.* Los métodos de inmunoprecipitación incluyen las reacciones de floculación y de precipitación. Cuando una solución de un antígeno es mezclada a los anticuerpos correspondientes, en condiciones adecuadas, los reactivos forman agregados floculantes o precipitantes. La relación entre las cantidades de los reactivos correspondientes al más corto tiempo de floculación, o a la precipitación más acentuada se llama relación óptima. Esta es generalmente obtenida en presencia de cantidades equivalentes de antígeno y anticuerpo. La inmunoprecipitación puede ser evaluada, visualmente, o por la medición de la dispersión de la luz.

*Métodos Inmunoquímicos Turbidimétricos.* Puede obtenerse un aumento de la sensibilidad del método mediante el uso de partículas revestidas de anticuerpos, o de antígenos (por ejemplo, látex). En los métodos de floculación se utilizan, generalmente, diluciones sucesivas de uno de

los reactivos mientras que en el método de inmunodifusión (ID), la dilución es obtenida por difusión en un gel. Son obtenidos gradientes de concentración de uno, o dos reactivos para crear en el gel zonas en las cuales las proporciones de reactivos favorecen la precipitación. Mientras que los métodos de floculación son realizados en tubos de ensayo, los métodos de inmunodifusión pueden ser realizados usándose diferentes soportes, como: probetas, placas, láminas, tinas, o cámaras. Se llama *inmunoprecipitación simple* cuando el antígeno reacciona apenas con su anticuerpo correspondiente; se dice *compleja* cuando se utilizan varios reactivos serológicamente aparentados; y *múltiples*, cuando se utilizan varios reactivos serológicamente no aparentados. En el método de difusión simple es establecido un gradiente de concentración solamente para uno de los reactivos difundidos a partir de una fuente exterior para dentro del gel que contiene el reactivo correspondiente a una concentración relativamente baja.

*Inmuno Difusión Radial Simple (IDRS).* Es una técnica de inmunodifusión simple cuantitativa. Cuando se establece el equilibrio entre los reactivos externo e interno, el área de la zona circular de precipitación, originada a partir del reactivo externo, es directamente proporcional a la concentración del antígeno aplicado e inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos en el gel.

*Métodos de Difusión Doble.* Los gradientes de concentración son establecidos para dos reactivos. Tanto el antígeno como el anticuerpo difunden a partir de locales separados en un gel inicialmente neutro bajo el punto de vista inmunológico. Los métodos de inmunodifusión doble son utilizados para comparar, cualitativamente, varios antígenos con relación a un anticuerpo apropiado o viceversa. La comparación está basada en la presencia o ausencia de interacción entre los estándares de precipitación. Es posible distinguir reacciones de identidad, de no identidad, o de identidad parcial entre antígenos y anticuerpos.

*Métodos de Inmunolectroforesis.* La Inmunolectroforesis (IE) es una técnica cualitativa de dos métodos asociados: electroforesis en gel, seguida de inmunodifusión. La Inmunolectroforesis cruzada es una modificación de la Inmunolectroforesis (IE), adaptada al análisis cualitativo y cuantitativo. En un primer momento es realizada una electroforesis clásica. Una banda del gel que contiene las fracciones a ser analizadas, separadas por la electroforesis, es posteriormente recortada y transferida a la otra placa. Esa nueva placa es entonces sujeta a una segunda electroforesis en una dirección perpendicular a la banda anterior, mediante el uso de un gel que contiene un tenor relativamente bajo en anticuerpos correspondientes al antígeno. Para una dada concentración de anticuerpos y espesor del gel, la relación entre el área de cada uno de los picos de precipitación y la cantidad del antígeno correspondiente es lineal.

*Método Electroinmunológico o Inmunolectroforesis Fusiforme.* El Ensayo Electroinmunológico muchas veces referido como Inmunolectroforesis Fusiforme es un método rápido para analizar los antígenos cuya carga difiere del anticuerpo y viceversa. La electroforesis del antígeno a ser analizado es realizada en un gel que debe contener

una concentración relativamente, inferior a la del anticuerpo correspondiente. La sustancia a ser analizada y las diluciones del antígeno usado para la calibración deben ser colocadas en las diferentes cavidades del gel. Durante la electroforesis se forman zonas de precipitación fusiformes que migran a partir de las cavidades. Cuando el antígeno ya no está en exceso, la línea de precipitación se torna estacionaria. Para una dada concentración de anticuerpos, la relación entre la distancia recorrida por la línea de precipitación y la cantidad de antígeno aplicada es lineal.

*Contrainmunolectroforesis.* Es un método cuantitativo rápido que posibilita establecer gradientes de concentración de antígenos y anticuerpos externos, en un campo eléctrico dependiente de sus diferentes cargas. Las diluciones del estándar y de la muestra deben ser organizadas en una fila de cavidades en el gel. Una cantidad conocida de reactivo correspondiente es colocada en una fila opuesta de cavidades. El título de la sustancia a ser analizada puede ser considerado como la mayor dilución en que se observa una línea de precipitación. Existen variantes de la inmunolectroforesis cruzada y del inmunolectroanálisis. Otras técnicas asocian la separación del antígeno por el tamaño molecular y propiedades serológicas. La visualización y caracterización de las líneas de inmunoprecipitación pueden ser realizadas por coloraciones selectivas, o no selectivas, por fluorescencia, por marcadores enzimáticos, marcadores isotópicos, o por otras técnicas apropiadas. Las coloraciones selectivas son, habitualmente, utilizadas para la caracterización de sustancias no proteicas en los precipitados.

En los geles translúcidos, tales como agar o agarosa, la línea de precipitación se torna claramente visible en el gel, siempre que la concentración de cada uno de los reactivos sea apropiada.

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

### *Criterios de validación.*

Un método inmunoquímico cuantitativo sólo será válido si:

- el antígeno o el anticuerpo no discriminen, significativamente, del estándar la sustancia en análisis. En el caso de un reactivo marcado, el reactivo correspondiente no debe distinguir, de manera significativa, la sustancia marcada de la no marcada;
- el método no sea influenciado por la matriz del ensayo, eso es, todos los componentes de la muestra en análisis, o sus excipientes, que puedan variar de una muestra a otra. Esos pueden incluir altas concentraciones de otras proteínas, sales, conservantes en concentraciones elevadas o ejercer una actividad de contaminación proteolítica;
- el límite de cuantificación esté abajo de los criterios de aceptabilidad indicados en la monografía individual;
- la exactitud del análisis sea tal que la variación de los resultados corresponda a las exigencias establecidas en la monografía individual;
- no ocurren errores sistemáticos ligados al orden en que el ensayo es realizado.

### *Métodos de validación*

Para que esos criterios sean verificados, la validación incluye los siguientes elementos:

- el ensayo debe ser efectuado por lo menos en triplicado;
- el ensayo debe incluir por lo menos tres diluciones diferentes del estándar y tres diluciones diferentes de la muestra con supuesta actividad semejante a la de la preparación estándar;
- la distribución de las muestras debe ser hecha casualmente;
- se la muestra está presente en el suero, o se está mezclada con otros constituyentes, el estándar debe ser preparado del mismo modo;
- el ensayo debe incluir una medida de conexión no específica del reactivo marcado;
- para ensayos radioinmunológicos con desplazamiento:
  - debe ser determinada la conexión máxima (desplazamiento cero);
  - las diluciones deben cubrir la gama completa de respuestas para los valores más próximos de la conexión no específica a la conexión máxima, de preferencia tanto para la muestra como para el estándar.

## CÁLCULO ESTADÍSTICO

Para análisis de los resultados, las curvas de respuesta de la muestra y del estándar pueden ser analizados por los procedimientos estadísticos aplicables a los ensayos biológicos (8). El no paralelismo significativo indica que antígeno o anticuerpo distingue la muestra del estándar e implica la invalidación del resultado. En los inmunoanálisis con desplazamiento, los valores de conexión no específica y del desplazamiento máximo a una alta concentración de la muestra o del estándar no deben ser significativamente diferentes. Las diferencias podrán reflejar efectos debido a la matriz, ya sea por inhibición de la conexión o degradación del marcador.

## 5.7 MÉTODOS FÍSICOS APLICADOS A MATERIALES QUIRÚRGICOS Y HOSPITALARIOS

### 5.7.1 RESISTENCIA A LA TRACCIÓN

La determinación de la resistencia a la tracción de las suturas quirúrgicas debe ser realizada en ambiente con humedad y temperatura constantes. La humedad relativa debe ser de 60 – 80 por ciento y la temperatura 20 – 25 °C.

#### EQUIPO

En la determinación de la resistencia a la tracción de las suturas quirúrgicas el equipo debe poseer motor eléctrico

que aplique a la sutura en análisis tasa de carga constante por unidad de tiempo.

#### EQUIPO DE PLANO INCLINADO

##### Especificaciones

Los prendedores deben ser del tipo de rollo con superficies planas para la fijación de las suturas. El diámetro del rollo debe ser de 1,8 cm a 1,9 cm y las superficies planas deben tener, en el mínimo, 2,5 cm de largo. La distancia entre los prendedores debe ser de 1,25 cm. El rozamiento del carro de la carga debe permitir que la pena inscritora deslice hasta 2,5% de la capacidad de registro cuando no hubiere muestra.

La velocidad de inclinación del plano debe ser regulada para ser necesarios 20 segundos a partir del inicio de la prueba para que la inclinación máxima de 30 ° sea alcanzada.

#### PROCEDIMIENTO

5

Determinar la resistencia a la tracción de las suturas quirúrgicas con los mismos cuidados preliminares exigidos para la prueba de determinación del diámetro. Ajustar el peso del carro para que, en el momento en que ocurre la ruptura, la posición de la pena inscritora esté entre 20 y 80% de la capacidad de registro.

##### Tracción directa

Colocar la sutura en el equipo prendiendo una de las extremidades y pasando la extremidad libre por el otro prendedor. Aplicar en esa última una tensión equivalente a 1/4 de la resistencia mínima exigida para la sutura en prueba y apretar el prendedor. Ajustar la pena inscritora en el punto cero del gráfico y ligar el equipo; anotar la lectura y evaluar la resistencia. Eliminar la determinación toda vez que la sutura se rompa en punto próximo de los prendedores.

##### Tracción sobre-nudo

Determinar la resistencia a la tracción sobre-nudo quirúrgico ejecutando en la sutura a prueba un nudo de cirujano (**Figura 1**) sobre un segmento de 5 cm de largo de un tubo de caucho flexible de 6,5 mm de diámetro interno y 8,1 mm de diámetro externo. Colocar la sutura en el equipo de modo que el nudo quede equidistante de los prendedores. Ajustar la pena inscritora en el punto cero del gráfico y encender el equipo; anotar la lectura y evaluar la resistencia. Eliminar la determinación toda vez que la sutura se rompa en punto próximo de los prendedores.

##### Ejecución del nudo quirúrgico

Para hacer un nudo quirúrgico, proceder conforme a continuación:

- agarrar las puntas de la sutura quirúrgica, una en cada mano;
- colocar la punta que se encuentra en la mano izquierda sobre la punta de la mano derecha formando un círculo;
- introducir la punta superpuesta en el círculo;
- repetir la operación;
- prender en el tubo de caucho flexible;
- colocar a punta del lado derecho sobre a punta del izquierdo formando un segundo círculo;
- cerrar el nudo.

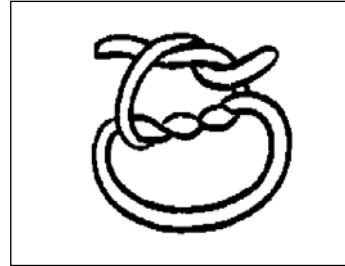


Figura 1 - Nudo quirúrgico.

##### Resultados

Los resultados deben atender a lo descrito en las **Tablas 1, 2 y 3** de las respectivas monografías.

## 5.7.2 DIÁMETRO DE SUTURAS

La determinación del diámetro de las suturas quirúrgicas debe ser realizada en ambiente con humedad y temperatura constante. La humedad relativa debe ser de 60 – 80 por ciento y la temperatura entre 20 – 25 °C. Los pesos para pre-tensión para determinación de diámetro de hilos de multifilamentos están registrados en la **Tabla 1**.

#### APARATOS

El reloj comparador utilizado para determinar el diámetro de suturas es del tipo “peso muerto”, mecánico o electrónico y está equipado con un mostrador de lectura directa, digital o de salida de lectura impresa. La resolución de escala es de por lo menos 0,002 mm y la zapata de apoyo debe tener aproximadamente 12,70 mm ± 0,02 mm de diámetro. La zapata de apoyo y las partes móviles conectadas a ella deben aplicar una carga total de 210 g ± 3 g a la muestra.

Para suturas de número quirúrgico 9-0 y menores, retirar el peso adicional de la zapata de manera que el peso total sobre la muestra no exceda 60 g.

La zapata y la base del equipo deben presentar paralelismo y planicidad de 0,005 mm.

**Tabla 1 - Pesos para pré-tensão para determinação de diâmetro de fios multifilamentares.**

Diámetro		Masa (g)	
Número conforme sistema métrico	Número quirúrgico	Suturas absorbibles	Suturas no absorbibles
0,01	12-0	-	-
0,1	11-0	-	-
0,2	10-0	12,5	12
0,3	9-0	25	27
0,4	8-0	35	38
0,5	7-0	70	69
0,7	6-0	125	125
1,0	5-0	340	250
1,5	4-0	475	375
2	3-0	885	600
3	2-0	1340	900
3,5	0	1950	1350
4	1	2540	1700
5	2	3175	2200
6	3 y 4	3645	3050
7	5	-	3850
8	6	-	4550
9	7	-	5650

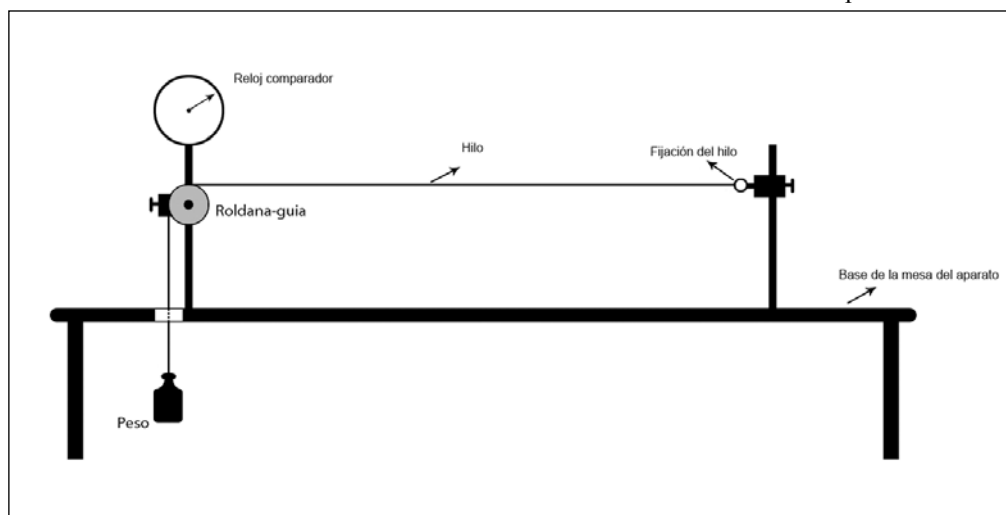
**PROCEDIMIENTO** El diámetro de las suturas quirúrgicas de origen natural, envasadas sin líquido conservante es determinado después de su permanencia durante 4 horas, como mínimo, en atmósfera con la humedad y temperatura anteriormente especificadas. Las suturas envasadas con líquido conservante son sometidas a prueba, inmediatamente, después de eliminación del líquido sin secado previo.

#### Suturas de multifilamentos

Para la determinación del diámetro de suturas quirúrgicas de multifilamentos, las medidas deben estar hechas

mantiéndolas tensionadas con auxilio de un sistema de polea fija a una mesa, conforme la **Figura 1** y procediendo de la siguiente forma:

- fijar una de las puntas de la sutura a través de un gancho de fijación;
- en la otra punta libre, colocar un peso con masa de acuerdo con a **Tabla 1**. Obs. se debe tomar cuidado para no distorsionar la sutura;
- posicionar la sutura en el reloj comparador de modo que pase por el centro de la base circular y, con auxilio de la palanca, bajar el pie de la barra móvil lentamente hasta que toda la carga sea aplicada;
- medir el diámetro de la sutura en tres puntos, aproximadamente a 1/4, 1/2 y 3/4 de su largo total;
- en el caso de suturas trenzadas de diámetros superiores al número quirúrgico 3-0, efectuar dos medidas perpendiculares entre sí en cada punto.



**Figura 1 - Modelo de mesa sugerida para la medición de diámetro de suturas de multifilamentos.**

*Suturas de monofilamentos*

Para determinación del diámetro de las suturas de monofilamentos, se debe proceder de la siguiente forma:

- efectuar la medida en suturas en la forma seca o con fluido, inmediatamente, después de su eliminación del embalaje sin secado previo;
- posicionar la sutura en el reloj comparador, entre la base fija y la base de la traba móvil;
- bajar la palanca lentamente de modo que toda la carga quede bajo la sutura;
- medir el diámetro de la sutura en tres puntos, aproximadamente a 1/4, 1/2 y 3/4 de su largo total.

*Resultado*

El promedio de las medidas realizadas en las suturas debe estar comprendido entre los límites de las tablas 1, 2, o 3 de las respectivas monografías.

Los valores individuales deben estar comprendidos entre las medias de los límites para los números quirúrgicos, inmediatamente, inferior y posterior al analizado.

### 5.7.3 RESISTENCIA A FIJAR EL HILO DE LA AGUJA

La finalidad de ese ensayo es evaluar la fijación de los hilos para suturas en agujas atraumáticas.

## APARATOS

Utilizar una máquina universal de tracción equipada con motor eléctrico que aplique tasa de carga constante por unidad de tiempo.

La célula de carga utilizada debe ser compatible con la fuerza de tracción necesaria para la verificación.

## PROCEDIMIENTO

Fijar la aguja en uno de los prendedores del equipo de modo que la parte fija quede libre y alineada con la dirección en que se va a aplicar la fuerza por el prendedor móvil. Medir la fuerza requerida para destrabar el hilo de la sutura de la aguja.

*Resultados*

Los resultados deben ser evaluados considerando a **Tabla 1**.

*Nota:* la evaluación a resistencia a fijar el hilo debe considerar simultáneamente los límites individuales para los hilos y los límites para el promedio de cinco hilos del lote analizado. En el caso que uno de los resultados de límite individual, y no más de que uno, no satisfaga los límites mínimos para valores individuales, repetir el ensayo con diez hilos más. El requisito del ensayo será atendido si ninguna de las 10 muestras está abajo de los límites descritos.

**Tabla 1 - Límites de resistencia a fijar el hilo de la aguja en relación al número quirúrgico.**

Número quirúrgico	Número conforme sistema métrico			Límites mínimos de resistencia			
	Absorbible		No absorbible	Promedio		Individual	
	Natural	Sintética		kgf	N	kgf	N
11-0	-	0,1	0,1	0,007	0,07	0,005	0,05
10-0	-	0,2	0,2	0,014	0,14	0,010	0,10
9-0	0,4	0,3	0,3	0,021	0,21	0,015	0,15
8-0	0,5	0,4	0,4	0,05	0,49	0,025	0,25
7-0	0,7	0,5	0,5	0,08	0,78	0,045	0,44
6-0	1	0,7	0,7	0,17	1,67	0,08	0,78
5-0	1,5	1,0	1,0	0,23	2,26	0,11	1,08
4-0	2	1,5	1,5	0,45	4,41	0,23	2,26
3-0	3	2	2	0,68	6,67	0,34	3,33
2-0	3,5	3	3	1,10	10,79	0,45	4,41
0	4	3,5	3,5	1,50	14,71	0,45	4,41
1	5	4,0	4,0	1,80	17,65	0,60	5,88
2	6	5	5	1,80	17,65	0,70	6,86
3	7	6	6	2,00	19,61	0,90	8,83
4	8	6	6	2,00	19,61	0,90	8,83
≥ 5	-	≥ 7	≥ 7	2,20	21,57	1,10	10,79



## 5.7.4 DETERMINACIÓN DE ABSORCIÓN

Para la realización de los pruebas de *Determinación de absorción*, retirar el algodón de su embalaje original y condicionarlo por, como mínimo, 4 horas, en atmósfera estándar de  $65\% \pm 2\%$  de humedad relativa a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### PROCEDIMIENTO

Utilizar cesto, que pese como máximo 3 g, constituido de alambre de cobre de aproximadamente 0,4 mm de diámetro, en la forma de un cilindro de aproximadamente 5 cm de diámetro y 8 cm de profundidad, con espacios de cerca de 2 cm entre los alambres. Transferir porciones de algodón hidrófilo de, exactamente, cerca de  $1\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$ , de cinco diferentes partes del paquete, a través de tirones y no de cortes de la muestra. Colocar las porciones combinadas en el cesto y pesar. Sujetar el cesto por la lateral aproximadamente

a 12 mm arriba de la superficie del agua a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  y

dejar caer en la misma. Determinar, de preferencia por el uso de un cronómetro, el tiempo en segundos requerido para sumersión completa.

Retirar el cesto del agua, dejarlo drenar por 10 segundos en la misma posición horizontal, entonces colocarlo inmediatamente en un recipiente tarado y cubierto y pesar. Calcular la masa de agua absorbida a partir de la masa del cesto de prueba y de la masa del algodón hidrófilo.

## 5.7.5 DETERMINACIÓN DEL LARGO DE LA FIBRA

Para la realización de las pruebas de *Determinación del largo de la fibra*, retirar el algodón de su embalaje original y condicionarlo por, como mínimo, 4 horas, en atmósfera estándar de  $65\% \pm 2\%$  de humedad relativa a  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Este procedimiento se aplica al aparato separador dúplex de fibra de algodón Suter-Webb. Con alteraciones en el procedimiento, puede ser aplicado a dos separadores Baer arreglados uno atrás del otro o aplicado a un Johanssen u otro aparato semejante.

### APARATOS

El separador consiste en dos bancos de peines rígidamente montados lado a lado sobre una base común. Cada banco de peines consiste en por lo menos 12 peines individuales espaciados por 3,2 mm, uno atrás del otro y montados de modo encajado para que, a medida que ellos sean aproximados durante el proceso de fraccionamiento y no más necesarios, ellos puedan ser sueltos para que caigan abajo del plano de trabajo. Cada peine tiene una serie simple de dientes precisamente alineados y bien puntiagudos, de 12 mm de largo, consistiendo en agujas de 0,38 mm de diáme-

tro. Los dientes son espaciados de 62 mm a 25 mm en una extensión de aproximadamente 50 mm.

Los accesorios consisten en fórceps separador de fibras, rejilla depresora de fibras, plato plano depresor de fibras y platos cubiertos por terciopelo. El fórceps separador consiste en dos piezas de latón, de 75 mm de largo, aproximadamente, encajado de un lado y levemente curvado, presentando, así, un formato de pico para agarrar las fibras que estén fuera y próximas a las superficies de los peines. Usualmente, una de las extremidades cogedoras tiene un tapizado de cuero u otro material fibroso. La extremidad cogedora tiene aproximadamente 19 mm de largura.

La rejilla depresora de fibras consiste en series de barras de metal espaciadas por 3,2 mm, de modo que ellas puedan ser colocadas entre los peines para presionar las fibras para abajo entre los dientes. El plato plano depresor de fibras consiste en un plato de metal pulido, de aproximadamente 25 mm por 50 mm, con una saliencia arredondeada o manija en la superficie superior por medio de la cual el plato puede ser aplanado sobre las fibras a medida que ellas son colocadas en la superficie de los platos cubiertos por terciopelo. Los platos cubiertos por terciopelo, sobre los cuales las fibras pueden ser colocadas en orden, son placas de aluminio de aproximadamente 100 mm por 225 mm y 2,4 mm de espesor, cubiertas en ambos los lados por terciopelo de alta calidad, de preferencia negro.

### SELECCIÓN DEL ALGODÓN

Después de desenrollar el algodón, preparar una muestra representativa por la porción, a partir de un paquete conteniendo de 225 g a 450 g, de 32 muestras (cada una con cerca de 75 mg) bien distribuidas a lo largo de la pieza, siendo 16 retiradas de una mitad longitudinal y lo restante de la otra mitad. Evitar las extremidades de la pieza y tomar particular cuidado, asegurando que las porciones sean retiradas teniéndose en cuenta el espesor de la pieza. Para evitar la selección de solamente fibras largas o fibras cortas, retirar todas las fibras de cada muestra y no dejar que las mismas pasen a través de los dedos.

De paquetes de, como máximo, 112,5 g, pesar 8 muestras y de paquetes pesando entre 112,5 g y 225 g, pesar 16 muestras, todas bien distribuidas.

Mezclar las muestras en pares, indiscriminadamente, y combinar cada par tirando y enrollando suavemente en los dedos. Entonces dividir longitudinalmente cada par combinado en dos partes aproximadamente iguales y utilizar una parte en la mezcla posterior (la otra parte puede ser descartada o reservada para cualquier otras prueba o controle).

Repetir el proceso descrito en el párrafo anterior con las mitades sucesivas de las series bifurcadas hasta que resulte solamente una muestra. Suavemente, disponer en posición paralela las fibras de la muestra final, tirando y enrollándolas en los dedos. Retener todas las fibras, incluyendo, tanto como posible, las enredadas y las masas de fibras trenzadas, descartando solamente los fragmentos de semillas in-

maduras con fibras y material extraño no fibroso tal como pecíolos, hojas y fragmentos de tegumentos.

A partir de la muestra final descrita en el párrafo anterior, separar longitudinalmente una muestra de  $75 \text{ mg} \pm 2 \text{ mg}$ , exactamente pesados. Retener el residuo para cualquier prueba necesaria.

#### PROCEDIMIENTO

Utilizando la rejilla depresora de fibras, insertar cuidadosamente la muestra pesada en un banco de peines del separador de algodón, de modo que ella se extienda a través de los peines en ángulos aproximadamente rectos.

Con el fórceps separador, sujetar, por las extremidades libres, una pequeña porción de las fibras que se extiende a través de los dientes del peine más próximo al operador; suavemente sacarla de los peines y transferirla para las puntas de los dientes del segundo banco, poniendo las fibras paralelamente unas a las otras, linealmente y aproximadamente en ángulos rectos con relación a las caras de los peines, liberando tan próximo a la cara del peine frontal como sea posible. Utilizando la rejilla depresora, cuidadosamente presionar las fibras transferidas para abajo, en los dientes de los peines. Continuar la operación hasta que todas las fibras sean transferidas para el segundo banco de peines. Durante esta transferencia de las fibras, dejar caer los peines del primer banco sucesivamente siempre y cuando todas las fibras salientes hayan sido retiradas.

Girar el equipo a  $180^\circ$  y transferir las fibras de algodón de vuelta para el primer banco de peines de la manera descrita en el párrafo anterior.

Tomar mucho cuidado al aplanar las extremidades de las fibras durante ambas transferencias, arreglándolas tan

próximamente como posible a la superficie frontal del peine proximal. Tal aplanamiento puede envolver la retirada de fibras aisladas de ambos lados, frontal y distal, de los bancos de peines y el re-depósito de las mismas en el haz principal de los peines.

Girar el equipo nuevamente a  $180^\circ$ . Dejar caer peines sucesivos, si necesario, para exponer las extremidades de las fibras más largas. Puede ser necesario re-depositar algunas fibras aisladas. Utilizando el fórceps, retirar las pocas fibras más salientes. De esta manera, continuar retirando sucesivamente las fibras salientes remanentes de vuelta a la parte frontal del peine proximal. Dejar caer este peine y repetir las series de operaciones de la misma manera hasta que todas las fibras hayan sido retiradas. Para no perturbar seriamente la muestra y por tanto viciar el fraccionamiento en grupos, jalar diversas veces (ocho a diez) entre cada par de peines.

Colocar los tirones sobre los platos cubiertos por terciopelo en paralelo unos a los otros, tan rectamente como posible, con las extremidades tan claramente definidas como posible y con las partes distales arregladas en línea recta, presionándolas para abajo suavemente con el plato plano depresor de fibras antes de liberar el tirón del fórceps. Emplear, como mínimo, 50 y, como máximo, 100 tirones para fraccionar la muestra.

Agrupar todas las fibras que tengan largo de 12,5 mm o más y pesar el grupo hasta décimos de miligramo. De la misma manera, agrupar todas las fibras que tengan largo de 6,25 mm o menos y pesar de la misma manera. Finalmente, agrupar las fibras remanentes, de largos intermedios y pesar. La suma de los tres pesos no debe diferir del peso inicial de la muestra por más de 3 mg. Dividir la masa de cada uno de los dos primeros grupos por la masa de la muestra para obtener el porcentaje en peso de fibra en las dos bandas de largo.

# 6 RECIPIENTES PARA MEDICAMENTOS Y RELACIONADOS

## 6.1 RECIPIENTES DE VIDRIO

### CLASIFICACIÓN

**Vidrio tipo I.** Vidrio neutro del tipo borosilicato, no alcalino, de alta resistencia térmica, mecánica y hidrolítica, con alcalinidad de hasta 1,0 ml de  $H_2SO_4$  0,01 M (ensayo en frasco de vidrio molido). Destinado al envasado de medicamentos; para aplicación intravascular y uso parenteral.

**Vidrio tipo II.** Vidrio alcalino del tipo sódico / cálcico, de resistencia hidrolítica elevada, resultante del tratamiento apropiado de la superficie interna del vidrio tipo III, de modo que su alcalinidad sea como máximo 0,7 ml de  $H_2SO_4$  0,01 M para frascos hasta 100 ml y 0,2 ml de  $H_2SO_4$  0,01 M para capacidad arriba de 100 ml (ensayo en frasco de vidrio entero). Destinado al envasado de soluciones de uso parenteral; neutras y ácidas, que no tengan su pH alterado.

**Vidrio tipo III.** Vidrio alcalino del tipo sódico / cálcico, de resistencia hidrolítica media, sin embargo con buena resistencia mecánica, sin cualquier tratamiento superficial, con alcalinidad máxima de 8,5 ml de  $H_2SO_4$  0,01 M (ensayo en frasco de vidrio molido). Destinado al envasado de soluciones de uso tópico y oral; pudiendo ser utilizado para soluciones parenterales, cuando aprobado por ensayos de estabilidad.

**Vidrio tipo NP (no parenteral).** Vidrio alcalino del tipo sódico / cálcico, de resistencia hidrolítica baja y alta alcalinidad, de como máximo 15 ml de  $H_2SO_4$  0,01 M (ensayo en frasco de vidrio molido). Indicado al envasado de productos no parenterales, o sea, de uso tópico y oral.

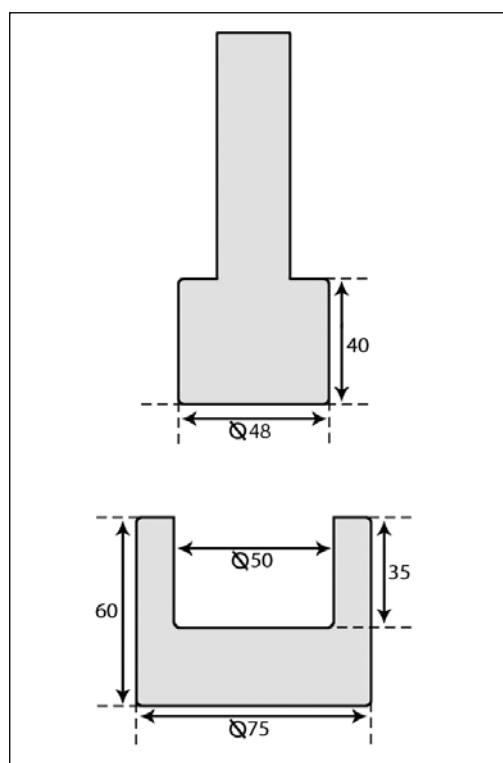
### 6.1.1 RESISTENCIA HIDROLÍTICA O ALCALINIDAD

Ensayo que cuantifica la intensidad de la reacción química entre el agua y los elementos alcalinos existentes en el vidrio, especialmente sodio y potasio. Esa resistencia determina la clasificación del tipo de vidrio.

### EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

- Autoclave con control de temperatura de  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , equipada con termómetro, manómetro, válvula de seguridad y estantería para sustentación de, como mínimo, 12 frascos.

- Molino de bolas con estricor de acero templado y esferas de acero pulido o mortero en acero templado con las especificaciones en la **Figura 1**.



**Figura 2 - Figura 1 – Mortero y pilón para pulverización de vidrio.**

- Estufa para secado con temperatura de  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Balanza de precisión con dos casas decimales;
- Conjunto de tamices en acero inoxidable, n° 20, n° 40 y n° 50, con diámetro de 20,3 cm (8”), incluyendo la olla y la tapa;
- Imán;
- Vaso de precipitados o papel aluminio;
- Matraz de 250 ml;
- Desecador;
- Bureta y microbureta para titulación;
- Probeta graduada de 100 ml;
- Agua bidestilada o desionizada, con conductividad máxima de  $0,15\text{ }\mu\text{S/cm}$  (o  $6,67\text{ M}\Omega/\text{cm}$ ) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- Solución de rojo de metilo (24 mg en 100 ml de agua);
- Acetona PA;
- Solución de  $H_2SO_4$  a 0,01 M;
- Solución de HCl a 0,01 M.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO EN FRASCO DE VIDRIO MOLIDO

Lavar, como mínimo, seis frascos, escogidos aleatoriamente, con agua bidestilada o desionizada, y secarlos en corriente de aire limpio y seco.

Si necesario, cortar los frascos y transferir y triturar de 30 a 40 g de vidrio utilizando el molino de bolas o el mortero. Pasar el vidrio molido por tamiz n° 20 y transferir la porción retenida en el tamiz nuevamente para el molino de bolas o el mortero. Repetir las operaciones de molienda y pasaje de los fragmentos por el tamiz hasta que, por lo menos, 2/3 del material haya pasado por el tamiz n° 20. Combinar todas las porciones de vidrio molido que pasaron por el tamiz n° 20 y pasar por tamiz n° 40. Triturar la porción retenida en el tamiz y repetir la operación.

Combinar las porciones de vidrio molido que pasaron por el tamiz n° 40 y transferir para conjunto montado de tamices n° 40 y n° 50. Agitar horizontalmente por 5 minutos. Recoger 12,0 g de vidrio molido que pasó por el tamiz n° 40 pero no pasó por el tamiz n° 50 y almacenar en desecador hasta ser utilizado en la prueba.

Esparcir la muestra de vidrio molido sobre un pedazo de papel satinado y pasar el imán, para retirar posibles fragmentos de hierro que puedan haber sido introducidos durante el procedimiento de molienda.

Transferir la muestra para matraz de 250 ml y lavar las partículas de vidrio con 6 porciones de 30 ml de acetona PA, agitando por cerca de 30 segundos cada procedimiento, y decantar cuidadosamente la acetona. Después del lavado, la muestra debe estar libre de bloques de polvo de vidrio y la superficie de los granos debe estar prácticamente libre de la adherencia de partículas finas. Secar el material por 20 minutos a 140 °C.

La muestra debe ser probada hasta 48 horas después del secado y en ese caso, debe ser mantenida en desecador.

Pesar 10,0 g del vidrio molido, transferir para matraz de 250 ml, previamente preparado con agua bidestilada o desionizada en baño a 90 °C, por lo menos, por 24 horas o a 121 °C por 1 hora, y añadir 50 ml de agua bidestilada o desionizada.

Como *blanco*, utilizar matraz de 250 ml, previamente preparado en agua bidestilada o desionizada en baño a 90 °C, por lo menos, por 24 horas o a 121 °C por 1 hora, y añadir 50 ml de agua bidestilada o desionizada.

Cerrar los frascos matraz con el uso de vaso de precipitados invertido o papel aluminio, previamente lavado con agua bidestilada o desionizada.

Colocarlos en la autoclave y someterlos al siguiente tratamiento:

- promover el aumento de la temperatura del autoclave después de cerrar la válvula de escape, entre 19 a 23 minutos, hasta alcanzar 121 °C + 1 °C;

- mantener en temperatura de 121 °C + 1 °C durante 60 minutos;
- descargar la presión en un período de 38 a 46 minutos, hasta alcanzar la presión atmosférica.

Retirar los frascos y enfriarlos, inmediatamente, en agua corriente. Después de enfriamiento, decantar el agua del matraz y lavar el vidrio molido con 4 porciones de 15 ml de agua bidestilada o desionizada. Añadir 5 gotas de la solución de rojo de metilo y titular, inmediatamente, con ácido sulfúrico 0,01 M. Si el volumen esperado de solución que será utilizada en la titulación es inferior a 10 ml, utilizar una microbureta.

Registrar el volumen de ácido sulfúrico utilizado en la titulación y corregir el valor en relación al volumen del *blanco*.

### Límites

El valor de la alcalinidad máxima para el frasco de vidrio tipo I es de 1,0 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M para 10 g de vidrio molido.

El valor de la alcalinidad máxima para el frasco de vidrio tipo III es de 8,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M para 10 g de vidrio molido.

El valor de la alcalinidad máxima para el frasco de vidrio tipo NP es de 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M para 10 g de vidrio molido.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO EN FRASCO DE VIDRIO ENTERO

Lavar frascos, escogidos aleatoriamente, con agua bidestilada o desionizada y secarlos en corriente de aire limpio y seco. Añadir volumen de agua bidestilada o desionizada correspondiente a 90% de la capacidad total del frasco, determinada conforme descrito en *Capacidad Volumétrica Total (6.1.3)*.

Cerrar los frascos con papel aluminio previamente lavado con agua bidestilada o desionizada y colocarlos en la autoclave. Someterlos al siguiente tratamiento:

- calentar a autoclave a 100 °C, con la válvula de escape abierta, por 10 minutos;
- promover el aumento de la temperatura de la autoclave después del cierre de la válvula de escape, en 1 °C/min, hasta alcanzar 121 °C ± 1 °C;
- mantener la temperatura de 121 °C ± 1 °C durante 60 minutos;
- bajar la temperatura, en 0,5 °C/min, hasta alcanzar 100 °C, descargando la presión hasta alcanzar la presión atmosférica;
- abrir la autoclave solamente después de alcanzar la temperatura de 95 °C;
- transferir los frascos para baño maría a 80 °C. Añadir agua fría; tomando cuidado de evitar la contaminación de la solución de extracción, siendo que el tiempo de enfriamiento no debe exceder 30 minutos.

Después de enfriamiento, combinar la solución de extracción de cada uno de los frascos. Medir el volumen conforme registrado en la **Tabla 1** y transferir para matraz de 250 ml.

Como *blanco*, utilizar matraz de 250 ml y añadir el mismo volumen de agua bidestilada o desionizada.

**Tabla 1 - Volumen de solución de extracción de acuerdo con la capacidad volumétrica total del recipiente.**

Capacidad volumétrica del frasco (ml)	Volumen de solución de extracción (ml)
≤ 3	25,0
De 3 a 30	50,0
De 30 a 100	100,0
≥ 100	100,0

Añadir 5 gotas de la solución de rojo de metilo para cada 25 ml de solución de extracción y titular, inmediatamente, con ácido clorhídrico 0,01 M, utilizando una microbureta. Registrar el volumen de ácido clorhídrico 0,01 M utilizado en la titulación y corregir el valor en relación al volumen del *blanco*.

#### Límites

El valor de alcalinidad máxima no debe exceder los valores indicados en la **Tabla 2**.

**Tabla 2 - Alcalinidad máxima de acuerdo con el tipo de vidrio y la capacidad volumétrica del frasco.**

Capacidad volumétrica del frasco (ml)	Volumen máximo de HCl 0,01 M (ml) para 100 ml de solución de extracción	
	Tipos I y II	Tipo III
< 1	2,0	20,0
De 1 a 2	1,8	17,6
De 2 a 5	1,3	13,2
De 5 a 10	1,0	10,2
De 10 a 20	0,80	8,1
De 20 a 50	0,60	6,1
De 50 a 100	0,50	4,8
De 100 a 200	0,40	3,8
De 200 a 500	0,30	2,9
> 500	0,20	2,2

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO DE ATAQUE DE AGUA A 121 °C – PARA CUALIFICAR EL VIDRIO DE TIPO II.

Enjuagar 3 o más frascos, escogidos aleatoriamente, con agua bidestilada o desionizada por 2 veces y secarlos en corriente de aire limpio y seco. Añadir volumen de agua bidestilada o desionizada correspondiente a 90% de la capacidad total del frasco, determinada conforme descrito en *Capacidad Volumétrica Total (6.1.3)*. Cerrar los frascos con el uso de vaso de precipitados invirtiendo el papel aluminio, previamente lavado con agua bidestilada, o desionizada.

Colocarlos en la autoclave y someterlos al siguiente tratamiento:

- promover el aumento de temperatura del autoclave
- después de cerrar la válvula de escape, entre 19 a 23 minutos, hasta alcanzar 121 °C + 1 °C;
- mantener en temperatura de 121 °C + 1 °C durante 60 minutos;
- descargar la presión en un período de 38 a 46 minutos, hasta alcanzar la presión atmosférica.

Combinar el volumen de solución de extracción de varios frascos, en probeta graduada y transferir 100,0 ml para matraz de 250 ml. Añadir 5 gotas de la solución de rojo de metilo y titular, inmediatamente, con ácido sulfúrico 0,01 M. Completar la titulación dentro de 60 minutos después de la abertura de la autoclave. Registrar el volumen de ácido sulfúrico utilizado en la titulación y corregir el valor en relación al volumen del *blanco* (100 ml de agua bidestilada o desionizada en la misma temperatura y con la misma cantidad de indicador).

#### Límites

El valor de la alcalinidad máximo para el frasco de vidrio tipo II es de 0,7 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M para frascos con hasta 100 ml de capacidad volumétrica.

El valor de la alcalinidad máximo para el frasco de vidrio tipo II es de 0,2 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M para frascos con más de 100 ml de capacidad volumétrica.

## 6.1.2 ARSÉNICO

### EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

- Autoclave con control de temperatura de 121 °C ± 1,0 °C, equipada con termómetro, manómetro, válvula de seguridad y estantería para sustentación de, como mínimo, 12 frascos;
- estufa para secado con temperatura de 140 °C;
- vaso de precipitados o papel aluminio;
- matraz de 250 ml;
- probeta graduada de 100 ml;
- agua bidestilada o desionizada, con conductividad máxima de 0,15 µS/cm (o 6,67 M Ω /cm) a 25 °C.

### PROCEDIMIENTO

Lavar frascos, escogidos aleatoriamente, con agua bidestilada, o desionizada y secarlos en corriente de aire limpio y seco. Añadir volumen de agua bidestilada o desionizada correspondiente a 90% de la capacidad total del frasco, determinada conforme descrito en *Capacidad Volumétrica Total (6.1.3)*. Cerrar los frascos con papel aluminio previamente lavado con agua bidestilada o desionizada y colocarlos en la autoclave. Someterlos al siguiente tratamiento:

- calentar la autoclave a 100 °C, con la válvula de escape abierta, por 10 minutos;
- promover el aumento de la temperatura de la autoclave después del cierre de la válvula de escape, en 1 °C/min, hasta alcanzar 121 °C ± 1 °C;



- mantener en la temperatura de  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 60 minutos;
- bajar la temperatura, en  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , hasta alcanzar  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , descargando la presión hasta alcanzar la presión atmosférica;
- abrir la autoclave solamente después de alcanzar la temperatura de  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- transferir los frascos para baño maría a  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Añadir agua fría, cuidadosamente, para evitar la contaminación de la solución de extracción, siendo que el tiempo de enfriamiento no debe exceder 30 minutos.

Después de enfriamiento, combinar la solución de extracción de cada uno de los frascos para obtener 35 ml y transferir para matraz de 250 ml.

Proceder conforme descrito para *Ensayos-límite de arsénico (5.3.2.5)*. Límite para arsénico es de  $1\text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ .

### 6.1.3 CAPACIDAD VOLUMÉTRICA TOTAL

Ensayo para determinar el volumen de producto líquido que el frasco puede contener, cuando lleno, hasta la superficie superior de la terminación.

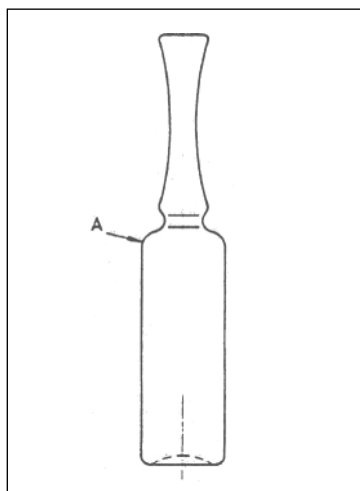
#### EQUIPOS Y MATERIALES

- Balanza con resolución mínima de  $0,1\text{ g}$ ;
- termómetro de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con resolución de  $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- agua bidestilada.

#### PROCEDIMIENTO

Seleccionar seis unidades aleatoriamente. Tarar la balanza con el frasco seco y vacío.

Llenar el frasco con agua bidestilada hasta la superficie de sellado de la terminación (región de cierre del frasco, también, denominada de cuello, *finish*, o acabado), manteniendo superficie externa totalmente seca, siendo que para ampollas el llenado debe ser realizado hasta la altura del punto A **Figura 1**.



**Figura 1** - Llenado del volumen de ampollas (hasta el punto A).

Determinar la temperatura del agua – durante la realización del ensayo, asegurar que la temperatura del agua no tenga variación arriba de  $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pesar el frasco lleno y determinar la masa de agua en el contenida.

Calcular el volumen del frasco dividiendo la masa del agua por su densidad, en la temperatura del ensayo, con el uso de los datos registrados en la **Tabla 1** para agua destilada.

**Tabla 1** - Densidad del agua destilada en función de la temperatura.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Densidad del agua ( $\text{g}/\text{ml}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Densidad del agua ( $\text{g}/\text{ml}$ )
10	0,99839	23	0,99660
11	0,99832	24	0,99638
12	0,99823	25	0,99617
13	0,99814	26	0,99593
14	0,99804	27	0,99569
15	0,99893	28	0,99544
16	0,99780	29	0,99518
17	0,99766	30	0,99491
18	0,99751	31	0,99464
19	0,99735	32	0,99435
20	0,99718	33	0,99406
21	0,99700	34	0,99375
22	0,99680	35	0,99345

#### RESULTADOS

Los resultados expresados en ml, con una casa decimal, deben estar de acuerdo con las especificaciones indicadas.

## 6.2 RECIPIENTES PLÁSTICOS

El objetivo pretendido con esa sección es establecer normas para materiales y componentes plásticos utilizados para acondicionar medicamentos y relacionados. Las normas y pruebas para las propiedades funcionales de los recipientes y de sus componentes son suministradas en *Recipientes de Plástico – Pruebas de desempeño (6.2.3)*.

Los artículos de plástico son identificados y caracterizados por espectroscopia de infrarrojo y calorimetría diferencial de barrido. En esa sección están descritos los procedimientos de pruebas y normas para la identificación y caracterización de los diferentes tipos de plástico. El grado de verificación se basa en el contacto directo o no con el medicamento, y el riesgo se basa en la vía de administración.

Los plásticos pueden contener residuos del proceso de polimerización, plastificantes, estabilizadores, antioxidantes, pigmentos y lubricantes. Los factores como la composición del plástico, procesamiento y procedimientos de limpieza, tratamiento de superficie, medios de contacto, colorantes, adhesivos, absorción y permeabilidad de conservantes y condiciones del almacenamiento, también, pueden afectar la adecuación de un plástico para un uso específico.

Las pruebas de extraíbles son planeadas para caracterizar los componentes extraídos e identificar los posibles migrantes. El grado o extensión de las pruebas para extraer sustancias de un componente depende de la finalidad de uso y del grado de riesgo de impactar negativamente en la eficacia del producto. En este capítulo están descritos las pruebas de extraíbles específicos para resinas de polietileno, polipropileno, poli (tereftalato de etileno) y poli (tereftalato de etileno glicol). Todos los otros plásticos deben ser probados conforme descrito en los *Pruebas Físico Químicas de Métodos de Prueba (6.2.1.3)*. La prueba de *Capacidad Tamponante* debe ser probada para recipientes destinados a embalar un producto líquido.

Los componentes plásticos utilizados para productos de alto riesgo, tales como aquellos destinados a la inhalación; preparaciones parenterales y oftálmicas son probados utilizando los *Pruebas Biológicas de Métodos de Prueba (6.2.1.3)*.

Los recipientes plásticos destinados al embalaje de productos parenterales deben cumplir los requisitos de las *Pruebas Biológicas* y de las *Pruebas Físico Químicas*. También, son suministradas normas para los recipientes en polietileno utilizados para embalar formas farmacéuticas orales secas, no destinadas para constitución en solución.

## 6.2.1 RECIPIENTES Y RELACIONADOS PLÁSTICOS

### 6.2.1.1 RECIPIENTES DE POLIETILENO

Polietilenos de alta y baja densidad son polímeros de cadena larga, sintetizados bajo condiciones controladas de calor y presión, con el auxilio de catalizadores y a partir de, como mínimo, 85,0% de etileno y un total de 95,0% de olefinas. Tanto el polietileno de alta densidad cuanto el de baja densidad tienen un espectro de absorción de infrarrojo específico del polietileno y poseen propiedades térmicas características. El polietileno de alta densidad tiene una densidad entre 0,941 y 0,965 g/cm<sup>3</sup>. El polietileno de baja densidad tiene una densidad entre 0,850 y 0,940 g/cm<sup>3</sup>. Otras propiedades que pueden afectar la adecuación del polietileno incluyen módulo de elasticidad, índice de fluidez, resistencia a la quiebra bajo tensión ambiental y grado de cristalinidad después del moldeo.

Las normas y ensayos descritos en esta sección caracterizan recipientes y componentes, producidos a partir del polietileno de baja o de alta densidad de resinas homopoliméricas o copoliméricas.

Todos los componentes de polietileno están sujetos a pruebas de espectroscopia en el infrarrojo y calorimetría diferencial de barrido. Cuando estudios de estabilidad son realizados para determinar la fecha de validez de una forma farmacéutica especial en un recipiente de polietileno adecuado, cualquier otro recipiente de polietileno que cumpla esos requisitos puede ser igualmente utilizado para embalar la forma farmacéutica en cuestión, siempre que los programas de estabilidad apropiados sean ampliados para incluir el recipiente alternativo para garantizar que la

identidad, la fuerza, la calidad y la pureza de la forma farmacéutica sean mantenidas durante el período de validez.

#### ENSAYOS

##### *Polietileno de Alta Densidad*

**Espectroscopia de Infrarrojo.** Utilizar el accesorio de reflexión total atenuada, conforme descrito en el ítem *Infrarrojo medio (5.2.14)*. El espectro corregido de la muestra debe presentar bandas de mayor absorción apenas en los mismos largos de onda del espectro del estándar de referencia.

**Calorimetría Diferencial de Barrido. Proceder** como descrito en la *Análisis Térmico de Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*. El termograma de la muestra debe ser parecido con el del estándar de referencia, determinado de manera semejante, y la temperatura endotérmica (derretimiento) en el termograma de la muestra no debe diferir en más de 6,0 °C de los estándares de referencia.

**Metales Pesados y Residuo No Volátil.** Preparar extractos de la muestra conforme descrito en las *Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*, con porción de 60 cm<sup>2</sup>, sin considerar el espesor, para cada 20,0 ml de *Medio de Extracción*.

**Metales Pesados.** *Los recipientes deben cumplir los requisitos para Metales Pesados en Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3).*

**Residuo No Volátil.** Proceder como descrito en *Residuo No Volátil en Pruebas Físico Químicas en Métodos de Prueba (6.2.1.3)*, siendo que el *Blanco* debe ser el mismo solvente utilizado en cada una de las condiciones de prueba. La diferencia entre las cantidades obtenidas de la *Preparación de la Muestra y del Blanco* no debe exceder 12,0 mg cuando el agua mantenida a 70 °C es utilizada como *Medio de Extracción*; no exceder 75,0 mg cuando el alcohol mantenido a 70 °C es utilizado como *Medio de Extracción*; y no exceder 100,0 mg cuando el hexano mantenido a 50 °C es utilizado como *Medio de Extracción*.

#### **Sustancias Utilizadas en Contacto con Líquidos Orales.**

*Proceder como descrito en la Capacidad Tamponante de Pruebas Físico Químicas, Métodos de Pruebas (6.2.1.3).*

##### *Polietileno de Baja Densidad*

**Espectroscopia de Infrarrojo.** Utilizar el accesorio de reflexión total atenuada, conforme descrito en el ítem *Infrarrojo medio (5.2.14)*. El espectro corregido de la muestra debe presentar bandas de mayor absorción apenas en los mismos largos de onda del espectro del estándar de referencia.

**Calorimetría Diferencial de Barrido. Proceder** como descrito en la *Análisis Térmico, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*. El termograma de la muestra debe ser parecido con el del estándar de referencia, determinado de manera semejante, y la temperatura endotérmica (derretimiento) en

el termograma de la muestra no debe diferir en más de 8,0 °C de los estándares de referencia.

**Metales Pesados, y Residuo No Volátil.** Preparar extractos de la muestra conforme descrito en *Preparación de la Muestra en Pruebas Físico Químicas de Métodos de Pruebas*, con porción de 60 cm<sup>2</sup>, sin considerar el espesor, para cada 20,0 ml de Medio de Extracción.

**Metales Pesados.** *Los recipientes deben cumplir los requisitos para Metales Pesados de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3).*

**Residuo No Volátil.** Proceder conforme descrito en

*Residuo No Volátil de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*, siendo que el Blanco debe ser el mismo solvente utilizado en cada una de las condiciones de prueba. La diferencia entre las cantidades obtenidas de la *Preparación de la Muestra y del Blanco* no debe exceder 12,0 mg cuando el agua mantenida a 70 °C es utilizada como *Medio de Extracción*; no exceder 75,0 mg cuando el alcohol mantenido a 70 °C es utilizado como *Medio de Extracción*; y no exceder 350,0 mg cuando el hexano mantenido a 50 °C es utilizado como *Medio de Extracción*.

**Sustancias Utilizadas en Contacto con Líquidos Orales.**

*Proceder conforme descrito en la Capacidad Tamponante de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3).*

### 6.2.1.2 RECIPIENTES DE POLIPROPILENO

Los polímeros de polipropileno son polímeros de cadena larga, sintetizados con el auxilio de catalizadores bajo condiciones controladas de calor y presión. Factores como composición del plástico, procesamiento y procedimientos de limpieza, medios de contacto, colorantes, adhesivos, absorción, adsorción, permeabilidad de conservantes y condiciones de almacenamiento pueden afectar la adecuación de un plástico para un uso específico. La adecuación de un polipropileno característico debe ser establecida por medio de pruebas adecuadas.

El polipropileno tiene un espectro en el infrarrojo distinto y propiedades térmicas características. Posee una densidad de 0,880 a 0,913 g/cm<sup>3</sup>. Las propiedades de permeabilidad de los recipientes en polipropileno moldados pueden ser alteradas cuando el polímero repulverizado es incorporado, dependiendo de su proporción en el producto final. Otras propiedades que pueden afectar la adecuación de polipropileno utilizado en recipientes para embalaje de medicamentos incluyen permeabilidad al oxígeno y a la humedad, módulo de elasticidad, índice de fluidez, resistencia a la quiebra bajo tensión ambiental y grado de cristalinidad después del moldeo.

Las normas y ensayos suministrados caracterizan recipientes en polipropileno, producidos a partir de homopolímeros o copolímeros, que son adecuados para envasado de for-

mas farmacéuticas orales secas sólidas y líquidas. Considerándose que estudios adecuados de estabilidad tengan sido realizados para determinar la fecha de validez de una forma farmacéutica específica en un recipiente apropiado en polipropileno, cualquier otro recipiente en polipropileno que atienda a esos requisitos puede ser utilizado para embalar la misma forma farmacéutica, siempre que los programas de estabilidad apropiados sean ampliados para incluir ese recipiente alternativo, a fin de garantizar que la identidad, la fuerza, la calidad y la pureza de la forma farmacéutica sean mantenidas durante el período de validez.

### ENSAYOS

**Espectroscopia de Infrarrojo.** Utilizar accesorio de reflexión total atenuada, conforme descrito en el ítem

*Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo (5.2.14).* El espectro corregido de la muestra debe presentar bandas de mayor absorción solamente en los mismos largos de onda del espectro del respectivo estándar de referencia (homopolímero o copolímero de polipropileno) determinado de forma semejante.

**Calorimetría Diferencial de Barrido.** Proceder conforme descrito en la *Análisis Térmico de Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*. La temperatura endotérmica (derretimiento) en el termograma no debe diferir en más que 6,0 °C de los estándares de referencia para homopolímeros. La temperatura endotérmica obtenida del termograma de la muestra de copolímero de polipropileno no debe diferir en más que 12,0 °C de los estándares de esa sustancia.

**Metales Pesados y Residuo No Volátil.** Preparar extractos de las muestras conforme descrito en *Preparación de la Muestra, de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*, con porción de 60 cm<sup>2</sup>, sin considerar el espesor, para cada 20,0 ml de *Medio de Extracción*.

**Metales Pesados.** *Los recipientes deben cumplir los requisitos para Metales Pesados de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3).*

**Residuo No Volátil.** Proceder conforme descrito en *Residuo No Volátil de Pruebas Físico Químicas, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3)*, siendo que el Blanco debe ser el mismo solvente utilizado en cada una de las condiciones de prueba. La diferencia entre las cantidades obtenidas de la *Preparación de la Muestra y del Blanco* no debe exceder 10,0 mg cuando el agua mantenida a 70 °C es utilizada como *Medio de Extracción*; no exceder 60,0 mg cuando el alcohol mantenido a 70 °C es utilizado como el *Medio de Extracción*; y no exceder 225,0 mg cuando el hexano mantenido a 50 °C es utilizado como *Medio de Extracción*. Los recipientes deben atender a los requisitos para *Residuo No Volátil* para todos los medios de extracción.

**Nota:** *hexano y alcohol son inflamables. Al evaporar esos solventes, utilizar una corriente de aire con baño maría; al secar el residuo, utilizar estufa a prueba de explosión.*

**Sustancias Utilizadas en Contacto con Líquidos Orales.** Proceder conforme descrito en la *Capacidad Tamponante de Pruebas Físico Químicas*, en Métodos de Pruebas (6.2.1.3).

### 6.2.1.3 RECIPIENTES DE POLI (TEREFTALATO DE ETILENO) Y POLI (TEREFTALATO DE ETILENO GLICOL)

Resinas de poli (tereftalato de etileno) (PET) son polímeros cristalinos de cadena larga preparados por la condensación del etilenoglicol con dimetil tereftalato o ácido tereftálico. Las resinas de copolímero PET son preparadas de forma semejante, excepto que, también, pueden contener una pequeña cantidad de ácido isoftálico (inferior a 3% de mol de la resina) o 1,4-ciclo-hexano-dimetanol (inferior a 5% de mol de la resina). La polimerización es conducida bajo condiciones controladas de calor y vacío; con el auxilio de catalizadores y estabilizadores.

Las resinas de copolímero PET tienen propiedades físicas y espectrales semejantes al PET y, para efectos prácticos, son tratadas como PET. Los ensayos y las especificaciones suministradas en esta sección para caracterizar resinas y recipientes de PET, se aplican también a las resinas de copolímero y a los recipientes fabricados a partir de ellas.

Generalmente, el PET y sus resinas de copolímero presentan un grado elevado de orden en su estructura molecular. Como resultado, presentan un comportamiento térmico característico dependiente de la composición, incluyendo una temperatura de transición vítrea de cerca de 76 °C y una temperatura de fusión de aproximadamente 250 °C. Estas resinas tienen un espectro de absorción de infrarrojo particular que permite la diferenciación de otros materiales plásticos, como policarbonato; poliestireno; polietileno y resinas poli (tereftalato de etileno glicol) (PETG). El PET y sus resinas de copolímero tienen una densidad entre 1,3 y 1,4 g/cm<sup>3</sup> y una viscosidad intrínseca mínima de 0,7 dL/g, que corresponde a un peso molecular promedio de cerca de 23.000 Da.

Las resinas PETG son polímeros de alto peso molecular preparadas por la condensación del etilenoglicol con dimetil tereftalato, o ácido tereftálico y con 15 a 34% de 1,4-hexano-dimetanol molar. Las resinas PETG son polímeros transparentes, amorfos, con una temperatura de transición vítrea de cerca de 81 °C y sin un punto de fusión cristalina, conforme determinado por la calorimetría diferencial de barrido. Las resinas PETG tienen un espectro de absorción infrarrojo particular que posibilita la distinción entre otros materiales plásticos, inclusive el PET. Las resinas PETG tienen una densidad de aproximadamente 1,27 g/cm<sup>3</sup> y una viscosidad intrínseca mínima de 0,65 dL/g, lo que corresponde a un peso molecular medio de cerca de 16.000 Da.

Las resinas PET y PETG no contienen ningún plastificante, apoyo de procesamiento o antioxidantes. Cuando colorantes son utilizados en la fabricación de recipientes de PET y de PETG, estos no deben migrar para el líquido.

Las normas y ensayos suministrados en esa sección caracterizan recipientes de tereftalato de polietileno (PET)

y tereftalato de polietileno glicol (PETG) que son usados para embalar formas farmacéuticas orales líquidas. Considerando que estudios adecuados de estabilidad hayan sido realizados para determinar la validez de una forma farmacéutica líquida particular en un recipiente que atienda los requisitos para recipientes de PET o de PETG, cualquier otro recipiente de esas sustancias que atienda a estos requisitos puede ser utilizado para embalar la misma forma farmacéutica, siempre que programas de estabilidad apropiados sean ampliados para incluir ese recipiente alternativo, para garantizar que la identidad, la fuerza, la calidad y la pureza de la forma farmacéutica sean mantenidas durante toda la validez. La adecuación de un recipiente de PET o de PETG específico para ser usado en la dispensación de una forma farmacéutica oral líquida específica debe ser establecida por medio de pruebas adecuadas.

#### ENSAYOS

**Espectroscopia de Infrarrojo.** Utilizar accesorio de reflexión total atenuada, proceder conforme descrito en *Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo* (5.2.14). El espectro corregido de la muestra presenta bandas de mayor absorción apenas en los mismos largos de onda del espectro de los estándares de referencia, determinados semejantemente.

**Calorimetría Diferencial de Barrido.** Proceder conforme descrito en el ítem *Análisis Térmico en Métodos de Pruebas*. Para el tereftalato de polietileno, el termograma de la muestra debe ser parecido con el del estándar de referencia, determinado de forma semejante; el punto de derretimiento de la muestra ( $T_m$ ) no debe diferir de los estándares de referencia en más de 9 °C y la temperatura de transición vítrea en más de 4 °C. Para el tereftalato de polietileno glicol, el termograma de la muestra debe ser parecido con el del estándar de referencia, determinado de forma semejante; la temperatura de transición vítrea de la muestra ( $T_g$ ) no debe diferir en más de 6 °C de los estándares de referencia.

**Extracción de Colorantes.** Seleccionar tres recipientes para el ensayo. Cortar una parte relativamente plana de la pared lateral de un recipiente y apararla en la medida necesaria para ajustar la muestra al soporte del espectrofotómetro. Realizar barrido (5.2.14) para obtener el espectro visible de 350-700 nm de la pared lateral. Con aproximación de 2 nm, determinar el largo de onda de absorbancia máxima. Llenar los dos recipientes restantes con 50% de etanol para recipientes PET y 25% de etanol para PETG. Preparar los recipientes con sellados impermeables, como una hoja de papel aluminio, y cerrar con las tapas. Llenar con el solvente correspondiente un recipiente de vidrio de misma capacidad que los recipientes a prueba, prepararlo con sellado impermeable, como una hoja de papel aluminio, y cerrar con una tapa. Incubar los recipientes a prueba y el recipiente de vidrio a 49 °C por 10 días. Retirar los recipientes y aguardar que alcancen temperatura ambiente. Concomitantemente, determinar las absorbancias (5.2.14) de las soluciones a prueba en células de 5 cm en el largo de onda de absorbancia máxima, utilizando el solvente correspondiente del recipiente de vidrio como blanco. Para



ambas las soluciones a prueba, los valores de absorbancia, así, obtenidos no deben ser inferiores a 0,01.

Metales Pesados; Total de Tereftaloíla y Etilenoglicol.

### Medios de extracción.

#### Agua purificada

- *Etanol a 50%*. Diluir 125 ml de etanol en agua para 238 ml de solución y homogeneizar.
- *Etanol a 25%*. Diluir 125 ml de *Etanol a 50%* en agua para 250 ml de solución y homogeneizar.
- n-Heptano.

**Procedimiento general.** Utilizar un medio de extracción de *Etanol a 50%* para recipientes de PET y *Etanol a 25%* para PETG. Para cada medio de extracción, llenar un número suficiente de recipientes pruebas con 90% de su capacidad nominal para obtener como mínimo 30 ml. Llenar un número correspondiente de recipientes de vidrio con *Agua purificada*, la misma cantidad de recipientes con *Etanol a 50%*, o *Etanol a 25%* y el mismo número de recipientes de vidrio con *n-Heptano* para ser utilizado como blanco de los medios de extracción. Colocar en los recipientes sellados impermeables, como hoja de aluminio, y taparlos. Incubar los recipientes pruebas y los recipientes de vidrio a 49 °C por 10 días. Retirar los recipientes pruebas con las muestras y los blancos del medio de extracción y almacenarlos en temperatura ambiente. No transferir las muestras del medio de extracción para recipientes de almacenamiento alternativos.

**Metales Pesados.** Pipetear 20 ml de *Agua purificada* extraída de los recipientes pruebas, filtrada conforme necesario, colocar en uno, o dos tubos de 50 ml para comparación de color y guardar el *Agua purificada* restante para utilizar en la prueba de *Etilenoglicol*. Ajustar el pH del extracto entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M*, utilizando un papel indicador de corto intervalo de pH. Diluir con agua hasta cerca de 35 ml y homogeneizar.

Pipetear 2 ml de la *Solución estándar de plomo (10 ppm Pb)* (5.3.2.3), preparada en el día del uso; transferir para un segundo tubo de comparación de color y añadir 20 ml de *Agua purificada*. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M*, utilizando un papel indicador de corto intervalo de pH. Diluir con agua hasta cerca de 35 ml y homogeneizar.

En cada tubo, añadir 1,2 ml de tioacetamida SR y 2 ml de *Tampón acetato pH 3,5* (5.3.2.3) diluir con agua hasta 50 ml de solución y homogeneizar. Cualquier color producido dentro de 10 minutos en el tubo que contiene el *Agua purificada* extraída de los recipientes pruebas, no debe ser más intenso que el del tubo conteniendo la *Solución estándar de plomo (10 ppm Pb)*, ambas visualizadas sobre una superficie blanca (límite 1 ppm).

**Total de tereftaloíla.** Determinar la absorbancia del extracto de *Etanol a 50%* o de *Etanol a 25%* en una célula de 1 cm, en el largo de onda de absorbancia máxima a cerca de 244 nm (5.2.14), utilizando como blanco aquel correspondiente al medio de extracción. La absorbancia del ex-

tracto no debe exceder 0,150, lo que corresponde, como máximo, 1 ppm del total de tereftaloíla del medio.

Determinar la absorbancia del extracto de *n-Heptano* en una célula de 1 cm, en el largo de onda de absorbancia máxima a cerca de 240 nm (5.2.14), utilizando como blanco el medio de extracción de *n-Heptano*. La absorbancia del extracto no debe exceder 0,150, lo que corresponde, como máximo, 1 ppm de tereftaloíla del medio.

### Etilenoglicol.

*Solución de ácido periódico.* Disolver 125 mg de ácido periódico en 10 ml de agua.

*Ácido sulfúrico diluido.* Para 50 ml de agua, añadir lentamente y en constante agitación, 50 ml de ácido sulfúrico y aguardar que alcance la temperatura ambiente.

*Solución de bisulfito de sodio.* Disolver 0,1 g de bisulfito de sodio en 10 ml de agua. Utilizar esa solución dentro de 7 días.

*Solución de cromotropato disódico.* Disolver 100 mg de cromotropato disódico en 100 ml de ácido sulfúrico. Proteger la solución de la luz y utilizarla dentro de 7 días.

*Solución estándar.* Disolver una cantidad, precisamente pesada, de etilenoglicol en agua y diluir, cuantitativamente, paso a paso, si necesario, para obtener una solución con una concentración de cerca de 1,0 µg/ml.

*Solución prueba.* Utilizar el extracto en *Agua purificada*.

**Procedimiento.** Transferir 1 ml de la *Solución estándar* para un balón volumétrico de 10 ml. Transferir 1 ml de la *Solución prueba* para un segundo balón volumétrico de 10 ml. Transferir 1 ml del medio de extracción en *Agua purificada* para un tercer balón volumétrico de 10 ml. Para cada uno de los tres balones, añadir 100 µL de la *Solución de ácido periódico*, agitar para homogeneizar y dejar reposar por 60 minutos. Añadir en cada balón 1 ml de la *Solución de bisulfito de sodio* y homogeneizar. Añadir 100 µL de la *Solución de cromotropato disódico* para cada balón y homogeneizar. Todas las soluciones deben ser analizadas hasta 1 hora después de la adición de la *Solución de cromotropato disódico*. Añadir, cuidadosamente, 6 ml de ácido sulfúrico cada balón, homogeneizar y esperar que las soluciones alcancen la temperatura ambiente.

**Nota:** la dilución del ácido sulfúrico produce calor considerable y puede causar la ebullición de la solución. Realizar esa adición cuidadosamente. El gas de dióxido de azufre será liberado. La utilización de una cámara de extracción es recomendada.

Diluir cada solución con ácido sulfúrico diluido hasta llenar el volumen y homogeneizar. Concomitantemente, determinar las absorbancias (5.2.14) de las soluciones a partir de la *Solución estándar* y de la *Solución prueba* en células de 1 cm, en el largo de onda de absorbancia máxima a cerca de 575 nm, utilizando como blanco la solución retirada



del medio de extracción en *Agua purificada*. La absorbancia de la solución obtenida a partir de la *Solución de prueba* no es superior a la de la solución obtenida a partir de la *Solución estándar*; correspondiendo, como máximo, 1 ppm de etilenoglicol.

## MÉTODOS DE PRUEBAS

### *Reflectancia Interna Múltiple*

Equipos. Utilizar espectrofotómetro de infrarrojo capaz de corregir para el espectro del blanco y equipado con un accesorio de reflexión total atenuada y una placa KRS-5 de reflexión interna. El cristal KRS-5 de 2 mm de espesor, con un ángulo de incidencia de 45° da un número suficiente de reflexiones.

**Preparación de la muestra.** Cortar dos porciones planas representativas de la espesor media de la pared del recipiente, y apararlas conforme necesario, para obtener segmentos adecuados para montaje en el accesorio de reflectancia interna múltiple. Para evitar rayar la superficie, limpiar las muestras con papel seco o, si necesario, con un paño suave humedecido con metanol y aguardar el secado. Encajar firmemente las muestras en ambos lados de la placa de reflexión interna KRS-5, garantizando la superficie de contacto adecuada. Antes de colocar las muestras sobre la placa, comprimirlas obteniendo películas finas uniformes para ser expuestas a temperaturas de cerca de 177 °C, bajo alta presión (15 000 psi o más).

**Procedimiento General.** Colocar las partes encajadas de la muestra en el accesorio de reflectancia interna múltiple y colocar el conjunto en el haz de luz del espectrofotómetro de infrarrojo. Ajustar la posición de la muestra y los espejos del equipo para permitir la transmisión máxima de luz por el haz de referencia no-atenuado. Completar los ajustes del accesorio, atenuar el haz de referencia para permitir la escala total de deflexión, durante el barrido de la muestra. Determinar el espectro infrarrojo de 3500 a 600 cm<sup>-1</sup> para polietileno y polipropileno y de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup> para PET y PETG.

### *Análisis Térmico*

**Procedimiento General.** Cortar una sección con peso aproximado de 12 mg y colocarla en el compartimiento para la muestra. El contacto próximo entre el compartimiento y el termoelemento es esencial para la reproducibilidad de los resultados. Determinar el termograma bajo nitrógeno, utilizando las condiciones de calentamiento y enfriamiento conforme especificadas para el tipo de resina y utilizar un equipo capaz de realizar las determinaciones.

**Para Polietileno.** Determinar el termograma bajo nitrógeno en temperaturas entre 40 °C y 200 °C, a una tasa de calentamiento entre 2 °C y 10 °C por minuto, seguido de enfriamiento para 40 °C, a una tasa entre 2 °C y 10 °C por minuto.

**Para Polipropileno.** Determinar el termograma bajo nitrógeno en temperaturas que varíen entre la temperatura ambiente y 30 °C arriba del punto de fusión. Mantener la

temperatura por 10 minutos, en seguida, enfriar para 50 °C abajo de la temperatura máxima de cristalización a una tasa de 10 °C a 20 °C por minuto.

**Para poli (tereftalato de etileno).** Calentar la muestra de la temperatura ambiente hasta 280 °C a una tasa de calentamiento de cerca de 20 °C por minuto. Mantener la muestra a 280 °C por 1 minuto. Enfriar rápidamente la muestra para la temperatura ambiente y recalentarla para 280 °C a una tasa de calentamiento de aproximadamente 5 °C por minuto.

**Para poli (tereftalato de etileno) glicol.** Calentar la muestra de la temperatura ambiente hasta 120 °C a una tasa de calentamiento de cerca de 20 °C por minuto. Mantener la muestra a 120 °C por 1 minuto. Enfriar rápidamente la muestra para temperatura ambiente y recalentarla para 120 °C a una tasa de calentamiento de aproximadamente 10 °C por minuto.

### *Pruebas Biológicas*

Las Pruebas biológicas *in vitro* son realizadas de acuerdo con los procedimientos establecidos en *Pruebas de reactividad biológica in vitro* (6.2.5). Los componentes que satisfacen los requisitos de las Pruebas *in vitro* no precisan ser sometidos a pruebas adicionales. Ninguna designación de clase de plástico es atribuida a esos materiales. Los materiales que no cumplen los requisitos de las Pruebas *in vitro* no son adecuados para uso como recipientes de medicamentos.

Si la designación de clase fuese necesaria para plásticos y otros polímeros que atiendan a los requisitos previstos en

Pruebas de reactividad biológica *in vitro* (6.2.5), realizar la prueba *in vivo* adecuado especificado para Clasificación de Plásticos en Pruebas de reactividad biológica *in vivo* (6.2.6).

### *Pruebas Físico Químicas*

Las siguientes pruebas destinadas a determinar las propiedades físicas y químicas de plásticos y sus extractos, están basadas en la extracción de material plástico, siendo esencial que la cantidad designada del plástico sea utilizada. Además de eso, el área de superficie especificada debe estar disponible para la extracción en la temperatura determinada.

Parámetros de la prueba:

**Medio de Extracción.** A menos que realizada de otra forma en una prueba específica a continuación, utilizar *Agua Purificada* como medio de extracción, manteniendo la temperatura a 70 °C, durante la extracción para la *Preparación de la muestra*.

**Blanco.** Utilizar *Agua Purificada* donde el blanco es especificado en las Pruebas que siguen.

**Equipos.** Utilizar baño maría y *Recipientes de extracción*, conforme descrito en *Pruebas de reactividad biológica in*

vivo (6.2.6). Proceder conforme descrito en la *Preparación de equipos en Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6). Los recipientes y equipos no precisan ser estériles.

**Preparación de la Muestra.** A partir de una muestra homogénea de plástico, utilizar una alícuota para cada 20 ml de medio de extracción, equivalente a 120 cm<sup>2</sup> del área de la superficie total (uniendo ambos lados), y subdividida en bandas de, aproximadamente, 3 mm de ancho y próximo a 5 cm de largo. Transferir la muestra subdividida para una probeta de vidrio tipo I, graduada, de 250 ml con tapa y añadir cerca de 150 ml de *Agua purificada*. Agitar por, aproximadamente, 30 segundos, vaciar, descartar el líquido y repetir un segundo lavado.

**Extracción para Preparación de la Muestra.** Transferir la *Preparación de la muestra* pronta para un frasco de extracción adecuado y añadir la cantidad solicitada de medio de extracción. Extraer por 24 horas por calentamiento en un baño maría en la temperatura especificada para el medio de extracción. Enfriar para temperaturas no abajo de 20 °C. Pipetear 20 ml del extracto preparado para un recipiente adecuado. Utilizar esa parte en la prueba para *Capacidad Tamponante*. Decantar, inmediatamente, el extracto residual en un recipiente limpio adecuado y cerrarlo.

**Residuo No Volátil.** Transferir, en alícuotas adecuadas, 50 ml del *Extracto de Preparación de la muestra* para un crisol adecuado tarado (preferencialmente un crisol de sílice fundida que haya sido limpiado con ácido) y evaporar la parte volátil en un baño a vapor. Evaporar de forma semejante 50 ml del *Blanco* en otro crisol. Si se espera un residuo oleoso, examinar repetidamente el crisol durante la evaporación y el proceso de secado y reducir la cantidad de calor, si el aceite tiende a deslizar por la pared del crisol. Secar a 105 °C por 1 hora. La diferencia entre las cantidades obtenidas del *Extracto para la Preparación de la muestra* y el *Blanco* no debe ser superior a 15 mg.

**Residuo por incineración (5.2.10).** No es necesario realizar esta prueba cuando el resultado de la prueba de *Residuo No Volátil* no exceda 5 mg. Proceder con la obtención de los residuos, a partir del *Extracto para la Preparación de la muestra* y *Blanco* descrito en la prueba para *Residuo No Volátil* arriba, utilizando, si necesario, más ácido sulfúrico para la misma cantidad en cada crisol. La diferencia entre las cantidades obtenidas de residuo de ignición a partir del *Extracto para la Preparación de la muestra* y del *Blanco* no debe ser superior a 5 mg.

**Metales Pesados.** Pipetear 20 ml del *Extracto de la Preparación de la muestra*, filtrado, si necesario, para uno de los dos tubos de 50 ml para comparación de color. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M*, utilizando un papel indicador de corto intervalo de pH. Diluir con agua hasta cerca de 35 ml y homogeneizar.

Pipetear 2 ml de *Solución estándar de plomo* (10 ppm Pb) (5.3.2.3), transferir para el segundo tubo para comparación de color y añadir 20 ml del *Blanco*. Ajustar el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético *M* o hidróxido de amonio 6 *M*, utilizando un papel indicador de corto intervalo de pH. Diluir

con agua hasta cerca de 35 ml y homogeneizar. En cada tubo, añadir 1,2 ml de tioacetamida SR y 2 ml de *Tampón acetato pH 3,5* (5.3.2.3), diluir con agua hasta 50 ml de solución y homogeneizar. Cualquier color producido dentro de 10 minutos en la preparación que contiene el *Extracto de la Preparación de la muestra* extraído de los recipientes pruebas, no debe ser más intenso que en la *Preparación estándar*, ambas visualizadas sobre una superficie blanca (1 ppm en el extracto).

**Capacidad Tamponante.** Titular, potenciométricamente, las alícuotas de 20 ml, previamente recopiladas, del *Extracto de la Preparación de la muestra* para un pH 7,0, utilizando ácido clorhídrico 0,010 *M* o hidróxido de sodio 0,010 *M*, conforme necesario. Tratar, semejantemente, una alícuota de 20 ml del *Blanco*. Si el mismo titulante fuese necesario para ambos los titulados, la diferencia entre los dos volúmenes no debe ser superior a 10 ml; y si el ácido fuese necesario o para el *Extracto de la Preparación de la muestra*, o para el *Blanco*, y el álcali para el otro, el total de los dos volúmenes solicitados no debe ser superior a 10 ml.

## 6.2.2 TAPAS DE ELASTÓMERO

Tapas de elastómero son fabricadas en materiales obtenidos a partir de la polimerización, poli adición o poli condensación de sustancias orgánicas. Los polímeros obtenidos son, generalmente vulcanizados. Las formulaciones de las tapas contienen elastómeros naturales o sintéticos y aditivos inorgánicos y orgánicos para auxiliar o controlar la vulcanización, proporcionar propiedades físicas y químicas, coloración, o estabilizar la formulación de la tapa.

Para tapas formuladas con sustancias de elastómero naturales o sintéticas, utilizadas para almacenamiento de largo plazo. No se aplica a las tapas fabricadas en elastómero de silicona, pero se aplica a las tapas tratadas con silicona, como dimeticona, y tapas revestidas con otros materiales lubricantes, como materiales ligados químicamente, o mecánicamente a la tapa.

Los comentarios a continuación se refieren apenas a las tapas laminadas o revestidas con materiales destinados a suministrar o funcionar como una barrera a la base del elastómero, por ejemplo poli (tetrafluoretileno) (PTFE) o revestimientos barnizados. No es permitida la utilización de un material con el intuito de transformar una tapa que no se encuentra dentro de las exigencias específicas para una que esté en conformidad. Sin embargo, todas las Pruebas fisico-químicas se aplican a la fórmula base de tales tapas, así como a las tapas laminadas o revestidas. Las pruebas de funcionalidad deben ser realizadas utilizando tapas de elastómero laminadas o revestidas. Las pruebas biológicas se aplican a los materiales revestidos o laminados, así como a la fórmula base. Las pruebas biológicas pueden ser realizadas en tapas o materiales revestidos o laminados y en tapas no laminadas y no revestidas, siendo que los resultados deben ser reportados, separadamente. La fórmula base, utilizada en las pruebas fisico- químicas, o biológicas debe cumplir las especificaciones de una tapa con barrera de revestimiento que debe ser similar al revestimiento de la tapa en configuración y tamaño.

Las pruebas de esa sección se limitan a las tapas de elastómero de los Tipos I y II, siendo que las del Tipo I son utilizadas para preparaciones acuosas y las del Tipo II son normalmente destinadas a las preparaciones no acuosas. Si una tapa no atiende a todas las exigencias de la prueba del Tipo I, pero atiende a las exigencias para la prueba del Tipo II, la tapa recibe la clasificación final del Tipo II.

En esa sección se propone realizar una clasificación inicial para identificar tapas de elastómero que pueden ser apropiadas para el uso con preparaciones inyectables, con base en sus compatibilidades biológicas; en las propiedades físico-químicas de sus extractos acuosos y en sus funcionalidades. Todas las tapas de elastómero adecuadas para uso en preparaciones inyectables cumplen tanto con los límites de la prueba del Tipo I como del Tipo II. Sin embargo, con esa especificación no se tiene el intuito de servir como un único criterio de evaluación para la selección de tales tapas.

Entre los requisitos para evaluación de tapas que están además del ámbito de esa sección está el establecimiento de pruebas de identificación y especificaciones de la tapa, la verificación de la tapa, compatibilidad físico química del producto, la identificación y la determinación de seguridad de tapas filtrables encontradas en el embalaje del producto, la verificación de la funcionalidad del embalaje del producto bajo condiciones reales de almacenamiento y condiciones de uso.

El usuario de las tapas debe obtener del proveedor una garantía de que la composición de la tapa no varía y de que es la misma utilizada en la prueba de compatibilidad. Cuando el proveedor informa al usuario final sobre cambios en la composición, la prueba de compatibilidad debe ser repetida, total o parcialmente, dependiendo de la naturaleza de los cambios.

## CARACTERÍSTICAS

Las tapas de elastómero son translúcidas, u opacas y no tienen coloración característica, dependiendo de los aditivos utilizados. Son homogéneas y prácticamente exentas de materiales luminosos y accidentales, como fibras, partículas extrañas, y residuos de caucho.

## IDENTIFICACIÓN

Las tapas son fabricadas a partir de una amplia variedad de materiales elastoméricos y revestimientos poliméricos opcionales. Por tanto, en esa sección no se especifica pruebas de identificación envolviendo todas las posibles presentaciones de las tapas. Es de responsabilidad del proveedor de la tapa y del fabricante del producto acabado verificar la formulación de la tapa y cualquier material revestido, o laminado utilizado de acuerdo con las pruebas de identi-

cación adecuadas. Ejemplos de algunas pruebas analíticas que pueden ser empleadas incluyen densidad específica, análisis de cenizas, determinación del contenido de azufre, cromatografía en capa delgada del extracto, espectrofotometría de absorción ultravioleta del extracto, o espectrofotometría de absorción.

## PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS

Las tapas de elastómero deben estar en conformidad con las exigencias biológicas; físico-químicas y funcionales.

Como las tapas de elastómero son procesadas por el proveedor antes de la distribución para el usuario final, el proveedor debe demostrar la conformidad de las tapas expuestas a las etapas de procesamiento o esterilización. De modo análogo, si las tapas de elastómero recibidas por el usuario final fueren procesadas, o esterilizadas, subsiguientemente, el usuario final es responsable en comprobar la conformidad continuada de las tapas subsiguientes a las condiciones de procesamiento o esterilización. Eso es importante si las tapas son expuestas a procesos o condiciones que puedan tener impacto significativo en las características biológicas, físico-químicas o funcionales de la tapa, como la radiación gamma.

Para tapas que normalmente son lubricadas con silicona antes del uso, es permitido realizar la prueba físico-química en tapas no lubricadas para evitar interferencia potencial de método y/o dificultades en la interpretación de los resultados de la prueba. Para tapas suministradas con otros lubricantes no oclusivos, todas las pruebas deben ser realizadas utilizando la tapa revestida.

Para tapas revestidas, o laminadas con revestimientos destinados a proporcionar una función de barrera, como PTFE, o revestimientos barnizados, las Pruebas físico-químicas serán aplicadas al elastómero con base no revestida, así como a las tapas revestidas. La tapa no revestida sometida a las Pruebas físico-químicas debe ser similar a la tapa revestida en tamaño y configuración. Los usuarios finales de tapas revestidas, también, son responsables en comprobar la conformidad de esas tapas con las de las especificaciones físico-químicas, procesadas o tratadas de una manera que simula las condiciones normalmente empleadas por el usuario final antes del uso.

En todos los casos es adecuados documentar las condiciones de procesamiento, pre-tratamiento, esterilización o lubricación de la tapa cuando se relatan los resultados.

En la **Tabla 1** están resumidas las exigencias de las pruebas de las tapas y las responsabilidades del proveedor y del usuario final.

**Tabla 1 - Exigencias de las pruebas de las tapas y las responsabilidades del proveedor.**

<i>Tipos de tapas (como suministrados o Usados)</i>	<i>Pruebas Físico químicas</i>	<i>Pruebas de Funcionalidad</i>	<i>Pruebas Biológicas</i>
Tapas con o sin revestimiento de silicona	Las Pruebas deben ser realizadas El uso de silicona es opcional Responsabilidad: proveedor y usuario final	Las Pruebas deben ser realizadas El uso de silicona es opcional Responsabilidad: proveedor y usuario final	Las Pruebas deben ser realizadas El uso de silicona es opcional Responsabilidad: proveedor y usuario final
Tapas con revestimientos lubricantes (Materiales no oclusivos, no silicona)	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas Responsabilidad: proveedor y usuario final	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas Responsabilidad: proveedor y usuario final	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas Responsabilidad: proveedor y usuario final
Tapas con revestimientos oclusivos	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas Responsabilidad: proveedor y usuario final Y: Las Pruebas deben ser realizadas en tapas no revestidas (fórmula base) Responsabilidad: proveedor	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas Responsabilidad: proveedor y usuario final	Las Pruebas deben ser realizadas en tapas revestidas O: Las Pruebas deben ser realizadas en tapas no revestidas (fórmula base) y material laminado/ revestido (reportar los resultados separadamente) Responsabilidad: proveedor y usuario final.

## 6

**PRUEBAS BIOLÓGICAS**

Son indicadas dos etapas de prueba. La primera etapa es la realización de la prueba *in vitro*. Los materiales que no atienden las exigencias de la prueba *in vitro* son sometidos a la segunda etapa de pruebas *in vivo*, conforme descrito en *Pruebas de reactividad biológica in vivo (6.2.6)*. Los materiales que atienden las exigencias para las Pruebas *in vitro* no necesitan ser sometidos a la prueba *in vivo*.

Las tapas Tipo I y Tipo II deben estar en conformidad con las Pruebas de reactividad biológica *in vitro* e *in vivo*.

**PRUEBAS FÍSICO-QUÍMICAS***Desarrollo de la Preparación S*

Colocar las tapas enteras, no cortadas, correspondientes a un área de superficie de  $(100 \pm 10)$  cm<sup>2</sup> en un recipiente de vidrio adecuado. Cubrir las tapas con 200 ml de agua purificada o agua para inyectables. Se no es posible obtener una tapa con el área de superficie prescrita utilizando tapas no cortadas, seleccionar un número de tapas que irán a aproximarse de 100 cm<sup>2</sup>, y ajustar el volumen de agua utilizado para el equivalente a 2 ml para cada 1 cm<sup>2</sup> del área de superficie real de la tapa utilizada. Hervir por 5 minutos y enjuagar cinco veces con agua purificada o agua para inyectables fría.

Colocar las tapas lavadas en un frasco de vidrio de cuello largo del Tipo I, añadir la misma cantidad de agua purificada o agua para inyectables, inicialmente adicionada a

las tapas y pesar. Cubrir la boca del frasco con un vaso de precipitados de vidrio del Tipo I. Esterilizar en una autoclave, de modo que la temperatura de  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  sea alcanzada dentro de 20 a 30 minutos y mantener esa temperatura durante 30 minutos. Dejar enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 30 minutos. Añadir agua purificada o agua para inyectables para volver a la masa original. Agitar, decantar inmediatamente y recoger el líquido. Ese líquido debe ser agitado antes de ser utilizado en cada una de las pruebas.

*Preparación del Blanco*

La preparación del blanco debe ser realizada similarmente, utilizando 200 ml de agua purificada, o agua para inyectables, omitiendo las tapas.

*Apariencia de la Preparación (Turbidez y Coloración)***Determinación de la Turbidez**

La determinación de la turbidez puede ser realizada por medio de comparación visual (Procedimiento A), o instrumentalmente utilizando un turbidímetro adecuado (Procedimiento B). La evaluación instrumental de la turbidez da una prueba que no depende de la acuidad visual del analista.

**Solución de Sulfato de Hidracina.** Disolver 1,0 g de sulfato de hidracina en agua y diluir con agua a 100,0 ml. Dejar en reposo durante 4 a 6 horas.



**Solución de Hexametilentetramina.** Disolver 2,5 g de hexametilentetramina en 25,0 ml de agua en frasco de vidrio, con tapón, de 100 ml.

**Suspensión Stock de Opalescencia.** Añadir 25,0 ml de la solución de sulfato de hidracina a la solución de hexametilentetramina en el frasco, mezclar y dejar en reposo durante 24 horas. Esa suspensión es estable por 2 meses, si es estocada en un recipiente de vidrio exento de defectos de superficie. La suspensión no debe adherir al vidrio y debe ser mezclada antes del uso.

**Preparación Estándar de Opalescencia.** Preparar una suspensión a través de la dilución de 15,0 ml de la suspensión stock de opalescencia con agua para 1000,0 ml. La preparación estándar de opalescencia es estable por, aproximadamente, 24 horas después de la preparación.

**Suspensiones de Referencia.** Preparar de acuerdo con la **Tabla 2**. Mezclar y agitar antes del uso. Suspensiones estables de formacina que pueden ser utilizadas para preparar estándares estables están disponibles comercialmente y pueden ser utilizadas después de la comparación con estándares preparados como descrito.

**Tabla 2 - Preparado de las suspensiones de referencia.**

	<i>Referencia Suspensión A</i>	<i>Referencia Suspensión B</i>	<i>Referencia Suspensión C</i>	<i>Referencia Suspensión D</i>
Estándar de Opalescencia	5,0 ml	10,0 ml	30,0 ml	50,0 ml
Agua	95,0 ml	90,0 ml	70,0 ml	50,0 ml
Unidad de Turbidez Nefelométrica	3 UTN	6 UTN	18 UTN	30 UTN

**Procedimiento A. Comparación Visual** – Utilizar tubos de ensayo idénticos, de vidrio incoloro; transparente y neutro; con una base plana y un diámetro interno de 15 a 25 mm. Llenar un tubo con largo de 40 mm con la *Preparación S*, un tubo de mismo largo con agua y cuatro otros tubos de mismo largo con las Suspensiones de Referencia A, B, C y D. Comparar las preparaciones a luz del día difusa 5 minutos después de la preparación de las *Suspensiones de Referencia*, visualizando, verticalmente, contra un fondo negro. Las condiciones de luz deben ser tales que la Suspensión de Referencia A pueda ser rápidamente distinguida del agua y que la Suspensión de Referencia B pueda ser rápidamente distinguida de la Suspensión de Referencia A.

**Límite.** La *Preparación S* no debe ser más opalescente que la Suspensión de Referencia B para las tapas del Tipo I, y no más opalescente del que a Suspensión de Referencia C para las tapas del Tipo II. La *Preparación S* es considerada límpida si la claridad es la misma que la del agua cuando

examinada es como descrito arriba, o si su opalescencia no es más pronunciada del que la Suspensión de Referencia A (consultar la **Tabla 3**).

**Procedimiento B. Comparación Instrumental:** Medir la turbidez de las Suspensiones de Referencia en un turbidímetro calibrado adecuado. El blanco debe ser probado y los resultados corregidos para el blanco. Las Suspensiones de Referencia A, B, C y D representan 3, 6, 18 y 30 Unidades de Turbidez Nefelométricas (UTN) respectivamente. Medir la turbidez de la Solución S utilizando el turbidímetro calibrado.

**Límite.** La turbidez de la Solución S no debe ser mayor del que aquella para la Suspensión de Referencia B (6 UTN) para las tapas del Tipo I, y no es mayor que la de la Suspensión de Referencia C (18 UTN) para las tapas del Tipo II (**Tabla 3**).

**Tabla 3 - Método de comparación de la turbidez desarrollada en las preparaciones.**

<i>Exigencias de Opalescencia</i>	<i>Procedimiento A (visual)</i>	<i>Procedimiento B (Instrumental)</i>
Tapas del Tipo I	No más opalescente que la Suspensión B	No más que 6 UTN
Tapas del Tipo II	No más opalescente que la Suspensión C	No más que 18 UTN

### Determinación del Color

**Color Estándar.** Preparar una dilución 3,0 ml del Fluido de Correspondencia O con 97,0 ml de ácido clorhídrico diluido.

**Procedimiento.** Utilizar tubos idénticos, de vidrio neutro, incoloro, transparente, con un fondo plano y diámetro in-

terno de 15 a 25 mm. Colocar en un tubo, la *Preparación S*, formando una columna líquida de 40 mm de largo y en un segundo el Estándar de Color formando la misma columna líquida. Comparar los líquidos a luz diurna difusa, visualizando, verticalmente, contra un fondo blanco.

**Límite.** La *Preparación S* no debe ser más intensamente colorida que el Estándar de Color.



*Acidez o Alcalinidad*

**Solución de Azul de Bromotimol.** Disolver 50 mg de azul de bromotimol en una mezcla de 4 ml de hidróxido de sodio a 0,02 M y 20 ml de alcohol. Diluir con agua para 100 ml.

**Procedimiento.** Añadir 0,1 ml de la solución de azul de bromotimol a 20 ml de la *Preparación S*.

Si la preparación se queda amarilla, titular con hidróxido de sodio a 0,01 M hasta que el punto final azul sea alcanzado.

Si la preparación se queda azul, titular con ácido clorhídrico a 0,01 M hasta que el punto final amarillo sea alcanzado.

Si la preparación se queda verde, ella es neutra y no es necesaria la titulación.

**Corrección del Blanco.** Probar 20 ml del blanco de modo similar. Corregir los resultados obtenidos para la *Preparación S* a través de la sustracción o adición del volumen de titulante requerido para el blanco, como apropiado.

**Límite.** No más que 0,3 ml de hidróxido de sodio a 0,01 M produce un color azul, o no más que 0,8 ml de ácido clorhídrico a 0,01 M produce un color amarillo, o la titulación no es necesaria.

*Absorbancia*

**Procedimiento.** Realizar esta prueba en el espacio de tiempo de 5 horas después de desarrollar la *Preparación S*. Filtrar la *Preparación S* a través de un filtro con poro de 0,45 µm, descartando el primer ml de lo filtrado. Medir la absorbancia de lo filtrado en largos de onda entre 220 y 360 nm en una célula de 1 cm utilizando el blanco en una célula de correspondencia en un haz de referencia. Si la dilución del filtrado es necesaria antes de la medida de la absorbancia, corregir los resultados de la prueba para la dilución.

**Límite.** Las absorbancias en todos esos largos de onda no deben exceder 0,2 para las tapas del Tipo I o 4,0 para las tapas del Tipo II.

*Sustancias Reductoras*

**Procedimiento.** Realizar esta prueba en el espacio de tiempo de 4 horas después de desarrollar la *Preparación S*. A 20,0 ml de la *Preparación S* añadir 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20,0 ml de permanganato de potasio a 0,002 M. Hervir por 3 minutos. Enfriar, añadir 1 g de yoduro de potasio, y titular, inmediatamente, con tiosulfato de sodio a 0,01 M, utilizando 25,0 ml de solución de almidón TS como indicador. Realizar la titulación utilizando 20,0 ml de blanco y notar la diferencia en el volumen de tiosulfato de sodio a 0,01 M necesario.

**Límite.** La diferencia entre los volúmenes de titulación no debe ser mayor que 3,0 ml para las tapas del Tipo I y no debe ser mayor que 7,0 ml para las tapas del Tipo II.

*Metales Pesados*

**Procedimiento.** Proceder como realizado para el Método 1 en Metales Pesados. Usar 10,0 ml de la *Preparación S*, en la preparación problema.

**Límite.** 2 ppm de metales pesados como plomo.

*Zinc Extraíble.*

**Solución Prueba.** Preparar una Solución Prueba por medio de la dilución de 10,0 ml de la *Preparación S* para 100 ml con ácido clorhídrico a 0,1 M. Preparar el blanco de la prueba similarmente, utilizando el blanco para la *Preparación S*.

**Solución Estándar de Zinc.** Preparar una solución (10 ppm de Zn) disolviendo sulfato de zinc en ácido clorhídrico 0,1 M

**Soluciones de Referencia.** Preparar, como mínimo, 3 Soluciones de Referencia por medio de la dilución de la Solución Estándar de Zinc con ácido clorhídrico 0,1 M. Las concentraciones de zinc en estas Soluciones de Referencia son la extensión del límite esperado de la Solución Prueba.

**Procedimiento.** Utilizar un espectrómetro de absorción atómica; adecuado y equipado con una fuente de radiación electromagnética, adecuada y una llama de aire acetileno. Un procedimiento alternativo como un análisis por espectrometría de masa o espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado, apropiadamente validado puede ser utilizado.

Probar cada una de las Soluciones Referencia en largo de onda para Zinc seleccionado en 213,9 nm, por lo menos 3 veces. Registrar las lecturas estables. Enjuagar el equipo con la solución blanco, toda vez para garantizar que la lectura retorna al valor inicial del blanco. Preparar una curva de calibración a partir de la media de las lecturas obtenidas para cada Solución de Referencia. Registrar la absorbancia de la Solución Prueba. Determinar la concentración de zinc en ppm de la Solución Prueba utilizando la curva de calibración.

**Límite.** La *Preparación S* contiene, como máximo, 5 ppm de zinc extraíble.

*Amonio*

**Solución de Tetrayodomercurato (II) de Potasio Alcalina.** Preparar una solución de 100 ml conteniendo 11 g de yoduro de potasio y 15 g de yoduro de mercurio en agua. Inmediatamente antes del uso, mezclar 1 volumen de esa solución con igual volumen de una solución a 250 g por L de hidróxido de sodio.

**Solución Prueba.** Diluir 5 ml de la *Preparación S* en 14 ml de agua. Tornar alcalina, si necesario, por medio de la adición de hidróxido de sodio 1 M, y diluir en agua a 15 ml. Añadir 0,3 ml de la solución de tetrayodomercurato (II) de potasio alcalina, y cerrar el recipiente.

**Solución Estándar de Amonio.** Preparar una solución de cloruro de amonio en agua (1 ppm de  $\text{NH}_4$ ). Mezclar 10 ml de la solución de 1 ppm de cloruro de amonio con 5 ml de agua y 0,3 ml de solución de tetrayodomercurato (II) de potasio alcalina. Cerrar el recipiente.

**Límite.** Después de 5 minutos, cualquier color amarillo en la Solución Prueba no debe ser más oscuro que en la Solución Estándar de Amonio (como máximo, 2 ppm de  $\text{NH}_4$  en la *Preparación S*).

#### *Sulfuros Volátiles*

**Procedimiento.** Colocar las tapas, cortar si necesario, con un área de superficie total de  $(20 \pm 2)$  cm<sup>2</sup> en un frasco de 100 ml, y añadir 50 ml de una solución de ácido cítrico a 20 g por L. De la misma manera y al mismo tiempo, preparar una solución control en un frasco de 100 ml separado por medio de la disolución de 0,154 mg de sulfuro de sodio en 50 ml de una solución de ácido cítrico a 20 g por L. Colocar un pedazo de papel de acetato de plomo sobre la boca de cada frasco, y agarrar el papel en la posición, colocándolo sobre un frasco de pesaje invertido. Caliente los frascos en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

**Límite.** Cualquier coloración negra en el papel producida por la *Preparación S* no es más intensa que la producida por la solución control.

#### PRUEBAS FUNCIONALES

Las muestras tratadas como descrito para obtener la *Preparación S* y secas al aire deben ser utilizadas para las Pruebas de Funcionalidad; de Penetrabilidad; Fragmentación y Capacidad Autosellante. Las Pruebas de Funcionalidad son realizadas en tapas destinadas a ser penetradas por una aguja hipodérmica. La prueba de Capacidad autosellante es necesaria apenas para tapas destinadas para recipientes de dosis múltiple. La aguja especificada para cada prueba es una aguja hipodérmica lubricada con bisel largo (ángulo del bisel  $12 \pm 2^\circ$ ).

#### *Penetrabilidad*

**Procedimiento.** Llenar 10 frascos adecuados al volumen nominal, con agua, ajustar las tapas a ser examinadas y cerrar los frascos con las respectivas tapas. Utilizando una nueva aguja hipodérmica, como ya descrito, para cada tapa, perforar la tapa con la aguja perpendicular a la superficie.

**Límite.** La fuerza para perforación de cada tapa no debe ser mayor que 10 N (1 kgf), determinada con una precisión de  $\pm 0,25$  N (25 gf).

#### *Fragmentación*

**Tapas para Preparaciones Líquidas.** Llenar 12 frascos limpios con agua hasta 4 ml menos que la capacidad nomi-

nal. Ajustar las tapas que serán examinadas, cerrar con una tapa y dejar en reposo por 16 horas.

**Tapas para Preparaciones Secas.** Ajustar las tapas a ser examinadas en 12 frascos limpios y cerrar cada uno con una tapa.

**Procedimiento.** Utilizando una aguja hipodérmica como descrito anteriormente, ajustada a una jeringa limpia, inyectar dentro de cada frasco 1 ml de agua, mientras se remueve 1 ml de aire. Repetir ese procedimiento 4 veces para cada tapa, perforar cada vez en un local diferente. Utilizar una nueva aguja para cada tapa, verificando si ella no se rompió durante la prueba. Filtrar el volumen total del líquido en todos los frascos a través de un filtro simple con tamaño nominal de poro no mayor que 0,5  $\mu\text{m}$ . Contar los fragmentos de caucho en la superficie del filtro visibles a ojo.

**Límite.** No hay más que 5 fragmentos visibles. Ese límite está basado en la asunción de que los fragmentos con un diámetro superior a 50  $\mu\text{m}$  son visibles a ojo. En el caso de dudas o controversia, las partículas son examinadas microscópicamente para verificar sus naturalezas y tamaños.

#### *Capacidad Autosellante*

**Procedimiento.** Llenar 10 frascos adecuados con agua hasta el volumen nominal. Ajustar las tapas a ser examinadas y tapar. Utilizando una nueva aguja hipodérmica como anteriormente para cada tapa, perforar cada tapa 10 veces, cada vez en un local diferente. Sumergir los 10 frascos en una solución de azul de metileno a 0,1% (1 g por L), y reducir la presión externa por 27 kPa por 10 minutos. Restaurar la presión atmosférica, y dejar los frascos inmersos por 30 minutos. Enjuagar la parte externa de los frascos.

**Límite.** Ninguno de los frascos debe contener cualquier trazo de solución azul.

## 6.2.3 1 RECIPIENTES DE PLÁSTICO – PRUEBAS DE DESEMPEÑO

En esa sección están propuestos estándares para las propiedades funcionales de recipientes plásticos y sus componentes utilizados para acondicionar medicamentos. Las Pruebas a continuación son establecidas para determinar la permeabilidad a la humedad y transmisión de luz de los recipientes plásticos aplicables a cada tipo de embalaje.

Un recipiente destinado a suministrar protección a la luz, o presentado como recipiente resistente a la luz debe satisfacer la exigencia de *Prueba de Transmisión de la luz (6.2.3.5)*, donde la protección, o la resistencia es debido a las propiedades específicas del material de que el recipiente es compuesto, incluyendo cualquier revestimiento aplicado a él. Un recipiente claro e incoloro, o translúcido, fabricado como *resistente a la luz* por medio de inclusión de compuesto opaco está exento de los requisitos del ítem *Pruebas de Transmisión de luz (6.2.3.5)*. De la forma como

2 Se refiere a la ISO 7864, agujas hipodérmicas estériles de uso único con un diámetro externo de 0,8 mm (calibre 21).

utilizado en ese capítulo, el término recipiente se refiere al sistema completo incluyendo el recipiente en sí, el revestimiento cuando utilizado, el cierre en el caso de recipientes de unidades múltiples y las tapas y *blíster* en los casos de recipientes de dosis unitaria.

### 6.2.3.1 RECIPIENTES DE MÚLTIPLES UNIDADES PARA CÁPSULAS Y COMPRIMIDOS

**Desecante.** Colocar una cantidad de cloruro de calcio anhidro (1) de 4 a 8 *mesh* en un recipiente raso, teniendo el cuidado de excluir cualquier polvo fino, secar a 110 °C durante una hora y enfriar en un desecador.

**Procedimiento.** Seleccionar 12 recipientes de tamaños y tipo uniformes, limpiar las superficies de cierre con un paño exento de fibras, cerrar y abrir cada recipiente 30 veces. Tapar firme y uniformemente toda vez que el recipiente es cerrado. Tapar los recipientes con tapa de rosca con movimiento de momento que esté dentro del intervalo especificado en la **Tabla 1**. Añadir desecantes a 10 recipientes, designados *recipientes pruebas*, llenar cada uno hasta 13 mm del cierre si el volumen fuese de 20 ml o superior, o llenar cada uno hasta dos tercios de la capacidad si el volumen del recipiente fuese inferior a 20 ml. Si la parte interna del recipiente posee más de 63 mm de profundidad, un embudo inerte o separador debe ser colocado en el fondo para minimizar el peso total del recipiente y del desecante; la capa de desecante en tal recipiente no debe ser inferior a 5 cm en profundidad. Cerrar cada uno, inmediatamente después de la adición del desecante, aplicando el momento designado en la **Tabla 1** en el caso de recipientes con tapa de rosca. Para cada uno de los 2 recipientes remanentes, designados como *controles*, añadir un número suficiente de esferas de vidrio para alcanzar un peso aproximadamente igual a los de los *recipientes pruebas* y cerrar aplicando el momento designado en la **Tabla 1** en el caso de recipientes con tapa a rosca. Registrar el peso de los recipientes, individualmente, así, preparados hasta la aproximación de 0,1 mg si el volumen del recipiente es inferior a 20 ml, o hasta la aproximación en mg más próximo si el volumen del recipiente es de 20 a 200 ml, o hasta a aproximación en centigramos (10 mg) si el volumen es de 200 ml o superior. Almacenar a la humedad relativa de  $(75 \pm 3) \%$  y a la temperatura de  $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . Un sistema saturado de 35 g de cloruro de sodio para cada 100 ml de agua colocado en el fondo del desecador mantiene la humedad especificada, u otros métodos pueden ser empleados para mantener esas condiciones. Después de  $336 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (14 días), registrar el peso de los recipientes individualmente de la misma forma. Llenar, completamente, 5 recipientes vacíos del mismo tamaño y tipo de los *recipientes pruebas* con agua o un sólido no compresible, de flujo libre tal como esferas de vidrio pequeñas bien acomodadas hasta nivel indicado por la superficie del cierre. Transferir el contenido de cada recipiente para una probeta graduada, y determinar el volumen promedio del recipiente en ml. Calcular la tasa de permeabilidad a la humedad, en mg por día, por L, por medio de la fórmula:

$$(1000/14V)[(T_F - T_I) - (C_F - C_I)]$$

en que

$V$  es el volumen en ml del recipiente,  $(T_F - T_I)$  es la diferencia en mg entre el peso final e inicial de cada *recipiente prueba*;  $(C_F - C_I)$  es la diferencia en mg entre el promedio final y el promedio inicial de los pesos de los 2 controles.

**Tabla 1 - Momento aplicable al recipiente con tapa tipo rosca.**

Diámetro de Cierre (mm)	Intervalo de apriete sugerido con momento aplicado manualmente (pulgadas / libras)
8	5
10	6
13	8
15	5-9
18	7-10
20	8-12
22	9-14
24	10-18
28	12-21
30	12-23
33	15-25
38	17-26
43	17-27
48	19-30
53	21-36
58	23-40
63	25-43
66	26-45
70	28-50
83	32-65
86	40-65
89	40-70
100	45-70
110	45-70
120	55-95
132	60-95

a El momento designado para el próximo diámetro de cierre mayor debe ser aplicado en los *recipientes prueba* que tengan un diámetro de cierre intermedio a los diámetros listados.

b utilizar equipamiento adecuado para medición de momento.

Para recipientes utilizados en medicamentos concedidos bajo prescripción, los recipientes así probados son del tipo recipientes sellados, si no más que uno de los 10 *recipientes pruebas* excede a 100 mg por día por L en permeabilidad a la humedad, y ninguno excede a 200 mg por día por L. Para recipientes utilizados para medicamentos dispensados bajo prescripción, los recipientes son bien cerrados si no más que uno de los 10 *recipientes pruebas* excede a 2000 mg por día por L en permeabilidad a la humedad y ninguno excede a 3000 mg por día por L.

### RECIPIENTES DE UNIDADES MÚLTIPLES PARA CÁPSULAS Y COMPRIMIDOS (sin cierre)

**Recipiente de Polietileno.** Cerrar los recipientes, con sellos impenetrables obtenidos por medio de sellado caliente con una hoja de aluminio laminada con polietileno u otro sellado adecuado. Probar los recipientes conforme descrito arriba. Los recipientes de polietileno de alta densidad, probados atienden a los requisitos si la permeabilidad a la humedad excede 10 mg por día por L, como máximo, en

1 de los 10 *recipientes pruebas* y no excede 25 mg por día por L en ninguno de ellos. Los recipientes de polietileno de baja densidad, así, probados atienden a los requisitos si la permeabilidad a la humedad excede 20 mg por día por L, como máximo, en 1 de los 10 *recipientes pruebas* y no excede 30 mg por día por L en ninguno de ellos.

**Recipientes de Polipropileno.** Cerrar los recipientes, con sellados impenetrables obtenidos por medio de sellado caliente con una hoja de aluminio laminada con polietileno u otro cierre adecuado. Probar los recipientes conforme descrito arriba. Los recipientes atienden a los requisitos si la permeabilidad a la humedad excede 15 mg por día por L, como máximo, en 1 de los 10 *recipientes pruebas* y no excede 25 mg por día por L en ninguno de ellos.

### 6.2.3.2 RECIPIENTES DE UNIDAD SIMPLE Y DOSIS UNITARIA PARA CÁPSULAS Y COMPRIMIDOS

Para permitir una evaluación fundamentada con relación a la adecuabilidad del embalaje para un tipo específico de producto, los procedimientos y esquemas de clasificación a continuación son presentados para evaluar las características de permeabilidad a la humedad de los recipientes para unidad simple y para dosis unitaria. Dado que los desempeños del equipo y del operador pueden afectar la penetración de humedad en un recipiente formado o cerrado, las características de penetración de humedad del sistema de embalaje utilizado deben ser determinadas.

**Desecante.** Secar las pastillas desecantes apropiadas a 110 °C durante 1 hora antes del uso. Utilizar pastillas con peso aproximado de 400 mg cada una y con diámetro de, aproximadamente, 8 mm. Si necesario, debido a la dimensión limitada del recipiente de dosis unitaria, pueden ser utilizadas pastillas pesando menos que 400 mg cada una y con diámetro inferior a 8 mm.

#### PROCEDIMIENTO

**Método I.** Sellar no menos que 10 recipientes de dosis unitaria con una pastilla cada uno, y sellar 10 unidades adicionales de recipientes de dosis unitaria vacíos para *control*, utilizando dedos de guantes o una pinza almohadada para manipular los recipientes sellados. Numerar los recipientes y registrar los pesos, individualmente, con la aproximación en mg más próxima. Pesar los *controles* como una unidad y dividir el peso total por el número de controles para obtener el promedio. Almacenar todos los recipientes a una humedad relativa de  $(75 \pm 3) \%$  y a una temperatura de  $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . Un sistema saturado de 35 g de cloruro de sodio para cada 100 ml de agua colocado en el fondo de un desecador mantiene la humedad especificada, u otros métodos pueden ser empleados para mantener esas condiciones. Después de un intervalo de 24 horas, y en cada uno de sus múltiplos, retirar los recipientes de la cámara, y dejar equilibrar durante 15 a 60 minutos en el área de pesaje. Nuevamente registrar el peso de los recipientes individualmente y los controles combinados de la misma manera. Si ninguna pastilla indicadora se torna rosa durante los procedimientos, o si el aumento de peso de la pastilla excede 10%, finalizar

la prueba y considerar válida apenas las primeras determinaciones. Retornar los recipientes a la cámara de humedad. Calcular la tasa de penetración de humedad en mg por día de cada recipiente utilizando a fórmula:

$$(1/N) [(W_F - W_I) - (C_F - C_I)]$$

en que

N es el número de días expirados en el período de prueba (comenzando después de las 24 horas iniciales de período de equilibrio);

$(W_F - W_I)$  es la diferencia en mg entre los pesos finales e iniciales de cada recipiente prueba;

$(C_F - C_I)$  es la diferencia en mg entre los pesos promedios finales e iniciales de los controles, con los datos calculados con relación a dos cifras significativas. Cuando la penetración mensurada es inferior a 5 mg por día, y cuando es observado que los controles alcanzan el equilibrio en un plazo de 7 días, la penetración individual puede ser determinada más precisamente, utilizando el *recipiente prueba del 7º día* y el *recipiente control* como  $W_1$  y  $C_1$  respectivamente, en los cálculos. En este caso, un intervalo adecuado de prueba para Clase A no debe ser inferior a 28 días a partir del período de equilibrio del 7º día (un total de 35 días).

**Método II.** Utilizar ese procedimiento para embalajes, como cartelas que pueden ser perforadas, que incorporan un número de *blister* o recipientes de dosis unitaria sellados, separadamente. Sellar un número suficiente de embalajes, como mínimo, 4 y un total de, como mínimo, 10 recipientes de dosis unitaria o *blister* llenados con una pastilla en cada unidad a ser probada. Sellar un número correspondiente de embalajes vacíos, cada uno conteniendo el mismo número de recipientes de dosis unitaria o *blister* iguales a los utilizados en los embalajes pruebas, como *controles*. Almacenar todos los recipientes en humedad relativa de  $(75 \pm 3) \%$  y a la temperatura de  $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . Un sistema saturado de 35 g de cloruro de sodio para cada 100 ml de agua, colocado en el fondo del desecador mantiene la humedad requerida, u otros métodos pueden ser empleados para mantener esas condiciones. Después de 24 horas y cada 24 horas subsiguientes, retirar los embalajes de la cámara y dejar que se equilibren a temperatura ambiente durante aproximadamente 45 minutos. Registrar los pesos de los embalajes individuales y retornarlos a la cámara. Pesar los embalajes *control* como una unidad y dividir el peso total por el número de embalajes control para obtener el peso promedio de los embalajes vacíos. Si cualquier pastilla indicadora adquiere una coloración rosa durante el procedimiento o si el peso promedio de la pastilla excede a 10% en cualquiera de los embalajes, finalizar la prueba y considerar válidas apenas las primeras determinaciones. Calcular la tasa promedio de penetración de humedad, en mg por día para cada recipiente de dosis unitaria o *blister*, en cada embalaje de acuerdo con la fórmula:

$$(1/NX) [(W_F - W_I) - (C_F - C_I)]$$

en que

N es el número de días transcurridos dentro del período de la prueba (comenzando después de las 24 horas iniciales de período de equilibrio);



X es el número de unidades selladas separadamente por embalaje;  
 $(W_F - W_V)$  es la diferencia en mg entre los pesos iniciales y finales de cada embalaje prueba;  
 $(C_F - C_V)$  es la diferencia en mg entre los pesos promedios finales e iniciales de los embalajes control, siendo esas tasas calculadas hasta dos cifras significativas.

**Límites.** Los recipientes de dosis unitaria individuales, como probados en el *Método I*, son clasificados como *Clase A* si, como máximo, 1 de los 10 recipientes probados excede 0,5 mg por día en tasa de penetración de humedad y ninguno excede 1 mg por día; son clasificados como *Clase B* si, como máximo, 1 de los 10 recipientes probados excede 5 mg por día y ninguno excede 10 mg por día; son clasificados como *Clase C* si, como máximo, 1 de los 10 recipientes probados excede 20 mg por día y ninguno excede 40 mg por día y son clasificados como *Clase D* si los recipientes probados no cumplen ninguno de esos requisitos de tasa de penetración de humedad.

Los embalajes, de la forma como son probados en el *Método II*, son clasificados como *Clase A* si ningún embalaje probado excede 0,5 mg por día de tasa de penetración de humedad promedio por *blíster*; son clasificados como *Clase B* si ningún embalaje probado excede 5 mg por día de tasa de penetración de humedad en promedio por *blíster*; son clasificados como *Clase C* si ningún embalaje excede 20 mg de tasa de humedad en promedio por *blíster* y son clasificadas como *Clase D* si ningún embalaje probado cumple los requisitos de tasa de penetración de humedad en promedio por *blíster* arriba mencionados.

Con el uso del *desecante* descrito en el *Método I* y *Método II*, después de cada 24 horas, los *recipientes pruebas y controles* son pesados; los intervalos de prueba adecuados para los pesajes finales, WF y CF, deben ser los siguientes: 24 horas para *Clase D*; 48 horas para *Clase C*; 7 días para *Clase B* y, como mínimo, 28 días para *Clase A*.

### 6.2.3.3 RECIPIENTES DE DOSIS MÚLTIPLE Y DE DOSIS UNITARIA PARA LÍQUIDOS

Los estándares y las pruebas presentados en esta sección son usados para medir las características funcionales y de desempeño de recipientes plásticos utilizados para embalar productos acuosos por medio de la medida de la pérdida de peso de agua líquida como un porcentaje de su contenido. Esta prueba, también, puede ser utilizada para demostrar una comparación funcional y de desempeño. Durante todo el procedimiento, determinar los pesos de los sistemas individuales de cierre de los recipientes (recipiente, sellado interno si utilizado, y cierre) ambos como pesos de tara y pesos de envase, a una aproximación de 0,1 mg si la capacidad máxima es inferior a 200 ml; una aproximación en mg si la capacidad máxima está entre 200 y 1000 ml o una aproximación en centigramos (10 mg) si la capacidad máxima es de 1000 ml o superior.

**Procedimientos para Pruebas de Recipientes Cerrados Comercializados** (tapón si aplicable, sellado interno y

tapa). Seleccionar 10 recipientes de tipo y tamaño uniformes y limpiar las superficies de sellado con un paño exento de fibras. Montar cada recipiente con el tapón, si aplicable, y sistema de cierre. Numerar cada sistema de cierre y registrar el peso tarado.

Retirar los cierres y con el auxilio de una pipeta, llenar los recipientes con agua hasta la capacidad máxima. Montar los recipientes con los sellados y aplicar los cierres. Si fueren utilizadas tapas de rosca, aplicar el momento especificado en la **Tabla 1** en *Recipientes de múltiples unidades para cápsulas y comprimidos (6.2.3.1)* y almacenar los recipientes cerrados a temperatura de  $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  y humedad relativa de  $(50 \pm 2)\%$ . Después de  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (7 días), registrar el peso de los recipientes individualmente. Retornar los recipientes al local de almacenamiento durante  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  más. Después de transcurrido el segundo período de  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ , retirar los recipientes, registrar los pesos de cada sistema de recipiente, individualmente, y calcular la tasa de penetración de vapor de agua, en porcentaje de pérdida de peso de agua, para cada recipiente por medio de la fórmula:

$$(W_7 - W_{14}) 365 \times 100 / (W_{7-t}) 7 = \text{Porcentaje por año}$$

En que

$W_7$  es el peso en mg del recipiente a los 7 días;  $W_{14}$  es el peso en mg del recipiente a los 14 días;

$W_T$  es el peso de la tara en g;

7 es el tiempo de prueba en días, después de 7 días de período de equilibrio. Los recipientes así probados cumplen los requisitos y son considerados como recipientes firmemente sellados si el porcentaje de pérdida de peso de agua excede 2,5% por año, como máximo, en 1 de los 10 recipientes probados y no excede a 5,0%, por año, en ninguno de ellos.

Los recipientes de dosis unitaria para líquidos cumplen los requisitos de un recipiente firmemente sellado si el peso promedio en pérdida de peso de agua es inferior o igual a 2,5% (p/p) por año y 5% al final de 2 años.

#### **Procedimiento para Pruebas de Recipientes de Dosis Múltiples en Condiciones de Uso.**

Seleccionar 10 recipientes de tipo y tamaño uniformes. Se es utilizado un sellado interno, abrir los recipientes, cuidadosamente, y retirar los sellados internos de cada uno. Montar cada recipiente con tapón, si aplicable, y su sistema de cierre. Numerar cada sistema de cierre de recipiente y registrar el peso de la tara. Abrir y cerrar los recipientes 30 veces, teniendo cuidado para no perder líquido durante ese procedimiento. Cerrar los recipientes con tapa de rosca dentro del intervalo de momento presentado en la **Tabla 1** en *Recipientes de múltiples unidades para cápsulas y comprimidos (6.2.3.1)* y almacenar los recipientes sellados a la temperatura de  $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  y humedad relativa de  $(50 \pm 2)\%$ . Después de  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$  (7 días), registrar el peso de los recipientes, individualmente. Retornar al local de almacenamiento durante de más  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ . Después del segundo período de  $168 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ , retirar los recipientes, registrar los pesos de cada sistema de recipiente, individualmente, y calcular la tasa de penetración de vapor de agua, en porcentaje de



pérdida de peso de agua, para cada recipiente por medio de la fórmula:

$$(W_7 - W_{14}) \cdot 365 \times 100 / (W_{7-wt}) \cdot 7 = \text{Porcentaje por año}$$

en que

$W_7$  es el peso en mg del recipiente a los 7 días;

$W_{14}$  es el peso en mg del recipiente a los 14 días;

$W_T$  es el peso tarado en g y 7 es el tiempo de prueba en días, después de 7 días de período de equilibrio.

Los recipientes así probados cumplen los requisitos y son considerados como recipientes firmemente sellados si el porcentaje de pérdida de peso de agua excede 2,5% por año, como máximo, en 1 de los 10 recipientes probados y no excede a 5,0% en ninguno de ellos.

#### 6.2.3.4 PRUEBA DE TRANSMISIÓN DE LUZ

**Equipo.** Utilizar un espectrofotómetro de sensibilidad y precisión, adecuadas, adaptado, para medir la cantidad de luz transmitida por materiales plásticos, o de vidrio translúcidos, o transparentes, utilizados como recipientes farmacéuticos. Adicionalmente, el espectrofotómetro debe medir y registrar la luz transmitida difusa así como rayos paralelos.

**Procedimiento.** Seleccionar secciones para representar el espesor promedio de la pared del recipiente. Cortar secciones circulares de dos o más áreas del recipiente y preparar lo necesario para suministrar segmentos de tamaños convenientes para su inserción en el espectrofotómetro. Cortar, lavar y secar cada muestra, teniendo cuidado de evitar riesgos en la superficie. Si la muestra es muy pequeña para cubrir la abertura en el soporte de muestra, cubrir la porción descubierta de la abertura con un papel opaco o cinta adhesiva, haciendo con que el largo de la muestra sea mayor que la abertura en el espectrofotómetro. Inmediatamente antes de montar el soporte de la muestra, limpiar la muestra con un tejido propio para limpiar lentes. Montar la muestra con el auxilio de una cera viscosa, o por medio de otros medios convenientes, teniendo cuidado de no dejar impresiones digitales u otras marcas en las superficies por las cuales la luz debe pasar. Colocar la sección en el espectrofotómetro con su eje cilíndrico paralelo al plano de abertura y aproximadamente centralizado con relación a la abertura. Cuando colocado adecuadamente, el haz de luz es normal a la superficie de la sección y las pérdidas por reflexión son mínimas.

Medir, continuamente, la transmitancia de la sección con referencia al aire en el largo de onda de interés, con un equipo de registro o en intervalos de aproximadamente 20 nm con un equipo manual, en la amplitud de onda entre 290 a 450 nm.

**Límite.** La transmisión de luz observada no debe exceder a los límites constantes en la **Tabla 1** para recipientes destinados al uso parenteral.

**Tabla 1 - Límites para plásticos clases I-VI.**

Tamaño Nominal (en ml)	Porcentaje máximo de transmisión de luz en cualquier largo de onda entre 290 y 450 nm	
	Recipientes termosellados	Recipientes sellados herméticamente
1	50	25
2	45	20
5	40	15
10	35	13
20	30	12
50	15	10

Cualquier recipiente, con un tamaño intermedio de los listados en la **Tabla 1**, presenta una transmisión no mayor que el próximo tamaño mayor, listado en la tabla. Para recipientes mayores que 50 ml, se aplican los límites para 50 ml.

La transmisión de luz observada para recipientes plásticos para productos destinados a la administración oral o tópica no debe exceder a 10% en cualquier largo de onda en el intervalo entre 290 a 450 nm.

#### 6.2.4 BIOCOMPATIBILIDAD

En esta sección hay orientaciones sobre procedimientos de evaluación de la biocompatibilidad de recipientes plásticos para medicamentos, tapas de elastómero y relacionados. La biocompatibilidad se refiere a la tendencia de que estos productos permanezcan, biológicamente, inertes, cuando están en contacto con el cuerpo. En combinación con los ensayos químicos, los procesos biológicos pueden ser utilizados para detectar e identificar la toxicidad inherente o adquirida de relacionados, antes o durante su fabricación y procesamiento.

Los procedimientos utilizados para evaluar la biocompatibilidad de un relacionado o de sus constituyentes fueron clasificados en un panel de efectos biológicos o procedimientos de toxicidad como citotoxicidad, sensibilización, irritación o reactividad intracutánea, toxicidad sistémica aguda, toxicidad subcrónica (toxicidad subaguda), genotoxicidad, implantación, hemocompatibilidad, toxicidad crónica (prolonga en 10% la expectativa de vida del animal prueba, o para más de 90 días), carcinogenicidad, toxicidad reproductiva o de desarrollo y biodegradación.

La pirogenicidad, en un área de toxicidad especial, es evaluada por la prueba de *Endotoxinas Bacterianas* (5.5.2.2) y Prueba de *Pirogénicos* (5.5.2.1). Actualmente no hay capítulos que detallan sobre sensibilización, toxicidad subcrónica, genotoxicidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad, hemotoxicidad, toxicidad reproductiva o requisitos de prueba de biodegradación.

### 6.2.4.1 RECIPIENTES PLÁSTICOS Y TAPAS DE ELASTÓMEROS

Los recipientes plásticos pueden ser constituidos por polímeros que, por extracción, no presentan toxicidad o no alteran la estabilidad del producto embalado. Los requisitos de prueba de biocompatibilidad de recipientes para medicamentos son relacionados a Recipientes Plásticos. El plástico, u otras porciones poliméricas de esos productos son probados de acuerdo con los procedimientos establecidos en *Pruebas de reactividad biológica in vitro* (6.2.5), siendo que aquellos que no atienden a los requisitos de estas pruebas no son adecuados para un recipiente de medicamentos. Los materiales que atienden a los requisitos *in vitro* se califican como materiales biocompatibles, sin la necesidad de otras pruebas, y pueden ser utilizados en la fabricación de un recipiente para medicamentos. Si fuese solicitada una designación de clase (clases I-VI) para plásticos u otros polímeros, los procedimientos adecuados de prueba son realizados conforme presentado en *Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6) y Designación de Clase.

La biocompatibilidad de un material elastomérico es evaluada en dos fases, conforme descrito en Procedimientos de Prueba Biológica en Tapas de Elastómero (6.2.2).

Al contrario de plásticos u otros polímeros, un material elastomérico que no atiende a las exigencias de la primera fase de prueba *in vitro*, puede ser considerado un material biocompatible, si es aprobado en la segunda fase – *in vivo*, que consiste en la prueba de *Inyección Sistémica* y la prueba *Intracutánea* en *Pruebas de reactividad biológica in vitro* (6.2.5). Ninguna distinción de clase o tipo es realizada entre los materiales elastoméricos que atienden a los requisitos de la primera fase de prueba y aquellos que cumplen la segunda etapa, calificándose como materiales biocompatibles. Los materiales elastoméricos no son clasificados en las clases de I-VI.

### 6.2.4.2 RELACIONADOS

La biocompatibilidad del plástico, de otros polímeros y partes elastoméricas de esos productos son probadas de acuerdo con los procedimientos descritos en *Pruebas de reactividad biológica in vitro* (6.2.5). Si, también, es necesaria una designación de clase para un plástico u otro polímero, son realizados los procedimientos de pruebas adecuados descritos en *Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6).

### 6.2.4.3 PRUEBAS *IN VITRO*, PRUEBAS *IN VIVO* Y DESIGNACIÓN DE CLASE PARA PLÁSTICOS Y OTROS POLÍMEROS

Los requisitos de pruebas *in vitro* e *in vivo* son elaborados para determinar la reactividad biológica de las cultivos de células de mamíferos y la respuesta biológica de animales a los materiales elastoméricos, plásticos y otros polímeros, cuando en contacto directo o indirecto con el paciente. La reactividad biológica de esos materiales puede depender tanto de sus características de superficie, como de sus componentes químicos extraíbles. Los procedimientos de prue-

ba pueden ser realizados con el material, o un extracto del material en prueba, salvo indicación contraria.

#### *Preparación de Extractos*

Normalmente la evaluación de la biocompatibilidad de un relacionado entero no es realista y la utilización de porciones representativas, o de extractos de materiales seleccionados puede ser una alternativa práctica para la realización de los ensayos. Cuando porciones o extractos son utilizados, es importante considerar que la materia prima puede sufrir alteraciones químicas durante la fabricación; el procesamiento y la esterilización de un relacionado. Ensayos, *in vitro*, de materia prima pueden servir como un importante proceso de clasificación, pero la evaluación final de la biocompatibilidad del relacionado debe ser realizada con partes del producto, acabado y esterilizado.

Las extracciones pueden ser realizadas en varias temperaturas (121, 70, 50, o 37 °C), en varios intervalos de tiempo (1, 24, o 72 horas) y en medios de extracción diferentes. La elección del medio de extracción para pruebas *in vitro* incluye solución de cloruro de sodio inyectable a 0,9%, o medio de cultivo de tejidos con o sin suero. Cuando el medio con suero es utilizado, la temperatura de extracción no puede exceder 37 °C. Al escoger las condiciones de extracción, seleccionar la temperatura, el solvente y las variables de tiempo que mejor simulen las condiciones de uso del producto. El desempeño de varias pruebas en diversas condiciones puede ser utilizado para simular las variaciones de las condiciones “en uso”. Una evaluación de biocompatibilidad es realizada con el producto, acabado y esterilizado, a pesar de que, una selección cuidadosa de las condiciones de extracción permita la simulación de las condiciones de producción y prueba de la materia prima.

#### *Prueba in vitro*

Cuando pruebas *in vitro* son realizadas, la muestra es biocompatible, si los cultivos de células no presentan reactividad mayor que la suave (grado 2), conforme descrito en las *Pruebas de reactividad biológica in vitro* (6.2.5).

#### *Prueba in vivo y designación de clase*

De acuerdo con la definición de inyección e implantación descritas en *Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6), plásticos y otros polímeros son clasificados en clases de I a VI. Para obtener designación de plásticos, u otros polímeros, los extractos de la sustancia prueba son producidos de acuerdo con los procedimientos descritos en diversos medios. Para evaluar la biocompatibilidad, los extractos son inoculados, por vía sistémica y intracutánea, en ratones y conejos. De acuerdo con los requisitos para inyección, un plástico u otro polímero puede ser clasificado inicialmente como I, II, III, o V. Si además de la prueba de inyección, es realizada la prueba de implantación con el mismo material, el plástico o el polímero pueden ser clasificados como clase IV o VI.

### 6.2.4.4 BIOCMPATIBILIDAD DE RELACIONADOS

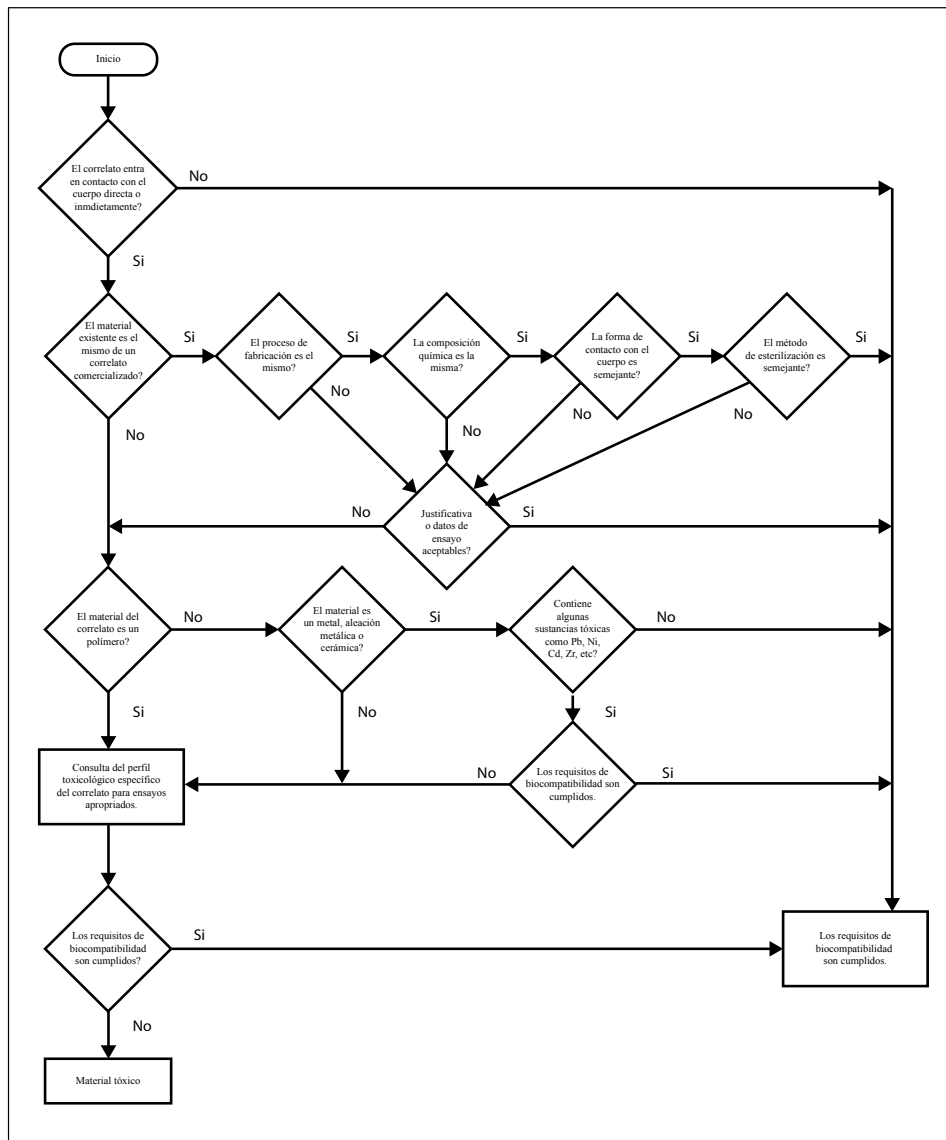
Además de evaluar los relacionados para esterilidad, Pruebas *in vitro* e *in vivo*, los relacionados son evaluados para sensibilización, toxicidad subcrónica, genotoxicidad, hemocompatibilidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad, toxicidad reproductiva o de desarrollo y biodegradación.

En las orientaciones internacionales hay indicación de que la extensión de las pruebas ejecutadas para un relacionado depende de los siguientes factores: la semejanza y la exclusividad del producto con relación a los productos anteriormente comercializados, como considerado en el

*Fluxograma de Decisión*; la extensión y la duración del contacto entre el producto y el paciente, como descrito en la *Categorización de Relacionados* y la composición del material del producto, como considerado en las secciones *Fluxograma de Decisión*, Pruebas *in vivo* y Designación de Clases.

#### FLUXOGRAMA DE DECISIÓN

Las orientaciones para la comparación de un relacionado con productos comercializados anteriormente son suministradas por el Fluxograma de Decisión de Biocompatibilidad (**Figura 1**).



**Figura 1** - Fluxograma de biocompatibilidad adaptado a partir del FDA Blue Book Memorandum # G95-1.

El objetivo con el fluxograma es determinar si los datos disponibles de relacionados anteriormente comercializados son suficientes para garantizar la seguridad del relacionado en cuestión. Como indicado en el fluxograma, la composición del material y las técnicas de fabricación de un producto son comparadas con los relacionados ya comercializados, que entran en contacto directo con el cuerpo. Además de eso, en el fluxograma hay exigencia de una evaluación de la toxicidad de un material exclusivo que no

haya sido utilizado anteriormente en productos relacionados. Las respuestas a las cuestiones colocadas en el fluxograma llevan a la conclusión de que los datos disponibles son suficientes, o que pruebas adicionales son necesarios para garantizar la seguridad del producto. Las orientaciones cuanto a la identificación de los procedimientos apropiados para pruebas adicionales son suministradas en la sección Matriz de Selección de Prueba.

## CATEGORIZACIÓN DE RELACIONADOS

Para facilitar la identificación de los procedimientos de pruebas adecuados, los relacionados están divididos y subdivididos, como está registrado en la **Tabla 1** de acuerdo con la naturaleza y la extensión de su contacto con el

cuerpo. Las principales categorías de relacionados son de superficie, comunicación extracorpórea e implantables. Después, estas clasificaciones son subcategorizadas y ejemplos de relacionados pertenecientes cada una de las subcategorías (**Tabla 1**).

**Tabla 1 - Clasificación y ejemplos de relacionados.**

<i>Categoría del Relacionado</i>	<i>Subcategoría del Relacionado</i>	<i>Naturaleza o Extensión de Contacto</i>	<i>Ejemplos</i>
Superficie	Piel	Relacionados que entran en contacto solamente con la superficie intacta de la piel.	Electrodos, prótesis externas, cintas de fijación, vendas de compresión y monitores de diversos tipos.
	Mucosa	Relacionados que se comunican con membranas intactas de la mucosa.	Lentes de contacto, catéteres urinarios, dispositivos intravaginales y intraintestinales (tubos de estómago, sigmoidoscopios, colonoscopios, gastroscopios), tubos endotraqueales, broncoscopios, prótesis dentarias, dispositivos ortodóncicos e intrauterinos.
	Superficies Comprometidas o No Íntegras	Relacionados que entran en contacto con superficies corporales comprometidas o no-íntegras.	Curativos, dispositivos de cicatrización y vendas oclusivas para úlcera, quemadura y tejido granulado.
Comunicación extracorpórea	Vaso Sanguíneo, Indirecto	Relacionados que entran en contacto con el vaso sanguíneo en un punto y sirven como canal de entrada para el sistema vascular.	Conjunto de administración de solución, de transferencia y de administración de sangre, extensores.
	Comunicación con Tejido, Hueso o Dentina	Relacionados y materiales que se comunican con tejido, hueso o sistema dentina/pulpa.	Laparoscopios, artroscopios, sistemas de drenaje, cemento odontológico, material de llenado dentario y ganchos de piel.
	Circulación sanguínea	Relacionados que entran en contacto con la circulación sanguínea.	Catéteres intravasculares, electrodos de marca-paso temporario, oxigenadores, tubo de oxigenador extracorpóreo y accesorios, dializadores, tubo de diálisis y accesorios, hemoabsorbentes y inmunoadsorbentes
Implantables	Tejido u hueso	Relacionados que entran en contacto principalmente con el hueso, el tejido o con el fluido de tejido.	Ejemplos de molde como pasadores ortopédicos, placas, juntas de sustitución, prótesis de hueso, cementos y dispositivos intraóseos. Ejemplos de los últimos son marca-pasos, dispositivos de suministro de medicamentos, sensores y estimuladores neuromusculares, tendones de sustitución, implantes mamarios, laringes artificiales, implantes subperiosteales y ganchos de conexión.
	Sangre	Relacionados en contacto principalmente con sangre.	Electrodos de marca paso, fistula arteriovenosa artificial, válvulas cardíacas, injerto de válvula, catéteres de administración interna de medicamentos y dispositivos de asistencia ventricular.

## MATRIZ DE SELECCIÓN DE PRUEBA

En la matriz hay orientaciones para identificación de los procedimientos adecuados para pruebas biológicas para las tres categorías de relacionados: Pruebas para Dispositivos de superficie (**Tabla 1** en *Guía para a selección de plástico y otros polímeros (6.2.4.5)*), Pruebas para Dispositivos de Comunicación Extracorpórea (**Tabla 2** en *Guía para la selección de plástico y otros polímeros (6.2.4.5)*), y Pruebas para Dispositivos Implantables (**Tabla 3** en *Guía para la selección de plástico y otros polímeros (6.2.4.5)*). Cada categoría de relacionados es subcategorizada y subdividida conforme la duración del contacto entre el dispositivo y el cuerpo. La duración del contacto es definida como limitada (menos de 24 horas); prolongada (24 horas a 30 días) o permanente (más de 30 días). Los efectos biológicos que están incluidos en la matriz son: citotoxicidad, sensibilización, irritación o reactividad intracutánea, toxicidad sistémica, toxicidad subcrónica, genotoxicidad, implantación, hemocompatibilidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad, toxicidad reproductiva o de desarrollo y biodegradación.

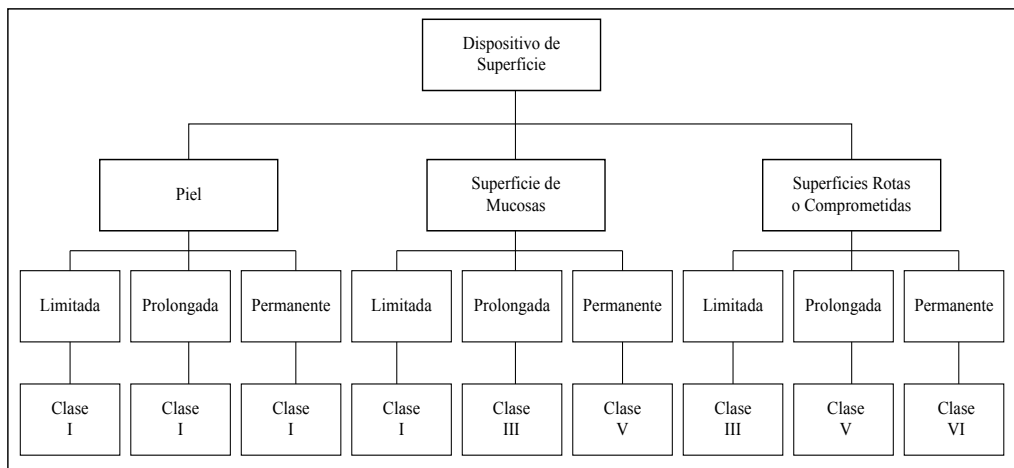
En la matriz, para cada subcategoría hay un cuadro asociado a los requisitos de prueba y, generalmente, el número de pruebas aumenta conforme la duración del contacto entre

el dispositivo y el cuerpo es extendida y de acuerdo con la proximidad de contacto entre el dispositivo y el sistema circulatorio. Dentro de las subcategorías, la opción de realizar pruebas adicionales debe ser considerada caso a caso. Las situaciones específicas, como el uso de dispositivos implantables permanentes o con comunicación extracorpórea en mujeres embarazadas, deben ser consideradas por el fabricante que decidirá cuanto a la inclusión de la prueba de reproducción o de desarrollo. Las orientaciones sobre la identificación de eventuales procedimientos adicionales para prueba son suministradas en la matriz de cada subcategoría de relacionados.

### 6.2.4.5 GUÍA PARA LA SELECCIÓN DE PLÁSTICO Y OTROS POLÍMEROS

#### Designación de Clase para Relacionado

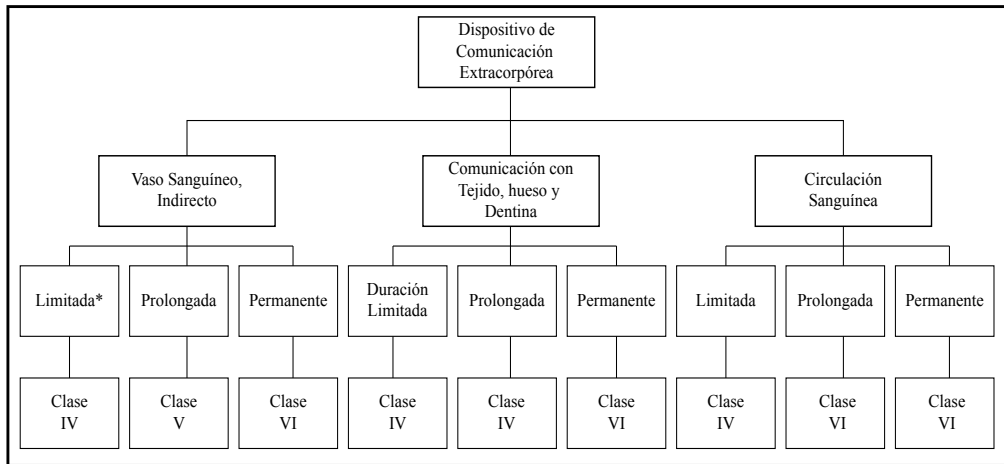
En la **Figura 1** hay orientación para la elección de la designación de la clase apropiada del plástico o de otro polímero para un relacionado y cada subcategoría de Dispositivos de Superficie y en la **Figura 2** para Dispositivos de Comunicación. Las designaciones de clase pueden ser encontradas en *Pruebas de reactividad biológica in vivo (6.2.6)*.



**Figura 1 - Requisitos de Clase de plásticos y otros polímeros para dispositivos de superficie.**

Categorización basada en la duración del contacto. Limita: menos de 24 horas; prolongada: de 24 horas a 30 días; permanente: más de 30 días. † Designación de Clase de Plásticos.





**Figura 2 - Requisitos de Clase de plásticos y otros polímeros para dispositivos de comunicación extracorpórea.**

Categorización basada en la duración del contacto. Limita: menos de 24 horas; prolongada: de 24 horas a 30 días; permanente: más de 30 días. † Designación de Clase de Plásticos.

El número de la clase indicada aumenta conforme la duración de contacto entre el dispositivo y el cuerpo (riesgo). En la categoría de Dispositivos Implantables, el uso exclusivo de la clase VI es obligatorio. La designación de clases de plástico está basada en las matrices de selección de pruebas ilustradas en las **Tablas 1, 2 y 3**.

La atribución de clase de un plástico u otro polímero a una subcategoría no se destina a restringir el uso de categorías

superiores de plásticos u otros polímeros. A pesar de que la designación atribuida defina la clase numérica más baja de plástico u otro polímero que puede ser utilizado en el relacionado correspondiente, el uso de una clase de plástico numéricamente mayor es opcional. Cuando un relacionado pertenece a más de una categoría, el plástico, u otros polímeros deben satisfacer las exigencias de la clase numérica más alta.

Tabla 1 - Matriz de selección de tests para dispositivos de superficie.\*

Categorías de Correlatos		Efecto Biológico b												
Contacto con el Cuerpo		tracción del Contacto <sup>a</sup>	Citotoxicidad	Sensibilización	Intracutánea	Toxicidad Sistémica (Aguda)	Toxicidad Subcrónica (Subaguda)	Genotoxicidad	Implantación	Hemocompatibilidad	Toxicidad Crónica	Carcinogenicidad	Toxicidad Reproductiva o de Desarrollo	Biodegradación
Dispositivos de Superficie	Piel	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Mucosa	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Superficies Comprometidas No íntegras	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 días); C: permanente (más de 30 días).

b Legenda X: Exámenes de evaluación ISO para consideración; O: exámenes adicionales que pueden ser aplicados.

\* Adaptado do FDA's Blue Book Memorandum #G95-1(7)(Tabla 1. Pruebas de Evaluación Inicial para Consideración y Tabla 2. Pruebas de Evaluación Complementaria para Consideración).

Tabla 2 - Matriz de Selección de Testes para Dispositivos de Comunicación Extracorpórea.\*

Categorías de Correlatos		Efecto Biológico b												
Contacto con el Cuerpo		tracción del Contacto <sup>a</sup>	Citotoxicidad	Sensibilización	Reactividad o Reactividad Intracutánea	Toxicidad Sistémica (Aguda)	Toxicidad Subcrónica (Subaguda)	Genotoxicidad	Implantación	Hemocompatibilidad	Toxicidad Crónica	Carcinogenicidad	Toxicidad Reproductiva o de Desarrollo	Biodegradación
Vaso Sanguíneo, Indirecto	A	X	X	X	X	X	—	—	—	X	—	—	—	—
	B	X	X	X	X	X	O	—	—	X	—	—	—	—
	C	X	X	X	O	X	X	X	O	X	X	X	—	—
Dispositivos de Comunicación Extracorpórea	A	X	X	X	X	O	—	—	—	—	—	—	—	—
	B	X	X	X	O	O	O	X	X	—	—	—	—	—
	C	X	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X	—	—
Circulación Sanguínea	A	X	X	X	X	X	—	O	—	X	—	—	—	—
	B	X	X	X	X	X	O	X	O	X	—	—	—	—
	C	X	X	X	X	X	X	X	O	X	—	—	—	—

a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 días); C: permanente (más de 30 días).

b Legenda X: Exámenes de evaluación ISO para consideración; O: exámenes adicionales que pueden ser aplicados.

\* Adaptado do FDA's Blue Book Memorandum #G95-1(7)(Tabla 1. Pruebas de Evaluación Inicial para Consideración y Tabla 2. Pruebas de Evaluación Complementaria para Consideración).

Tabela 3 – Matriz de Selección de Testes para Dispositivos Implantáveis.\*

Categorías de Correlatos		Efecto Biológico b												
Contacto con el Cuerpo		tracción del Contacto <sup>a</sup>	Citotoxicidad	Sensibilización	Intracutánea	Toxicidad Sistémica (Aguda)	Toxicidad Subcrónica (Subaguda)	Genotoxicidad	Implantación	Hemocompatibilidad	Toxicidad Crónica	Carcinogenicidad	Toxicidad Reproductiva o de Desarrollo	Biodegradación
Dispositivos Implantables	Tejido o Hueso	A	X	X	X	O	—	—	—	—	—	—	—	—
		B	X	X	O	O	O	X	X	—	—	—	—	—
		C	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X	X	—
Sangre	A	X	X	X	X	X	—	—	X	X	—	—	—	—
	B	X	X	X	X	X	O	X	X	X	—	—	—	—
	C	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	—	—

a Legenda A: limitada (menos de 24 horas); B: prolongada (de 24 horas a 30 días); C: permanente (más de 30 días).

b Legenda X: Exámenes de evaluación ISO para consideración; O: exámenes adicionales que pueden ser aplicados.

\* Adaptado de FDA's *Blue Book Memorandum #G95-1/7* (Tabla 1. Pruebas de Evaluación Inicial para Consideración y Tabla 2. Pruebas de Evaluación Complementaria para Consideración).

Documento de la ISO 10993-1:1997 titulado Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1: Evaluation and Testing. [Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos-Parte 1: Evaluación y Pruebas].

\* Adaptado del FDA's *Blue Book Memorandum #G95-1* ("Lysis of International Standard ISO-10993. Biological Evaluation of Medical Devices-Part 1: Evaluation and Testing. <sup>(a)</sup> ["Liso de las Normas Internacionales de la ISO-10993. Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos-Parte 1: Evaluación y Pruebas. <sup>(a)</sup>"]

## 6.2.5 PRUEBAS DEREACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO

Las Pruebas a continuación son elaboradas para determinar la reactividad biológica de cultivos de células de mamíferos, después del contacto con plásticos elastoméricos y otros materiales poliméricos, que entran en contacto directo, o indirecto con el paciente, o después del contacto con extractos específicos elaborados a partir de los materiales a prueba. Es esencial que las Pruebas sean realizadas sobre el área de superficie especificada. Cuando la superficie de la muestra no puede ser determinada, utilizar 0,1 g de elastómero o 0,2 g de plástico, u otro material, para cada ml de fluido de extracción.

Tres ensayos son descritos: *Prueba de Difusión en Agar*, *Prueba de Contacto Directo* y *Prueba de Elución*. La decisión de cual tipo o del número de ensayos a ser realizado para evaluar el potencial de la respuesta biológica de una muestra específica o de un extracto, depende del material, del producto final y de sus intenciones de uso. Otros factores que, también, pueden afectar la adecuación de la muestra para un uso específico son: composición polimérica; procedimientos de procesamiento y limpieza; medios de contacto; colorantes; adhesivos; absorción, adsorción y permeabilidad de los conservantes y las condiciones de almacenamiento. La evaluación de tales factores debe ser realizada por ensayos específicos adicionales apropiados, antes de determinar que un producto producido por medio de un material específico, es adecuado para su intención de uso.

**Preparación del Cultivo Celular.** En un medio esencial mínimo suplementado con suero de densidad de sembrado de cerca de 105 células por ml, preparar cultivos múltiples de células fibroblásticas L-929 (linaje celular ATCC CCL 1, NCTC clone 929). Incubar los cultivos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  en una incubadora humidificada, con una atmósfera de ( $5 \pm 1$ ) % de dióxido de carbono, por como mínimo 24 horas hasta la obtención de monocapa, con confluencia superior a 80%. Examinar los cultivos preparados con un microscopio para asegurar un nivel uniforme de monocapas casi confluentes.

**Solventes de extracción.** Solución de cloruro de sodio inyectable (ver monografía correspondiente). Alternativamente pueden ser utilizados medios libres o suplementados con suero para cultivo de células de mamíferos. La suplementación del suero es utilizada cuando la extracción es realizada a  $37\text{ °C}$ , por 24 horas.

### Equipos

**Autoclave.** Emplear una autoclave capaz de mantener la temperatura de  $121\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  y capaz de enfriar los recipientes de ensayo en torno de  $20\text{ °C}$ .

**Estufa.** Utilizar preferencialmente un modelo de convección mecánica, capaz de mantener las temperaturas de operación en la banda de  $50\text{ °C}$  a  $70\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

**Incubadora.** Utilizar incubadora capaz de mantener la temperatura de  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  y una atmósfera húmeda con ( $5 \pm 1$ ) % de dióxido de carbono en el aire.

**Recipientes de Extracción.** Utilizar apenas recipientes de vidrio Tipo I, tales como tubo de ensayo de cultivo con tapa de rosca, o equivalente. La tapa de rosca debe tener revestimiento elastomérico apropiado. La superficie expuesta de ese revestimiento debe ser totalmente protegida con un disco sólido inerte de 50-75  $\mu\text{m}$  de espesor.

**Preparación de los Equipos.** Limpiar, completamente, todos los elementos de vidrio con solución de limpieza de ácido crómico y, si necesario, con ácido nítrico caliente, seguido de enjuague prolongado con agua estéril para inyectables. Esterilizar y secar los recipientes y equipos utilizados para extracción, transferencia o administración del material de ensayo, por medio de proceso adecuado. Si el óxido de etileno fuese utilizado como agente esterilizante, aguardar por lo menos 48 horas para desgasificación completa.

### Procedimiento

**Preparación de la Muestra para Extracto.** Preparar conforme descrito en el Procedimiento de *Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6).

**Preparación de Extractos.** Preparar conforme descrito en el Procedimiento de *Pruebas de reactividad biológica in vivo* (6.2.6), utilizando solución de cloruro de sodio inyectable (0,9% NaCl) o medio libre de suero para cultivo de células de mamíferos conforme descrito en Extracción de Solventes. Si la extracción fuese hecha a  $37\text{ °C}$  por 24 horas en incubadora, utilizar medios de cultivo celular suplementados con suero. En ningún caso, las condiciones de extracción deben causar cambios físicos, tales como fusión o derretimiento de las porciones del material, excepto una leve adherencia.

### PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR

Esta prueba fue elaborada para materiales elastoméricos de diversos modelos. La capa de agar actúa como un soporte para proteger las células de daños mecánicos, posibilitando la difusión de productos químicos lixiviables de las muestras poliméricas. En un pedazo de papel de filtro, son aplicados los extractos de materiales a ser probados.

**Preparación de la Muestra.** Utilizar extractos preparados conforme descrito o porciones de las muestras con superficies planas y no inferiores a 100 mm<sup>2</sup>.

**Preparación del Control Positivo.** Proceder conforme descrito en *Preparación de la Muestra*.

**Preparación del Control Negativo.** Proceder conforme descrito en *Preparación de la Muestra*.

**Procedimiento.** Utilizar 7 ml de la suspensión de células preparada conforme descrito en la *Preparación del Cultivo Celular* y preparar las capas en placas de 60 mm de diáme-



tro. Después de realizada la incubación, aspirar el medio de cultivo de las capas y sustituirlo por medio suplementado con suero conteniendo cantidades de hasta 2% de agar. La calidad del agar debe ser adecuada para sustentar el crecimiento celular. La capa de agar debe ser suficientemente fina para posibilitar la difusión de los productos químicos lixiviables. Colocar las superficies planas de la muestra, control negativo y control positivo, o sus extractos, en contacto con la superficie solidificada de agar, en duplicado. No utilizar más que tres muestras en cada placa preparada. Incubar todas los cultivos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , por, como mínimo, 24 horas, en incubadora apropiada. Examinar, visualmente, o con un microscopio cada cultivo alrededor de la muestra; control negativo y control positivo, utilizando coloración adecuada, si necesario.

**Interpretación de Resultados.** La reactividad biológica, o sea, mala formación y degeneración celular, es descrita y clasificada en una escala de 0 a 4 (**Tabla 1**). Medir las respuestas de los cultivos celulares de la muestra, control negativo y control positivo. El sistema de ensayo de cultivo de células es adecuado si las respuestas observadas fueren clasificadas como 0 (sin reactividad) para el control negativo y como mínimo 3 (moderada) para el control positivo. La muestra atiende a los requisitos de la prueba si la respuesta no es superior a la clasificación 2 (suavemente reactiva). Repetir el procedimiento, si la adecuación del sistema no está confirmada.

**Tabla 1 - Clasificación de la reactividad para Prueba de Difusión en Agar y Prueba de Contacto Directo.**

<i>Clasificación</i>	<i>Reactividad</i>	<i>Descripción de la Zona de Reactividad</i>
0	Ninguna	Ninguna zona detectable alrededor o bajo la muestra
1	Leve	Algunas células mal formadas o degeneradas bajo la muestra.
2	Suave	Zona limitada al área bajo la muestra
3	Moderada	La zona se extiende de 0,5 a 1,0 cm por sobre la muestra.
4	Fuerte	La zona se extiende más que 1,0 cm por sobre la muestra

#### PRUEBA DE CONTACTO DIRECTO

Esta prueba es definida para materiales en diversos formatos. El procedimiento posibilita extracciones simultáneas y prueba de productos químicos lixiviables de la muestra en un medio suplementado con suero. El procedimiento no es apropiado para materiales con densidad muy alta o muy baja, pues puede causar daños mecánicos a las células.

**Preparación de la Muestra.** Utilizar porción de la muestra con superficie plana no inferior a 100 mm<sup>2</sup>.

**Preparación del Control Positivo.** Proceder conforme descrito en Preparación de la Muestra.

**Preparación del Control Negativo.** Proceder conforme descrito en Preparación de la Muestra.

**Procedimiento.** Utilizar 2 ml de la suspensión de células preparada conforme descrito en Preparación del Cultivo Celular, preparar las capas en placas de 35 mm de diámetro. Después de la incubación, aspirar el medio de los cultivos y sustituirlo por 0,8 ml de medio de cultivo fresco. Colocar una única muestra, control negativo y control positivo en cada una de las duplicatas del medio de cultivo. Incubar todos los cultivos a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , por, como mínimo, 24 horas, en incubadora apropiada. Examinar, visualmente, o con un microscopio cada cultivo alrededor de la muestra; del control negativo y del control positivo, utilizando coloración adecuada, si necesario.

**Interpretación de Resultados.** Proceder conforme a interpretación de resultados de la prueba de *Difusión en Agar*. La muestra atiende a los requisitos de la prueba, si la respuesta de la muestra no es superior a la clasificación 2 (suavemente reactiva). Repetir el procedimiento, si la adecuación del sistema no es confirmada.

#### PRUEBA DE ELUCIÓN

Este ensayo es definido para la evaluación de extractos de materiales poliméricos. El procedimiento posibilita la extracción de muestras por intervalos de tiempo variados y en temperaturas fisiológicas y no fisiológicas. Es apropiado para materiales de alta densidad y evaluaciones de dosis respuesta.

**Preparación de la Muestra.** Preparar conforme descrito en Preparación de Extractos, utilizando solución de cloruro de sodio inyectable (0,9% NaCl) o medio libre de suero para cultivo de células de mamíferos conforme Solventes de Extracción. Si el tamaño de la muestra no puede ser rápidamente medido, puede ser utilizada una masa de como mínimo 0,1 g de material elastomérico o 0,2 g de plástico o material polimérico, por ml de medio de extracción. Alternativamente, para simular condiciones más próximas a las fisiológicas, utilizar para la extracción, un medio de cultivo de células de mamíferos, suplementado con suero. Preparar los extractos por medio del calentamiento a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  por 24 horas, en una incubadora apropiada. Temperaturas superiores pueden causar la desnaturalización de las proteínas del suero.

**Preparación del Control Positivo.** Proceder conforme descrito en Preparación de la Muestra.

**Preparación del Control Negativo.** Proceder conforme descrito en Preparación de la Muestra.

**Procedimiento.** Utilizar 2 ml de la suspensión de células preparada conforme descrito en la Preparación del Cultivo Celular, preparar las monocapas en placas de 35 mm de diámetro. Después de la incubación, aspirar el medio de las capas y sustituirlo con extracto de la muestra; del control negativo y del control positivo. Los extractos de los medios

suplementados, o no con suero son probados en duplicado, sin dilución (100%). El extracto de la solución de cloruro de sodio inyectable es diluido con células del medio de cultivo suplementado con suero y probado, en duplicado, a una concentración de 25%. Incubar todos los cultivos a 37 ° C ± 1 ° C por 48 horas, en una incubadora apropiada. Examinar con un microscopio cada cultivo después de 48 horas, utilizando coloración adecuada, si necesario

**Interpretación de Resultados.** Proceder conforme interpretación de resultados de la prueba de *Difusión en Agar*; sin embargo utilizando la **Tabla 2**. La muestra atiende a los requisitos de la prueba, si la respuesta de la muestra no es superior a la clasificación 2 (suavemente reactiva). Repetir el procedimiento si la adecuación del sistema no es confirmada. Para evaluaciones de dosis- respuesta, repetir el procedimiento, utilizando diluciones cuantitativas del extracto de la muestra.

**Tabla 2 - Clasificación de la reactividad para prueba de elución**

Clasificación	Reactividad	Condiciones de los Cultivos
0	Ninguna	Gránulos intracitoplasmáticos discontinuos; sin lisis celular
1	Leve	Hasta 20% de las células son redondas, vagamente unidas, sin gránulos intracitoplasmáticos; células lisadas están ocasionalmente presentes.
2	Suave	Hasta 50% de las células son redondas y desprovistas de gránulos citoplasmáticos; sin lisis celular extensiva y áreas vacías entre las células
3	Moderada	Hasta 70% de las capas contienen células arredondeadas o lisadas
4	Fuerte	Zona se extiende más que 1,0 cm por sobre la muestra

## 6.2.6 PRUEBAS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VIVO*

Las Pruebas a continuación son elaboradas para determinar la respuesta biológica de animales a materiales elastoméricos, plásticos y otros materiales poliméricos, que entran en contacto directo, o indirecto con el paciente, o la respuesta a la inoculación de extractos específicos elaborados a partir de los materiales a prueba. Es esencial disponer el área de superficie específica para extracción. Cuando el área de superficie de la muestra no puede ser determinado, utilizar 0,1 g de elastómero o 0,2 g de plástico, u otro material, para cada ml de fluido de extracción.

Tres ensayos son descritos para clasificar plásticos y otros polímeros, que son aplicables a materiales y relacionados, basándose en ensayos de reactividad biológica *in vivo*. *Prueba de Inyección Sistémica* y *Prueba Intracutánea* son utilizados para materiales elastoméricos, especialmente para materiales en que la prueba de reactividad biológica *in vitro* (6.2.5) adecuada indicó reactividad biológica sig-

nificativa. La prueba de Implante es usada para verificar la adecuación de plásticos y otros polímeros, utilizados en la fabricación de recipientes y accesorios; en preparaciones parenterales, en relacionados, implantes y otros sistemas.

En este capítulo se aplican las siguientes definiciones: muestra es el material a prueba, o el extracto preparado a partir de un determinado material. El blanco consiste de la misma cantidad del medio que es utilizado para la extracción de la muestra, siendo tratado de la misma forma que el medio que contiene la muestra analizada. El control negativo es una muestra que no presenta ninguna reacción en las condiciones del ensayo.

**Clasificación de Plásticos.** Seis clases de plástico son definidas (**Tabla 1**), basadas en las respuestas para una serie de ensayos *in vivo* en el cual los extractos, materiales y vías de administración son especificados. Estas pruebas están, directamente relacionadas, con la utilización final de los artículos de plástico. En las preparaciones en que los plásticos están susceptibles a entrar en contacto con los vehículos, la elección de la solución de extracción es representativa. La clasificación registrada en la **Tabla 1**.

**Tabla 1** - Clasificación de plásticos y pruebas a ser realizadas.

Clases de Plásticos <sup>a</sup>						pruebas a ser realizadas			
I	II	III	IV	V	VI	Material de Prueba	Animal	Dosis	Procedimientos <sup>b</sup>
x	x	x	x	x	x	Extracto de Muestra	Ratón	50 ml/kg	A (IV)
x	x	x	x	x	x	en Solución de Cloruro de Sodio inyectable	Conejo	0,2 ml/ animal en cada uno de los 10 sitios	B
	x	x	x	x	x	Extracto de Muestra de Solución de Alcohol 1:20	Ratón	50 ml/kg	A (IV)
	x	x	x	x	x	en Solución de Cloruro de Sodio inyectable	Conejo	0,2 ml/animal en cada uno de los 10 sitios	B
		x		x x	x x	Extracto de Muestra en Polietilenglicol 400	Ratón	10 g/kg	A (IP) B
				x x	x x	Extracto de Muestra en Aceite Vegetal	Conejo	0,2 ml/ animal en cada uno de los 10 sitios	A (IP) B
			x		x	Tiras de Implante de Muestra	Conejo	4 tiras/animal	C

<sup>a</sup> Pruebas exigidas para cada clase indicada con una "x" en la columna apropiada.

<sup>b</sup> Explicación: A (IP) *Prueba de Inyección Sistémica* (Intraperitoneal); A (IV) *Prueba de Inyección Sistémica* (intravenosa); B *Prueba Intracutánea* (intracutánea); C *Prueba de Implantación* (implantación intramuscular).

Con excepción de la prueba *de Implante*, los procedimientos son basados en la utilización de extractos que, en función de la resistencia térmica del material, son preparados en una de las tres temperaturas estándar: 50, 70 y 121 °C. Por esa razón, la designación de la clase de un plástico debe ser acompañada por una indicación de la temperatura de extracción (por ejemplo IV-121 °C, es la designación de la clase IV, de un plástico extraído a 121 °C; I-50 °C, es la designación de la clase I, de un plástico extraído a 50 °C). Los plásticos pueden ser clasificados en las clases de I a VI, con base en los criterios de respuesta registrados en la **Tabla 1**.

Esa clasificación no se aplica a los plásticos que son destinados a ser utilizados como recipientes para productos tópicos u orales, o que puedan ser utilizados como parte integrante de una formulación de medicamento. Las informaciones registradas en la **Tabla 1** no se aplican a los elastómeros naturales, que son probados solamente por medio de solución de cloruro de sodio inyectable y de aceites vegetales.

La prueba *de Inyección Sistémica* y la prueba *Intracutánea* son elaboradas para determinar, respectivamente, las respuestas biológicas sistémicas y las locales; en animales expuestos a los plásticos y otros polímeros, por la inoculación de dosis única de extractos específicos de la muestra. La prueba *de Implante* es elaborada para evaluar la reacción del tejido vivo al plástico y otros polímeros, por medio de la implantación de la propia muestra en el tejido animal. La preparación adecuada y la colocación de las muestras en condiciones de asepsia son importantes en la realización de la prueba *de Implante*.

Estas pruebas son elaboradas para aplicación en materiales en las condiciones en que son utilizadas. Si, antes de su utilización final, el material debe ser expuesto a cualquier proceso de limpieza o de esterilización, las pruebas deben ser realizadas en una muestra sometida a tales procesos.

#### Medios de Extracción

**Solución de cloruro de sodio inyectable.** Ver monografía correspondiente.

**Solución de Alcohol 1:20** en solución de cloruro de sodio inyectable.

**Polietilenglicol 400.** Ver monografía correspondiente.

**Aceite vegetal.** Utilizar aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón u otros aceites vegetales apropiados (ver monografía). Si posible, obtener aceites recién refinados. Utilizar tres animales debidamente preparados e inocular intercutáneamente en cada animal una dosis de 0,2 ml de aceite, en cada uno de los 10 sitios, y observar los animales por 24, 48 y 72 horas después de la inoculación. Clasificar las observaciones de cada local, conforme a la escala numérica indicada en la **Tabla 2**. En cualquier momento de observación, la respuesta promedio en los 3 conejos (30 sitios de inoculación) no debe ser superior a 0,5 para eritema, debe ser inferior a 1,0 para el edema, y en ninguno de los locales puede ocurrir una reacción del tejido mayor que 10 mm de diámetro total. El residuo de aceite en el local de la inoculación no debe ser interpretado como edema. Cuando presionado suavemente, el edema del tejido queda blanquecino.

**Agua para inyectables.** Ver monografía correspondiente.

Tabla 2 - Evaluación de las reacciones de la piel

<i>Eritema y Formación de Escaras</i>	<i>Puntuación</i>
Sin eritema	0
Eritema suave (muy poco perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (rojo beterrava) a leve formación de escara (heridas profundas)	4
<i>Formación de Edema</i>	<i>Puntuación</i>
Sin eritema	0
Edema muy suave (muy poco perceptible)	1
Edema suave (bordes con área bien definida por el aumento preciso)	2
Edema moderado (aproximadamente con 1 mm de saliencia)	3
Edema grave (con más de 1 mm de saliencia y además del área de exposición)	4

Excluye el edema no inflamatorio (mecánico) a partir de blanco o del fluido de extracción.

### Equipos

**Autoclave.** Emplear una autoclave capaz de mantener la temperatura de  $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  y capaz de enfriar los recipientes de ensayo en torno de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Estufa.** Utilizar preferencialmente un modelo de convección mecánica, capaz de mantener las temperaturas de operación en la banda de  $50\text{ a }70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Recipientes de Extracción.** Utilizar apenas recipientes de vidrio Tipo I, tales como tubo de ensayo de cultivo con tapa de rosca, o equivalente. La tapa de rosca debe tener revestimiento elastomérico apropiado. La superficie expuesta de ese revestimiento debe estar totalmente protegida con un disco sólido inerte de  $50\text{-}75\text{ }\mu\text{m}$  de espesor.

**Preparación de los Equipos.** Limpiar completamente todos los elementos de vidrio con solución de limpieza de ácido crómico y, si necesario, con ácido nítrico caliente, seguido de enjuague prolongado con agua. Antes de utilizar en la subdivisión de la muestra, limpiar los equipos cortantes por medio de un método adecuado, como limpie-

zas sucesivas con acetona y cloruro de metileno. Limpiar todos los otros equipos por medio de un lavado completo con detergente adecuado y enjuague prolongado con agua. Esterilizar y secar los recipientes y equipos utilizados para extracción, transferencia o administración del material de ensayo, por medio de proceso adecuado. Si el óxido de etileno fuese utilizado como agente esterilizante, posibilitar tiempo

adecuado para la desgasificación completa.

### Procedimiento.

**Preparación de la muestra.** La prueba de *Inyección Sistémica* y la prueba *Intracutánea* pueden ser realizadas con el mismo extracto o con extractos distintos. Seleccionar y subdividir en partes la muestra del tamaño indicado en la **Tabla 3**. Retirar el material particulado de cada muestra subdividida, o del control negativo, colocando la muestra en una probeta graduada de 100 ml, de vidrio de tipo I, limpia y con tapa, y añadir cerca de 70 ml de agua para inyectables. Agitar por cerca de 30 segundos y drenar el agua, repetir esa etapa y secar las piezas preparadas para la extracción con aceite en una estufa hasta  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No limpiar la *muestra* con paño seco o mojado o lavar y enjuagar con solvente orgánico, tensoactivo, etc.

Tabla 3 - Área de superficie de la muestra a ser utilizada

Forma del Material	Espesor	Cantidad de Muestra para cada 20 ml de Medio de Extracción	Subdividida En 1
Película o lámina	<0,5 mm	Equivalente a 120 cm <sup>2</sup> de la área total de superficie (ambos lados combinados)	Tiras con cerca de 5 x 0,3 cm
	0,5 a 1 mm	Equivalente a 60 cm <sup>2</sup> de la área total de superficie (ambos lados combinados)	
Tubo	<0,5 mm (pared)	Largo (en cm) = 120 cm <sup>2</sup> / (sumatoria de las circunferencias de diámetro interno y externo)	Partes con cerca de 5 x 0,3 cm
	0,5 a 1 mm (pared)	Largo (en cm) = 60 cm <sup>2</sup> / (sumatoria de las circunferencias de diámetro interno y externo)	
Tiras, tubo e ítems moldados	>1 mm	Equivalente a 60 cm <sup>2</sup> del área total de superficie (todas las superficies expuestas combinadas)	Pedazos con hasta 5 x 0,3 cm
Elastómeros	>1 mm	Equivalente a 25 cm <sup>2</sup> del área total de superficie (todas las superficies expuestas combinadas)	Sin subdivisión <sup>2</sup>

**Preparación de extractos.** Colocar una muestra, debidamente preparada, para ser probada en un recipiente de extracción y añadir 20 ml del medio adecuado. Repetir esas instrucciones para cada medio de extracción necesario para la prueba. Preparar, también, un blanco de 20 ml de cada medio para inyecciones paralelas y comparaciones. Extraer por calentamiento, en una autoclave a 121 °C, por 60 minutos, y en el caso de un horno a 70 °C, por 24 horas, o a 50 °C, por 72 horas. Posibilitar tiempo suficiente para que el líquido del recipiente alcance la temperatura de extracción. En ningún momento las condiciones de extracción deben causar alteraciones físicas, tales como fusión o derretimiento de las partes de muestra, para no resultar en una disminución de la superficie disponible. Una leve adherencia de las partes puede ser tolerada. Añadir siempre, individualmente, las partes limpias al medio de extracción. Si los tubos de cultivo son utilizados para extracción de aceite vegetal con autoclave, sellar adecuadamente las tapas de rosca con cinta adhesiva sensible a la presión. Enfriar hasta temperatura ambiente, sin embargo, no inferior a 20 °C, agitar, vigorosamente, por varios minutos e, inmediatamente, decantar cada extracto de forma aséptica, en un recipiente estéril y seco. Almacenar los extractos a una temperatura entre 20 °C y 30 °C y no utilizar para pruebas después de 24 horas.

#### PRUEBA DE INYECCIÓN SISTÉMICA

Esta prueba es elaborada para evaluar las respuestas sistémicas a los extractos de materiales probados por medio de inoculación en ratones.

**Animal de prueba.** Utilizar ratones albinos saludables, no utilizados anteriormente, pesando entre 17 y 23 g. Para cada grupo de prueba, utilizar apenas los ratones del mismo origen. Agua y alimentos de composición conocidos, comúnmente utilizados en animales de laboratorio, son permitidos a gusto.

**Procedimiento.** Antes de retirar la dosis de inoculación, agitar, vigorosamente cada extracto para asegurar la distribución uniforme de la materia extraída. Las partículas visibles no deben ser administradas por vía intravenosa. En un grupo de prueba, inocular en cada uno de los cinco ratones la muestra o el blanco, conforme descrito en la **Tabla 4**, diluyendo cada g del extracto de la muestra preparada con Polietilenglicol 400 y el blanco correspondiente, con 4,1 volúmenes de solución de cloruro de sodio inyectable, para obtener una solución con una concentración de cerca de 200 mg de Polietilenglicol por ml.

Tabla 4 - Procedimiento para inoculación – Prueba de Inyección Sistémica

Extracto o Blanco	Dosis por kg	Vía de Administración*	Velocidad de Inoculación, pL por segundo
Solución de alcohol 1:20 en solución de cloruro de sodio inyectable	50 ml	IV	100
Polietilenglicol 400	10 g	IP	—
Vehículo de medicamentos (cuando aplicable)	50 ml	IV	100
	50 ml	IP	—
Oleo vegetal	50 ml	IP	—

\* IV = intravenosa (muestra acuosa y blanco); IP = intraperitoneal (muestra oleosa y blanco).



Observar los animales en los siguientes tiempos: inmediatamente después de la inoculación, después de 4 horas y, como mínimo después de 24, 48 y 72 horas. Si durante el período de observación, ninguno de los animales tratados con el extracto de la muestra presenta una reactividad biológica significativamente mayor que los tratados con el blanco, la muestra satisface los requisitos de esta prueba. Si dos o más ratones mueren o presentan un comportamiento anormal, como convulsiones o postración, o si hay pérdida de peso corporal superior a 2 g en tres o más ratones, la muestra no atiende a los requisitos de la prueba. Si algún animal tratado con la muestra exhibe solamente leves señales de reactividad biológica, y si apenas un animal presenta síntomas graves de reactividad biológica o muere, repetir la prueba utilizando grupos de 10 ratones. En la prueba de repetición, durante el período de observación, todos los 10 animales tratados con la muestra no deben presentar ninguna reactividad biológica significativa a más que los tratados con el blanco.

#### PRUEBA INTRACUTÁNEA

Esta prueba fue elaborada para evaluar las respuestas locales para los extractos de los materiales probados, después de inoculación intracutánea en los conejos.

**Animal de prueba.** Seleccionar conejos albinos saludables, cuyo pelo posibilite ser preso al ras de la piel, siendo esa, fina y libre de irritación o trauma. Al lidiar con los animales durante los períodos de observación, evitar tocar los locales de inoculación, excepto para diferenciar un edema y un residuo de aceite. Los conejos anteriormente utilizados en pruebas independientes, como la prueba de pirogénico (5.5.2.1), y que reposaron el período previsto, pueden ser utilizados para esta prueba, siempre que tengan piel limpia, utilizados para esta prueba, siempre que tengan piel limpia, sin manchas.

**Procedimiento.** Antes de retirar la dosis de inoculación, agitar, vigorosamente, cada extracto para asegurar la distribución uniforme de la materia extraída. En el día de la prueba, prender, cuidadosamente, el pelo del lomo del animal, en ambos los lados de la columna vertebral, encima de un área de prueba suficientemente grande. Evitar la irritación y el trauma. Retirar el pelo suelto por medio de vacío. Si necesario, antes de la inoculación, limpiar levemente la piel con alcohol diluido y secar. Más de un extracto de un determinado material puede ser utilizado por conejo, se es determinado que los resultados no serán afectados. Para cada muestra, utilizar dos animales e inocular vía intracutánea, utilizando un lado del animal para la muestra y el otro para el blanco, conforme descrito en la **Tabla 5**. Diluir cada g del extracto de la muestra preparada con polietilenglicol 400, y el blanco correspondiente con 7,4 volúmenes de solución de cloruro de sodio inyectable para obtener una solución con concentración de cerca de 120 mg de polietilenglicol por ml.

**Tabla 5 - Prueba Intracutánea.**

<i>Extracto o Blanco</i>	<i>Número de Locales (por animal)</i>	<i>Dosis, pL por sitio</i>
Muestra	5	200
Blanco	5	200

Examinar los sitios de inoculación para evidenciar cualquier reacción del tejido, tales como eritema, edema y necrosis. Si necesario, limpiar levemente la piel con alcohol diluido para facilitar la lectura de los locales de inoculación. Observar todos los animales 24, 48 y 72 h después de la inoculación. Clasificar las observaciones en una escala numérica para el extracto de la muestra y para el blanco, utilizando la **Tabla 2**. **Si necesario**, agarrar nuevamente el pelo durante el período de observación. El promedio de puntuaciones de eritema y edema para los locales de la muestra y del blanco son determinadas para cada conejo y cada intervalo de puntuación después de 24, 48 y 72 horas de inoculación. Después de la puntuación referente a 72 horas, todas las puntuaciones de eritema, más las de edema son totalizadas, separadamente, para cada muestra y blanco. Dividir cada total por 12 (2 animales x 3 períodos de puntuación x 2 categorías de puntuación) para determinar el promedio total para cada muestra frente a cada blanco correspondiente. Los requisitos de la prueba son cumplidos si la diferencia entre la puntuación promedio de la muestra y del blanco es inferior o igual a 1,0. Si en cualquier período de observación, el promedio para la reacción de la muestra es cuestionable por ser mayor que el promedio para la reacción del blanco, repetir la prueba utilizando tres conejos adicionales. Los requisitos de la prueba son cumplidos si la diferencia entre la puntuación promedio de la muestra y del blanco es igual o inferior a 1,0.

#### PRUEBA DE IMPLANTE

La prueba de implante es elaborada para evaluación de materiales plásticos y otros polímeros cuando entran en contacto directo con tejido vivo. La preparación adecuada de las tiras de implante y su implantación deben ser realizadas bajo condiciones de asepsia. Preparar para implantación 8 tiras de la muestra y 4 tiras de estándar. Cada tira debe medir como mínimo 10 x 1 mm. Los bordes de las tiras deben ser lo más suave posible, para evitar traumas mecánicos adicionales en la implantación. Las tiras de tamaño mínimo especificado son implantadas por medio de una aguja hipodérmica (calibre 15 a 19) con punta intravenosa y un trocar estéril. Utilizar una u otra aguja pre-esterilizada en que las tiras estériles de plástico estén insertadas, asépticamente, o insertar cada tira limpia en una aguja cuya cánula y el orificio central estén protegidos con una tapa adecuada y, en seguida, sometidos al procedimiento de esterilización apropiado.

**Animal de prueba.** Seleccionar conejos adultos saludables con peso mínimo de 2,5 kg, y que posean músculos paravertebrales suficientemente grandes para posibilitar la implantación de las tiras de prueba. No utilizar ningún tejido muscular además de aquel situado en el área paravertebral. Los animales deben ser anestesiados con un agente

anestésico comúnmente utilizado para un grado de profundidad suficiente para impedir movimientos musculares, como espasmos.

**Procedimiento.** Realizar la prueba en un área limpia. En el día de la prueba o hasta 20 horas antes, atar el pelo de los animales en ambos los lados de la columna vertebral. Retirar los pelos sueltos por medio de vacío. Antes de la inoculación, limpiar levemente la piel con alcohol diluido y secarla. Implantar cuatro tiras de la muestra en los músculos paravertebrales, distantes cerca de 2,5 cm una de la otra, en un lado de la columna de cada uno de los dos conejos, de 2,5 a 5,0 cm de la línea mediana y paralela a la columna vertebral. De forma semejante, implantar dos tiras estándar en el músculo opuesto de cada animal. Insertar un catéter estéril en la aguja para asegurar la tira de implante en el tejido con la retirada de la aguja. Después de la implantación de una tira, si hay un sangrado excesivo, colocar otro pedazo en duplicado en otro local. Mantener los animales por un período mínimo de 120 horas, y sacrificarlos en el final del período de observación con una sobredosis de un agente anestésico o de otros agentes adecuados. Posibilitar que transcurra un tiempo suficiente para cortar el tejido, sin sangrado. Examinar macroscópicamente el área del tejido alrededor de la parte central de cada tira de

implante. Utilizar un lente de aumento y una fuente de luz auxiliar. Observar si hay hemorragias, necroses, descoloraciones e infecciones en los locales de implante de la muestra y del control y registrar las observaciones. Si hubiere encapsulamiento, medir y registrar el ancho de la cápsula, arredondeando para el 0,1 mm más próximo, a partir de la periferia del espacio ocupado por el implante del control o de la muestra hasta la periferia de la cápsula. Puntuar el encapsulamiento, conforme a **Tabla 6**.

**Tabla 6 - Evaluación de encapsulamiento en la prueba de Implante.**

<i>Ancho de la Cápsula</i>	<i>Puntuación</i>
Ninguna	0
hasta 0,5 mm	1
0,6-1,0 mm	2
1,1-2,0 mm	3
Superior a 2,0 mm	4

Calcular las diferencias entre el promedio de puntuación para los sitios de muestra y de control. Los requisitos de la prueba son cumplidos si la diferencia no es superior a 1, o si la diferencia para más de uno de los cuatro locales de implante, no excede a 1 en cualquiera de los animales.



# 7 PREPARACIÓN DE PRODUCTOS ESTÉRILES

## 7.1 ESTERILIZACIÓN Y GARANTÍA DE ESTERILIDAD

Esterilidad es la ausencia de microorganismos viables. Como la obtención de la esterilidad de cualquier ítem aislado de una población sometida al proceso de esterilización no puede ser garantizada ni demostrada, la esterilidad de un lote es definida en términos probabilísticos por medio de un proceso de producción adecuadamente validado.

La inactivación de microorganismos por medios físicos o químicos sigue una ley exponencial y, por tanto, hay una probabilidad estadística de que microorganismos puedan sobrevivir al proceso de esterilización. Para un determinado proceso, la probabilidad de supervivencia está determinada por el número; tipo y resistencia de los microorganismos presentes y por el ambiente durante la esterilización. El nivel de garantía de esterilidad de un proceso de esterilización traduce la seguridad con que el proceso en cuestión esteriliza un conjunto de ítems, estando expresado como la probabilidad de un ítem no estéril en aquella población. El nivel de garantía de esterilidad de  $10^{-6}$ , por ejemplo, indica la probabilidad de no más que un microorganismo viable en  $1 \times 10^6$  ítems esterilizados del producto final. El nivel de garantía de esterilidad de un proceso para un determinado producto está establecido por medio de estudios de validación apropiados y generalmente es aceptado que productos inyectables o dispositivos críticos estériles sometidos a la esterilización terminal alcancen una probabilidad de supervivencia microbiana de  $10^{-6}$ . Con productos termoestables, el abordaje frecuente es exceder el tiempo crítico necesario para conseguir la probabilidad de supervivencia microbiana de  $10^{-6}$  (sobreesterilización). Sin embargo, para productos termosensibles, el abordaje de sobremorte no puede ser empleado y el desarrollo del ciclo de esterilización depende del conocimiento de la carga microbiana del producto.

El valor D, tiempo de reducción decimal, es el tiempo en minutos necesario para reducir la población microbiana en 90%, o 1 ciclo logarítmico, a una condición específica, eso es, para una fracción sobreviviente de 1/10. Por tanto, donde el valor D de una preparación de indicador biológico de, por ejemplo, esporas de *Geobacillus stearothermophilus* es de 1,5 minutos bajo los parámetros totales de proceso, esto es, a 121 °C, se fuese tratado por 12 minutos bajo las mismas condiciones, se puede declarar que el incremento de letalidad es de 8 D. La aplicación de ese incremento en la esterilización del producto depende de la carga microbiana inicial. Asumiendo que la carga microbiana del producto presenta resistencia al proceso de esterilización igual a la resistencia del indicador biológico y que la carga inicial del producto es de 102 microorganismos, el incremento de letalidad de 2 D reduciría la carga microbiana a 1 (teóricamente 100) y, consecuentemente, 6 D adicionales resultaría en una probabilidad de supervivencia microbiana

calculada de  $10^{-6}$ . Bajo las mismas condiciones, un incremento de letalidad de 12 D puede ser usado como abordaje típico para obtención de la sobremorte. Generalmente, la probabilidad de supervivencia de la carga microbiana en el material, cuyo proceso de validación de la esterilización está siendo realizado, no es la misma del indicador biológico. Para el uso válido, sin embargo, es esencial que la resistencia del Indicador Biológico sea mayor que aquella de la biocarga del material a ser esterilizado, siendo necesario asumir la situación de peor caso durante la validación. El valor D del indicador biológico a ser empleado debe ser determinado o verificado para cada programa de validación y, también, en la ocurrencia de alteración de ese programa.

La determinación de curvas de supervivencia, o abordaje de ciclo fraccionado, pueden ser empleados para determinar el valor D del indicador biológico escogido para el proceso de esterilización específico. Ese abordaje, también, puede ser usado para evaluar la resistencia de la biocarga del producto. Ciclos fraccionados son utilizados para evaluar la reducción del conteo microbiano o para alcanzar fracción negativa. Esos números pueden ser usados tanto para determinar la letalidad del proceso bajo condiciones de producción como para establecer ciclos de esterilización apropiados. Un indicador biológico adecuado, tal como la preparación de *Geobacillus stearothermophilus*, también, debe ser usado durante la esterilización de rutina. Cualquier método de carga microbiana, utilizado para la garantía de esterilidad requiere vigilancia adecuada de la resistencia microbiana del ítem para detectar cualquier cambio.

### 7.1.1 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

Con un método de esterilización se tiene por finalidad retirar, o destruir todas las formas de vida, animal o vegetal, macroscópica o microscópica, saprófitas o no, del producto considerado, sin garantizar la inactivación de toxinas y enzimas celulares. El procedimiento seleccionado para alcanzar el nivel de garantía de esterilidad depende del conocimiento de la naturaleza del material a ser esterilizado; del proceso de esterilización a ser empleado y de las alteraciones que pueden ocurrir en el material, en función de la esterilización. El conocimiento del tipo, de la cantidad y de la fuente de los contaminantes en los productos, antes de la esterilización, y la aplicación de métodos para minimizar tal contaminación y prevenirla post-procesamiento contribuyen para asegurar el éxito de la esterilización.

En ese capítulo están registrados conceptos y principios involucrados en el control de calidad de productos que deben cumplir la exigencia de esterilidad e incluye descripción de los métodos de esterilización e instrucciones para proceso aséptico.

### 7.1.1.1 MÉTODOS FÍSICOS

#### 7.1.1.1.1 Esterilización por el calor

El calor es el agente esterilizante más simple, económico y seguro del que se dispone, sin embargo la sensibilidad de los diferentes microorganismos a la acción del calor es bastante variada, siendo las formas esporuladas las más resistentes. La eficiencia en la inactivación de los microorganismos es dependiente de la temperatura, tiempo de exposición y presencia de agua, pues en la presencia de esa son exigidos menores tiempos de exposición y temperaturas. La esterilización por el calor húmedo causa la coagulación de las proteínas celulares de los microorganismos, mientras la esterilización por el calor seco se da en función de procesos oxidantes, que necesitan de altas temperaturas y largo tiempo de exposición.

#### CALOR HÚMEDO

El proceso de esterilización empleando vapor saturado bajo presión es realizado en cámara denominada autoclave. El principio básico de operación es la sustitución del aire de la cámara por vapor saturado. Para dislocar aire más eficientemente de la cámara y de dentro de los productos, el ciclo de esterilización puede incluir etapas de evacuación de aire y de vapor. Para ese método de esterilización, la condición de referencia para esterilización de preparaciones acuosas es de calentamiento de, como mínimo, 121 °C por lo menos por 15 minutos. Combinaciones distintas de tiempo y temperatura pueden ser utilizadas, mientras que validadas y que demuestren la eficacia del proceso escogido, proporcionando un nivel adecuado y reproducible de letalidad cuando operado, rutinariamente, dentro de las tolerancias establecidas. Son aplicados procedimientos y precauciones para alcanzar un nivel de seguridad de esterilidad de 10-6 o mejor. Combinaciones de tiempo y temperatura deben ser establecidas basadas en factores como naturaleza del material y su termolabilidad, penetrabilidad del vapor en el producto a ser esterilizado y otros parámetros definidos en el proceso de validación. Cuando sea utilizada temperatura de esterilización diferente de 121 °C, el concepto de  $F_0$  debe ser empleado. El  $F_0$  en una temperatura particular diferente de 121 °C, es el tiempo en minutos necesario para suministrar la letalidad equivalente a aquella suministrada a 121 °C durante un referido tiempo.  $F_0$  es una medida de la eficacia esterilizante, eso es, es el número de minutos de esterilización térmica por vapor a la determinada temperatura suministrada a un recipiente o unidad de producto en un dado valor  $Z$ .

Para garantizar la eficiencia del proceso de esterilización, la distribución de la carga en la cámara debe ser hecha de manera que propicie el contacto del vapor con las regiones de más difícil acceso. Para materiales esterilizados por calor húmedo, es aceptable que se alcance una probabilidad de supervivencia microbiana de la orden de 10-6. Para productos termoestables, el tiempo necesario para alcanzar la condición anterior puede ser excedido, resultando en sobremuerte, lo que no se aplica a productos que puedan sufrir alteración en función de la exposición excesiva al calor. En esa situación, el desarrollo del ciclo de esterilización de-

pende, especialmente, del conocimiento de la carga microbiana en el producto, que debe ser determinada en cantidad sustancial de lotes del producto, anteriormente a la esterilización. El valor  $D$  del indicador biológico adecuado usado, como *Geobacillus stearothermophilus*, debe ser evaluado en el programa de validación y en la ocurrencia de alguna alteración de ese programa.

#### CALOR SECO

La esterilización térmica por calor seco es realizada en estufa con distribución homogénea del calor, que puede ser obtenida por circulación forzada de aire. Pueden ser esterilizados artículos como vidrios, metales, polvos, vaselinas, grasas, ceras, soluciones y suspensiones oleosas, y tejidos especiales. Ese proceso es aplicado, principalmente, para materiales sensibles a la esterilización por calor húmedo. Para ese método de esterilización, la condición de referencia es una temperatura mínima de 160 °C por, por lo menos, 2 horas. Combinaciones distintas de tiempo y temperatura pueden ser utilizadas, siempre que validadas y que demuestren la eficacia del proceso escogido, proporcionando un nivel adecuado y reproducible de letalidad cuando operado rutinariamente dentro de las tolerancias establecidas.

Un nivel de garantía de esterilidad de 10-12 es considerado aceptable para productos termoestables. Un ejemplo de indicador biológico para validar y monitorear la esterilización por calor seco es la preparación de esporas de *Bacillus atrophaeus*.

El proceso empleando el calor seco, también, puede ser usado para esterilización y despirogenización como parte integrante del proceso de llenado aséptico, en que se requiere temperaturas muy altas debido al menor tiempo de exposición al calor. En los procesos continuos, usualmente, hay necesidad de una etapa de enfriamiento anterior al proceso de envasado. En función del menor tiempo de exposición del material. Con el programa de validación se deben alcanzar parámetros como la uniformidad de temperatura y el tiempo de permanencia.

El calor seco en temperaturas mayores que 220 °C puede ser utilizado para la esterilización y despirogenización de elementos de vidrio. En ese caso, un desafío con endotoxina bacteriana debe formar parte del programa de validación, demostrando una reducción de como mínimo 3 ciclos logarítmicos de endotoxina resistente al calor, o sea, probar materiales inoculados con como mínimo 1000 unidades de endotoxina bacteriana. La prueba, con lisado de *Limulus*, puede ser usada para demostrar que la endotoxina fue inactivada a no más que 1/1000 de la cantidad original, siendo que el remanente de endotoxina es medido para garantizar la reducción de 3 ciclos logarítmicos.

#### 7.1.1.1.2 Esterilización por radiación ionizante

Las radiaciones ionizantes son emisiones de alta energía, bajo la forma de ondas electromagnéticas o partículas, que al chocarse con los átomos del material irradiado alteran su carga eléctrica por desplazamiento de electrones, trans-



formando los átomos irradiados en iones positivos o negativos. Cuando esas radiaciones atraviesan las células crean hidrógeno libre; radicales hidroxilos y algunos peróxidos, que a su vez pueden causar diferentes lesiones intracelulares. Las principales fuentes de radiación son: rayos alfa; beta; gama y rayos X. Los dos tipos de radiación ionizante en uso son decaimiento de radioisótopo (radiación gama) y radiación por haz de electrones. Los productos son expuestos a una radiación ionizante en la forma de radiación gama de una fuente radioisotópica adecuada (por ejemplo, cobalto 60) o de un haz de electrones energizados por medio de un acelerador de electrones.

Además de la posibilidad del procesamiento a bajas temperaturas, lo que posibilita la esterilización de productos termosensibles, la esterilización por radiación ionizante posee ventajas como la baja reactividad química y el hecho de que existen pocos parámetros a ser controlados, siendo imprescindible el control de la dosis de radiación adsorbida. La dosis de radiación establecida para la esterilización debe garantizar el no comprometimiento de los materiales a ser esterilizados. Para la radiación gamma, la validación del proceso incluye el establecimiento de la compatibilidad del material, el establecimiento del modelo de cargamento del producto y el mapeo de dosis en el recipiente de esterilización, identificando las zonas de dosis máxima y mínima de radiación, la definición del tiempo de exposición y la comprobación de la aplicación de la dosis de esterilización requerida. Para irradiación por haz de electrones, deben ser controlados, además, voltaje, corriente, velocidad de la cinta transportadora y dimensión de barrido del haz de electrones. Para ese proceso de esterilización, la dosis adsorbida de referencia es de 25 kGy, sin embargo en algunas situaciones hay necesidad de selección de una dosis mayor o menor. La dosis escogida debe ofrecer un nivel de letalidad adecuado y reproducible cuando el proceso es operado rutinariamente dentro de las tolerancias establecidas. Procedimientos y precauciones deben ser aplicados para alcanzar un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup> o mejor.

Para validar la eficacia de esa esterilización, especialmente cuando se utilizan dosis menores, es necesario determinar la resistencia a la radiación de la carga microbiana del producto. Estándares de cargamento de producto específico y la distribución de dosis mínimas y máximas adsorbidas deben ser establecidos. Las dosis adsorbidas son normalmente medidas por medio de dosímetros específicos, como soporte plástico estandarizado que muestra intensificación del color proporcional a la cantidad de radiación adsorbida. El abordaje de ciclo fraccionado da los datos utilizados para determinar el valor D<sub>10</sub> del indicador biológico, información aplicada para extrapolar la cantidad de radiación adsorbida, para establecer una probabilidad adecuada de supervivencia microbiana. Actualmente, la dosis se basa en la resistencia a la radiación de la carga microbiana heterogénea natural contenida en el producto a ser esterilizado. Los procedimientos de validación pueden usar la exposición de producto inoculado, usando organismos resistentes, como *Bacillus pumilus*, o exposición de muestras de producto acabado de la línea de producción a la dosis subletal de proceso.

El procedimiento para selección de la dosis de radiación, basado en la evaluación de la resistencia de los microorganismos constituyentes de la carga microbiana del producto a ser esterilizado, posibilita una determinación más representativa de la resistencia de esa al trabajarse con microorganismos con diferentes susceptibilidades a la radiación. Ese procedimiento exige la enumeración de la población microbiana en muestreo representativa de diferentes lotes de producto. Con el conocimiento de la carga microbiana, la dosis de radiación es establecida basándose en tabla disponible en la literatura. Otro método que posibilita el establecimiento de la dosis de radiación se basa en el empleo de incrementos de dosis de radiación hasta obtener, como máximo, una muestra positiva en 100 unidades irradiadas. Esa información provee la base para extrapolación de esa dosis y obtención de la dosis de radiación. Evaluaciones periódicas deben ser hechas para garantizar que los valores establecidos continúan siendo efectivos (referencia: ISO 11137-1: 2006 – *Sterilization of health care products – Radiation – Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices*).

La eficiencia del ciclo de esterilización debe ser evaluada, periódicamente, por la determinación de la carga microbiana del producto, o por el empleo de indicador biológico y por el uso de dosímetros calibrados.

#### 7.1.1.3 Esterilización por filtración

La filtración es empleada para esterilización de soluciones termosensibles por eliminación física de los microorganismos contaminantes. El material filtrante no puede liberar fibras o materiales extraíbles indeseables para la solución filtrada, lo que restringe la naturaleza del elemento filtrante a vidrio, metal, polímeros sintetizados y membranas poliméricas. El montaje de un filtro consiste de una matriz porosa insertada en un abrigo impermeable. La eficiencia de un medio, o sustrato filtrante depende del tamaño del poro del material, de la adsorción de microorganismos sobre o dentro de la matriz del filtro y del mecanismo de tamiz o exclusión. El efecto de exclusión por tamaño es función de la abertura (diámetro) de los poros, y la adsorción depende de la composición, espesor del elemento filtrante y fluido que está siendo filtrado.

El tamaño de los poros de las membranas filtrantes es estimado por valor nominal que refleja la capacidad de la membrana del filtro de retener microorganismos representados por cepas específicas. La filtración para fines de esterilización es, normalmente, realizada con membranas de graduación de tamaño de poro nominal de 0,2 µm, o menor. Esas membranas de filtración esterilizante, clasificadas como 0,22 µm o 0,2 µm, dependiendo del fabricante, son capaces de retener 100% de un cultivo conteniendo 107 microorganismos de *Brevundimonas diminuta* ATCC 19146, por cm<sup>2</sup> de superficie de membrana filtrante, bajo una presión mínima de 30 psi (2,0 bar).

El usuario es responsable de la elección del filtro en función de la naturaleza del material a ser filtrado, que atienda a la necesidad del proceso de esterilización, debiendo, también,

determinar si los parámetros empleados en la producción influenciarán la eficiencia de la retención microbiana. Una vez que la eficiencia del proceso de filtración, también, es influenciada por la biocarga de la solución a ser filtrada, es importante la determinación de la calidad microbiana de las soluciones antes de la filtración, así como el establecimiento de parámetros como presión; tasa de flujo y características de la unidad filtrante.

El valor de reducción logarítmica, también, puede ser utilizado para evaluar la capacidad de retención de la membrana filtrante. Por ejemplo, un filtro de 0,2 µm, que puede retener 107 microorganismos de una cepa específica, tendrá un valor de reducción logarítmica de, como mínimo, 7, bajo condiciones declaradas.

Las membranas filtrantes comercialmente disponibles incluyen acetato de celulosa, nitrato de celulosa, fluorocarbonato, polímeros acrílicos, poliéster, policarbonato, cloruro de polivinilo, vinil, nylon, polytef y además, membranas metálicas. Los filtros de membrana, por ser películas poliméricos, ofrecen muchas ventajas y algunas desventajas cuando comparados a los filtros de profundidad como porcelana o material sinterizado. Como buena parte de la superficie de la membrana es un espacio vacío o abierto, el correcto montaje y esterilización del filtro proporcionan la ventaja de una alta tasa de flujo. Una desventaja es que, debido a la fragilidad de la membrana, se debe garantizar la ausencia de ruptura durante el montaje, esterilización, o uso.

El sistema de filtración debe ser probado antes y después del proceso de filtración para garantizar el mantenimiento de su integridad durante el proceso de filtración. Pruebas típicas de uso incluyen la prueba del punto de burbuja, la prueba de flujo de aire difusivo, la prueba de retención bajo presión y la prueba de flujo progresivo. La prueba de punto de burbuja consiste en prueba no destructiva, cuya denominación va de la visualización de burbujas después de la aplicación de una determinada presión sobre el filtro. Como ejemplo, después de la filtración de cerca de dos litros de agua destilada estéril, se aplica presión constante de nitrógeno, durante 5 minutos para membranas de éster de celulosa de 0,2 µm. Para cada tipo de filtro hay un valor límite de presión a ser soportado, sin que presente la formación de burbujas, indicando la resistencia del material filtrante. Las pruebas deben ser correlacionadas con la retención de microorganismos. Pruebas adicionales realizadas por el fabricante del filtro, como el de desafío microbiano, no son normalmente repetidas por el usuario.

### 7.1.1.2 MÉTODO QUÍMICO

#### 7.1.1.2.1 Gas óxido de etileno

La esterilización por gas puede ser el método de elección para materiales que no resisten a altas temperaturas como en el procesamiento por calor seco o calor húmedo. El agente activo generalmente empleado en la esterilización por gas es el óxido de etileno. Entre las desventajas de ese agente esterilizante están sus propiedades mutágenas; la posibilidad de residuos tóxicos en los materiales tratados y su naturaleza altamente inflamable, excepto cuando en

ciertas mezclas con gases inertes. El proceso de esterilización es generalmente realizado en una cámara presurizada proyectada de forma semejante a la autoclave, pero con características específicas como sistema para desgasificación después de la esterilización y minimización de la exposición de los operadores a gas.

El programa de calificación del proceso de esterilización con óxido de etileno es más amplio que de otros procesos de esterilización, dado que además de la temperatura, deben ser controlados la humedad; vacío / presión positiva y la concentración de óxido de etileno. Es importante determinar y demostrar que todos los parámetros críticos del proceso están adecuados en el interior de la cámara de esterilización durante todo el ciclo. Como los parámetros de esterilización aplicados a los productos a ser procesados son críticos, es recomendable el pre-condicionamiento de la carga para minimizar el tiempo de exposición a la temperatura requerida. El programa de validación es generalmente realizado empleando el producto inoculado, o producto simulado inoculado con preparaciones apropiadas como esporas de *Bacillus atrophaeus*. Los indicadores biológicos, normalmente, son empleados para establecer la probabilidad final de supervivencia microbiana, usando el concepto de ciclo fraccionado, para proyectar un ciclo de esterilización con óxido de etileno, y deben ser usados en cargas del producto, o producto simulado, con cámara llena.

El indicador biológico debe ser empleado en el monitoreo de ciclos de rutina, además del planeamiento del ciclo de esterilización por óxido de etileno. Otro aspecto importante del planeamiento del proceso de esterilización es la definición del tipo de envasado del material a ser procesado y su distribución en la cámara de esterilización, debido a la limitada capacidad de difusión del óxido de etileno en áreas más internas del producto.

## 7.1.2 VALIDACIÓN DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

La validación debe demostrar de forma documentada que el proceso de esterilización establecido irá, consistentemente, suministrar productos que atiendan el nivel de garantía de esterilidad requerido. Los productos esterilizados de acuerdo con el proceso validado deben atender las especificaciones pre-determinadas y las características de calidad relacionadas a la funcionalidad y seguridad.

Una vez validado el proceso, él deberá ser revalidado, periódicamente, y después de alteraciones de producto; equipos y proceso, que puedan comprometer el nivel de garantía de esterilidad especificado.

Los principales elementos de la validación son: Calificación de Instalación; Calificación de Operación y Calificación de Desempeño.

### 7.1.2.1 CALIFICACIÓN DE INSTALACIÓN

La aplicación del plano de calificación de instalación debe suministrar evidencia documentada que el equipo y todos

los ítems auxiliares fueron suministrados, instalados y funcionan de acuerdo con las especificaciones. Debe demostrarse que el equipo de esterilización, sus componentes, ítems auxiliares y suministros, como vapor, agua y aire, fueron correctamente proyectados, instalados y calibrados.

A fin de atender a los parámetros y límites recomendados para la esterilización, es necesario el empleo de instrumentación apropiada para monitorear y controlar los parámetros críticos como temperatura, tiempo, humedad, concentración del gas esterilizante o radiación adsorbida. Esos instrumentos deben ser evaluados en la calificación de instalación.

La calificación de instalación comprende los siguientes elementos: equipo, instalación y función.

En lo que se refiere al equipo e instalación, las especificaciones del esterilizador; ítems auxiliares y servicios; los procedimientos operacionales; la localización de instalación y la documentación deben ser previamente definidos y verificados en la calificación de instalación, garantizada su conformidad. Para garantizar la función, debe ser verificado que el equipo y los sistemas de seguridad operacional funcionan de acuerdo con sus especificaciones; los ciclos de operación están de acuerdo con lo definido y que no hay evidencia de fuga de las utilidades o esterilizador, cuando aplicable.

En los procedimientos documentados para la calificación de instalación debe estar especificado como cada elemento de la calificación es planeado, realizado y revisado. La documentación que proporciona soporte a la calificación de instalación incluye descripción de las características físicas y operacionales del equipo; sus componentes y servicios. Dibujos y diagramas de proceso e instrumentación deben ser verificados contra la configuración propuesta y actualizados, cuando necesario. Sistemas de seguridad aplicables deben ser evaluados para garantizar desempeño; calidad y seguridad de los equipos y operadores.

La calificación de la instalación es necesaria para nuevos equipos, o cuando el esterilizador existente es sustituido o transferido. La calificación debe ser rehecha en intervalos de tiempo definidos, y al menos parcialmente cuando ocurren modificaciones que puedan alterar la eficacia del proceso de esterilización, como sustitución o reforma de equipos, o partes, modificaciones en los suministros de proceso y alteración en fuente radioactiva

### 7.1.2.2 CALIFICACIÓN DE OPERACIÓN

En la calificación de operación debe demostrarse que el equipo instalado es capaz de realizar el proceso de esterilización especificado dentro de los intervalos definidos. El intervalo de parámetros y los límites de operación deben ser establecidos en la definición del proceso. Antes de la calificación de operación, el estado de calibración de toda instrumentación usada para monitorear, controlar, indicar y registrar debe ser confirmado.

Para autoclaves y otros esterilizadores que emplean proceso térmico, deben ser realizados estudios de distribución del calor en diferentes posiciones considerando el tamaño de la cámara y la carga. Debe confirmarse que a cámara (vacía y llena) opera dentro de los parámetros críticos en todos sus principales locales. El número y posición de los termopares son determinados por el tipo y configuración de la carga; tamaño de equipo; tipo de instrumento y ciclo empleado. Una banda aceptable de temperatura en la cámara vacía es  $\pm 1$  °C cuando la temperatura de la cámara es 121 °C. Para esterilizadores a óxido de etileno, la humedad relativa; la concentración del gas y la temperatura deben ser monitoreadas por sensores distribuidos en posiciones adecuadas. Sistemas de seguridad aplicables deben ser probados. *Softwares* de control deben ser validados y desafiados en condiciones de falla. La penetración y distribución de la radiación ionizante en la carga debe ser realizada y monitoreada por dosímetros. La operación de calificación de filtros esterilizantes está hecha por medio de la prueba de integridad de los filtros; medidas de presión diferencial y velocidad de flujo. Como los fluidos esterilizados por membranas filtrantes pueden ser expuestos al ambiente durante el procesamiento siguiente, el control ambiental y la calificación y/o validación del área de manipulación aséptica deben ser parte integrante del proceso de esterilización por filtración.

### 7.1.2.3 CALIFICACIÓN DE DESEMPEÑO

En la calificación de desempeño debe demostrarse que el proceso de esterilización es capaz de alcanzar, repetidamente, el nivel de garantía de esterilidad pre-determinado para las cargas definidas de productos; que el equipo opera consistentemente de acuerdo con criterios pre-determinados y que el producto atiende a los requisitos especificados de seguridad, calidad y desempeño.

La calificación de desempeño comprende evaluaciones físicas y microbiológicas que demuestren la eficacia y reproductibilidad del proceso de esterilización, manteniendo las características especificadas del producto.

En los estudios físicos deben ser considerados: criterios como carga prueba representativa del proceso; embalaje idéntico al producto; pre-condicionamiento; perfil de temperatura y temperatura en el punto de referencia; respuesta de indicadores químicos; integridad de embalaje; documentación; entre otros. La carga para esterilización debe ser establecida y documentada, teniendo en consideración parámetros como configuración, distribución, orientación, densidad, dimensión, composición del material, uso y tipo de *pallets*. El producto o material con características similares al producto (producto simulado) usado para la calificación debe tener embalaje idéntico al producto y representar, como mínimo, el peor caso de la carga de rutina de producción, o sea, la configuración más difícil de esterilizar. Criterios para reutilización de carga deben ser definidos, siendo que ella debe ser equilibrada a las condiciones ambientales o aireadas antes de la reutilización. Con los datos generados debe demostrarse la conformidad con los parámetros físicos y químicos aplicables. La relación

entre las condiciones de posiciones de monitoreo durante la calificación y la rutina debe ser establecida.

En la calificación de desempeño físico debe demostrarse a reproductibilidad del proceso con mínimo de tres ciclos consecutivos para verificar la atención de todos los criterios de aceptación.

En la calificación microbiológica deben seguirse requisitos específicos para cada agente esterilizante. Diferentes métodos pueden ser usados en la validación del proceso de esterilización e incluyen tres categorías: proceso basado en la inactivación de la carga microbiana natural (biocarga); proceso combinado con base en la inactivación de microorganismo referencia y conocimiento de la carga microbiana (biocarga e indicador biológico) y proceso basado en la inactivación de microorganismo referencia (sobremorte u *overkill*). Se indica que el desafío microbiano sea ejecutado en los parámetros mínimos de proceso y debe atender el nivel de garantía de esterilidad para todas las combinaciones de carga, pudiendo usar el peor caso de producto representante de las familias. Para cada tipo de carga a ser esterilizada, la reproductibilidad del proceso debe ser demostrada empleándose, por lo menos, tres ciclos consecutivos. Los indicadores biológicos usados deben ser posicionados en y/o sobre el producto en localización definida.

La calificación de desempeño debe ser repetida cuando alteraciones significativas fueren propuestas, como cambios en diseño y embalaje del producto; configuración o densidad de carga y equipo o proceso de esterilización. Los efectos de esos cambios en las etapas de validación del proceso de esterilización deben ser evaluados.

### 7.1.3 REVISIÓN Y APROBACIÓN DE LA VALIDACIÓN

La revisión documentada, de los datos de validación, generados en las cualificaciones de instalación, operación y desempeño debe ser hecha para confirmar la aceptabilidad del proceso de esterilización y definir la especificación del proceso, incluyendo parámetros y tolerancia.

La etapa final del programa de validación requiere la documentación de los datos de apoyo desarrollados en la ejecución de este programa.

## 7.2 INDICADORES BIOLÓGICOS

El indicador biológico es definido como una preparación caracterizada de microorganismo específico que da una resistencia definida y estable a un determinado proceso de esterilización. Bacterias formadoras de esporas son los microorganismos reconocidos como apropiados para empleo como indicadores biológicos una vez que, con excepción de la radiación ionizante, estos microorganismos son, significativamente, más resistentes a los procesos de esterilización del que los microorganismos de la carga microbiana natural del producto. Un indicador biológico puede ser

usado en la calificación de desempeño del equipo de esterilización y en el desarrollo y establecimiento del proceso de esterilización para un producto específico. Los indicadores biológicos son usados en procesos de obtención de producto estéril en su recipiente final y en la esterilización de equipos; materiales y componentes de embalaje, empleados en el proceso aséptico. Los indicadores biológicos pueden, además, ser utilizados para monitorear ciclos de esterilización en revalidaciones periódicas y para evaluar la capacidad del proceso usado en la descontaminación de aisladores o salas limpias.

### 7.2.1 TIPOS DE INDICADORES BIOLÓGICOS

Hay, por lo menos, tres tipos de indicadores biológicos, siendo que cada tipo incorpora una especie microbiana con resistencia conocida al proceso de esterilización.

Un tipo de indicador biológico incluye las esporas que son añadidos a un soporte o acarreador (disco, o tira de papel de filtro, vidrio, plástico, u otro material) embalado para mantener la integridad y viabilidad del material inoculado. Los acarreadores y embalajes primarios no deben contener cualquier tipo de contaminación química, física o microbiológica que pueda comprometer el desempeño y estabilidad del indicador biológico y no pueden sufrir alteración en función del proceso de esterilización sometido. Los acarreadores y embalajes primarios deben resistir al transporte y manipulación hasta el momento del uso y deben evitar la pérdida del inóculo original durante el transporte, manipulación y almacenamiento hasta el vencimiento del período de validez.

Otro tipo de indicador biológico consiste de una suspensión de esporas inoculada en unidades representativas del producto a ser esterilizado. Cuando no sea posible el empleo del producto real, puede inocularse un producto simulado, que difiere del producto real en algunas características, pero se comporta de forma semejante cuando sometido a las condiciones de prueba, o de esterilización. Una suspensión de esporas de valor D conocido debe ser utilizada para inoculación del producto real o simulado, garantizando que al ser usado el producto simulado, ese no comprometa la resistencia del indicador biológico. La configuración física del producto a ser inoculado (real o simulado) puede afectar la resistencia de la suspensión microbiana inoculada. En el caso de productos líquidos es recomendable la determinación del valor D y valor Z del indicador biológico en el producto líquido especificado. La población, valor D, valor Z donde aplicable y tiempo de destrucción del microorganismo deben ser determinados.

Valor Z es la elevación de temperatura en grados, necesaria para reducir el valor D en 90%, o producir la reducción de un ciclo logarítmico en la curva de resistencia térmica. El tercer tipo es el indicador biológico auto contenido, presentado de tal forma que el embalaje primario destinado para incubación después de la esterilización contenga el medio de crecimiento requerido para la recuperación del microorganismo. En ese caso, el sistema



constituido por el indicador biológico y el medio de crecimiento del microorganismo debe ser resistente al proceso de esterilización y debe posibilitar la penetración del agente esterilizante. El valor D, tiempo de destrucción del microorganismo y el tiempo de supervivencia deben ser determinados para el sistema y no solamente para la tira o disco de papel que contiene los microorganismos. Después de la esterilización, está permitido el contacto de las tiras o discos, conteniendo los microorganismos, con el medio de cultivo.

El indicador biológico auto contenido, también, puede consistir de una suspensión de esporas en un medio de cultivo conteniendo indicador de pH que permita visualizar la presencia o a ausencia de crecimiento después de la incubación. La resistencia del sistema auto contenido es dependiente de la penetración del agente esterilizante en el embalaje, que debe ser controlado por el fabricante por medio del diseño y composición del material que constituye el embalaje, ampolla o recipiente. El indicador biológico auto contenido en la forma de ampolla puede ser incubado directamente después de la exposición al proceso de esterilización, en las condiciones especificadas. La ausencia o la presencia del crecimiento microbiano son determinadas visualmente, a partir del cambio de coloración de un indicador incorporado al medio, o por la turbidez derivada del desarrollo del microorganismo; o además, por el examen microscópico del medio inoculado. El indicador biológico auto contenido debe soportar el transporte y la manipulación durante el uso sin que ocurran rupturas o pérdida del inóculo original. Durante o después del proceso de esterilización, el material del cual es constituido el sistema auto contenido no debe retener o liberar cualquier sustancia que pueda inhibir el crecimiento de microorganismos sobrevivientes. La capacidad promotora de crecimiento del medio de cultivo después de exposición al proceso de esterilización debe ser comprobada.

## 7.2.2 PREPARACIÓN DEL INDICADOR BIOLÓGICO

Todas las operaciones involucradas en la preparación de indicadores biológicos deben ser monitoreadas por medio de un sistema de la calidad documentado que posibilite la rastreabilidad de todos los materiales y componentes incorporados a la suspensión microbiana; el acarreador inoculado, o el indicador biológico. La preparación de suspensiones stock de las esporas de los microorganismos seleccionados como indicadores biológicos requiere el desarrollo de procedimientos apropiados incluyendo su cultivo, recolección, purificación y mantenimiento. Las suspensiones stock deben contener, predominantemente, esporas latentes (no germinativos) mantenidos en líquido no nutritivo. El producto final suministrado por los fabricantes (suspensión microbiana, acarreador inoculado o indicador biológico) no debe contener microorganismo diferente del microorganismo prueba en número suficiente que pueda afectar el producto. El sistema para minimizar la presencia de microorganismos diferentes del microorganismo prueba debe ser validado, monitoreado y registrado.

## 7.2.3 SELECCIÓN DEL INDICADOR BIOLÓGICO PARA EL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

La elección del indicador biológico requiere conocimiento de su resistencia al proceso de esterilización específico para garantizar que el sistema del indicador biológico proporcione desafío mayor que el de la carga microbiana en el producto.

El uso eficiente de los indicadores biológicos para desarrollo del ciclo, proceso y validación, o para monitoreo del proceso de esterilización de rutina requiere conocimiento del material a ser esterilizado incluyendo sus componentes y material de embalaje. Apenas indicadores biológicos reconocidos y especificados en las monografías deben ser usados en el desarrollo o validación de un proceso de esterilización para garantizar que el indicador biológico seleccionado propicie un desafío mayor al proceso de esterilización que la carga microbiana en el producto.

En los casos del uso de indicadores biológicos con características diferentes de aquellos comercialmente disponibles, puede cultivarse microorganismos descritos en literatura científica para preparado de indicadores biológicos. El usuario debe ser capaz de determinar los valores D y Z para los indicadores domésticos. Cuando indicador biológico no comercial fuese utilizado, la población, pureza y validez deben ser confirmadas para garantizar la legitimidad de las pruebas a ser realizadas usando ese indicador.

Cuando la definición del proceso de esterilización está basada en la carga microbiana del producto, esa debe ser cuantificada y las resistencias del indicador biológico y de la carga microbiana deben ser comparadas. El proceso de esterilización debe resultar en nivel de garantía de esterilidad de como mínimo 10<sup>-6</sup>.

El método de sobremorte (*overkill*) puede ser empleado en el desarrollo del proceso de esterilización y, en ese caso, deben ser hechas consideraciones específicas relacionadas a la supuesta resistencia usada en el establecimiento de los requisitos de letalidad del proceso. En general, los procesos de sobremorte son desarrollados con la suposición de que la carga microbiana es igual a 10<sup>6</sup> microorganismos altamente resistentes. Un proceso 12 D es definido como el proceso que provee letalidad suficiente para reducción de 12 ciclos logarítmicos, equivalente a 12 veces el valor D para microorganismos con resistencia arriba de la resistencia promedio de los microorganismos presentes en la carga microbiana del producto. Al asumir una carga microbiana de 10<sup>6</sup>, un proceso de sobremorte resultará en una probabilidad de no esterilidad menor que 10<sup>-6</sup>. El uso del proceso de sobremorte y su validación pueden minimizar o evitar la necesidad de cuantificación e identificación de la carga microbiana del producto.

Para el proceso de calor húmedo, esporas de cepas apropiadas de *Geobacillus stearothermophilus* están disponi-



bles comercialmente como indicadores biológicos. Otros microorganismos formadores de esporas resistentes al calor húmedo como *Clostridium sporogenes*, *Bacillus atrophaeus* y *Bacillus coagulans*, también, pueden ser utilizados en el desarrollo y validación de un proceso de esterilización por calor húmedo.

Para la validación del proceso de esterilización, por vía calor seco, pueden ser empleados esporas de *Bacillus atrophaeus*. Durante la validación pueden ser realizados estudios para evaluación de la despirogenización en el lugar de la inactivación microbiana, una vez que la tasa de inactivación de endotoxinas bacterianas es más lenta que la inactivación de las esporas de *Bacillus atrophaeus*. En la práctica, una reducción de la orden de por lo menos tres ciclos logarítmicos del nivel de endotoxina resulta en una probabilidad de no esterilidad menor que 10<sup>-6</sup>.

Para monitorear los procesos de esterilización empleando radiación ionizante, esporas de *Bacillus pumilus* han sido usados a pesar de no ser práctica usual. El método de establecimiento de la dosis de radiación, más empleado, no usa indicadores biológicos. Algunos microorganismos en la carga microbiana del material a ser esterilizado, pueden presentar mayor resistencia al proceso de esterilización por radiación en comparación con las esporas de *Bacillus pumilus*.

Para el proceso de esterilización por óxido de etileno son comúnmente utilizadas esporas de subespecies de *Bacillus atrophaeus* var. *niger*, cuando se emplea óxido de etileno 100%, o diferentes mezclas de gases.

**Tabla 1 - Características ejemplificativas de sistemas de indicadores biológicos disponibles comercialmente.**

Proceso de Esterilización	Valor D (minutos)	Banda de valor D para selección de indicador biológico (minutos)	Límites para resistencia adecuada (dependiente del valor D en minutos)	
			Tiempo de supervivencia	Tiempo de muerte
Calor secoa (160 °C)	1,9	Mín. 1,0 Máx. 3,0	Mín. 4,0 Máx. 14,0	10,0 32,0
Oxido de etilenob (600 mg/L, 54 °C, 60% UR)	3,5	Mín. 2,5 Máx. 5,8	Mín. 10,0 Máx. 27,0	25,0 68,0
Calor húmedoc (121 °C)	1,9	Mín. 1,5 Máx. 3,0	Mín. 4,5 Máx. 14,0	13,5 32,0

a para 1,0 x 10<sup>6</sup> a 5,0 x 10<sup>6</sup> esporas / acarreador

b para 1,0 x 10<sup>6</sup> a 5,0 x 10<sup>7</sup> esporas / acarreador

c para 1,0 x 10<sup>5</sup> a 5,0 x 10<sup>6</sup> esporas / acarreador

## 7

## 7.2.4 EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO

### 7.2.4.1 RESPONSABILIDAD DEL FABRICANTE

Son responsabilidades del fabricante: determinación y suministro de las características de desempeño del lote de indicador biológico por medio de certificado de análisis que certifique la validez del desempeño declarado en el embalaje del producto; definición del proceso de esterilización para el cual el indicador biológico es recomendado; caracterización de cada tipo de indicador biológico, usando condiciones estandarizadas y equipos adecuados; valor D y el método por el cual ese valor fue definido; conteo microbiano; estabilidad de la resistencia hasta la validez indicada en el rótulo; condiciones de almacenamiento, incluyendo temperatura y humedad relativa; orientaciones sobre el medio de cultivo a ser empleado y las condiciones de recuperación de los microorganismos después de la exposición al proceso de esterilización y su descarte.

### 7.2.4.2 RESPONSABILIDAD DEL USUARIO

#### PRODUCTOS COMERCIAIS

Cuando un indicador biológico es adquirido, comercialmente, su adecuación para uso en un proceso de esterilización debe haber sido establecida en estudios, a no ser que existan datos disponibles para confirmar el empleo del indicador en un proceso específico. El usuario debe establecer dentro de su institución, los criterios de aceptación para los lotes del indicador biológico. Al adquirir un indicador biológico, ese debe venir acompañado de un certificado emitido para cada lote. Si el indicador biológico es empleado de forma diferente de aquella indicada por el fabricante, el usuario debe proceder al registro de las condiciones de uso, de las verificaciones y del desempeño del indicador biológico.

Después del recibimiento de un lote de indicador biológico, el usuario debe cuantificar la carga de esporas por unidad y proceder a la verificación de la morfología y pureza de los microorganismos, confirmando, por lo menos, el género del microorganismo. Las informaciones referentes al valor D; a las condiciones de almacenamiento; al plazo

de validez y a la estabilidad del indicador biológico deben ser observadas y registradas. El usuario puede considerar la necesidad de auditar el valor D antes de la aceptación del lote de indicador biológico. Para almacenamiento por largo periodo, es importante verificar el valor D y la estabilidad del conteo. En el caso de almacenamiento de la suspensión de esporas, por período superior a 12 meses, bajo condiciones documentadas, la confirmación del conteo y la comprobación de la resistencia de las esporas deben ser realizadas, a menos que el desempeño de un cultivo anterior haya sido validado después de largo período de almacenamiento. Los resultados de los ensayos de resistencia y conteo de esporas deben estar dentro de la banda de aceptación establecida durante la aprobación del lote de suspensión de esporas.

## PRODUCTOS NO COMERCIALES

El usuario puede decidir cultivar microorganismos para desarrollo de indicadores biológicos a ser empleados en el desarrollo o en la validación de un proceso de esterilización. En el caso de que el usuario se torne un productor, las exigencias de desempeño del indicador biológico deben ser satisfechas. Si un sistema de indicador biológico es empleado para el desarrollo de un nuevo proceso de esterilización o validación de un proceso ya existente, los mismos criterios de desempeño para productos comerciales deben ser cumplidos.

### 7.2.4.3 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ESPORAS

Los registros de la identificación de las suspensiones de esporas deben ser mantenidos por productores comerciales o no comerciales y deben incluir informaciones sobre la fuente del cultivo inicial de microorganismos; la identificación; la rastreabilidad del cultivo madre de esporas, la frecuencia de subcultivo; el medio de cultivo utilizado para la esporulación; los cambios ocurridos en la preparación del medio; las observaciones sobre contaminación de la suspensión; los datos anteriores y posteriores al choque térmico; los registros del uso de la suspensión de esporas y la resistencia a la esterilización (particularmente, valores D y Z, donde aplicable).

### 7.2.5 USO DE INDICADOR BIOLÓGICO PARA VALIDACIÓN

Independiente del proceso de esterilización a ser empleado, la población inicial de microorganismos, su resistencia al proceso esterilizante y el local de inoculación del producto pueden influenciar la tasa de inactivación del indicador biológico. Durante el proceso de validación, en varios locales del producto deben ser inoculados el indicador biológico, garantizando el desafío tanto del embalaje como del producto en él contenido, para que se asegure un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup> para el producto y para el embalaje. Puede ser necesario, por medio de estudios de laboratorio, determinar si los componentes del producto son más difíciles de esterilizar que, por ejemplo, una solución, o medicamento en él contenidos. La fase de calificación

de desempeño del producto debe identificar los parámetros más importantes del proceso para inactivación de los microorganismos en los locales más difíciles de esterilizar. La supervivencia del indicador biológico es consecuencia de la resistencia y tamaño de la población microbiana. Por tanto, ni siempre un indicador biológico con población de 10<sup>6</sup> es necesario para confirmar un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup>. El uso apropiado de los indicadores biológicos es para confirmar que los parámetros establecidos en el proceso de esterilización garantizan el nivel de seguridad de esterilidad deseado. En la esterilización por calor húmedo, el empleo del indicador biológico confirma la letalidad determinada por parámetros físicos. Indicadores biológicos con valor D relevante y poblaciones sustancialmente menores que 10<sup>6</sup> son adecuados para validar muchos procesos de esterilización y descontaminación. Es importante que los usuarios estén capacitados para justificar, científicamente, la elección de un indicador biológico.

## 7.3 PROCESO ASÉPTICO

A pesar de que la esterilización terminal de un producto embalado sea el procedimiento que garantice riesgos mínimos de contaminación microbiana en la producción de un lote, existen clases de productos que no pueden ser esterilizados en su envasado final y que deben ser preparados empleando proceso aséptico. Ese proceso es proyectado para prevenir la contaminación de los componentes estériles por microorganismos viables, o además, en la fase intermediaria de la producción, cuando algún componente debe ser suministrado exento de microorganismos. Un producto definido como procesado asépticamente consiste de componentes que fueron esterilizados por uno de los procesos de esterilización como, por ejemplo, la filtración, en el caso de tratarse de un líquido. En el caso de material de envasado constituido por vidrio, puede ser empleado el calor seco y, cuando se trata de material de envasado polimérico, como tapas, puede ser utilizada la autoclavación u óxido de etileno.

En el proceso aséptico, el ambiente donde los insumos son manipulados y a etapa de llenado aséptico son considerados puntos críticos. Las exigencias para un proyecto adecuadamente validado y que mantenga las condiciones necesarias para el proceso aséptico abarcan un ambiente libre de microorganismos viables, donde la calidad del aire sea garantizada por equipos adecuados, por personal entrenado y paramentado de acuerdo con las exigencias del ambiente y por operación a ser realizada. El ambiente deseado puede ser obtenido por medio de la tecnología de filtración del aire que propicia el suministro del aire con la calidad microbiana exigida. El planeamiento de la planta debe proporcionar un sistema de cascada de flujo de aire con presión positiva mayor, de las áreas más críticas (asépticas) para aquellas de exigencia intermediaria (áreas de preparación) y finalmente, aquellas de menor exigencia de control; y además, debe permitir el cambio frecuente del aire, además del empleo de flujo de aire unidireccional en la área inmediata del producto o componentes expuestos y el control de la temperatura y humedad (cuando aplicable). Las instalaciones deben incluir sistemas de aislamiento

primario (próximo al producto) y secundario (donde el proceso aséptico es realizado) por medio de barreras físicas. Las superficies, como paredes y techo, deben ser lisas possibilitando la sanitización frecuente. Los vestuarios deben tener espacio adecuado para el personal y almacenamiento de las vestimentas estériles. El entrenamiento del personal cuanto a la paramentación, debe abarcar el uso correcto de las vestimentas como, delantales, guantes y otros ítems que propicien la cobertura de la superficie del cuerpo. Todo el proceso de sanitización debe ser documentado. La certificación y la validación del proceso e instalaciones asépticas son realizadas por medio de la confirmación de la eficiencia de los sistemas de filtración; por los procedimientos de monitoreo microbiológico del ambiente y por la simulación de llenado aséptico del producto, empleando medio de cultivo estéril. El monitoreo de la instalación aséptica debe incluir el examen periódico de filtro ambiental, el monitoreo de rutina de material particulado y viable y el llenado simulado con medio de cultivo estéril.

## 7.4 SALAS LIMPIAS Y AMBIENTES CONTROLADOS ASOCIADOS

En esa sección están incluidos algunos aspectos relacionados al procesamiento aséptico de productos con el establecimiento; mantenimiento y control de la calidad microbiológica de salas y zonas limpias. Incluye la clasificación de esos ambientes controlados con base en los límites de conteo de partículas; en el programa de evaluación microbiológica para ambientes controlados; en el entrenamiento de funcionarios; en los factores críticos en el proyecto e implementación de un programa de evaluación microbiológica; en el desarrollo de un plan de muestreo; en el establecimiento de niveles microbiológicos de alerta y acción; en los métodos y equipos usados para muestreo microbiológico; en los medios de cultivo y diluyentes usados; en la identificación de aislados microbiológicos y en la evaluación operacional por medio del envase de medio de cultivo (*media fill*).

**Media fill** es una prueba para simulación de las operaciones asépticas en que el producto es sustituido por un medio de cultivo y sirve para asegurar que los procesos utilizados sean capaces de conducir a productos estériles.

Hay métodos alternativos para evaluar y controlar el estado microbiológico de salas y zonas limpias, con variedad de equipos y métodos para muestreo microbiológico. La aplicación impropia de muestreo y análisis microbiológicos puede causar variabilidad significativa y potencial para contaminación inadvertida. Un gran número de productos estériles es fabricado por procesamiento aséptico, que depende de la exclusión de microorganismos de la línea de

procesamiento y, por tanto, la prevención de la entrada de los microorganismos en recipientes abiertos durante el envase y la carga microbiana del producto y del ambiente de fabricación son factores importantes relacionados al nivel de garantía de esterilidad de estos productos.

### 7.4.1 CLASIFICACIÓN DE SALAS LIMPIAS Y AMBIENTES CONTROLADOS ASOCIADOS

Sala limpia es la sala en la cual la concentración de partículas en suspensión en el aire es controlada; es construida y utilizada de manera que minimice a introducción, generación y retención de partículas dentro de la sala, en la cual otros parámetros relevantes, como, por ejemplo, temperatura; humedad y presión, son controlados conforme necesario.

La clasificación de limpieza del aire de salas y zonas limpias, por medio del análisis de concentración de partículas en suspensión en el aire, es regulada por la norma ABNT NBR ISO 14644-1 – Salas limpias y ambientes controlados asociados – Parte 1: clasificación de la limpieza del aire. Ese documento se aplica a partículas suspendidas en el aire dentro de un ambiente controlado, pero no pretende caracterizar la naturaleza viable o no viable de las partículas.

La aplicación de esa norma ha sido usada por fabricantes de salas y zonas limpias para orientar la construcción, la preparación y el mantenimiento de esas instalaciones. Sin embargo, no da relación entre el número de partículas no viables y la concentración de microorganismos viables.

La industria farmacéutica se preocupa con el conteo de partículas viables y, en el caso de productos inyectables, hay preocupación adicional con el conteo de partículas totales. La justificativa de que, cuanto menor el número de partículas presentes en una sala limpia, menos probable que microorganismos carreados por el aire estén presentes, es aceptable y orientativa en el proyecto, en la construcción y en la operación de salas y zonas limpias.

En la **Tabla 1** están descritas las clases de limpieza de aire de acuerdo con la norma ABNT NBR ISO 14644-1, que está basada en límites de partículas con tamaños de 0,1 a 5 µm. En la **Tabla 2** está la relación entre los diferentes sistemas de clasificación de salas limpias.

Es aceptable que, si un menor número de partículas está presente en la sala limpia o ambiente controlado, el conteo microbiano bajo condiciones operacionales será menor, siempre que no haya cambios en el flujo de aire, en la temperatura y en la humedad. Salas limpias son mantenidas bajo un estado de control operacional con base en datos dinámicos (operacionales).

**Tabla 1** - Clases de limpieza del aire para partículas en suspensión, seleccionadas para salas y zonas limpias.

Número de Clasificación ISO (N)	Límites máximos de concentración (partículas/m <sup>3</sup> de aire) para partículas iguales o mayores que los tamaños considerados					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
ISO Clase 1	10	2				
ISO Clase 2	100	24	10	4		
ISO Clase 3	10.000	237	102	35	8	
ISO Clase 4	100.000	2.370	1.020	352	83	
ISO Clase 5	1.000.000	23.700	10.200	3.520	832	29
ISO Clase 6		237.000	102.000	35.200	8.320	293
ISO Clase 7				352.000	83.200	2.930
ISO Clase 8				3.520.000	832.000	29.300
ISO Clase 9				<b>35.200.000</b>	<b>8.320.000</b>	<b>293.000</b>

**Tabla 2** - Comparación entre los diferentes sistemas de clasificación de limpieza de aire.

OMS y EEC(GMP)	Estados Unidos (habitual)	ISO
Clase A	Clase 100	ISO 5
Clase B	Clase 100	ISO 5
Clase C	Clase 10.000	ISO 7
Clase D	Clase 100.000	ISO 8

## 7.4.2 PROGRAMA DE EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA PARA SALAS LIMPIAS Y AMBIENTES CONTROLADOS ASOCIADOS

El monitoreo de partículas totales en suspensión en el aire en salas y zonas limpias no da información sobre el contenido microbiológico del ambiente. La limitación básica de los contadores de partículas es que normalmente miden partículas de 0,5 µm o mayores y los microorganismos cargados por el aire no son células que fluctúan libremente, no están solas y frecuentemente se asocian con partículas de 10 a 20 µm. Conteos de partículas, así como, conteos microbianos dentro de salas y zonas limpias, varían con las actividades conducidas durante el muestreo y su localización. El monitoreo del ambiente para partículas no viables y microorganismos es importante porque ambos son necesarios para alcanzar las exigencias relativas al material particulado y esterilidad establecidas para los productos.

Programas de monitoreo microbiológico para salas y zonas limpias deben evaluar la efectividad de las prácticas de limpieza y desinfección que pueden tener impacto sobre la carga microbiana del ambiente. El monitoreo microbiológico, normalmente, no identifica y cuantifica todos los contaminantes microbianos en los ambientes; sin embargo, el monitoreo de rutina debe suministrar información suficiente para certificarse de que el ambiente esté operando dentro del estado de control adecuado.

El monitoreo microbiológico ambiental y el análisis de datos realizados por personas calificadas posibilitan que el

estado de control sea mantenido en salas y zonas limpias. El ambiente debe ser muestreado durante operaciones normales para posibilitar a recolección de datos significativos y el muestreo microbiano debe ocurrir cuando los materiales estén en el área, las actividades de procesamiento estén ocurriendo y todos los funcionarios estén en operación en el local.

El monitoreo microbiológico de salas y zonas limpias debe incluir la cuantificación del contenido microbiano del aire ambiental; del aire comprimido que entra en el área crítica; de las superficies; de los equipos; de los recipientes; de los pisos; de las paredes y de las vestimentas de las personas. El objetivo pretendido con el programa es obtener estimación representativa de la carga microbiana del ambiente y, una vez compilada y analizada, cualquier tendencia debe ser evaluada por personas entrenadas. Es importante rever resultados ambientales con base en frecuencia especificada, así como rever resultados por períodos prolongados para determinar si hay tendencias presentes. Tendencias pueden ser visualizadas por medio de cuadros de control estadístico que incluyen niveles de alerta y de acción. El control microbiológico de ambientes controlados, también, puede ser evaluado con base en los datos de tendencia. Informes o resúmenes periódicos deben ser emitidos para alertar al responsable del área.

Cuando el nivel microbiológico especificado para un ambiente controlado es excedido, revisión de la documentación e investigación deben ocurrir. La investigación debe incluir la revisión de la documentación de mantenimiento del área; de la documentación de desinfección; de los parámetros físicos u operacionales inherentes, tales como, cambios en la temperatura ambiental y humedad relativa y la etapa de entrenamiento de los funcionarios involucrados.

Luego de la investigación, las acciones adoptadas pueden incluir el refuerzo en el entrenamiento de las personas para enfatizar el control microbiológico del ambiente; el muestreo adicional en frecuencia aumentada; la desinfección adicional; las pruebas adicionales de producto; la identificación del contaminante microbiano y su posible fuente y la reevaluación y revalidación de los actuales procedimientos operacionales estandarizados, si necesario. Con base en la revisión de la investigación y en los resultados de las pruebas, el significado del nivel microbiológico excedido y la aceptabilidad de las operaciones o productos procesados bajo aquella condición pueden ser definidos. Toda investigación y justificativa de las acciones deben ser documentadas y formar parte del sistema de gerenciamiento de la calidad.

Sala y zona limpia son definidas por certificación de acuerdo con la norma aplicable, siendo que los parámetros evaluados incluyen integridad de filtros, diferenciales de presión y velocidad, estándares y cambios del aire. Un ejemplo de método para conducir la prueba de desafío de partículas para el sistema consiste en aumentar la concentración de partículas en el ambiente por medio de humo en el entorno de áreas de trabajo críticas y visualizar los movimientos del aire. La presencia de vórtices y zonas turbulentas pueden ser visualizados y el estándar de flujo de aire puede ser finamente ajustado para eliminar o minimizar efectos indeseables. Esa evaluación está hecha bajo condiciones de producción simuladas; sin embargo, con equipos y funcionarios en el local.

La prueba y la optimización apropiados de las características físicas de la sala limpia o ambiente controlado son esenciales antes de concluir la validación del programa de monitoreo microbiológico. La garantía de que el ambiente está operando adecuadamente y de acuerdo con sus especificaciones dará mayor garantía de que la carga microbiana del ambiente será apropiada para procesamiento aséptico. Estas pruebas deben ser repetidas durante la certificación de rutina de la sala o zona limpia y siempre que alteraciones consideradas significativas fueren hechas en la operación, tales como cambios en el flujo de personas, procesamiento, operación, flujo de material, sistemas de manipulación de aire o *disposición* de equipos.

### 7.4.3 TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS PARA PROCESO ASÉPTICO

Debido a la fuerte correlación entre el involucramiento e intervención humana y el riesgo potencial para contaminación de producto en el envase aséptico, sistemas de producción donde personas son retiradas de las zonas críticas han sido implementados, empleando, por tanto, estrategias avanzadas de procesamiento aséptico, con requisitos reducidos de monitoreo ambiental de partículas viables y no viables.

Siguen algunas definiciones de sistemas usados para reducir la tasa de contaminación en el proceso aséptico.

**Barreras:** dispositivo que restringe el contacto entre el operador y el campo aséptico. Barreras no pueden ser esterilizadas y ni siempre poseen sistemas de transferencia que permiten el paso de materiales para dentro o fuera del sistema sin exposición al ambiente alrededor. Hay diferentes tipos de barreras, desde cortinas de plástico en zonas críticas hasta barreras rígidas en equipos, que pueden incorporar elementos como soporte de guantes y puerta de transferencia.

**Soplo/Llenado/Sellado (*Blow/Fill/Seal*):** ese sistema combina el montaje del recipiente con el envase del producto y el sellado en un único equipo. Del punto de vista microbiológico, la secuencia de formación del recipiente, envase del producto estéril y la formación y aplicación del sellado son obtenidos, asépticamente, en una operación ininterrumpida con exposición mínima al ambiente. Esos sistemas existen hace muchos años y las tasas de contaminación son menores que 0,1%.

**Aisladores:** tecnología usada para doble propuesta, de proteger el producto de la contaminación del ambiente y de personas durante envasado y cierre y de proteger personas de productos tóxicos o nocivos durante su producción. Esa tecnología está basada en el principio de colocar materiales previamente esterilizados, como recipientes, productos y tapas, en un ambiente estéril, que permanecen estériles durante toda operación, una vez que personas o componentes no estériles no están dentro del aislador. La barrera del aislador es una barrera absoluta que no permite cambios entre ambientes protegidos y no protegidos. Aisladores pueden ser físicamente sellados contra la entrada de contaminantes externos o pueden ser efectivamente sellados por la aplicación continua de sobrepresión. Manipulación de material por funcionarios es realizada por medio de guantes o vestimentas completas o parciales. El aire que entra en el aislador pasa a través de un filtro HEPA o ULPA y la extracción de aire normalmente pasa por un filtro HEPA. Vapores de peróxido de hidrógeno o ácido peracético normalmente son usados para esterilización de las superficies o ambiente interno. La esterilización del interior de los aisladores y todo contenido son normalmente validados para un nivel de garantía de esterilidad de 10-6.

La introducción de equipos; componentes y materiales puede ser hecha de diversas maneras, como uso de autoclave de puerta doble, introducción continua de componentes a través de una cinta que pasa por túnel de esterilización o uso de un sistema de dique. Es necesario monitorear la integridad, calibración y mantenimiento del aislador.

Los requisitos para los ambientes controlados adyacentes a esas nuevas tecnologías usadas en el procesamiento aséptico dependen del tipo de tecnología usada.

Equipos de Soplo/Llenado/Sellado que limitan el contacto del operador con el producto pueden ser instalados en un ambiente controlado, especialmente si alguna intervención del operador es posible durante la producción.

Sistemas de barreras requieren alguna forma de ambiente controlado. En función de los numerosos tipos y aplicacio-



nes, los requisitos para el ambiente adyacente pueden variar. Las estrategias de diseño y operación para el ambiente donde circulan esos sistemas deben ser desarrolladas por los productores usando un criterio lógico y racional y la capacidad del sistema de suministrar productos estériles debe ser validada de acuerdo con criterios pre-establecidos.

En aisladores, el aire entra a través de los filtros integrales de calidad HEPA, o mejor, y su interior es, típicamente, esterilizado con un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup>. Por tanto, aisladores que contienen aire estéril no intercambian aire con el ambiente alrededor y son libres de operadores humanos. No obstante, cuando el aislador está en un ambiente controlado, el potencial de producto contaminado es reducido en la eventualidad de un fuga en los guantes o vestimentas.

La extensión y alcance del monitoreo microbiológico ambiental dependen del sistema utilizado. Productores deben balancear la frecuencia del muestreo ambiental que requiere intervención humana, con los beneficios acumulados por los resultados del monitoreo. Una vez que barreras son diseñadas para reducir la intervención humana, sistemas de muestreo remotos deben ser usados en sustitución a la intervención de personas. En general, una vez que la validación estableció la eficacia de la barrera, la frecuencia de muestreo para monitorear el estado microbiológico del área de procesamiento aséptico puede ser reducida cuando comparada a la frecuencia de un sistema clásico de proceso aséptico.

Sistemas de aisladores requieren frecuencia menor de monitoreo microbiológico. El monitoreo continuo de partículas totales puede suministrar garantía de que el sistema de filtración de aire dentro del aislador está funcionando adecuadamente. Métodos tradicionales para muestreo microbiológico cuantitativo del aire pueden no ser suficientes para probar el ambiente dentro del aislador. Experiencias con aisladores indican que, bajo condiciones normales de operación, fuga o rompimiento en los guantes representan el mayor potencial para contaminación microbiológica, lo que requiere pruebas frecuentes de integridad de los guantes y monitoreo de sus superficies. El monitoreo no frecuente de superficies dentro del aislador debe ser evaluado y puede ser benéfico.

## 7.4.4 ENTRENAMIENTO DE FUNCIONARIOS

Productos procesados asépticamente exigen mucha atención a los detalles, disciplina rigurosa y supervisión estricta de las personas, a fin de mantener el nivel de calidad ambiental apropiado para la garantía de esterilidad del producto final.

El entrenamiento de todos los funcionarios que trabajan en salas y zonas limpias es crítico. Ese entrenamiento,

también, es importante para las personas responsables del programa de monitoreo microbiológico, una vez que la contaminación del área de trabajo puede ocurrir inadvertidamente durante el muestreo microbiológico, por uso de técnicas impropias. En operaciones altamente automatizadas, el monitoreo puede ser realizado por personas que tienen contacto más directo con zonas críticas dentro del área de procesamiento. El monitoreo de los funcionarios debe ser conducido antes y después del trabajo en el área de procesamiento.

El gerenciamiento de la instalación debe garantizar que todas las personas involucradas en operaciones en las salas y zonas limpias conozcan principios microbiológicos relevantes, incluyendo principios básicos del procesamiento aséptico y la relación de los procedimientos de fabricación y manipulación con fuentes potenciales de contaminación del producto. También, deben tener conocimiento sobre principios básicos de microbiología; fisiología microbiana; limpieza, desinfección y esterilización; selección y preparación de medios de cultivo; de acuerdo con el involucramiento de los funcionarios en el proceso. Las personas involucradas en la identificación microbiana requieren entrenamiento especializado en los métodos de laboratorio aplicables. Entrenamiento adicional en el gerenciamiento de los datos ambientales colectados debe ser suministrado. Conocimiento y comprensión de los procedimientos operacionales estándar aplicables son críticos, especialmente aquellos relacionados con las medidas correctivas que son tomadas cuando las condiciones ambientales lo exigen. La comprensión de las políticas de adhesión a las exigencias regulatorias y la responsabilidad de cada individuo, relativas a las Buenas Prácticas de Fabricación deben ser parte integrante del programa de entrenamiento, así como entrenamiento sobre cómo conducir investigaciones y analizar datos.

El control de la contaminación microbiana asociada con las personas es uno de los elementos más importantes del programa de control ambiental. La contaminación puede ocurrir a partir de la diseminación de microorganismos por individuos, particularmente aquellos con infecciones activas y, por tanto, apenas individuos saludables deben ser autorizados a acceder a ambientes controlados. La buena higiene personal y atención cuidadosa en los detalles de los procedimientos de paramentación aséptica son ítems importantes. Los funcionarios apropiadamente paramentados deben ser cuidadosos en mantener la integridad de sus guantes y delantales durante todo el período de permanencia en los ambientes controlados.

Como el programa de monitoreo ambiental no es capaz de detectar todos los eventos del procesamiento aséptico que podrían comprometer la calidad microbiológica del ambiente, estudios periódicos de envase de medio de cultivo o simulación de proceso son necesarios para garantizar que los controles operacionales apropiados y entrenamiento sean efectivamente mantenidos.

## 7.4.5 PROYECTO E IMPLANTACIÓN DEL PROGRAMA DE CONTROL MICROBIOLÓGICO AMBIENTAL

Es responsabilidad del fabricante desarrollar, iniciar, implantar y documentar un programa de monitoreo microbiano ambiental que sea capaz de detectar un evento adverso en las condiciones microbiológicas a tiempo de permitir acciones correctivas significativas y efectivas. Es imperativo que el programa sea hecho a medida para las condiciones e instalaciones específicas.

Un medio de cultivo de crecimiento microbiológico general como el medio de caseína / soja, debe ser adecuado en la mayoría de los casos. Ese medio puede ser suplementado con aditivos para contornear o minimizar los efectos de los agentes desinfectantes o de antibióticos, si usados o procesados en esos ambientes. La detección y cuantificación de levaduras y mohos deben ser consideradas. Medios, generalmente aceptados, son tales como Sabouraud y Sabouraud modificado. Otros medios validados para promover el crecimiento de hongos pueden ser usados, tal como Agar caseína / soja. En general, el análisis de microorganismos anaeróbicos obligatorios no es realizado en la rutina, a no ser que condiciones o investigaciones exijan. La capacidad de los medios de cultivo seleccionados para detectar y cuantificar los microorganismos anaeróbicos o microaerófilos debe ser evaluada.

Los procesos de esterilización usados para preparar medios de cultivo para el programa ambiental deben ser validados y deben ser examinados para esterilidad y promoción de crecimiento. Los medios deben ser capaces de mantener el crecimiento cuando inoculados con menos de 100 UFC. La selección de tiempo y temperatura de incubación es hecha una vez que los medios apropiados hayan sido seleccionados. Típicamente, temperaturas de incubación en los intervalos de  $22,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  y  $32,5\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$  han sido usadas con tiempos de incubación de 72 y 48 h, respectivamente.

El programa de control ambiental debe incluir identificación y evaluación de los locales de muestreo y validación de los métodos de muestreo microbiológica del ambiente.

## 7.4.6 PLAN Y LOCALES DE MUESTREO

Durante la fase inicial de actividades, así como, en la preparación de una sala limpia, u otro ambiente controlado, locales específicos para muestreo de aire o de superficies deben ser determinados. Debe considerarse la proximidad del producto, si el aire y las superficies existentes en la sala

están en contacto con él o con superficies internas de los sistemas de cierre de los recipientes.

La frecuencia de muestreo dependerá de la criticidad de los locales especificados y el tratamiento subsiguiente al proceso aséptico.

A medida que intervenciones manuales durante la operación y el potencial de contacto personal con el producto aumentan, crece la importancia del programa de monitoreo ambiental. Ese es más crítico para productos procesados asépticamente que para aquellos sometidos a la esterilización terminal. Cuando el ciclo de esterilización terminal no se basar en el concepto de sobremorte, el programa de carga microbiana anterior a la esterilización es crítico. Los planos de muestreo deben ser dinámicos con frecuencias de monitoreo y localizaciones ajustadas con base en el desempeño de tendencia. Es apropiado aumentar o disminuir el muestreo con base en ese desempeño.

## 7.4.7 LÍMITES MICROBIOLÓGICOS DE ALERTA Y ACCIÓN EN SALAS Y ZONAS LIMPIAS

Los principios y conceptos de control de procesos estadísticos son útiles para establecer niveles de alerta y acción, así como mecanismos para control de tendencias.

El nivel de alerta en el monitoreo microbiológico ambiental evidencia nivel de contaminación significativamente superior a las condiciones de operación normales. Exceder el nivel de alerta no necesariamente debe exigir acción correctiva, sin embargo, al menos llevar a una investigación de acompañamiento documentada, que puede incluir modificaciones en el plano de muestreo.

El indicativo de acción en monitoreo microbiológico ambiental, cuando excedido, requiere acompañamiento inmediato y, si necesario, acción correctiva.

Niveles de alerta se basan normalmente en informaciones históricas obtenidas de operaciones de rutina del proceso en un ambiente controlado específico.

En una instalación nueva, esos niveles generalmente se basan en la experiencia anterior de instalaciones y procesos similares; y, en datos obtenidos en el paso de varias semanas. Esos niveles son normalmente re-examinados para adecuación a una frecuencia establecida. Tendencias a un deterioro de la calidad ambiental requieren atención para determinar la causa y para instituir un plan de acción correctiva, a fin de traer las condiciones de vuelta a los niveles esperados. Una investigación debe ser implementada, y la evaluación del impacto potencial sobre el producto debe ser efectuada.

## 7.4.8 MÉTODOS Y EQUIPOS USADOS PARA MONITOREO AMBIENTAL

Microorganismos viables del aire pueden influenciar la calidad microbiológica de los productos fabricados en salas y zonas limpias. La cuantificación de estos microorganismos puede ser influenciada por instrumentos y procedimientos utilizados en los ensayos. El empleo de los métodos, o equipos alternativos debe ser precedido de la verificación cuanto a la equivalencia de los resultados. Hay diferentes formas de monitoreo de tipos y tipos de equipos disponibles para cuantificar microorganismos viables, incluyendo muestreadores de sedimentación, de impacto y centrífugos. La selección y adecuación del método a ser utilizado es responsabilidad del usuario.

El método utilizando placas de sedimentación es además el más ampliamente diseminado debido a su simplicidad y bajo costo y da informaciones cualitativas sobre el ambiente de exposición por tiempo prolongado, sin embargo, la exposición de placas de Petri abiertas y conteniendo medio de agar no es para evaluación cuantitativa de los niveles de contaminación microbiana de ambientes críticos.

Una de las principales limitaciones de los muestreadores de aire mecánicos es el tamaño de la muestra de aire que está siendo probada, pues el nivel de microorganismos en el aire de un ambiente controlado es normalmente reducido y un gran volumen de aire debe ser probado para que el resultado sea preciso y exacto, lo que, muchas veces, no es práctico. Para demostrar que los conteos microbianos en el ambiente no están aumentando después del muestreo, ella puede ser extendida para determinar si el tiempo de muestreo es un factor limitante para obtener una muestra representativa. Hay equipos capaces de muestrear altas tasas de volumen de aire, pero debe considerarse la ruptura del flujo de aire en áreas críticas o a creación de turbulencia que puedan aumentar la probabilidad de contaminación.

Muestreadores centrífugos demuestran selectividad para partículas mayores y, por tanto, el uso de esos equipos puede resultar en conteos mayores de partículas en el aire. Al usar esos muestreadores, debe considerarse su efecto en la linealidad del flujo de aire en la zona controlada donde es posicionado para el muestreo. La utilización de sondas remotas requiere que sea determinado si el tubo extra usado no tiene efecto adverso en el conteo de partículas viables, pues ese efecto debe ser eliminado, o un factor de corrección debe ser usado para los resultados obtenidos.

## 7.4.9 MÉTODOS Y EQUIPOS USADOS PARA MONITOREO DE PARTÍCULAS VIABLES EN SUPERFICIES

El muestreo de superficies de equipos, de áreas y de funcionarios es un componente del programa de control microbiológico de ambientes controlados. Para minimizar la

ruptura de operaciones críticas, normalmente el muestreo es realizado al final de las operaciones. El muestreo puede ser hecho usando placas de contacto o *swab*.

El monitoreo es realizado normalmente en las áreas que entran en contacto con el producto y en áreas adyacentes. Placas de contacto con agar nutriente son usadas para muestrear superficies planas y son incubadas en temperatura adecuada para cuantificación de partículas viables. Agar específico puede ser usado para cuantificar hongos, esporas, etc. El *swab* es empleado en superficies irregulares, especialmente en los equipos. El *swab* es colocado en un diluyente adecuado y la estimativa de conteo microbiano está hecha plaqueando una alícuota apropiada en agar nutriente específico. El área a ser muestreada usando *swab* es definida usando un molde de tamaño apropiado estéril, en general entre 24 a 30 cm<sup>2</sup>. El resultado está dado por placa de contacto, o por *swab*.

## 7.4.10 MEDIOS DE CULTIVO Y DILUYENTES PARA MUESTREO Y CUANTIFICACIÓN DE PARTÍCULAS VIABLES

Los medios de cultivo y diluyentes usados para muestreo y cuantificación de microorganismos en salas y zonas limpias dependen de los procedimientos y equipos usados. El agar caseína / soja es el medio sólido normalmente usado, pero hay diferentes medios y diluyentes disponibles para diferentes propuestas. Medios alternativos deben ser validados para la propuesta usada. Cuando se usan desinfectantes o antibióticos en el área controlada, debe considerarse el empleo de medios con agentes inactivantes apropiados.

## 7.4.11 IDENTIFICACIÓN DE AISLADOS MICROBIANOS

El programa de control ambiental incluye un nivel apropiado de identificación de la flora obtenida en la muestreo. El conocimiento de la flora normal de las salas y zonas limpias es importante para definir el monitoreo de la área, a eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección y los métodos de desinfección microbiana. La información obtenida utilizando el programa de identificación puede ser útil en la investigación de fuentes de contaminación, especialmente cuando los límites de acción son excedidos. La identificación de microorganismos aislados de áreas críticas es importante.

## 7.4.12 EVALUACIÓN OPERACIONAL DEL ESTADO MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS ENVASADOS ASEPTICAMENTE

Salas y zonas limpias son monitoreadas por un programa de monitoreo ambiental apropiado. Para garantizar carga

microbiana mínima, información adicional en la evaluación del estado microbiológico del ambiente puede ser obtenida por medio de la prueba de envase aséptico de medio de cultivo (*media fill*). La prueba de *media fill* es empleada para evaluar el procesamiento aséptico usando medio de cultivo estéril en el lugar del producto. Resultados satisfactorios de *media fill* demuestran la adecuación de la línea para la fabricación del producto. No obstante, otros factores son importantes, como construcción de las áreas; monitoreo ambiental y entrenamiento de personas.

Cuando un proceso aséptico es desarrollado e instalado, es necesario cualificar el estado microbiológico del proceso, realizando, como mínimo, tres *media fill* consecutivos. Los problemas en el desarrollo del programa de *media fill* a ser considerados comprenden procedimientos del envase del medio; selección del medio; volumen de envase; tiempo y temperatura de incubación; inspección de unidades envasadas; interpretación de resultados y posibles acciones correctivas requeridas.

Una vez que el *media fill* es realizado para simular el procesamiento aséptico de un producto, es importante que sea realizado en condiciones normales de producción. Eso incluye número máximo de personas y uso de todas las etapas y materiales usados en el proceso de producción normal. Durante el desarrollo del *media fill*, intervenciones pre-documentadas conocidas deben ser planeadas durante las corridas normales de producción, como cambio de picos de envase, componentes de fijación, etc. Alternativamente, para añadir un margen de seguridad, una combinación de condiciones posibles puede ser usada y ejemplos incluyen paradas frecuentes; reparaciones no esperadas; cambio de filtros, etc.

La calificación de un proceso aséptico debe ser hecha en todos los productos y para cada línea. Desde que la geometría del recipiente (como tamaño y abertura) y la velocidad de la línea sean factores que son variables. La combinación apropiada de esos factores, preferencialmente en los extremos, debe ser usada en la calificación. Un análisis racional de los productos usados debe ser documentado.

Se recomienda que el *media fill* sea realizado para cubrir todos los turnos de producción para línea / producto / combinaciones de recipientes para calificación inicial y revalidaciones periódicas. El programa de *media fill* debe simular prácticas de producción en tiempos prolongados y puede ser realizado al final del turno de producción.

Medios de cultivo ricos pueden ser usados, como caldo caseína / soja. Después del procesamiento aséptico del medio de cultivo, esos deben ser incubados a  $22,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  o  $32,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por como mínimo 14 días. Si dos temperaturas fueron usadas para la incubación de las muestras de medio de cultivo, estas deben ser incubadas, como mínimo, 7 días en cada una de ellas. Después de incubación, las muestras deben ser inspeccionadas para crecimiento. Aislados deben ser identificados para género y, cuando sea posible, para especie a fin de propiciar la investigación de las fuentes de contaminación.

Puntos críticos en la realización del *media fill* son número de recipientes para cualificar el proceso aséptico; número de unidades llenadas para el *media fill*; interpretación de resultados e implementación de acciones correctivas. Normalmente tres trayectos de *media fill* son usados para calificación inicial, o inicio de un área para demostrar consistencia en la línea de envase aséptico. El número mínimo para demostrar la tasa de contaminación de no más que 0,1%, criterio de aceptación para trayecto de *media fill*, es de, como mínimo, 3000 unidades. Plantas pilotos que preparan pequeños lotes pueden usar número menor de unidades.

Una vez que los funcionarios son una fuente crítica de contaminación en salas limpias, documentación visual puede ser útil para verificar correlación de actividades de producción con eventos de contaminación.

## 7.5 PROCEDIMIENTOS DE LIBERACIÓN

Debe ser establecido un programa de garantía de la calidad que describa en detalles los pasos y la documentación requerida para la liberación de la carga o lote. La liberación de los productos esterilizados dependerá de liberación que puede ser convencional o paramétrica.

### LIBERACIÓN PARAMÉTRICA DE PRODUCTOS CON ESTERILIZACIÓN TERMINAL

La liberación paramétrica es definida como la liberación de cargas o lotes de productos sometidos a la esterilización terminal por medio del cumplimiento de parámetros críticos del proceso de esterilización sin la necesidad de realización de la prueba de esterilidad. La liberación paramétrica es una posibilidad cuando el proceso de esterilización es muy bien conocido, los puntos importantes de control del proceso son bien definidos, previsible y mensurables y la letalidad del ciclo de esterilización fue validada con indicador biológico adecuado, o, en el caso de esterilización por radiación ionizante, la realización de las pruebas microbiológicas y dosimétricos apropiados. El uso de liberación paramétrica para procesos de esterilización requiere aprobación previa del órgano regulador, que debe evaluar la justificativa científica para el proceso de esterilización empleado y los datos documentados de validación.

Es importante considerar las limitaciones de la prueba de esterilidad en la evaluación de los productos sometidos a la esterilización terminal, que tiene sensibilidad comprometida y es estadísticamente limitado debido a la baja probabilidad de la presencia de unidades contaminadas. Por tanto, una vez que el proceso de esterilización esté completamente validado y operando, consistentemente, los datos físicos de la esterilización combinados con otros métodos, como por ejemplo, indicadores biológicos, indicadores termoquímicos e integradores físico químicos, pueden suministrar informaciones más exactas que la prueba de esterilidad para la liberación de productos sometidos a la esterilización terminal.



Cuatro procesos de esterilización pueden ser calificados para la liberación paramétrica: calor húmedo, calor seco, óxido de etileno y radiación ionizante. Los productos sometidos a la esterilización terminal representan la categoría de menor riesgo entre los productos farmacéuticos estériles. Al contrario de productos estériles obtenidos por producción aséptica en ambientes controlados, productos sometidos a la esterilización terminal presentan nivel de garantía de esterilidad mensurable.

Los productos estériles obtenidos por esterilización terminal deben atender a un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup>, o sea, no más que una unidad contaminada en un millón de unidades producidas. La aplicación apropiada de los métodos usados para desarrollo de proceso terminal requiere amplio conocimiento científico del método de esterilización seleccionado, dentro de tres categorías, para uso con producto específico:

- a) proceso basado en la carga microbiana (biocarga);
- b) proceso combinado: indicador biológico y biocarga;
- c) proceso de sobremorte.

El proceso basado en la biocarga requiere amplio conocimiento de la carga microbiana del producto. Debe ser observado que diversos procedimientos de establecimiento de dosis en el proceso de esterilización por radiación utilizan el conocimiento de la carga microbiana del producto y su resistencia a la radiación. Ese método exige, también, un nivel de garantía de esterilidad de por lo menos 10<sup>-6</sup>. El método basado en la determinación de la biocarga necesita que sean desarrollados puntos críticos de control del proceso cuanto a la carga microbiana del producto. Procedimientos de análisis de riesgo, como Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), son útiles para establecer condiciones de control de manufactura y parámetros apropiados de control en proceso.

Para los productos que posibilitan la supervivencia de la carga microbiana son necesarios ambientes de producción más controlados y controles de proceso más precisos. Ese proceso es más indicado para productos limpios, con reducido nivel de carga microbiana y baja frecuencia de microorganismos formadores de esporas. Ese proceso, también, puede ser útil para productos que pueden sufrir alteraciones cuando sometidos a procesos de esterilización más drásticos.

El proceso combinado que usa indicador biológico y biocarga es generalmente empleado para productos que pueden perder atributos al usar proceso de sobremorte y cuando se desea un proceso de esterilización que demuestre la inactivación de altos números de microorganismos de los indicadores biológicos, reconocidamente más resistentes al proceso de esterilización. Ese proceso requiere el co-

nocimiento de la carga microbiana del producto y datos relativos a su resistencia al proceso de esterilización. La resistencia relativa del indicador biológico seleccionado debe ser establecida por la inoculación de las esporas microbianas en el producto. Normalmente son usados indicadores biológicos con 10<sup>6</sup> esporas y valor D mayor que 1 minuto. Ciclos fraccionados son usados para determinar la resistencia (valor D) relativa entre producto inoculado con los microorganismos del indicador biológico y con aquellos, frecuentemente, encontrados en la carga microbiana. Ese proceso es empleado generalmente para desarrollo de ciclos de esterilización de productos parenterales empleando esterilización terminal y esterilización de relacionados por óxido de etileno.

El proceso de sobremorte es usado cuando el producto a ser esterilizado no es deletéreamente influenciado por el agente esterilizante o condiciones del proceso de esterilización. Cuando se emplea ese proceso, es importante conocer la carga microbiana del producto y la prevalencia de los microorganismos formadores de esporas. En ese caso, los datos sobre la carga microbiana no necesitan ser minuciosos como para los otros dos procesos (biocarga e indicador biológico / biocarga). Generalmente los indicadores biológicos son resistentes al proceso. La sobremorte es demostrada por la reducción logarítmica de las esporas del indicador biológico, calibrado en un proceso que posibilita obtener F<sub>0</sub> mínimo de 12 minutos.

#### VALIDACIÓN DEL PROCESO DE ESTERILIZACIÓN

La liberación paramétrica requiere que el proceso de esterilización escogido sea desarrollado y consistentemente validado, para inactivación de la carga microbiana y la atención a un nivel de garantía de esterilidad de 10<sup>-6</sup>. La validación de la mayoría de los procesos de esterilización incluye la validación de parámetros físicos y de la eficacia microbiológica por intermedio del uso de indicadores biológicos para demostrar una correlación razonable entre la letalidad obtenida por medio de medidas físicas (F<sub>0</sub>) y a letalidad biológica determinada con el uso de indicadores biológicos.

Una vez que la eficacia del proceso de esterilización terminal definido en función de la biocarga está asociada con el número y la resistencia de los microorganismos en el producto, uno de los componentes de la liberación paramétrica es el programa activo de control microbiológico para monitorear el conteo y resistencia de la carga microbiana del producto. El control de la carga microbiana y su enumeración no es un factor crucial cuando se emplea el método de sobremorte, pues, en general, el método de sobremorte no requiere extensa evaluación de la carga microbiana en el transcurso del proceso y exige menor control en proceso del ambiente de producción.



# 8 PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS APLICABLES A LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS

## 8.1 GLOSARIO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
$a_1, \dots, z_1$	Dosis de las preparaciones ensayadas (muestras) A...Z
$a$	Significancia estadística de un resultado o medida estimada del grado en que este resultado es "verdadero"
$b_0$	Intersección de las respuestas ( $e$ ) sobre log dosis ( $x$ ) en la línea de regresión
$b, b_1$	Estimativa de la inclinación de la línea de regresión de la respuesta ( $e$ ) en relación al logaritmo de la dosis ( $x$ ).
$b1$	Número de bloques (animales) en un ensayo cruzado.
$c'$	Constante utilizada en la evaluación de los límites de confianza ( <b>Tabla 15</b> )
$d$	Número de niveles de dosis para cada preparación en un ensayo balanceado.
$f$	Número de diferencias en las respuestas comparadas entre estándar y muestra, en los ensayos realizados por el delineamiento 5 x 1
$gl$	grados de libertad
$h$	Número de preparaciones en un ensayo, incluyendo la preparación estándar
$h'$	Número de muestras ensayadas
$k$	número de tratamientos diferentes dentro de un ensayo $k = dh$
$k'$	número de logaritmos de potencias en los ensayos realizados por el delineamiento 5 x 1, para una misma muestra
$n$	número de réplicas para cada tratamiento
$n'$	número de estimación individuales de la potencia
$n''$	grados de libertad utilizado para estimar la varianza $s_{2M}^2$ en el ensayo 5 x 1
$P$	probabilidad
$P_1 P_2 P_3$	dosis menor, media y mayor de la preparación estándar $P$ ; en ensayos con solamente dos niveles de dosis, $p_2$ representa la dosis mayor
$r$	coeficiente de correlación de Pearson
$S^2$	estimativa de la varianza suministrada por el cuadrado promedio del error en el análisis de la varianza. También usado con una letra índice, por ejemplo, $s_{2M}^2$ representa la varianza del log potencia $M$ .
$s$	estimativa del desvío estándar, o sea, la raíz cuadrada de $s^2$
$t$	estadística de Student ( <b>Tabla 3</b> ).
$T'$	estadística de Dunnett ( <b>Tabla 12</b> ).
$v$	varianza para heterogeneidad entre ensayos
$w$	coeficiente de ponderación
$x$	log dosis – también usado con índice para indicar una preparación particular.
$\bar{x}$	promedio de los log dosis
$y$	respuesta individual o respuesta individual transformada.
$y'$	respuesta calculada para sustituir un valor perdido.
$\bar{y}_p, \dots, \bar{y}_z$	promedios de las respuestas para las preparaciones estándar y muestra.
$A, \dots, Z$	muestras ensayadas
$A, \dots, Z$	suma de las respuestas para las muestras $A, \dots, Z$
$A_1 A_2 A_3$	suma de las respuestas para las dosis menor, media y mayor de la muestra $A$ . para un ensayo con dos niveles de dosis, $A_2$ representa la respuesta para la dosis mayor. Similarmente para otras muestras ensayadas
$B_1, \dots, B_{2n}$	suma de las respuestas para cada sujeto (1 a $2n$ ) en ensayo doble cruzado
$B$	total incompleto de las respuestas en fila o bloque que tiene un valor perdido
$C$	estadística usada en el cálculo de los límites de confianza (Fórmula 14)
$C_1, \dots, C_n$	suma de respuestas en cada columna (1 a $n$ ) en delineamiento cuadrado latino
$C'$	suma incompleta de las respuestas en una columna de delineamiento en cuadrado latino con un valor perdido
$CV$	coeficiente de variación.
$x^2$	constante estadística de la <b>Tabla 18</b>

<i>Símbolo</i>	<i>Definición</i>
$X_m^2$	constante estadística para probar homogeneidad de estimación individuales de logaritmo de la potencia
E	suma de cuadrados para regresión ( <b>Tabla 10</b> )
F	razón de dos estimación de varianzas independientes ( <b>Tablas 4 y 5</b> )
$F_I, F_{II}$	suma de las respuestas en la fase I o fase II en un ensayo cruzado
$F_1, F_n$	suma de las respuestas en cada una de las filas 1 a n en delineamiento de cuadrado latino, o en cada bloque de un delineamiento en bloques al azar
$G_1, G_2, G_3$	estadística utilizada en la prueba de valores aberrantes
$G^2$	total incompleto de las respuestas en un ensayo con exclusión del valor perdido
I	intervalo entre log dosis adyacentes, en el ensayo de rectas paralelas
K	término de corrección utilizado en el análisis de varianza $K = (Ee)2/N$
L	intervalo de confianza en logaritmos
Lc	intervalo de confianza en logaritmos para promedio semiponderado
$L_p, \dots, L_z$	contrastes lineares para las preparaciones estándar y muestra
M	estimativa del log de la potencia o del log de la razón de potencia usada con una letra índice en un ensayo múltiple, para denotar una preparación particular ( $M = \log R$ )
$M_1, M_5$	límites de confianza de la estimativa del log de la potencia
$\bar{M}$	promedio de varias estimaciones independientes de M
$M^*$	estimativa del log de la potencia de la muestra A o del log de la razón de potencias antes de corregir por la potencia supuesta ( $M^* = \log R'$ )
$M'_s, M'_i$	límites superior y inferior de la estimativa del log de la potencia, antes de corregir por la potencia supuesta
N	número total de respuestas del ensayo
$N'_p, N'_A$	número total de respuestas para las preparaciones P y A
P	preparación estándar
P	suma de las respuestas para la preparación estándar
$P_1, P_2, P_3$	suma de las respuestas para las dosis inferior, media y superior de la preparación estándar P. Para ensayo de solamente dos niveles de dosificación, $P_2$ representa las respuestas para la dosis mayor
Q	suma de cuadrados para linealidad en la misma dirección ( <b>Tabla 10</b> ).
QM	suma de cuadrados debido a una fuente de variación dividido por el respectivo grado de libertad
$Q_p, \dots, Q_z$	contraste cuadrático para las preparaciones estándar y muestra ( <b>Tabla 9</b> )
R	estimativa de la potencia de la muestra
$R_i, R_s$	límites de confianza inferior y superior de la estimativa de potencia
$R^*$	estimativa de la razón de potencias antes de la corrección por la potencia supuesta
R+	constante específica para probar valores atípicos ( <b>Tabla 2</b> )
SA	potencia supuesta para la muestra A, cuando se preparan las dosis
SQ	suma de cuadrados debido a una fuente de variación
T'	total incompleto de las respuestas para un tratamiento excluyendo el valor perdido
$V=1/W$	varianza del logaritmo de potencia individual
X	diferencias en las respuestas comparadas entre muestra y estándar, divididas por el coeficiente de regresión ( $b_j$ ), en el delineamiento $5 \times 1$
W	ponderación estadística usada en la combinación de varias estimaciones independientes del log potencia
$W^*$	semi-ponderación de cada logaritmo de potencia en una serie de ensayos
X2	estadística qui-cuadrada (Tabla 18)

**Nota:** las Tablas de 1 a la 20 se encuentran en la sección **8.9 TABLAS ESTADÍSTICAS**. Las Tablas de 21 a la 47 se encuentran en la sección **8.10 EJEMPLOS DE ENSAYOS ESTADÍSTICOS**.

## 8.2 FUNDAMENTOS

### ENSAYOS BIOLÓGICOS

Son procedimientos destinados a evaluar la potencia de principios activos contenidos en las materias primas y preparaciones farmacopeicas, utilizando reactivos biológicos tales como microorganismos, animales, fluidos y órganos aislados de animales. La característica de los reactivos

biológicos es su variabilidad. Mientras los reactivos físico químicos pueden ser definidos y estandarizados para dar resultados idénticos en todos los laboratorios, es imposible definir totalmente los reactivos biológicos, a pesar de los esfuerzos de entidades internacionales en ese sentido. Esa variabilidad inherente a los reactivos biológicos torna imprescindible: 1) el empleo de estándares de referencia adecuados para obtener potencias relativas y 2) el empleo de métodos estadísticos para los delineamientos experimentales y análisis de los resultados.

## DELINEAMIENTOS EXPERIMENTALES

El delineamiento de un ensayo comprende: a) selección del conjunto de dosis del estándar (P) y de las muestras del desconocido (A) que serán ensayadas; b) especificación de las unidades experimentales (animales, microorganismos, antisueños, sangre etc.); c) reglas por las cuales se distribuirán las dosis para las unidades experimentales; d) especificaciones de las medidas u otros registros que deban ser procedidos en cada unidad experimental. El mejor delineamiento experimental es aquel que produce la información deseada con la mayor eficiencia. Por dificultades prácticas, puede ser imposible alcanzar ese objetivo. Por tanto, para cada ensayo pueden emplearse diferentes delineamientos experimentales, de acuerdo con la disponibilidad de personal, reactivos y tiempo. Todos los delineamientos que provean ensayos válidos y de precisión adecuada, como resultado final, son científicamente aceptables. Además de eso, deben comprender algún sistema que asegure distribución casual de las unidades experimentales para las diversas dosis utilizadas.

## CASUALIDAD Y VÍCIO

Debe hacerse distribución casual utilizando aparato empleado en juegos de azar o tabla de números aleatorios. Conviene señalar que ese procedimiento no elimina todos los vicios. Por ejemplo, por efecto de la casualidad, los animales de mayor peso podrán ser destinados a la determinada dosis y esa diferencia de pesos viciar los resultados. Por tanto, deberá ser creado el equilibrio, o sea, deben clasificarse los animales por banda de peso y distribuir, al azar, aquellos de mismo peso para todas las dosis y preparaciones (estándar y muestra).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Es el procedimiento matemático aplicado a los resultados experimentales con que se tiene como objetivo estimar la potencia de la muestra y evaluar la validez y precisión del ensayo. Los métodos de análisis se relacionan con los delineamientos experimentales utilizados.

## RESULTADOS

Expresar los resultados de evaluación biológica como estimativa de la potencia supuesta para una muestra (R), que será la expresión de la verdadera potencia relativa de la muestra en relación al estándar (p). Esa última es imposible de ser calculada con precisión debido a la variabilidad de los reactivos biológicos. Tal estimativa de la potencia supuesta (R) debe ser acompañada por los límites de confianza inferior y superior (R<sub>i</sub>, R<sub>s</sub>), o intervalo que abarca la verdadera potencia relativa de la muestra (p). En las monografías están establecidas especificaciones para la amplitud aceptable de esos intervalos con relación a la potencia estimada. Esas especificaciones tienen en cuenta la dificultad de los métodos y la necesidad práctica de estimarse la verdadera potencia con determinada precisión. Para alcanzar los límites de confianza especificados debe, a veces, realizarse más de un ensayo. Para obtener una estimativa de la potencia con intervalo de confianza reducido, deben combinarse, estadísticamente, los resultados de esos ensayos independientes.

La probabilidad, que mide el grado de confianza de que la potencia está fuera de los límites de confianza superior e inferior, está dada por la significancia estadística (a) de un resultado o medida estimada del grado en que ese resultado es “verdadero”. El nivel de significancia más utilizado en ensayos biológicos es de 5% (a = 0,05) o 1% (a = 0,01). En los casos no especificados explícitamente se entenderá que el nivel de significancia utilizado en el cálculo de los límites es a = 0,05.

Los procedimientos de cálculo son planeados para el ensayo en muestra única. En el caso de ser ensayadas varias muestras, simultáneamente, emplear las modificaciones descritas en ese volumen.

## 8.3 VALORES ATÍPICOS

Todas las respuestas obtenidas sin obedecer estrictamente el protocolo pre-establecido deben ser eliminadas. Cuando, después del registro de las respuestas, se observan valores aparentemente atípicos, la decisión de mantenerlos o eliminarlos debe basarse en criterios estadísticos, como los descritos a continuación:

Criterio basado en la variación dentro de un único grupo de respuestas supuestamente equivalentes

En promedio, para, relativamente, pocas respuestas idénticas dentro del grupo, serán rechazadas observaciones válidas en 2 o 4% de las pruebas. Comenzando con el valor supuestamente atípico, indicar las respuestas en orden de magnitud de  $y_1$  a  $y_n$ , donde  $n$  representa el número de observaciones en el grupo o réplicas del mismo tratamiento. Calcular

$$G_1 = (y_2 - y_1) / (y_n - y_1), \text{ cuando } n = 3 \text{ a } 7$$

$$G_2 = (y_3 - y_1) / (y_{n-1} - y_1), \text{ cuando } n = 8 \text{ a } 13 \text{ ou}$$

$$G_3 = (y_3 - y_1) / (y_{n-2} - y_1), \text{ cuando } n = 14 \text{ a } 24$$

Si  $G_1$ ,  $G_2$  o  $G_3$  exceden el valor crítico registrado en la **Tabla 1** para el valor correspondiente de  $n$ , existe base estadística para la eliminación del valor sospechoso.

Criterio que contempla a amplitud de una serie  $K = 2$  o más grupos de igual tamaño

Los grupos pueden recibir diferentes tratamientos, sin embargo todas las  $n$  respuestas dentro de cada grupo tienen del mismo tratamiento. En esta prueba, se estudia la variación de los valores para cada tratamiento que es obtenida por la diferencia entre el mayor y menor valor. El valor obtenido con mayor diferencia debe ser dividido por la suma de todas las diferencias y no debe exceder el valor en la tabla de (R+) en la **Tabla 2** para  $k =$  número de dosis y  $n =$  número de réplicas. Si el valor calculado excede el valor en la tabla, la columna sospechosa debe ser investigada para detectar el valor discrepante. Si  $k$  fuese menor o igual a 10, usar los valores presentados en la **Tabla 2**; si mayor, multiplicar R+ por  $(k + 2)$  e interpolar, si necesario, entre los valores presentados en la **Tabla 2a**.

Si  $R+$  excede el valor de la tabla o interpolado, el grupo con intervalo mayor es sospechoso ( $\alpha = 0,05$ ) y la observación de sus datos permitirá identificar el valor que, entonces, se considera atípico. El procedimiento puede ser repetido con los demás intervalos se hubiere sospecha de valor atípico en un segundo grupo.

## 8.4 ENSAYOS DIRECTOS

Se miden, directamente, las dosis de cada preparación (estándar y muestra) necesarias para producir respuestas pre-determinadas en cada unidad experimental de dos grupos equivalentes de animales u otros reactivos biológicos. Ejemplo típico es el ensayo biológico de digital. Preparar las soluciones del estándar y muestra de modo que contengan aproximadamente la misma potencia, teniendo en consideración la actividad declarada de la muestra o la estimada en ensayos previos ( $S_A$ ). Transformar cada resultado (dosis eficaz) en logaritmos ( $x$ ) y calcular los valores promedios de los logaritmos de las dosis eficaces para el estándar  $\bar{x}_p$  y para a muestra  $\bar{x}_A$ . Calcular la potencia relativa de la muestra ( $R'$ ), antes de ajustar por la potencia supuesta, como el antilogaritmo de  $M$ , en que:

$$M' = \bar{x}_p - \bar{x}_A \quad (1)$$

Calcular la varianza de  $M'$  como la suma de las varianzas de los dos promedios, a partir de la ecuación

2)en Calcular la potencia relativa de la muestra y los límites de confianza, teniendo en consideración la potencia supuesta de la muestra ( $S_A$ ) utilizada para preparar las diluciones:

$$S^2_{M'} = S^2_x \left( \frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_A} \right) \quad (2)$$

en que

$$S^2_x = \frac{\left[ \sum_P x_p^2 - \left( \sum_P x_p \right)^2 / N_p \right] + \left[ \sum_A x_A^2 - \left( \sum_P x_A \right)^2 / N_A \right]}{N_p + N_A - 2} \quad (3)$$

$N_p$  y  $N_A$  son números de animales tratados como estándar y muestra;  $\sum_p$  y  $\sum_A$  representan la suma de los resultados calculados para las dos preparaciones. Calcular los límites de confianza como:

$$\frac{R'_s}{R'_i} = \text{antilog} \left( M' \pm t_{S_{M'}} \right) \quad (4)$$

Obtener el valor apropiado de  $t$  en la **Tabla 3**, de acuerdo con los grados de libertad ( $gl$ ) dados por el denominador de la ecuación (3).

Calcular la potencia relativa de la muestra y los límites de confianza, teniendo en consideración la potencia supuesta de la muestra ( $S_A$ ) utilizada para preparar las diluciones:

$$R = \text{anti log } M \quad (5)$$

em que

$$M = M + \log S_A \quad (6)$$

con límites de confianza

$$\frac{R'_s}{R'_i} = \text{antilog} \left( M' \pm t_{S_{M'}} \right) \quad (7)$$

En este ensayo,  $s_M$  es igual a  $S_{M'}$ .

Para que el ensayo sea válido, la varianza de  $x_p$  debe ser la misma de  $x_A$ , diferenciando solamente por errores de muestreo. para probar, calcular las varianzas y dividir la mayor por la menor. De ese modo, se obtiene una relación de varianzas. Calcular la varianza de  $x_p$  del siguiente modo en que

Con límites de confianza

$$S^2_{xp} = \frac{\sum_P x_p^2 - \left( \sum_P x_p \right)^2 / N_p}{N_{p-1}} \quad (8)$$

Calcular análogamente  $S^2_{xA}$ . (8a)

La distribución de la razón de varianzas ( $F$ ) se encuentra en las **Tablas 4** y **5**, sin embargo para esta prueba los valores en la **Tabla 4** corresponden a los niveles de significancia  $\alpha = 0,05$  y los en la **Tabla 5** a  $\alpha = 0,01$ . El valor  $F$  del ensayo no debe ultrapasar el valor en la tabla, correspondiente a los grados de libertad del numerador y denominador con que se obtuvo  $F$ . Los grados de libertad son aquellos de los denominadores de las varianzas de las ecuaciones (8) y (8a).

## 8.5 ENSAYOS INDIRECTOS CUANTITATIVOS

NATURALEZA Y VALIDEZ

En general no es posible medir directamente la dosis eficaz. Por esa razón, la potencia es determinada indirectamente, comparando las respuestas producidas en escala cuantitativa, por ejemplo, peso, por dosis conocidas del estándar con aquellas producidas por una o más dosis de muestra.

En un intervalo restringido de dosis, las respuestas o su transformación conveniente (logaritmo, probit, etc.), presentan relación lineal con el logaritmo de las dosis correspondientes. Usar dos o más niveles de dosis del estándar o, preferencialmente, del estándar y de la muestra para determinar la posición y la inclinación de la recta. Proceder en cada ensayo de esa manera, pues, dependiendo de la sensibilidad de los reactivos biológicos utilizados, puede variar tanto la posición cuanto la inclinación de la recta.

Cada tratamiento consiste de una dosis fija del estándar ( $p_1, p_2, p_3$ , etc.) o de la muestra ( $a_1, a_2, a_3$ , etc.) y es administrada a un cierto número ( $n$ ) de unidades experimentales (animales, órganos, cultivos, tubos etc.). Registrar  $n$  respuestas, o sea, una para cada unidad experimental. Para que los métodos presentados en ese capítulo sean válidos, se deben cumplir las siguientes condiciones:

1. las unidades experimentales correspondientes a cada tratamiento deben ser seleccionadas casualmente;
2. para cada tratamiento, las respuestas o sus transformaciones utilizada en el cálculo (e) constituyen muestra de distribución normal;
3. el desvío estándar de la respuesta o de su transformación es independiente del nivel de respuesta, o sea, es

igual para todos los tratamientos, sólo diferenciando por los errores de muestreo;

4. la respuesta, o su transformación utilizada en los cálculos ( $e$ ), tiene relación lineal con el logaritmo de la dosis ( $x$ ) en el intervalo de dosis utilizadas;
5. la línea recta correspondiente a una o más muestras debe ser paralela a la del estándar.

A partir de estudios preliminares del método de ensayo, es posible suponer el cumplimiento de las condiciones 2 y 3. Teniendo de los resultados de cada ensayo, se puede probar las condiciones 4 y 5. La condición 4 (linealidad) sólo puede ser verificada en ensayos en que se aplican por lo menos tres diluciones de cada preparación. Cuando se realiza ensayo con solamente dos diluciones, se presume que la linealidad del sistema fue, previamente, establecida. La condición 5 (paralelismo) debe ser probada en cada ensayo. En ese, nunca deben ser utilizadas menos de dos diluciones de cada preparación.

Si no es cumplida cualquiera de las condiciones de 1 a 5, los métodos de cálculo descritos en ese capítulo no pueden ser aplicados y se tornan necesarios estudios para que se establezcan las condiciones recomendadas.

Es conveniente que la muestra sea ensayada con dosis cuyas respuestas sean aproximadamente iguales a aquellas obtenidas con las correspondientes dosis del estándar. Eso aumenta la precisión del resultado. Denominar la potencia supuesta para la muestra  $S_A$ .

#### EXPRESIÓN DE POTENCIA Y RESTRICCIONES

Realizadas las pruebas de validez correspondientes y siendo satisfactorios los resultados, se puede expresar la potencia relativa de cada muestra en relación al estándar con una razón de potencias o convertir en unidades apropiadas para cada muestra, por ejemplo, unidades internacionales, nacionales, unidades de peso etc. También, pueden calcularse los límites de confianza a partir del conjunto de datos obtenidos en el ensayo.

Para simplificar los cálculos del análisis estadístico presentado en este capítulo, es necesario imponer las siguientes restricciones al delineamiento de los ensayos:

- a) probar cada preparación, estándar y muestra, con el mismo número de diluciones. Se presentan fórmulas para ensayos farmacopeicos, utilizando dos y tres niveles de dosis para cada preparación así como el delineamiento  $5 \times 1$ ;
- b) mantener constante en cada ensayo la razón de dosis consecutivas para todos los tratamientos y
- c) obtener el mismo número de respuestas para cada tratamiento.

Caso alguna respuesta esté perdida, esa puede ser estimada por los métodos apropiados cada delineamiento presentado en ese capítulo; si hubiere pérdida de un tratamiento, atender a lo especificado en la sección de *Ensayos parcialmente balanceados*.

## 8.5.1 TIPOS DE DELINEAMIENTO

### CASUALMENTE

Cuando las unidades experimentales fueren, en su totalidad, razonablemente homogéneas y no hubiere indicación de que la variabilidad de la respuesta podrá ser menor en ciertos subgrupos, proceder a la distribución de las unidades experimentales para los diferentes tratamientos casualmente.

Habiendo posibilidad de que algunos subgrupos como, por ejemplo, capas, posiciones en estantes o días de experimento, sean más homogéneos que la totalidad de las unidades, la precisión del ensayo puede ser aumentada introduciéndose una o más restricciones en el delineamiento experimental.

### BLOQUES AL AZAR

Posibilita segregar una fuente de variación tal como la sensibilidad de diferentes crías de animales o la variación entre las placas de Petri en el ensayo microbiológico por difusión. Ese planeamiento obliga que cada tratamiento sea aplicado una vez en cada bloque (cría, placa, etc.) y sólo puede ser realizado cuando el bloque es suficientemente grande para acomodar todos los tratamientos.

### CRUZADO

Utilizar este planeamiento cuando el experimento pueda ser ajustado en bloques. Sin embargo, sólo es posible aplicar dos tratamientos por bloque. Por ejemplo, un bloque puede ser un animal posible de ser probado en dos ocasiones diferentes. Si tiene como objetivo aumentar la precisión, eliminando la influencia de la variación de los animales, al mismo tiempo que se equilibran los efectos de cualquier diferencia entre los niveles generales de respuesta, en las dos etapas del ensayo. Denominar *doble cruzado* el ensayo con dos dosis del estándar y de la muestra, y *triple cruzado* aquel de tres dosis de cada preparación. Proceder al ensayo en dos fases conforme el período de tiempo definido en el método. Distribuir los animales en cuatro o seis grupos y realizar un tratamiento en cada grupo en la primera fase. En la segunda fase, los animales que recibieron una preparación recibirán otra; los animales que recibieron dosis menores, en esa etapa recibirán las mayores. Seguir el esquema de la **Tabla 6**.

### CUADRADO LATINO

Adecuado cuando la respuesta puede ser afectada por dos fuentes de variación, cada cual pudiendo tener  $k$  niveles diferentes. Por ejemplo, se realiza el experimento en  $k$  días diferentes y por  $k$  experimentadores, o se realiza un ensayo de antibióticos por difusión en placa, en el cual los tratamientos pueden ser aplicados en un esquema de  $k \times k$ , donde cada tratamiento sólo ocurre una vez en cada fila y en cada columna. Utilizar solamente cuando el número de columnas, filas y tratamientos fueren iguales.



Las respuestas son registradas en forma de un cuadrado denominado latino. Existen muchas posibilidades de cuadrados latinos encontradas en la literatura especializada. A partir de uno pueden confeccionarse otros, alternando aleatoriamente filas y/o columnas. En la **Tabla 7** hay ejemplo de cuadrado latino con dos dosis del estándar y de la muestra.

Para cualquier delineamiento, la distribución de las unidades experimentales en los bloques debe estar hecha por procedimiento al azar, siendo las unidades mantenidas lo más uniformemente posible antes y durante el experimento.

## 8.5.2 ANÁLISIS DE VARIANZA

Al realizar este análisis se tiene como objetivo estudiar la validez del ensayo y calcular el error residual. Con excepción del cálculo del error residual, el análisis de los datos de un ensayo es idéntico para los delineamientos al azar, bloques al azar y cuadrado latino. A continuación, serán descritas las fórmulas para el análisis de cada tipo de ensayo. Consultar el glosario de símbolos. Las fórmulas son apropiadas para el caso en que se esté comparando una única muestra (*A*) contra el estándar de referencia (*P*), como, también, para el caso de ensayos múltiples donde estén incluidas *h*-1 muestras (*A...Z*). Las fórmulas para los ensayos cruzados no se encuadran en el esquema general y serán presentadas separadamente.

Si es necesario, transformar las respuestas (*y*) para cumplir las condiciones de validez descritas. Sumar todos los valores *y* para cada tratamiento y para cada preparación, como se observa en las **Tablas 8 y 9**. A partir de esos datos, obtener los contrastes lineales relacionados con las inclinaciones de las líneas dosis-respuesta.

Cuando son ensayadas tres dosis de cada preparación, se obtienen, también, contrastes cuadráticos que representan la curvatura de las líneas. Ver fórmulas en las **Tablas 8 y 9**.

La variación total de respuestas derivada de los diferentes tratamientos puede ser como se muestra en la **Tabla 10**. Las sumas de cuadrados son obtenidas a partir de los valores de las **Tablas 8 o 9**. *K* representa el cuadrado de la suma de todas las respuestas obtenidas en el ensayo dividido por el número total de ellas:

$$k = \{\sum y\}^2/N$$

Calcular el error residual del ensayo substrayendo las variaciones controladas en el delineamiento de la variación total en las respuestas (**Tabla 11**). En esa tabla,  $\sum y^2$  representa la suma de los cuadrados de todas las respuestas registradas en el ensayo. Conviene señalar que la suma de cuadrados, reducida, correspondiente, al ítem tratamientos es igual a la suma de las sumas de cuadrados reducidas (**Tabla 10**) y que, para el cuadrado latino, el número de respuestas replicadas (*n*) es igual al número de filas, columnas o tratamientos (*k*).

## 8.5.3 PRUEBAS DE VALIDEZ

Para probar el significado de las fuentes de variación relacionadas en la **Tabla 10**, cada suma de cuadrado reducida obtenida en la tabla debe ser dividida por el correspondiente grado de libertad para obtener el cuadrado promedio. El cuadrado promedio del error residual (*s*<sup>2</sup>) es cociente similar, obtenido de la línea apropiada en la **Tabla 11**.

Para obtener la razón conocida como *F*, dividir el cuadrado promedio de cada fuente de variación a ser probada por la varianza (*s*<sup>2</sup>). Calcular la significancia de cada fuente y comparar con los valores en la tabla (**Tablas 4 y 5**) al nivel de significancia de 5% (*a* = 0,05) y 1% (*a* = 0,01). Los valores de *F* son obtenidos en la columna correspondiente al número de grados de libertad asociado al cuadrado promedio de la fuente ensayada (*gl*<sub>1</sub>) y en la fila de la tabla correspondiente al número de grados de libertad asociado con *s*<sup>2</sup> (*gl*<sub>2</sub>). Si el valor de *F* calculado es mayor que el valor en la tabla, la fuente de variación ensayada es considerada "significativa" para el nivel de probabilidad utilizada.

Considerar los ensayos "estadísticamente válidos" si las pruebas presentan los siguientes resultados:

### Delineamiento de rectas paralelas

1. **Regresión significativa**, o sea, *F* calculado es mayor que en la tabla al nivel de significancia de 1% (*a* = 0,01). Indica que la inclinación de la línea dosis-respuesta es satisfactoria;
2. **términos cuadráticos no significativos**, o sea, los valores de *F* calculados deben ser menores que aquellos en la tabla al nivel de significancia de 5% (*a* = 0,05). Equivale a satisfacer la condición de linealidad de la relación entre la transformación de la respuesta utilizada y el logaritmo de la dosis;
3. **paralelismo no significativo**, o sea, *F* calculado debe ser menor que el valor en la tabla al nivel de significancia de 5% (*a* = 0,05) indicando que las rectas del estándar y muestra son paralelas. Caso estén ensayándose varias muestras, simultáneamente, y se obtenga un desvío significativo de paralelismo, eso puede ser debido a la utilización de alguna preparación que dio línea dosis-respuesta con una inclinación diferente con relación a las otras muestras. En ese caso, calcular el valor de *t'* para cada preparación *A...Z*, usando la ecuación  $t' = (L_p - L_A)/(2s\sqrt{n})$

$$t' = \frac{L_p - L_A}{2s\sqrt{n}} \quad (9)$$

Cada *t'* calculada debe ser comparada con el valor de la **Tabla 12**, donde *gl*<sub>1</sub> = *h* - 1 y *gl*<sub>2</sub> es igual al número de grados de libertad asociado con *s*<sup>2</sup>. Si se encuentra un valor de *t* "significativo" para alguna muestra, todos los datos relativos a esa preparación deben ser eliminados del ensayo y el análisis repetido desde el inicio.

En ensayos con error residual muy grande, una razón *F* "significativa" para el término preparaciones puede indicar que la suposición de potencia que sirvió de base para la preparación de las diluciones no fue correcta. Eso no

es condición de invalidad. Llegándose a esa conclusión, la potencia estimada en el ensayo puede ser usada como potencia supuesta en ensayos posteriores.

En las pruebas de paralelismo y cuadráticos pueden darse por casualidad valores de F muy bajos, menores que 1. Si pasa eso, repetidamente, puede ser indicación de que no se cumplieron las condiciones supuestas, lo que debe ser investigado más profundamente.

#### Delineamiento 5 x 1

La validez se establece cuando:

1. **regresión significativa**, o sea, F calculado debe ser mayor que el valor en la tabla para nivel de significancia  $\alpha = 0,01$ . Indica que la inclinación de la línea dosis-respuesta es satisfactoria;
2. **desvío de linealidad no significativo**. La relación entre ambas variables (logaritmo de la dosis y halo de inhibición) debe ser lineal. El valor de F calculado debe ser menor que aquel en la tabla para nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ . Otra medida a ser realizada es el coeficiente de correlación de Pearson (r) que debe ser mayor que 0,98;
3. **coeficiente de variación (CV)** menor que 5% es apropiado. La variabilidad de la respuesta en la curva de calibración debe ser constante.

En el caso de *ensayos cruzados*, con esquema de cálculo especial, las fórmulas a utilizar se encuentran en las **Tablas 13 y 14**.

Existen tres términos de interacciones debido a las réplicas dentro de cada grupo: Fases X Preparaciones, Fases X Regresión y Fases X Paralelismo.

Como en los delineamientos anteriormente discutidos, cada suma de cuadrados reducida debe ser dividida por el número correspondiente de grados de libertad para obtener los cuadrados medios.

En el caso del delineamiento doble cruzado, se obtiene dos cuadrados medios correspondientes a los errores I y II, que se denominan  $s_{2I}$  y  $s_{2II}$ . Dividir el Cuadrado promedio de cada fuente de variación por el  $s_2$  apropiado para obtener la razón F.

Para las fuentes Paralelismo, Fases X Preparaciones, Fases X Regresión, se utiliza  $s_{2I}$ . Para las otras fuentes, se utiliza  $s_{2II}$ .

Calcular La significancia de la fuente utilizando las **Tablas 4 y 5**. Si F calculado es mayor que el valor en la tabla, para los grados de libertad de la fuente ensayada ( $gl_1$ ) y del  $s_2$  correspondiente ( $gl_2$ ), la fuente de variación es considerada "significativa" para el nivel de significancia utilizado ( $\alpha = 0,05$  o  $\alpha = 0,01$ ).

Para que el ensayo sea válido, la *regresión* debe ser significativa y el *paralelismo* y las *tres interacciones* no deben ser significativos.

En el ensayo cruzado, la prueba de paralelismo no es muy sensible, pues depende de la variación entre bloques (animales).

Establecida la validez estadística de los ensayos hechos con cualquier delineamiento, calcular la potencia y los límites de confianza por los métodos descritos a continuación.

## 8.5.4 ESTIMATIVA DE LA POTENCIA Y LÍMITES DE CONFIANZA

*Cálculos para delineamiento de rectas paralelas (3 x 3 o 2 x 2)*

Calcular primero la respuesta promedio para cada preparación ( $\bar{y}_p, \bar{y}_A, \dots, \bar{y}_Z$ )

$$\bar{y}_p = \frac{P}{N_p} \quad (10)$$

y, análogamente, para otras preparaciones.

Llamándose de I el intervalo en logaritmo de las concentraciones, para cada preparación, en los ensayos con dos dosis se obtiene la inclinación común ( $b$ ), a partir de la ecuación

$$b = \frac{L_p + L_A + \dots + L_z}{Inh} \quad (11)$$

Para *ensayos con tres dosis* de cada preparación, el denominador  $Inh$  debe ser sustituido por  $2 Inh$ .

El logaritmo de la razón de potencia de la muestra A ( $M'_A$ ), antes de corregir por el valor de  $S_{A^2}$ , es

$$M'_A = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_p}{b} \quad (12)$$

La potencia calculada es la estimativa de la verdadera potencia de cada muestra. Los límites de confianza (con 5% de probabilidad de excluir la verdadera potencia o  $\alpha = 0,05$ ) pueden ser calculados como el antilogaritmo de la fórmula

$$\frac{M'_{As}}{M'_{AI}} = CM'_A \pm \frac{ts\sqrt{C}}{b} \sqrt{\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_A} + \frac{(\bar{y}_A - \bar{y}_p)^2}{E \cdot s^2 t^2}} \quad (13)$$

en que

$$C = E/(E - s^2 t^2) \quad (14)$$

Obtener E de la **Tabla 10**. El  $s_2$  es el error residual de la **Tabla 11** dividido por sus grados de libertad y t se encuentra en la **Tabla 3** de acuerdo con los grados de libertad de  $s^2$ .

Para ensayos balanceados de 2 y 3 dosis por preparación, la fórmula para los límites de la ecuación 13 puede simplificarse:

$$\frac{M'_{As}}{M'_{AI}} = CM'_A \pm \sqrt{(C-1)(CM'^2_A + c^2 I^2)} \quad (15)$$

en que  $c'$  es el coeficiente obtenido en la **Tabla 15** y C es a medida de significancia de la regresión. En ensayo con

inclinación bien definida el valor de C estará muy próximo de la unidad.

*Cálculo para delineamiento 5 x 1*

**Procedimiento para construcción de la curva dosis-respuesta** – En el método turbidimétrico, medir la turbidez en los tubos con medio líquido.

En el método por difusión en agar, medir los halos de inhibición para cada una de las concentraciones del estándar ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P_4$ , y  $P_5$ ) en los 4 conjuntos de placas. El promedio de las 36 lecturas de la concentración intermedia del estándar ( $P_3$ ) es utilizado para corregir los promedios de cada una de las otras concentraciones del estándar  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_4$ ,  $P_5$ .

La corrección se efectúa de la siguiente manera: medir las 36 lecturas de  $P_3$  en todas las placas y calcular el promedio. Medir las 9 lecturas de  $P_3$  en el conjunto de placas (3) para las otras concentraciones ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_4$  y  $P_5$ ) y calcular el promedio. Calcular la diferencia entre el promedio total y el promedio en las 3 placas de cada concentración, la cual debe ser sumada a las medidas de las otras concentraciones.

Ejemplo:

valor promedio de  $P_3$  en las 36 lecturas: 18,2 mm  
valor promedio de  $P_3$  en las placas con  $P_1$ : 18,0 mm  
valor de  $P_1$  en la primera lectura de las 9 placas: 17,3 mm  
valor corregido en el primer punto  $P_1$ :  $(18,2 - 18,0) + 17,3 = 17,5$  mm

valor de  $P_1$  en la segunda lectura de las 9 placas: 16,9 mm  
valor corregido en el segundo punto  $P_1$ :  $(18,2 - 18,0) + 16,9 = 17,1$  mm

Construir la tabla con las respuestas corregidas para las respectivas concentraciones ( $P_1$  a  $P_5$ ) de acuerdo con a **Tabla 19** y efectuar el análisis de varianza. Confirmada la validez de los resultados, calcular la diferencia en las respuestas comparadas entre muestra y estándar en el punto central de la curva por la ecuación

$$X = (y_A - y_p)/b_1 \quad (16)$$

en que  $y_A$  es una de las respuestas de la muestra entre las  $f$  repeticiones,  $y_p$  es la respuesta pareada del estándar y  $b_1$  es el coeficiente de regresión dado por la **Tabla 20**.

El logaritmo de la razón de potencia es

$$M'_A = \sum X/f \quad (17)$$

donde  $f$  es el número de diferencias en las respuestas comparadas entre la muestra y el respectivo estándar.

Cuando un número de ensayos de la misma muestra es obtenido a través de la misma curva, calcule el coeficiente de variación (CV) para los resultados de las muestras.

$$CV = \frac{\text{desvío padrón (s)}}{\text{promedio } y \text{ de cada muestra}} \times 100 \quad (18)$$

$$\text{Donde } S = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \sum (y^2)/n}{N-1}} \quad \text{e } y \text{ es respuesta de } 1 \text{ a } N \text{ para una misma muestra} \quad (18^a)$$

La varianza es calculada sobre los  $f$  valores de  $X$  para el total de muestras ensayadas como

$$S_M^2 = \frac{\sum X^2 - \sum (Tx^2/f)}{n''} \quad (19)$$

donde  $Tx = \sum X$  para una única muestra en  $n'' = \sum f - h'$  y  $h'$  es el número de muestras ensayadas.

El logaritmo del intervalo de confianza de cada muestra es

$$L = \frac{2s_M t}{\sqrt{k}} \quad (20)$$

donde  $s$  es el desvío estándar para el total de diferencias  $X$ ,  $t$  se encuentra en la **Tabla 3** con los grados de libertad de  $s_{2M}$  y  $k$  es el número de diferencias comparadas por muestra ensayada.

Los límites de confianza (con 5% de probabilidad de excluir la verdadera potencia) pueden ser calculados con el antilogaritmo de la fórmula

$$\frac{M'_{As}}{M'_{Ai}} = M'_A \pm 1/2L \quad (21)$$

Obtener la razón de potencia ( $R_A$ ) y los límites de confianza ( $R_s$ ,  $R_i$ ) tomando los antilogaritmos de los valores obtenidos a partir de las fórmulas 12 y 15 (delineamiento rectas paralelas 3 x 3 o 2 x 2) y 17 y 21 (delineamiento 5 x 1), después de sumar  $\log S_A$  a ambos:

$$M_A = M'_A + \log S_A \quad (22)$$

$$R_A = \text{antilog } M_A \quad (23)$$

$$M_{As} = M'_{As} + \log S_A \quad (24)$$

$$M_{Ai} = M'_{Ai} + \log S_A \quad (25)$$

$$R_{As} = \text{antilog } M_{As} \quad R_{Ai} = \text{antilog } M_{Ai}$$

*Valores perdidos*

En ensayos balanceados se requiere el mismo número de observaciones para cada concentración. Si alguna respuesta estuviese perdida por causa no relacionada con los tratamientos aplicados, como la muerte de un animal o la ruptura de algún tubo de ensayo, el análisis estadístico se torna mucho más complejo. Se puede restablecer el equilibrio de dos modos:

1. reducir el número de observaciones en los grupos mayores hasta que el número de respuestas sea el mismo para cada tratamiento. Si el delineamiento fuese totalmente al azar, se puede abstraer el promedio de cada grupo mayor, tantas veces como fueren necesarias, o eliminar una o más respuestas de cada grupo mayor, seleccionándolas al azar. Para ensayo de bloques al azar, conservar solamente los bloques completos;

2. alternativamente, un grupo, casualmente, menor puede ser recompuesto al tamaño original, cuando el número de respuestas perdidas no fuese mayor que uno en cualquier tratamiento o 5% en el total del ensayo. En ese caso, calcular la sustitución del valor perdido. *Se pierde un grado de libertad en la varianza del error  $s^2$  para cada valor sustituido:*

- si el delineamiento es totalmente al azar, sustituir el valor perdido por la media de las respuestas restantes del grupo incompleto;
- si el delineamiento es de bloques al azar, sustituir el valor perdido aplicando la fórmula

$$y' = \frac{nB' + kT' - G}{(n-1)(k-1)} \quad (26)$$

en que  $B'$  es el total incompleto de las respuestas en el bloque que contiene el valor perdido,  $T'$  es el total incompleto de las respuestas en el tratamiento que contiene el valor perdido,  $G$  es la suma total de las respuestas obtenidas en el ensayo. Como se definió anteriormente,  $n$  es el número de bloques y  $k$  es el número de tratamientos o dosis;

si el ensayo está basado en delineamiento de cuadrado latino, el valor perdido ( $y'$ ) se obtiene por la ecuación

$$y' = \frac{k(B' + C' + T') - 2G}{(k-1)(k-2)} \quad (27)$$

en que  $B'$  y  $C'$  son las sumas de las respuestas en las filas y columnas, respectivamente, que contienen el valor perdido. En ese caso,  $k = n$ .

Se hubiere pérdida de más de un valor, sustituir, temporariamente, por la media del tratamiento respectivo, todos los lugares vacíos, excepto uno. Sustituir ese lugar con el valor  $y'$ , calculado por la ecuación 27. Sustituir uno por uno los valores que habían sido colocados, temporariamente, por el promedio hasta que se obtenga conjunto estable de valores para todas las respuestas perdidas.

Si el número de valores sustituidos es pequeño en relación al número total de observaciones en el ensayo (menor que 5%), la aproximación derivada de las sustituciones descritas y de la reducción de los grados de libertad, equivalente al número de valores sustituidos, es generalmente satisfactoria. Sin embargo, el análisis debe ser interpretado con cuidado, sobretodo si existe predominancia de valores perdidos en un tratamiento o bloque particular. El mismo es válido para el caso de valores perdidos en los planeamientos cruzados.

#### Ensayos parcialmente balanceados

Si la potencia presumida de las muestras (usada para calcular las dosis del ensayo) fuese muy diferente de la verdadera potencia, es posible que la dosis mayor proporcione respuesta máxima o que la dosis menor proporcione respuesta muy baja o nula. Esas respuestas estarán fuera de la zona lineal de la curva log dosis-respuesta y las pruebas de validez indicarán curvatura y/o desvío de paralelismo "significativo".

En ese caso, las respuestas a la dosis mayor o menor de la muestra pueden ser rechazadas, calculándose un valor de potencia relativa a partir de los datos remanentes. Esa potencia puede ser tomada como potencia supuesta para seleccionar dosis de muestra para otro ensayo, con el objetivo de obtener respuestas similares al estándar y, de ese modo, aumentar la precisión del resultado. La ecuación que se emplea para calcular la potencia es:

$$M'_A = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_P}{b} \pm \frac{I}{2} \quad (28)$$

Esa fórmula es similar a la fórmula 12, sin embargo, se subtrae la mitad del intervalo log dosis cuando se omiten las respuestas de la dosis menor y se adiciona el mismo intervalo cuando se descarta la dosis mayor.

Las respuestas promedio  $y_A$  y  $y_P$  son obtenidas de la misma fórmula que en los ensayos totalmente balanceados (fórmula 10), sin embargo se debe introducir modificación en el cálculo de la inclinación ( $b$ ) de acuerdo con el delineamiento del ensayo.

Para *ensayos múltiples*, que, obligatoriamente, tendrían *dos dosis* de cada preparación, los contrastes lineales ( $L_p$  ...  $L_z$ ) deben formarse excluyendo  $L_A$  (como las respuestas para  $a_1$  o  $a_2$  fueron eliminadas, no es posible formar un contraste  $L_A$ ). Calcular la inclinación a partir del promedio de los valores de  $L$  dividida por  $ln$

$$b = \frac{L_p + \dots + L_z}{ln(h+1)} \quad (29)$$

Para ensayos con una simple muestra:

$$b = \frac{L_p}{ln} \quad (30)$$

Para *ensayos múltiples con tres dosis* de cada preparación, obtener  $L_A$  y los demás contrastes de la **Tabla 9**. La ecuación para la inclinación es:

$$b = \frac{2(L_p + \dots + L_z) + L_A}{ln(4h-3)} \quad (31)$$

Si existe una *muestra única*, la ecuación se reduce a:

$$b = \frac{2L_p + L_A}{5ln} \quad (32)$$

## 8.6 MEDIAS MOVILES

En el caso particular del *ensayo biológico de la heparina*, el intervalo entre la dosis que posibilita la coagulación y aquella que la inhibe es tan pequeña que la curva dosis-respuesta no puede ser determinada explícitamente. Para interpolar el logaritmo de la dosis correspondiente a 50% de la coagulación, tanto para el estándar cuanto para la muestra, se utilizan las medias móviles.

#### Cálculo de la potencia

Transformar en logaritmo los volúmenes de la preparación estándar usados en 5 o 6 tubos que constituyen la serie, de modo que 2 o 3 tubos presenten grados de coagulación

iguales o menores que 0,5 y 2 o 3 tubos tengan grados iguales o mayores que 0,5.

Confeccionar tabla correlacionando los tubos numerados, consecutivamente, con el grado de coagulación observado.

Denominar  $x$  los logaritmos de los volúmenes utilizados e  $y$  los grados de coagulación correspondientes. Calcular los promedios realizados  $x_i$  e  $y_i$  de los tubos 1, 2 y 3; de los tubos 2, 3 y 4 y de los tubos 3, 4 y 5, y cuando la serie consista de 6 tubos, de los tubos 4, 5 y 6, respectivamente. Si para uno de esos pares de promedios el grado de coagulación medio  $y_i$  es exactamente 0,50, el correspondiente  $x_i$  es la mediana del logaritmo del volumen de la preparación estándar  $x_p$ . En el caso de que eso no ocurra, interpolar el  $x_p$  a partir de los valores realizados de  $y_i$ ,  $x_i$  e  $y_{i+1}$ ,  $x_{i+1}$  que ocurren, inmediatamente abajo y arriba del grado 0,50, como:

$$x_p = x_i + (y_i - 0,5) (x_{i+1} - x_i) / (y_i - y_{i+1}) \quad (33)$$

A partir de los datos obtenidos en los tubos de la muestra, calcular del mismo modo la mediana del logaritmo del volumen  $x_A$ . El logaritmo de la potencia de la muestra es:

$$M_A = x_p - x_A + \log S_A \quad (34)$$

en que  $S_A$  es a suposición de la potencia de la muestra hecha en la preparación de la solución correspondiente de los tubos de la muestra.

Repetir el ensayo, independientemente, y calcular el promedio de dos o más valores de  $M$  para obtener  $M$ . En el caso que la segunda determinación de  $M$  difiera de la primera más que 0,05, continuar realizando ensayos hasta que el logaritmo del intervalo de confianza, calculado conforme final de la sección *Combinación de estimación de potencia*, no exceda 0,20.

La potencia de la heparina sódica es:

$$R = \text{anti log } M$$

## 8.7 ENSAYOS INDIRECTOS "TODO O NADA"

En algunos ensayos no es posible ni conveniente medir el efecto en cada unidad experimental (por ejemplo, animal) en escala cuantitativa. En ese caso, pueden medirse efectos de todo o nada, como muerte u ocurrencia de síntoma preestablecido. La proporción de unidades experimentales que presentan el síntoma constituye el resultado. Esos ensayos son llamados *quantales*. En este capítulo será presentado un cálculo aproximado. En el caso de disponer de facilidades de computación, se puede recurrir al cálculo teórico exacto. Se debe registrar, para cada dosis, el porcentaje de animales con efecto positivo. Ejemplo: porcentaje de ratones en convulsión. Transformar los porcentuales en probit, utilizando la **Tabla 16**. Cada probit será considerado como el valor de la respuesta transformada ( $y$ ). El método a continuación es utilizado cuando no ocurren respuestas equivalentes a porcentuales cero o 100. En ese caso, emplear métodos estadísticos completos de máxima probabilidad

(logit o probit). Para cada valor de  $y$ , se debe obtener un valor de coeficiente de ponderación ( $w$ ) en la **Tabla 17**.

Las fórmulas de las sumas de cuadrados para los pruebas de validez son las mismas utilizadas en los ensayos indirectos cuantitativos (**Tabla 10**), tomando  $n = 1$ , con excepción del

término error ( $s^2$ ), que tiene grados de libertad iguales a infinito, y se calcula como:

$$s^2 = \frac{k}{n \sum w} \quad (35)$$

en que  $k$  = número de tratamientos,  $n$  = número de animales utilizados en cada tratamiento.

Calcular la potencia y los límites de confianza usando las fórmulas 12 y 25. Ese método aproximado es útil cuando el ensayo es delineado de modo que las respuestas en porcentaje correspondientes a las dosis menores y mayores estén uniformemente espaciadas alrededor de 50%. Si una de las dosis probadas suministra respuestas cero o 100%, esas pueden ser descartadas. En ese caso, obtener la estimativa de potencia por los métodos descritos en la sección *Ensayos parcialmente balanceados*.

## 8.8 COMBINACIÓN DE ESTIMACIÓN DE POTENCIA

Cuando se realizan  $n'$  ensayos independientes para cada muestra, los resultados pueden ser combinados a fin de obtener una potencia estimada con intervalo de confianza reducido, que cumpla los límites establecidos en cada monografía. Existen varios métodos para combinar ensayos repetidos.

Adoptar simplificaciones, teniéndose en cuenta dos aspectos:

- corregir estimación del log de la potencia ( $M'$ ) por la potencia supuesta ( $S_A$ ) antes de realizar las combinaciones ( $M = M' + \log s_A$ );
- las estimaciones deben ser independientes, o sea, obtenidas en ensayos separados.

### 8.8.1 POTENCIA MEDIA PONDERADA Y LÍMITES DE CONFIANZA

Suponer que fueron analizados resultados de  $n$  ensayos para dar  $n'$  valores de  $M$  con límites de confianza (en logaritmos) asociados a cada valor de  $M$ , obtenidos según las ecuaciones 13 a 15 y 22 a 25. Para cada ensayo, obtener el intervalo de confianza logarítmico ( $L$ ), substrayendo el límite inferior del superior. Calcular, también, una ponderación ( $W$ ) para cada valor de  $M$  a partir de la ecuación 36, donde  $t$  es el mismo valor empleado en el cálculo del intervalo de confianza

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \quad (36)$$



Para cada ensayo, calcular el producto WM y dividir su suma por la suma de todas las ponderaciones a fin de obtener el logaritmo de la potencia media ponderada (M), conforme la ecuación 37:

$$\bar{M} = \frac{\sum_n WM}{\sum_n W} \quad (37)$$

El error estándar de la potencia media (sM) es la raíz cuadrada de la recíproca de la ponderación total:

$$SM = \sqrt{1/\sum_n W} \quad (38)$$

Calcular los límites de confianza aproximados ( $\alpha = 0,05$ ), a partir del antilogaritmo de los valores obtenidos por medio de la fórmula 39:

$$\bar{M} \pm ts_{\bar{M}} \quad (39)$$

Se obtiene el valor de t en la **Tabla 3**, con grados de libertad equivalentes a la suma de los grados de libertad de la varianza del error de los ensayos individuales.

Ese método aproximado de combinación da resultados satisfactorios cuando:

- C es menor que 1,1 para cada uno de los n' ensayos;
- las estimación individuales de la potencia forman un conjunto homogéneo de acuerdo con la prueba de homogeneidad realizada, aplicando la estadística  $\chi^2$ . Esa calculada elevándose al cuadrado la diferencia entre cada valor de M en relación al promedio ponderado  $\bar{M}$ , multiplicándose ese cuadrado por la ponderación correspondiente (W) y sumándose los valores para todos

los ensayos:

$$\chi^2_M = \sum_n W (M - \bar{M})^2 \quad (40)$$

Si el valor de  $\chi^2_M$  calculado es menor que el correspondiente en la **Tabla 18** para ( $n' - 1$ ) grados de libertad, se considera que no hay elementos para sospechar de la heterogeneidad de potencias. En ese caso, la potencia media y los límites calculados son correctos.

Si el valor de  $\chi^2_M$  es mayor que el de la **Tabla 18**, se considera que las potencias son heterogéneas, o sea, que la dispersión de los valores individuales de M es mayor que la esperada, de acuerdo con los respectivos límites de confianza. En ese caso, no aplicar las fórmulas 37 y 39, averiguar el origen de esa heterogeneidad y, en el caso que se considere adecuado, calcular M usando semi-ponderaciones W':

$$W' = 1/(V + v) \quad (41)$$

en que

$$V = 1/W = \frac{L^2}{4t^2} \quad (42)$$

y v es la varianza de la heterogeneidad entre ensayos y se calcula por la ecuación:

$$V = \frac{\sum M^2 - (\sum M)^2 / n'}{n' - 1} - \frac{\sum V}{n'} \quad (43)$$

Cuando v varía de tal manera que v calculada es número negativo, se puede calcular v aproximada, omitiéndose el término después del signo negativo en la ecuación 43.

Para calcular el promedio semi-ponderado (M), sustituir en la ecuación 31 los valores de W y  $\sum W$  por los respectivos valores de W' y  $\sum W'$ :

$$\bar{M} = \frac{\sum_n WM'}{\sum_n W'} \quad (44)$$

Se puede considerar ese valor de M próximo al centro de un intervalo de confianza de tamaño aproximado  $L'_c$  que es la raíz cuadrada de:

$$L'^2_c = 4t^2 / \sum W' \quad (45)$$

en que t, de la **Tabla 3**, tiene grados de libertad iguales a la suma de grados de libertad de la varianza del error de los n' ensayos individuales.

En el *caso especial del ensayo de heparina*, todos los logaritmos de potencia (M) tienen la misma ponderación y el intervalo de confianza de logaritmo de la estimativa de la potencia M se determina como a continuación:

Cálculo de la varianza del error con  $n' - 1$  grados de libertad:

$$s^2 = \{\sum M^2 - (\sum M)^2/n'\}/n' - 1 \quad (46)$$

Determinar el límite de confianza en logaritmos (L)

$$L = \frac{2st}{\sqrt{n'}} \quad (47)$$

en que

$s = \sqrt{s^2}$ , t (**Tabla 3**) con  $n' - 1$  grados de libertad, n = número de estimación individuales de la potencia.

Calcular los límites de confianza:

$$M_s = \bar{M} + 1/2L \quad (48)$$

$$M_i = \bar{M} - 1/2L \quad (48)$$

$$R_s = \text{antilog} M_s \quad (49)$$

$$R_i = \text{antilog} M_i \quad (50)$$

## 8.9 TABLAS ESTADÍSTICAS

Tabla 1 - Tabla G para valores atípicos.

$n$	3	4	5	6	7						
$G_1$	0,976	0,846	0,729	0,644	0,586						
$n$	8	9	10	11	12	13					
$G_2$	0,780	0,725	0,678	0,638	0,605	0,578					
$n$	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$G_3$	0,602	0,579	0,559	0,542	0,527	0,514	0,502	0,491	0,481	0,472	0,464

Tabla 2 - Prueba para grupos conteniendo valores atípicos.

$k$	<i>Valor crítico de <math>R+</math> para intervalo de <math>n</math> observaciones cada uno, al nivel de significancia <math>\alpha = 0,05</math></i>									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	0,962	0,862	0,803	0,764	0,736	0,717	0,702	0,691	0,682	
3	0,813	0,667	0,601	0,563	0,539	0,521	0,507	0,498	0,489	
4	0,681	0,538	0,479	0,446	0,425	0,410	0,398	0,389	0,382	
5	0,581	0,451	0,398	0,369	0,351	0,338	0,328	0,320	0,314	
6	0,508	0,389	0,342	0,316	0,300	0,288	0,280	0,273	0,267	
7	0,451	0,342	0,300	0,278	0,263	0,253	0,245	0,239	0,234	
8	0,407	0,305	0,267	0,248	0,234	0,225	0,218	0,213	0,208	
9	0,369	0,276	0,241	0,224	0,211	0,203	0,197	0,192	0,188	
10	0,339	0,253	0,220	0,204	0,193	0,185	0,179	0,174	0,172	

Tabla 2a - Prueba para grupos conteniendo valores atípicos.

$k$	<i>Valor crítico de <math>(k + 2) R+</math> para intervalo de <math>n</math> observaciones cada uno, al nivel de significancia <math>\alpha = 0,05</math></i>									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
10	4,06	3,04	2,65	2,44	2,30	2,21	2,14	2,09	2,05	
12	4,06	3,03	2,63	2,42	2,29	2,20	2,13	2,07	2,04	
15	4,06	3,02	2,62	2,41	2,28	2,18	2,12	2,06	2,02	
20	4,13	3,03	2,62	2,41	2,28	2,18	2,11	2,05	2,01	
50	4,26	3,11	2,67	2,44	2,29	2,19	2,11	2,06	2,01	

Tabla 3 - Distribución t de Student.

$\alpha$ gl	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	,05	,02	,01	,001
1	0,158	0,325	0,510	0,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	0,142	0,289	0,445	0,617	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	0,137	0,277	0,424	0,584	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,541	12,924
4	0,134	0,271	0,414	0,569	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	0,132	0,267	0,408	0,559	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	0,131	0,265	0,404	0,553	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	0,130	0,263	0,402	0,549	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,365	3,499	5,408
8	0,130	0,262	0,399	0,546	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	0,129	0,261	0,398	0,543	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	0,129	0,260	0,397	0,542	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	0,129	0,260	0,396	0,540	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	0,128	0,259	0,395	0,539	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	0,128	0,259	0,394	0,538	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	0,128	0,258	0,393	0,537	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	0,128	0,258	0,393	0,536	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	0,128	0,258	0,392	0,535	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	0,128	0,257	0,392	0,534	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	0,127	0,257	0,392	0,534	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	0,127	0,257	0,391	0,533	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	0,127	0,257	0,391	0,533	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	0,127	0,257	0,391	0,532	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	0,127	0,256	0,390	0,532	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	0,127	0,256	0,390	0,532	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	0,127	0,256	0,390	0,531	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,726
26	0,127	0,256	0,390	0,531	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	0,127	0,256	0,389	0,531	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	2,690
28	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,855	1,056	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,674
29	0,127	0,256	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,659
30	0,127	0,255	0,389	0,530	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	0,126	0,254	0,388	0,529	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	0,126	0,254	0,387	0,527	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	0,126	0,253	0,386	0,526	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
$\infty$	0,126	0,256	0,385	0,524	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

gl = grados de libertad;  $\alpha$  = nivel de significancia

Tabla 4 - Distribución F de Fisher para  $\alpha = 0,05$ .

$gl_1$ Denominador	$gl_2$ Numerador									
	1	2	3	4	5	6	8	12	24	$\infty$
1	161,40	199,50	215,70	224,60	230,20	234,00	238,90	243,90	249,00	254,30
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,02	1,83	1,61	1,25
$\infty$	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,10	1,94	1,75	1,52	1,00

Tabla 5 - Distribución F de Fisher para  $\alpha = 0,01$ .

$gl_2$ Denominador	$gl_1$ Numerador									
	1	2	3	4	5	6	8	12	24	$\infty$
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5982	6106	6234	6366
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,37	99,42	99,46	99,50
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,49	27,05	26,60	26,12
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,80	14,37	13,93	13,46
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,29	9,89	9,47	9,02
6	13,74	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,10	7,72	7,31	6,88
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,84	6,47	6,07	5,65
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,03	5,67	5,28	4,86
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,47	5,11	4,73	4,31
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,06	4,71	4,33	3,91
11	9,65	7,20	6,22	5,67	5,32	5,07	4,74	4,40	4,02	3,60
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,50	4,16	3,78	3,36
13	9,07	6,70	5,74	5,20	4,86	4,62	4,30	3,96	3,59	3,16
14	8,86	6,51	5,56	5,03	4,69	4,46	4,14	3,80	3,43	3,00
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,00	3,67	3,29	2,87
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	3,89	3,55	3,18	2,75
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,79	3,45	3,08	2,65
18	8,28	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,71	3,37	3,00	2,58
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,63	3,30	2,92	2,49
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,56	3,23	2,86	2,42
21	8,02	5,78	4,87	4,37	4,04	3,81	3,51	3,17	2,80	2,36
22	7,94	5,72	4,82	4,31	3,99	3,76	3,45	3,12	2,75	2,31
23	7,88	5,66	4,76	4,26	3,94	3,71	3,41	3,07	2,70	2,26
24	7,82	5,61	4,72	4,22	3,90	3,67	3,36	3,03	2,66	2,21
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,86	3,63	3,32	2,99	2,62	2,17
26	7,72	5,53	4,64	4,14	3,82	3,59	3,29	2,96	2,58	2,13
27	7,68	5,49	4,60	4,11	3,78	3,56	3,26	2,93	2,56	2,10
28	7,64	5,45	4,57	4,07	3,75	3,53	3,23	2,90	2,52	2,06
29	7,60	5,42	4,54	4,04	3,73	3,50	3,20	2,87	2,49	2,03
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,17	2,84	2,47	2,01
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	2,99	2,66	2,29	1,80
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,82	2,50	2,12	1,60
120	6,85	4,79	3,95	3,48	3,17	2,96	2,66	2,34	1,95	1,38
$\infty$	6,64	4,60	3,78	3,32	3,02	2,80	2,51	2,18	1,79	1,00



Tabla 6 - Orden de dosis en los ensayos cruzados.

Grupo	Doble Cruzado		Triple Cruzado	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
1	$\rho_1$	$a_2$	$\rho_1$	$a_3$
2	$\rho_2$	$a_1$	$\rho_2$	$a_2$
3	$a_1$	$\rho_2$	$\rho_3$	$a_1$
4	$a_2$	$\rho_1$	$a_1$	$\rho_3$
5	-	-	$a_2$	$\rho_2$
6	-	-	$a_3$	$\rho_1$

Tabla 7 - Ejemplo de orden de dosis en el cuadrado latino.

$a_2$	$\rho_1$	$a_1$	$\rho_2$
$\rho_2$	$a_1$	$\rho_1$	$a_2$
$a_1$	$a_2$	$\rho_2$	$\rho_1$
$\rho_1$	$\rho_2$	$a_2$	$a_1$

Tabla 8 - Fórmulas para ensayos con dos dosis de cada preparación.

	Estándar (P)	1ª Muestra (A)	Muestra h-1 (Z)
Dosis menor (suma de respuestas)	$P_1$	$A_1$	$Z_1$
Dosis mayor (suma de respuestas)	$P_2$	$A_2$	$Z_2$
Por preparación (suma de respuestas)	$P_1 + P_2 = P$	$A_1 + A_2 = A$	$Z_1 + Z_2 = Z$
Contraste lineal	$P_2 - P_1 = L_p$	$A_2 - A_1 = L_A$	$Z_2 - Z_1 = L_Z$

Tabla 9 - Fórmulas para ensayo con tres dosis de cada preparación.

	Estándar (P)	1ª Muestra (A)	Muestra h-1 (Z)
Dosis menor (suma de respuestas)	$P_1$	$A_1$	$Z_1$
Dosis media (suma de respuestas)	$P_2$	$A_2$	$Z_2$
Dosis mayor (suma de respuestas)	$P_3$	$A_3$	$Z_3$
Por preparación (suma de respuestas)	$P_1 + P_2 + P_3 = P$	$A_1 + A_2 + A_3 = A$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 = Z$
Contraste lineal	$P_3 - P_1 = L_p$	$A_3 - A_1 = L_A$	$Z_3 - Z_1 = L_Z$
Contraste cuadrático	$P_1 - 2P_2 + P_3 = Q_p$	$A_1 - 2A_2 + A_3 = Q_A$	$Z_1 - 2Z_2 + Z_3 = Q_Z$

Tabla 10 - Pruebas de validez (análisis de varianza).

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados reducida	
		Ensayo de dos dosis	Ensayo de tres dosis
Preparaciones	$h - 1$	$\frac{P^2 + A^2 + \dots + Z^2}{2n} - K$	$\frac{P^2 + A^2 + \dots + Z^2}{3n} - K$
Regresión	$1$	$\frac{(L_p + L_A + \dots + L_Z)^2}{2nh} - E$	$\frac{(L_p + L_A + \dots + L_Z)^2}{2nh} - E$
Paralelismo	$h - 1$	$\frac{(L_p^2 + L_A^2 + \dots + L_Z^2)}{2n} - E$	$\frac{(L_p^2 + L_A^2 + \dots + L_Z^2)}{2n} - E$
Cuadrático	$1$	-	$\frac{(Q_p + Q_A + \dots + Q_Z)^2}{6nh} = Q$
Diferencia de Cuadráticos	$h - 1$	-	$\frac{(Q_p^2 + Q_A^2 + \dots + Q_Z^2)}{6n} - Q$

Tabla 11 - Estimativa del error residual.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados reducida		
		Delineamiento al azar	Bloques al azar	Cuadrado latino
Tratamientos	$k - 1$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$
Bloques (filas)	$n - 1$	--	$\frac{F_1^2 + F_2^2 + \dots + F_N^2}{k} - K$	$\frac{F_1^2 + F_2^2 + \dots + F_N^2}{k} - K$
Bloques (columnas)	$n - 1$	--	--	$\frac{C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_N^2}{k} - K$
Error residual	Por diferencia *	*	*	*
TOTAL	$N - 1$	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$	$\sum y^2 - K$

\* Obtenida sustrayendo, de la suma de cuadrados reducida total, todas las otras sumas de cuadrados reducidas calculadas para el delineamiento correspondiente.

**Tabla 12** - Tabla de  $t'$  para comparación bicaudal entre (h-1) muestras y un estándar para un coeficiente de confianza conjunto de  $p = 0,95$ .

$gl_2$	$gl_1 = (h - 1) = \text{número de muestras (excluyendo estándar)}$								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73
$\infty$	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69

**Tabla 13** - Totales y contrastes en ensayo con delineamiento doble cruzado.

	<i>Estándar (P)</i>	<i>Muestra (A)</i>	<i>Total</i>
FASE I			
Dosis menor (suma de respuestas)	$P_{11}$	$A_{11}$	-
Dosis mayor (suma de respuestas)	$P_{21}$	$A_{21}$	-
Total	$P_1$	$A_1$	$P_1 + A_1 = F_1$
FASE II			
Dosis menor (suma de respuestas)	$P_{111}$	$A_{111}$	-
Dosis mayor (suma de respuestas)	$P_{211}$	$A_{211}$	-
Total	$P_{11}$	$A_{11}$	$P_{11} + A_{11} = F_{11}$
Por preparación (suma de respuestas)	$P$	$A$	$\sum y$
Contraste lineal			
FASE I	$P_{21} - P_{11} = L_{P1}$	$A_{21} - A_{11} = L_{A1}$	$L_{P1} + L_{A1} = L_1$
FASE II	$P_{211} - P_{111} = L_{P11}$	$A_{211} - A_{111} = L_{A11}$	$L_{P11} + L_{A11} = L_{11}$
TOTAL	$P_2 + P_1 = L_P$	$A_2 + A_1 = L_A$	$L_P + L_A = \sum L$

Tabla 14 - Pruebas de validez en ensayo doble cruzado

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad (gl)</i>	<i>Suma de cuadrados reducida</i>	
Paralelismo	1	$\frac{L_p^2 + L_A^2}{2n} - E$	
Fases X Preparaciones	1	$\frac{P_I^2 + P_{II}^2 + A_I^2 + A_{II}^2}{n} - K$	(Fases X Preparaciones)
Fases X Regresión	1	$\frac{L_I^2 + L_{II}^2}{2n} - E$	
Error I	Diferencia	Bloques - Paralelismo - (Fases X Preparaciones) - (Fases X Regresión)	
Bloques (animales)	bl - 1	$\frac{B_1^2 + B_2^2 + \dots + B_{2n}^2}{2} - K$	
Preparaciones	1	$\frac{P^2 + A^2}{2n} - K$	
Regresión	1	$\frac{(L_p + L_A)^2}{N} - E$	
Fases	1	$\frac{F_I^2 + F_{II}^2}{2n} - K$	
Fases X Paralelismo	1	$\frac{L_{pI}^2 + L_{pII}^2 + L_{AI}^2 + L_{AII}^2}{n} - E$	Paralelismo - (Fases X Regresión)
Error II	Diferencia	Total - Bloques - Preparaciones - Regresión - Fases - (Fases X Paralelismo)	
TOTAL	N - 1	$\sum y^2 - K$	

$$K = (\sum y)^2 / N$$

N = número total de respuestas

n = número total de réplicas por dosis incluidas las dos fases

bl = número de bloques (animales)

B = suma de las dos repuestas para cada bloque (animal)

Tabla 15 - Constante usada en la fórmula para los límites de confianza.

Dosis de cada preparación (d)	Número de muestras ensayadas (h -1)	c'
2	1	1
	2	3/2
	3	2
	4	5/2
	5	3
3	1	8/3
	2	4
	3	16/3
	4	20/3
	5	8

Tabla 16 - Probit correspondientes a porcentaje.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
%	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
97	6,88	6,90	6,91	6,93	6,94	6,96	6,98	7,00	7,01	7,03
98	7,05	7,07	7,10	7,12	7,14	7,17	7,20	7,23	7,26	7,29
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

Tabla 17 - Coeficientes de ponderación para probit (w).

Probit	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
1	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002	0,003	0,005	0,006	0,008	0,011
2	0,015	0,019	0,025	0,031	0,040	0,050	0,062	0,076	0,092	0,110
3	0,131	0,154	0,180	0,208	0,238	0,269	0,302	0,336	0,370	0,405
4	0,439	0,471	0,503	0,532	0,558	0,581	0,601	0,616	0,627	0,634
5	0,637	0,634	0,627	0,616	0,601	0,581	0,558	0,532	0,503	0,471
6	0,439	0,405	0,370	0,336	0,302	0,269	0,238	0,208	0,180	0,154
7	0,131	0,110	0,092	0,076	0,062	0,050	0,040	0,031	0,025	0,019
8	0,015	0,011	0,008	0,006	0,005	0,003	0,002	0,002	0,001	0,001

Tabla 18 - Valores de  $\chi^2$  ( $\alpha = 0,05$ ).

gl	$\chi^2$	gl	$\chi^2$
1	3,84	9	16,92
2	5,99	10	18,31
3	7,81	11	19,67
4	9,49	12	21,03
5	11,07	13	22,36
6	12,59	14	23,69
7	14,07	15	25,00
8	15,51	20	31,41
		25	37,65



**Tabla 19 - Matriz de respuestas en el ensayo de antibióticos por el delineamiento 5 x 1, después de corrección.**

	<i>Estándar</i>					<i>Muestra</i>		
	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>3</sub></b>	<b>P<sub>4</sub></b>	<b>P<sub>5</sub></b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
Respuestas	y <sub>11</sub>	y <sub>21</sub>	y <sub>31</sub>	y <sub>41</sub>	y <sub>51</sub>	A <sub>31</sub>	B <sub>31</sub>	...
	y <sub>12</sub>	y <sub>22</sub>	y <sub>32</sub>	y <sub>42</sub>	y <sub>52</sub>	A <sub>32</sub>	B <sub>32</sub>	...
	y <sub>13</sub>	y <sub>23</sub>	y <sub>33</sub>	y <sub>43</sub>	y <sub>53</sub>	A <sub>33</sub>	B <sub>33</sub>	...
	y <sub>14</sub>	y <sub>24</sub>	y <sub>34</sub>	y <sub>44</sub>	y <sub>54</sub>	A <sub>34</sub>	B <sub>34</sub>	...
	y <sub>15</sub>	y <sub>25</sub>	y <sub>35</sub>	y <sub>45</sub>	y <sub>55</sub>	A <sub>35</sub>	B <sub>35</sub>	...
	y <sub>16</sub>	y <sub>26</sub>	y <sub>36</sub>	y <sub>46</sub>	y <sub>56</sub>	A <sub>36</sub>	B <sub>36</sub>	...
	y <sub>17</sub>	y <sub>27</sub>	y <sub>37</sub>	y <sub>47</sub>	y <sub>57</sub>	A <sub>37</sub>	B <sub>37</sub>	...
	y <sub>18</sub>	y <sub>28</sub>	y <sub>38</sub>	y <sub>48</sub>	y <sub>58</sub>	A <sub>38</sub>	B <sub>38</sub>	...
	y <sub>19</sub>	y <sub>29</sub>	y <sub>39</sub>	y <sub>49</sub>	y <sub>59</sub>	A <sub>39</sub>	B <sub>39</sub>	...
Total	y <sub>1·</sub>	y <sub>2·</sub>	y <sub>3·</sub>	y <sub>4·</sub>	y <sub>5·</sub>	A <sub>3·</sub>	B <sub>3·</sub>	

ynz: n es la concentración (P1 a P5) y z es la respuesta (de 1 a 9)

Anz: n es la concentración mediana (P3) y z es la respuesta (de 1 a 9)

**Tabla 20 - Tabla de Análisis de varianza para el modelo de regresión lineal simples – delineamiento 5 x 1.**

$$y = b_0 + b_1x$$

$$b_1 = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2} \quad b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{(N-1) \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N-1}} \sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N-1}}}$$

<i>Fuente de variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado promedio</i>	<i>F calculado</i>
Regresión	1	$SQ_{reg} = b_1 \sum xy + b_0 \sum y - (\sum y)^2 / N$	$QM_{reg} = SQ_{reg}$	$QM_{reg} / QM_{res}$
Error residual	N - 2	$SQ_{res} = \sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y$	$QM_{res} = \frac{SQ_{res}}{N} - 2$	---
Desvío lineal	3	$SQ_{desv} = SS_{res} - SQ_{ep}$	$QM_{desv} = \frac{SQ_{desv}}{3}$	$QM_{desv} / QM_{ep}$
Error puro (ep)	N - 5	$SQ_{ep} = \sum y^2 - (\sum yi)^2 / k'$	$QM_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{N} - 5$	---
Total	N - 1	$SQ_{reg} + SQ_{res}$	---	

$$(\sum yi)^2 = (y_{11} + y_{12} + y_{13} + \dots + y_{19})^2 + \dots + (y_{51} + y_{52} + y_{53} + \dots + y_{59})^2$$

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}} = S_{xx} = \text{desvío estándar de la variable (x)}$$

$$\sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{N - 1}} = S_{yy} = \text{desvío estándar de la variable respuesta (e)}$$

## 8.10 EJEMPLOS DE CÁLCULOS ESTADÍSTICOS APLICADOS EN ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 8.10.1 EJEMPLO DE ENSAYO DIRECTO

Ejemplo 1: ensayo directo con una muestra.

Ensayo de digital por el método de la parada cardíaca en cobaya

La solución del estándar fue usada en la concentración de 0,0658 UI/ml. Una dilución equivalente de muestra fue preparada a partir de la potencia supuesta de  $S_A = 1,3$  UI/100 mg.

Las cobayas fueron perfundidas aleatoriamente con solución estándar o muestra, registrándose el volumen justamente necesario para producir la parada cardíaca en cada animal.

Las respuestas se encuentran en la **Tabla 19**.

*Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza*

De la ecuación 1:

$$M^2 = 1,3974 - 1,4089 = -0,0115$$

De la ecuación 6:

$$M = -0,0115 + \log 1,3 = 0,1024$$

De la ecuación 5:

$$R = \text{antilog } 0,1024 = 1,2660$$

De la ecuación 3:

$$s_x^2 = \frac{1}{22} \left[ (1,4404^2 + \dots + 1,3304^2 - \frac{19,5641^2}{14}) + (1,5317^2 + \dots + 1,4072^2 - \frac{14,0890^2}{10}) \right]$$

$$= 1/22 [27,3829 - 27,3396 + 19,8879 - 19,8500]$$

$$= 0,003691$$

De la ecuación 2:

$$s_M^2 = 0,003691 (1/14 + 1/10) = 0,000632$$

$$s_M = \sqrt{0,000632} = 0,0251$$

Para  $\alpha = 0,05$  con 22 gl,  $t = 2,07$  (**Tabla 3**)

De la ecuación 7:

$$R_s = \text{antilog}[0,1024 \pm (2,07 \times 0,0251)]$$

$$R_s = \text{antilog}[0,1024 + (2,07 \times 0,0251)] = 1,43$$

$$R_i = \text{antilog}[0,1024 - (2,07 \times 0,0251)] = 1,12$$

La estimativa media de la potencia de la muestra de digital es 1,27 UI/100 mg. Los límites de confianza ( $p = 0,05$ ) para la verdadera potencia son 1,12 UI/100 mg y 1,43 UI/100 mg.

**Tabla 21 - Ejemplo 1: Dosis eficaces para producir parada cardíaca**

Estándar P		Muestra A	
Dosis letal mL/kg	Log dosis letal $x_p$	Dosis letal mL/kg	Log dosis letal $x_A$
27,57	1,4404	34,02	1,5317
25,97	1,4145	21,90	1,3404
27,74	1,4431	28,33	1,4523
30,94	1,4905	24,87	1,3957
28,31	1,4519	27,56	1,4403
27,29	1,4360	24,73	1,3932
22,13	1,3450	21,67	1,3359
23,63	1,3735	21,30	1,3284
21,39	1,3302	29,10	1,4639
22,13	1,3450	25,54	1,4072
20,97	1,3216		
29,23	1,4658		
23,78	1,3762		
21,40	1,3304		
$\Sigma x$	19,5641		14,0890
$\bar{x}$	1,3974		1,4089
$\Sigma x^2$	27,3829		19,8879
$s^2$	0,003331		0,004211
N	14		10

## 8.10.2 EJEMPLOS DE ENSAYOS INDIRECTOS CUANTITATIVOS

### Ejemplo 2: ensayo con tres dosis, delineamiento completamente al azar.

*Ensayo de gonadotrofina coriónica humana por el método del aumento de peso de vesículas seminales*

Las dosis utilizadas del estándar fueron:  $p_1 = 1,0$  UI/ml,  $p_2 = 2,0$  UI/ml y  $p_3 = 4,0$  UI/ml. Dosis equivalentes de la muestra fueron preparadas a partir de la potencia supuesta  $S_A = 3000$  UI/mg.

Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con 0,20 ml de la solución respectiva, durante tres días consecutivos, en un total de 0,6 ml/ratón.

Los pesos de las vesículas seminales se encuentran en la **Tabla 22**.

**Tabla 22 - Ejemplo 2: pesos de vesículas seminales (mg).**

$p_1$	$p_2$	$p_3$	$a_1$	$a_2$	$a_3$
8,5	12,5	14,8	10,5	16,8	16,7
10,4	13,1	14,1	10,5	14,3	16,9
11,4	8,3	14,9	9,1	14,9	18,8
11,6	13,1	13,8	9,9	12,3	16,7
10,2	9,0	14,6	10,5	15,4	12,7
9,1	14,4	15,2	8,4	14,9	16,2
9,5	11,7	12,3	10,1	12,8	17,3
7,7	11,72*	15,5	10,1	10,0	12,8

\* Valor perdido sustituido por el promedio del tratamiento.

**Tabla 23 - Ejemplo 2: totales y contrastes.**

	<i>Estándar P</i>	<i>Muestra A</i>
Dosis menor	$P_1 = 78,40$	$A_1 = 79,10$
Dosis media	$P_2 = 93,82$	$A_2 = 111,10$
Dosis mayor	$P_3 = 115,20$	$A_3 = 128,10$
Preparación	$P = 287,42$	$A = 318,60$
Contraste lineal	$L_p = 36,80$	$L_A = 49,00$
Contraste cuadrático	$Q_p = 5,96$	$Q_A = 15,60$

Resultados obtenidos con las fórmulas de la Tabla 9.

**Tabla 24 - Ejemplo 2: análisis de varianza.**

<i>Fuente de variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado promedio</i>	<i>F</i>	<i>A</i>
Preparaciones	1	20,26	20,26		
Regresión	1	230,05	230,05	79,05	<0,01
Paralelismo	1	4,65	4,65	1,60	>0,05
Cuadrático	1	0,97	0,97	0,33	>0,05
Diferencia de cuadrados	1	4,84	4,84	1,66	>0,05
Tratamientos	5	260,77	52,15		
Error	41*	119,18	$s^2 = 2,91$		
TOTAL	47	379,95			

\*Retirado un grado de libertad por haber sido sustituido un valor perdido.

Las sumas de cuadrados fueron obtenidas empleándose las fórmulas de las Tablas 9, 10 y 11.

$$N = 48$$

$$n = 8$$

$$K = (\sum y)^2 / N = 7\,651,25$$

$$\sum y^2 = 8\,031,21$$

$$\text{Preparaciones} = \frac{287,42^2 + 318,6^2}{24} - 7651,25 = 20,26$$

$$\text{Regresión} = \frac{(36,8 + 49,0)^2}{32} = 230,05 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{(36,82 + 49,0^2)}{16} - 230,05 = 4,65$$

$$\text{Cuadrático} = \frac{[5,96 + (-15,6)]^2}{96} = 0,67 = Q$$

$$\text{Diferencia de cuadrados} = \frac{5,96^2 + (-15,6)^2}{48} - 0,97 = 4,84$$

$$\text{Tratamientos} = \frac{78,40^2 + 93,83^2 + \dots + 128,10^2}{8} - 7651,25 = 260,77$$

$$\text{Total} = 8031,21 - 7651,25 = 379,95$$

$$\text{Error} = 379,95 - 260,77 = 119,18$$

Validez del ensayo

El ensayo cumple con las condiciones de validez:

- a) regresión significativa, F calculada 79,05 es mayor que el valor crítico de la **Tabla 5** para  $\alpha = 0,01$ ,  $gI_1 = 1$  y  $gI_2 = 41$ ;
- b) desvío de paralelismo no significativo, F calculado 1,60 es menor que el valor crítico de la **Tabla 4** para  $\alpha = 0,05$ ,  $gI_1 = 1$  y  $gI_2 = 41$ ;
- c) desvío de linealidad no significativo,  $F = 0,33$  y 1,66.

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza  
Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 2,0 = 0,3010$$

$$t = 2,02 \text{ com } 41 \text{ gl da } \mathbf{Tabla 3}$$

$$b = \frac{36,8 + 49,0}{2 \times 0,301 \times 8 \times 2} = 8,9$$

$$y_A = \frac{318,60}{24} = 13,2$$

$$\bar{y}_P = \frac{287,42}{24} = 11,97$$

$$M = \frac{13,27 - 11,97}{8,90} = 0,1460$$

$$S_A = 3\,000 \quad \log S_A = 3,4771$$

$$M = 0,1460 + 3,4771 = 3,6231$$

$$R = \text{anti log } 3,6231 = 4\,198,56 \text{ UI/mg}$$

$$C = \frac{230,05}{230,05 - 2,91(2,02)^2} = 1,05$$

$$C' = 8/3, \text{ da } \mathbf{Tabla 15}$$

$$M_s' = 1,05 \times 1,146 \pm \sqrt{(1,05 - 1) [1,05(0,146)^2 + 8/3(0,3010)^2]}$$

$$M_i'$$

$$M_s' = 0,2679$$

$$M_i' = 0,0381$$

Logaritmo de los límites de confianza de la potencia

$$M_s = 0,2679 + 3,4771 = 3,7449$$

$$M_i = 0,0381 + 3,4771 = 3,5151$$

Límites de confianza de la potencia

$$R_s = \text{anti log } 3,7445 = 5552,64 \text{ UI/mg} = \text{anti log } 3,5151 = 3274,16 \text{ UI/mg}$$

**Ejemplo 3: ensayo con tres dosis, delineamiento bloques al azar.**

Ensayo de antibiótico usando placas de Petri

Las dosis utilizadas del estándar fueron:

$$p_1 = 0,25 \text{ UI/ml}, p_2 = 0,50 \text{ UI/ml} \text{ y } p_3 = 1,00 \text{ UI/ml.}$$

Dosis equivalentes de la muestra fueron preparadas con base en la potencia supuesta  $S_A = 1\,650 \text{ UI/mg}$ .

Los diámetros de los halos de inhibición se encuentran en la **Tabla 25**.

**Tabla 25 - Ejemplo 3: diámetro de halos de inhibición.**

Placas (Bloques)	Estándar P			Muestra A			Total Bloque
	$p_1$	$p_2$	$p_3$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	
1	17,0	20,4	24,0	17,4	20,7	24,4	123,9
2	14,9	19,7	22,7	14,9	19,3	22,2	113,7
3	15,0	18,6	22,0	15,0	18,0	22,3	110,9
4	14,6	18,3	22,4	14,8	19,0	22,2	111,3
5	14,7	18,0	22,3	14,4	17,8	22,6	109,8
6	14,4	19,1	23,3	14,5	19,3	23,0	113,6
7	14,9	19,0	22,5	15,0	19,4	22,4	113,2

Tabla 26 - Ejemplo 3: totales y contrastes.

	<i>Estándar P</i>	<i>Muestra A</i>
Dosis menor	$P_1 = 105,5$	$A_1 = 106,0$
Dosis media	$P_2 = 133,1$	$A_2 = 133,5$
Dosis mayor	$P_3 = 159,2$	$A_3 = 159,1$
Preparación	$P = 397,8$	$A = 398,6$
Contraste lineal	$L_p = 53,7$	$L_A = 53,1$
Contraste cuadrático	$Q_p = -1,5$	$Q_A = -1,9$

Resultados obtenidos con las fórmulas de la Tabla 9

Tabla 27 - Ejemplo 3: análisis de varianza.

<i>Fuente de variación</i>	<i>gl</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrado promedio</i>	<i>F</i>	<i>A</i>
Preparaciones	1	0,0150	0,0150	0,09	>0,05
Regresión	1	407,3657	407,3657	2396	<0,01
Paralelismo	1	0,0129	0,0129	0,080	>0,05
Cuadrático	1	0,1376	0,1376	0,81	>0,05
Diferencia de cuadrados	1	0,0019	0,0019	0,01	>0,05
Tratamientos	5	407,53	3020,25		
Placas	6	22,18	3,70	21,8	< 0,01
Error	30	4,99	$s^2 = 0,17$		

Las sumas de cuadrados fueron obtenidas empleándose las fórmulas de las Tablas 9, 10 y 11.

$$N = 42$$

$$n = 7$$

$$K = (\sum y)^2 / N = 15101,26$$

$$\sum y^2 = 15\,535,96$$

$$\text{Preparaciones} = \frac{397,8^2 + 398,6^2}{21} - 15101,2610 = 0,0$$

$$\text{Regresión} = \frac{(53,7 + 53,1)^2}{28} = 407,3657 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{53,7^2 + 53,1^2}{14} - 407,3657 = 0,0129$$

$$\text{Cuadrático} = \frac{[-1,5 + (-1,9)]^2}{84} = 0,1376 = Q$$

$$\text{Diferencia de cuadrados} = \frac{-1,5^2 + (-1,9)^2}{42} - 0,1376 = 0,0019$$

$$\text{Tratamientos} = \frac{105,5^2 + 133,1^2 + \dots + 159,1^2}{7} - 15101,261 = 407,53$$

$$\text{Bloques (placas)} = \frac{123,9^2 + 113,7^2 + \dots + 113,2^2}{7} - 15101,261 = 22,18$$

$$\text{Total} = 15\,535,96 - 15\,101,261 = 434,7$$

$$\text{Error} = 434,7 - 22,18 - 407,53 = 4,99$$

Validez del ensayo

El ensayo cumple con las condiciones de validez:

- regresión significativa, F calculada 2390 es mayor que el valor crítico de la **Tabla 5** para  $\alpha = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 30$ ;
- desvío de paralelismo no significativo, F calculado 0,08 es menor que el valor crítico de la **Tabla 4** para  $\alpha = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 30$ , y
- desvío de linealidad no significativo, F calculados = 0,81 y 0,01.

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 1,00 - \log 0,50 = 0,301 \quad t =$$

$$t = 2,04 \text{ con } 30 \text{ gl de la Tabla 3.}$$

$$b = \frac{53,7 + 53,1}{28 \times 0,301} = 12,67$$

$$\bar{y}_A = \frac{398,6}{21} = 13,98$$

$$\bar{y}_P = \frac{397,8}{21} = 18,94$$

$$M^2 = \frac{18,92 - 18,94}{12,672} = 0,00315$$



$$S_A = 1650 \text{ UI/mg}$$

$$M = M' + \log 1650 = 0,003157 + 3,217480 = 3,2206$$

$$R = \text{anti log } 3,2206 = 1662$$

$$C = 407,3657/[407,3657 - 0,17 (2,04)^2] = 1,0017$$

$$c' = 8/3, \text{ de la Tabla 15}$$

$$M'_s = 0,0235$$

$$M'_i = -0,0171$$

Logaritmo de los límites de confianza de la potencia

$$M_s = 0,0235 + 3,2175 = 3,2410$$

$$M_i = -0,0171 + 3,2175 = 3,2004$$

Límites de confianza de la potencia

$$R_s = \text{anti log } 3,2410 = 1742 \text{ UI/mg}$$

$$R = \text{anti log } 3,2004 = 1586 \text{ UI/mg}$$

#### Ejemplo 4: ensayo con dos dosis, delineamiento cuadrado latino.

Ensayo de oxitocina – método de la contracción del útero aislado de rata

Las dosis administradas del estándar fueron:  $p_1 = 0,2 \text{ ml}$  y  $p_2 = 0,25 \text{ ml}$  de solución conteniendo  $0,02 \text{ UI/ml}$ .

Dosis equivalentes de la muestra fueron preparadas con base en la potencia supuesta de  $10 \text{ UI/ml}$  diluida 1:500.

Tabla 28 - Ejemplo 4: orden de adición de las dosis.

Filas	Columnas			
	1	2	3	4
1	$p_1$	$p_2$	$a_1$	$a_2$
2	$p_2$	$p_1$	$a_2$	$a_1$
3	$a_1$	$a_2$	$p_1$	$p_2$
4	$a_2$	$a_1$	$p_2$	$p_1$

Tabla 29 - Ejemplo 4: registros de contracciones en mm.

Filas	Columnas				Total Filas
	1	2	3	4	
1	38	43	35	40	$F_1 = 156$
2	38	30	44	38	$F_2 = 150$
3	39	45	37	40	$F_3 = 161$
4	45	38	45	37	$F_4 = 165$
Total Columna	$C_1 = 160$	$C_2 = 156$	$C_3 = 161$	$C_4 = 155$	
Total de las dosis	$P_1 = 142$	$P_2 = 166$	$A_1 = 150$	$A_2 = 174$	

Tabla 30 - Ejemplo 4: totales y contrastes.

	Estándar	Muestra
Dosis menor	$P_1 = 142$	$A_1 = 150$
Dosis mayor	$P_2 = 166$	$A_2 = 174$
Preparación	$P = 308$	$A = 324$
Contraste lineal	$L_p = 24$	$L_A = 24$

Tabla 31 - Ejemplo 4: análisis de varianza

Fuente de variación	gl	Soma dos cuadrados	Cuadrado promedio	F	A
Preparación	1	16,0	16,0	1,65	> 0,05
Regresión	1	144,0	144,0	14,89	< 0,01
Paralelismo	1	0,0	0,0	0,00	> 0,05
Tratamiento	3	160,0			
Filas	3	31,5	10,5	1,08	> 0,05
Columnas	3	6,5	2,2	0,23	> 0,05
Error	6	58,0	$s^2 = 9,67$		
Total	15	256,0			

Las sumas de cuadrados fueron obtenidas empleándose las fórmulas de las Tablas 8, 10 y 11.

$$N = 16$$

$$n = 4$$

$$K = (\sum y)^2 / N = 632^2 / 16 = 24\,964$$

$$\text{Preparaciones} = \frac{308^2 + 324^2}{8} - 24964,0 = 16,0$$

$$\text{Regresión} = \frac{(24 + 24)^2}{2 \times 4 \times 2} = 144,0 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{24^2 + 24^2}{2 \times 4} - 144,0 = 0$$

$$\text{Tratamientos} = \frac{142^2 + 166^2 + 150^2 + 174^2}{4} = 24964 = 160,0$$

$$\text{Filas} = \frac{156^2 + 150^2 + 161^2 + 165^2}{4} = 24964 = 31,5$$

$$\text{Columnas} = \frac{160^2 + 156^2 + 161^2 + 155^2}{4} = 24964 = 6,5$$

$$\text{Total} = 25220 - 24964 = 256,0$$

$$\text{Erro} = 256,0 - 160,0 - 31,5 - 6,5 = 58,0$$

El análisis no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre filas y entre columnas.

#### Validez del ensayo

El ensayo cumple con las condiciones de validez:

- regresión significativa, F calculada 14,9 es mayor que el valor crítico de la **Tabla 5** para  $\alpha = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 6$ ;
- desvío de paralelismo no significativo, F calculado 0,0 es menor que el valor crítico de la **Tabla 4** para  $\alpha = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 6$ .

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza

Utilizar fórmulas 10 a 15

$$I = \log 0,25 - \log 0,20 = 0,0969$$

$$t = 2,45 \text{ com } 6 \text{ gl da } \mathbf{Tabla 3}$$

$$b = \frac{24 + 24}{0,0969 \times 4 \times 2} = 61,9$$

$$\bar{y}_A = \frac{324}{8} = 40,5$$

$$\bar{y}_P = \frac{308}{8} = 38,5$$

$$M^* = \frac{40,5 - 38,5}{61,91} = 0,0323$$

$$S_A = 10 \quad \log S_A = 1$$

$$M = 0,0323 + 1 = 1,0323$$

$$R = \text{anti log } 1,0323 = 10,8 \text{ UI/mL} = \text{Potência estimada}$$

$$C = \frac{144,0}{144,0 - 9,67 \times 2,45^2} = 1,67$$

$c^* = 1$ , da **Tabla 15**

$$M_s^* = 1,67 \times 0,0323 \pm \sqrt{(1,67 - 1,0) [1,67(0,0323)^2 + 1(0,09691)^2]}$$

$$M_s^* = 0,1402$$

$$M_i^* = -0,0324$$

Logaritmo de los límites de confianza de la potencia

$$M_s = 0,1402 + 1 = 1,1402$$

$$M_i = 0,0324 + 1 = 0,9676$$

Límites de confianza de la potencia

$$R_s = \text{anti log } 1,1402 = 13,81 \text{ UI/ml}$$

$$R_i = \text{anti log } 0,9676 = 9,28 \text{ UL/ml}$$

#### Ejemplo 5: Ensayo doble cruzado

Ensayo de insulina en ratones

Las dosis utilizadas del estándar fueron  $p_1 = 60 \text{ m UL/ml}$  y  $p_2 = 120 \text{ m UL/ml}$ . Fueron preparadas dosis equivalentes de las muestras de  $a_1 = 60 \text{ m UL/ml}$  y  $a_2 = 120 \text{ m UL/ml}$ .

Los ratones fueron inyectados con 0,1 ml de la solución respectiva para cada 10 g de peso medio, de acuerdo con a **Tabla 6**.

Las respuestas se encuentran en la **Tabla 30**.

**Tabla 32 - Ejemplo 5: concentración de glucosa sanguínea (mg/100 ml), cuarenta minutos después de inyección.**

Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
$p_1$	$a_2$	total	$p_2$	$a_1$	total	$a_1$	$p_2$	total	$a_2$	$p_1$	Total
37,1	16,6	53,7	32,4	32,4	80,8	36,8	17,0	53,8	30,9	52,1	83,0
35,2	40,1	75,3	35,2	35,2	103,0	53,2	24,9	78,1	27,8	59,4	87,2
43,1	33,9	77,0	35,3	35,3	108,4	71,2	58,2	129,4	35,4	39,1	74,5
41,3	16,2	57,5	32,9	32,9	78,1	37,1	24,8	61,9	49,8	79,0	128,8
54,2	33,2	87,4	31,9	31,9	65,0	45,9	22,7	68,6	28,2	37,3	65,5
41,4	13,1	54,4	51,2	51,2	113,6	82,2	42,7	124,9	49,9	51,1	101,0
48,6	32,7	81,3	38,2	38,2	114,4	64,8	33,9	98,7	28,3	59,5	87,8
57,8	50,4	108,2	39,7	39,7	89,8	49,1	37,6	86,7	39,6	55,8	95,4
71,1	47,3	118,4	37,0	37,0	110,8	44,1	10,4	54,5	32,2	40,6	72,8
60,8	26,1	86,9	38,9	38,9	103,5	64,7	34,7	99,4	55,1	68,2	123,3
78,2	50,9	129,1	42,6	42,6	97,2	88,0	61,6	149,6	40,6	61,4	102,0
76,1	54,4	130,5	30,4	30,4	80,0	90,1	60,3	150,4	43,5	52,8	96,3

**Tabla 33 - Ejemplo 5: totales y contrastes.**

	Estándar P	Muestra A	Total
FASE I			
Dosis menor	$P_{11} = 644,9$	$A_{11} = 727,2$	
Dosis mayor	$P_{21} = 445,7$	$A_{21} = 461,3$	
TOTAL	$P_1 = 1090,6$	$A_1 = 1188,5$	$F_1 = 2279,1$
FASE II			
Dosis menor	$P_{111} = 656,3$	$A_{111} = 704,9$	
Dosis mayor	$P_{211} = 428,8$	$A_{211} = 414,9$	
TOTAL	$P_{11} = 1085,1$	$A_{11} = 1119,8$	$F_{11} = 2204,9$
Preparación Contraste Lineal	$P = 2175,7$	$A = 2308,3$	$\sum y = 4484,0$
FASE I	$L_{p1} = -199,2$	$L_{A1} = -256,9$	$L_1 = -465,1$
FASE II	$L_{p11} = -227,5$	$L_{A11} = -290,0$	$L_{11} = -517,5$
TOTAL	$L_p = -426,7$	$L_A = -555,9$	$\sum L = -982,6$

Resultados obtenidos con las fórmulas de la Tabla 13

**Tabla 34 - Ejemplo 5: análisis de varianza.**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F	A
Paralelismo	1	173,88	173,88	0,53	> 0,05
Fases × Preparaciones	1	41,61	41,61	0,13	> 0,05
Fases × Regressões	1	28,60	28,60	0,09	> 0,05
Error I	44	14 545,64	330,58		
Blocos	47	14 789,73	314,67		
Preparaciones	1	183,15	183,15	3,01	> 0,05
Regresión	1	10 057,32	10 057,32	165,52	< 0,01
Fases	1	57,35	57,35	0,94	> 0,05
Fases × Paralelismo	1	0,19	0,19	0,00	> 0,05
Error II	44	2 673,39	60,76		
TOTAL	95	27 761,13			

Las sumas de cuadrados fueron obtenidas empleando las fórmulas de las Tablas 13 y 14.

$$N = 96$$

$$n = 24$$

$$b_1 = 48$$

$$K = (\sum y)^2/N = 4\,484,0^2/96 = 209\,440,17$$

$$\sum y^2 = 237\,201,30$$

$$\text{Total} = 237\,201,30 - 209\,440,17 = 27\,761$$

$$\text{Bloques} = \frac{448459,8}{2} - 209440,17 = 14789,73$$

$$\text{Preparaciones} = \frac{2175,7^2 + 2308,3^2}{48} - 209440,17 = 183,15$$

$$\text{Fase} = \frac{2279,1^2 + 2204,9^2}{48} - 209440,17 = 57,35$$

$$\text{Regresión} = \frac{[(-426,7) + (-555,9)]^2}{96} = 10057,32 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{(-426,7)^2 + (-555,9)^2}{48} = 10057,32 = 17$$

$$\text{Fase x Regresión} = \frac{(-465,1)^2 + (-517,5)^2}{48} = 10057,32 = 28$$

Fase x paralelismo =

$$\frac{(-199,2)^2 + (-227,5)^2 + (-265,9)^2 + (-290,0)^2}{24} = 10057,32 = 28$$

Fase por preparaciones =

$$\frac{(-1090,6)^2 + (-1085,1)^2 + (1188,5)^2 + (1119,8)^2}{24} = 10057,32 = 28$$

$$\text{Error I} = 14\,789,73 - 173,88 - 41,61 - 28,60 = 14\,545,64$$

$$\text{Error II} = 27\,761,13 - 14\,789,73 - 183,15 - 10\,057,32 - 53,35 - 0,19 = 2\,673,39$$

Validez del ensayo

El ensayo cumple las condiciones de validez:

- regresión significativa, F calculada 165,52 es mayor que el valor crítico de la **Tabla 5**, para  $\alpha = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 44$ ;
- paralelismo no significativo, F calculado 0,53 es menor que el valor crítico de la **Tabla 4**, para  $\alpha = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 44$ ; y
- ninguna de las tres interacciones fue significativa – los tres valores de F calculados: 0,13, 0,09 y 0,00 fueron menores que el valor crítico de la **Tabla 4** para  $\alpha = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  y  $gl_2 = 44$ .

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 120 - \log 60 = 2,0792 - 1,77820,301$$

$$t = 2,01 \text{ con } 44 \text{ gl de la } \mathbf{Tabla 3}$$

$$b = \frac{(-426,7) + (-555,9)}{24 \times 2 \times 0,301} = 68,01$$

$$\bar{y}_A = \frac{2175,7}{2 \times 24} = 48,09$$

$$\bar{y}_P = \frac{2175,7}{2 \times 24} = 45,33$$

$$M^* = \frac{48,09 - 45,33}{-68,01} = 0,0406$$

$$S_A = 27,4 \quad \log S_A = 1,4377$$

$$M = -0,0406 + 1,4377 = 1,3971$$

Potencia estimada:  $R = \text{antilog } 1,3971 = 24,95 \text{ UI/mL}$

$$C = \frac{10057,32}{[10057,32 - 60,76(2,01)^2]} = 1,025$$

$c^* = 1$  da **Tabla 15**

$$M_s^* = 1,025(-0,0406) \pm \sqrt{(1,025 - 1) [1,025(-0,0406)^2 + 1(0,301)^2]}$$

$$M_i^* = -0,0064$$

$$M_s^* = 0,0064$$

$$M_i^* = -0,0064$$

Logaritmo de los límites de confianza

$$M_s = 0,0064 + 1,4377 = 1,4441$$

$$M_i = -0,0896 + 1,4377 = 1,3481$$

Límites de confianza de la potencia

$$R_s = \text{anti } \log 1,4441 = 27,80 \text{ UI/ml}$$

$$R = \text{anti } \log 1,3481 = 22,29 \text{ UI/ml}$$

Ejemplo 6: medias móviles

Ensayo de heparina por el método de inhibición de la coagulación de plasma ovino citratado

Las dosis utilizadas del estándar, en ml, fueron:  $p_1 = 0,78$ ;  $p_2 = 0,76$ ;  $p_3 = 0,74$ ;  $p_4 = 0,72$ ;  $p_5 = 0,70$  y  $p_6 = 0,68$ . Dosis equivalentes (a) de la muestra fueron preparadas a partir de la potencia supuesta  $S_A = 140,6 \text{ UI/mg}$ .

El ensayo fue desarrollado conforme está descrito en el método de evaluación de heparina en ese volumen.

Fueron realizados tres ensayos. A título de ejemplo del cálculo de  $M$ , solamente se desarrollará el ensayo No. 1.

Los grados de coagulación se encuentran en la **Tabla 35**.

**Tabla 35 - Ejemplo 6: grados de coagulación = y.**

Tubo	Estándar P		Muestra A	
	p (mL)	y	A (mL)	Y
1	0,78	0,00	0,78	0,00
2	0,76	0,00	0,76	0,25
3	0,74	0,50	0,74	0,75
4	0,72	0,75	0,72	1,00
5	0,70	1,00	0,70	1,00
6	0,69	1,00	0,68	1,00

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza

Utilizar fórmulas 27, 28 y 40 a 45.

$$x_{iP} = 0,8691$$

$$y_{iP} = 0,8572$$

$$x_{(i+1)} = 0,8691$$

$$y_{(i+1)} = 0,750$$

$$x_p = 0,8691 + (0,4171 - 0,5) \frac{0,8575 - 0,8691}{0,417 - 0,750} = 0,8661$$

$$x_{iA} = 0,8807$$

$$y_{iA} = 0,333$$

$$x_A = 0,8807 + (0,333 - 0,5) \frac{0,8691 - 0,8807}{0,333 - 0,667} = 0,8749$$

$$x_{(i+1)A} = 0,8691$$

$$y_{(i+1)A} = 0,667$$

$$S_A = 140,6 \text{ UI/mg}$$

$$M_1 = 0,8661 - 0,8749 + \log 140,6 = 2,1392$$

Suponiendo que otros dos ensayos realizados con la misma muestra dan las estimaciones:

$$M_2 = 2,1995 \text{ y } M_3 = 2,1805, \text{ calcular } \bar{M}$$

$$\bar{M} = (2,1392 + 2,1995 + 2,1805)/3 = 2,1731$$

$$R = \text{anti log } \bar{M} = 149,0 \text{ UI/mg}$$

$$= (2,1392 + 2,1995 + 2,1805)/3 = 2,1731 = \text{antilog}$$

$$M = 149,0 \text{ UI/mg}$$

Calcular la varianza del error:

$$s^2 = \{14,1686 - 42,4999/3\}/2$$

$$s^2 = 0,001$$

$$s = \sqrt{0,001} = 0,0316$$

$$n' = 3$$

$$t = 4,3 \text{ (Tabla 3 } gl=2)$$

Calcular el intervalo de confianza:

$$L = \frac{2 \times 0,0316 \times 4,3}{1,7321} = 0,1569$$

$$L/2 = 0,0784$$

$$M_s = 2,1731 + 0,0784 = 2,2515$$

$$M_i = 2,1731 - 0,0784 = 2,0947$$

$$R_s = 178,4$$

$$R_i = 124,4$$

Tabla 36 - Ejemplo 6: promedios asociados.

Tubo	Estándar P			Muestra A		
	Log dosis (mL × 10) $x_p$	Promedios log dosis $x_{iP}$	Promedios grado coagulación $y_{iP}$	log dose (mL × 10) $x_A$	Promedios log dosis $x_{iA}$	Promedios grado coagulación $y_{iA}$
1	0,8921	-	-	0,8921	-	-
2	0,8808	0,8807	0,167	0,8808	0,8807	0,333
3	0,8692	0,8491	0,417	0,8692	0,8691	0,667
4	0,8572	0,8572	0,750	0,8573	0,8572	0,917
5	0,8450	0,8450	0,917	0,8451	0,8450	1,000
6	-	-	-	0,8325	-	-

**Ejemplo 7: ensayo microbiológico con 5 dosis del estándar y una dosis de la muestra (5 x 1)**

Ensayo de antibiótico usando placas de Petri- Dosificación microbiológica de Bencilpenicilina Benzatina en polvo para inyectable.

Las dosis estándar utilizadas fueron: 0,15 UI/ml; 0,30 UI/ml; 0,60 UI/ml; 1,20 UI/ml; 2,40 UI/ml.

Dosis equivalentes de la muestra fueron preparadas con base en la potencia supuesta

$$S_A \text{ de } 600.000 \text{ UI/frasco}$$



Tabla 37 - Ejemplo 7: lecturas de los halos de inhibición.

	$P_1$	$P_3$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$P_3$	$P_5$	$P_3$
Diámetro de los halos de inhibición	13,87	19,88	16,24	19,54	23,47	19,21	27,41	19,32
	12,95	20,60	16,35	19,85	23,04	18,97	27,62	19,61
	13,08	20,43	16,88	19,86	23,19	19,39	26,67	19,72
	12,86	19,85	15,34	18,49	23,04	19,68	27,50	19,65
	13,24	20,07	15,98	19,06	22,65	19,14	27,41	19,27
	13,08	20,06	15,50	19,20	23,01	19,65	26,53	20,04
	12,88	19,75	16,26	19,96	23,99	19,81	27,30	19,25
	13,39	20,30	16,70	19,70	23,85	19,72	27,49	19,53
	13,31	20,30	16,70	19,95	23,82	19,55	27,27	19,90
Promedio	13,184	20,138	16,217	19,512	23,340	19,458	27,244	19,588

Promedio de  $P_3$  (36 lecturas): 19,674

Tabla 38 - Ejemplo 7: lecturas de los halos de inhibición después de corrección.

	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$P_5$
Diámetro de los halos de inhibición	$x_1 = -0,82391$	$x_2 = -0,52288$	$x_3 = -0,22185$	$x_4 = 0,079181$	$x_5 = 0,380211$
	13,406	16,402	19,674	23,686	27,496
	12,486	16,512	19,674	23,256	27,706
	12,616	17,042	19,674	23,406	26,756
	12,396	15,502	19,674	23,256	27,586
	12,776	16,142	19,674	22,866	27,496
	12,616	15,662	19,674	23,226	26,616
	12,416	16,422	19,674	24,206	27,386
	12,926	16,862	19,674	24,066	27,576
	12,846	16,862	19,674	24,036	27,356
	$(\Sigma y_i)^2$	13106,59	21729,12	31352,37	44945,7

x = concentración del antibiótico en logaritmo

**Totais**

$N = 45$   
 $\Sigma x = -9,983205$   
 $\Sigma y = 896,936$   
 $\Sigma y^2 = 19.076,73$   
 $\Sigma(\Sigma y_i^2)/9 = 19.070,78$   
 $\Sigma xy = -100,374$

$$\Sigma(x - \bar{x})(y - \bar{y}) = 98,61069$$

$$\Sigma(x - \bar{x})^2 = 8,155715 \quad \Sigma(y - \bar{y})^2 = 1.199,081$$

$$\sqrt{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2}{N - 1}} = 0,4305 \quad \sqrt{\frac{\Sigma(y - \bar{y})^2}{N - 1}} = 5,2203$$

$$b_0 = 22,61426$$

$$b_1 = 12,09086$$

**Tabla 39 - Ejemplo 7: análisis de varianza.**

$$b_1 = 12,09 \quad b_0 = 22,61 \quad r = 0,997$$

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F calc.
Regresión	1	1.192,3	1192,3	5691,5
Error residual	43	6,80	0,2	---
Desvio de linealidad	3	0,85	0,3	3
Error puro	40	5,95	0,1	---
Total	44	1.199,1	---	

**Tabla 40 - Ejemplo 7: lectura de las muestras.**

$A_1$	$P_3$	$A_2$	$P_3$	$A_3$	$P_3$
19,66	19,78	19,57	18,73	18,69	18,57
19,49	19,45	18,91	19,12	19,04	18,89
19,94	19,50	19,02	19,70	19,28	19,12
19,38	19,68	19,41	19,55	19,38	19,14
19,88	19,90	19,32	19,38	19,22	19,40
19,88	19,91	19,55	19,74	19,22	19,10
19,74	19,45	19,41	19,33	20,03	19,45
19,15	19,04	19,47	19,68	19,33	19,45
19,45	19,32	19,48	19,46	19,45	19,45
$\Sigma y_i^2 = 31.176,96$	$\Sigma y_i^2 = 30.986,56$	$\Sigma y_i^2 = 30.324,74$	$\Sigma y_i^2 = 30.516,6$	$\Sigma y_i^2 = 30.150,85$	$\Sigma y_i^2 = 29.780,40$

**Tabla 41 - Ejemplo 7: diferencias en las respuestas comparadas o  $X = (y_A - y_P) / b_1$  (fórmula 16).**

$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
- 0,0099256	0,0694789	0,0099256	- 0,0198511
0,0033085	- 0,0173697	0,0124069	- 0,0256410
0,0363937	- 0,0562448	0,0132341	0,0330852
- 0,0248139	- 0,0115798	0,0198511	- 0,0281224
- 0,0016543	- 0,0049628	- 0,0148883	0,0066170
- 0,0024814	- 0,0157155	0,0099256	0,0016543
0,0239868	0,0066170	0,0479735	- 0,0281224
0,0090984	- 0,0173697	- 0,0099256	0,0645161
0,0107527	0,0016543	0,0000000	- 0,0264682
$T_x = 0,044665$	$T_x = - 0,04549$	$T_x = 0,088503$	$T_x = - 0,02233$
$T_x^2/9 = 0,000222$	$T_x^2/9 = 0,00023$	$T_x^2/9 = 0,00087$	$T_x^2/9 = 0,0000554$

$$\Sigma X^2 = 0,024058 \quad \Sigma (T_x^2/9) = 0,001377$$

$$t = 2,042 \quad k' = 9 \quad f = 9 \quad n = 32$$

$$S_M^2 = \frac{0,024058 - 0,001377}{32} = 0,00071 \text{ (fórmula 19)}$$

$$s = 0,02662$$

$$\frac{1}{2} L = 0,01812 \text{ (fórmula 20)}$$

**Tabla 42 - Ejemplo 7: logaritmo de la razón de potencia y límites de confianza para las muestras A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>.**

	A <sub>1</sub>		A <sub>2</sub>		A <sub>3</sub>		A <sub>4</sub>	
Logaritmo de la razón de potencia (log)	0,004963		- 0,00505		0,009833		- 0,00248	
M' <sub>AS</sub> e M' <sub>AI</sub>	0,02308	- 0,01316	0,01307	0,01564	0,01564	0,02795	0,01564	- 0,02060

Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza para muestra A<sub>1</sub> :

Utilizando las fórmula 17 y 20 a 25

$$M'(A_1) = \sum X_i/9 = 0,004963$$

$$M = M' + \log 600.000 = 5,78311$$

$$R = \text{antilog } 5,78311 = 606.895,97 \text{ UI/frasco}$$

$$M'_{as}(A_1) + \frac{1}{2} L = 0,004963 + 0,01812 = 0,02308$$

$$M'_{Ai}(AI) - \frac{1}{2} L = 0,004963 - 0,01812 = -0,01316$$

Logaritmo de los límites de confianza de la potencia

$$M_{AS}(A_1) = 0,02308 + \log 600.000 = 5,80123$$

$$M_{Ai}(A_1) = -0,01316 + \log 600.000 = 5,76499$$

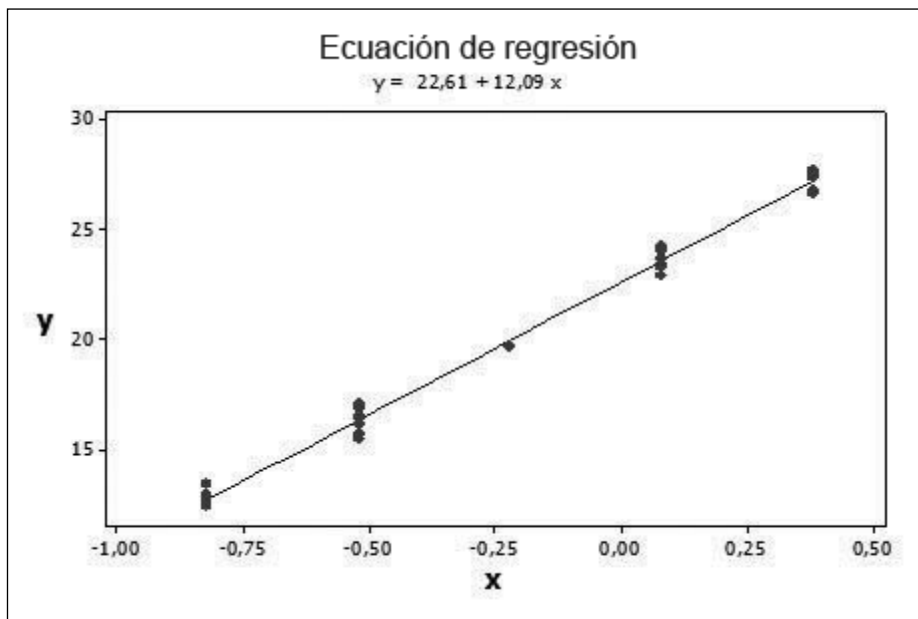
Límites de confianza de la potencia

$$R_s = \text{antilog } 5,80123 = 632.746,9 \text{ UI/frasco}$$

$$R_i = \text{antilog } 5,76499 = 582.091,5 \text{ UI/frasco}$$

**Tabla 43 - Ejemplo 7: coeficiente de Variación (fórmula 18).**

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>
Desvío estándar (s)	0,269	0,232	0,356	0,229
Promedio	19,62	19,35	19,24	19,26
Coeficiente de variación (CV)	1,37	1,20	1,85	1,19



**Figura 1 - Ejemplo 7: Gráfico de la curva de regresión**

### 8.10.3 EJEMPLO DE ENSAYO INDIRECTO “TODO O NADA”

#### Ejemplo 8: Ensayo dicotómico de dos dosis, método de probit simplificado

*Ensayo de insulina por el método de convulsión en ratones*

Las dosis estándar utilizadas fueron  $p_1 = 18$  mUI/ratón y  $p_2 = 30$  mUI/ratón.

Dosis equivalentes de la muestra ( $a_1 = 18$  mUI/ratón y  $a_2 = 30$  mUI/ratón) fueron preparadas con base en la potencia supuesta  $SA = 40$  UI/ml.

Los ratones fueron inyectados subcutáneamente con 0,25 ml/ratón de la respectiva solución. Previamente fueron divididos cuatro grupos al azar, que recibieron respectivamente,

**Tabla 44 - Ejemplo 8: Respuestas (% de ratones en convulsión).**

	Estándar P		Muestra A	
	$p_1$	$p_2$	$a_1$	$a_2$
Número de ratones inyectados (n)	30	28	28	24
Número de ratones en convulsión	9	17	11	18
Porcentaje de respuestas (%)	30,0	60,7	39,3	75,0

$$K = \frac{(P + A)^2}{k} = \frac{20,15^2}{4} = 101,5056$$

$$\text{Preparaciones} = \frac{9,75^2 + 10,4^2}{2} - 101,5056 = 0,1056$$

$$\text{Regresión} = \frac{(0,79 + 0,94)^2}{4} = 0,7482 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{0,79^2 + 0,94^2}{2} = 0,748 = 0,0056$$

*Validez del ensayo*

El ensayo cumple las condiciones de valores:

- regresión significativa, F calculada 12,15 es mayor que el valor crítico de la **Tabla 5**, para  $p = 0,01$ ,  $g_1 = 1$  y  $g_2 =$  infinito; y
- desvío de paralelismo no significativo, F calculado 0,09 es menor que el valor crítico de la **Tabla 4**, para  $p = 0,05$ ;  $g_1 = 1$  y  $g_2 =$  infinito.

**Tabla 45 - Ejemplo 8: Transformación en probitos, totales y contrastes.**

	Estándar P		Muestra A	
	$p_1$	$p_2$	$a_1$	$a_2$
Probito (Tabla 16)	$P_1 = 4,48$	$P_2 = 5,27$	$A_1 = 4,73$	$A_2 = 5,67$
Ponderación w (Tabla 17)	0,576	0,619	0,540	0,540
Preparación	$P = 9,75$		$A = 10,4$	$\sum y = 20,15$
Contraste lineal	$L_p = 0,79$		$L_A = 0,94$	$\sum L = 1,73$

Resultados obtenidos con las fórmulas de la Tabla 8.

**Tabla 46 - Ejemplo 8: Análisis de la varianza.**

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado promedio	F	p
Preparación	1	0,1056	0,1056	1,71	> 0,05
Regresión	1	0,7482	0,7482	12,15	< 0,01
Paralelismo	1	0,0056	0,0056	0,09	> 0,05
Error	Infinito		$s^2 = 0,0616$		

Las sumas de cuadrados fueron obtenidas empleándose las fórmulas de la Tabla 10, tomando  $n = 1$ .

*Cálculo de la estimativa de potencia y límites de confianza*

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 30 - \log 18 = 1,4771 - 1,2553 = 0,2219$$

$t = 1,96$  con  $gl = \text{infinito}$  y  $p = 0,05$  de (la **Tabla 3**)

$$b = \frac{0,79 + 0,94}{2(0,2219)} = 3,9318$$

$$\bar{y}_p = \frac{9,75}{2} = 4,87$$

$$\bar{y}_A = \frac{10,4}{2} = 4,87$$

$$M' = \frac{5,20 - 4,87}{3,9318} = 0,0839$$

$$S_A = 40,0$$

$$\log S_A = 1,6021$$

$$M = 0,0839 + 1,6021 = 1,6860$$

$$R_A = \text{antilog } 1,6860 = 48,53 \text{ UI/ml} = \text{Potencia estimada}$$

$$C = \frac{0,7482}{[0,7482 - 0,0616(1,96)^2]} = 1,4625$$

$c' = 1$  (da **Tabla 15**)

$$M'_s = 1,4625 \times 0,0839 \pm \sqrt{0,4625[1,425(0,0839)^2 + (0,2219)^2]}$$

$$M'_i$$

$$M'_s = 0,1227 \pm 0,1658$$

$$M'_i$$

$$M'_s = 0,2885$$

$$M'_i = 0,0431$$

*Logaritmo de los límites de confianza*

$$M_s = 0,2885 + 1,6021 = 1,8906$$

$$M_i = 0,0431 + 1,6021 = 1,5590$$

*Límites de confianza de la potencia*

$$R_s = 77,3 \text{ UI/ml}$$

$$R_i = 36,22 \text{ UI/ml}$$

Usando el método completo de análisis de probitos, se obtuvo una estimativa de potencia de 48,48 con límites de 35,9 y 75,92 UI/ml.

### 8.10.4 EJEMPLO DE COMBINACIÓN DE ESTIMACIÓN DE POTENCIA

#### Ejemplo 9: Combinación de estimación de potencia

Combinación de ensayos de corticotrofina por el método de depleción de ácido ascórbico supra-renal en ratas hipofisectomizadas.

Tres ensayos independientes de la misma muestra fueron realizados conforme procedimiento descrito en *Combinación de Estimación de Potencia (8.8)*. Los resultados de los ensayos se encuentran en la **Tabla 47**.

**Tabla 47 - Ejemplo 9: Datos para combinación de potencias.**

	<i>Ensayo 1</i>	<i>Ensayo 2</i>	<i>Ensayo 3</i>
<i>M</i>	1,24797	1,25164	1,42193
<i>L</i>	0,29097	0,90082	0,11555
$t^2$	4,1209	4,1209	4,2025
<i>gl</i>	34	33	27

*Cálculo de la potencia media ponderada*

$$\bar{M} = \frac{\sum MW}{\sum W} = \frac{2058,6174}{1474,0148} = 1,3966$$

$$R = \text{anti log } 1,3966 = 24,9$$

*Prueba de homogeneidad de los log de las estimación de potencia.*

$$x^2_M = \sum W(M - \bar{M})^2 = 5,5$$

$$x^2_M = 2p = 0,05 \text{ (Tabla 18)} = 5,9$$

Como  $\chi^2$  calculado es menor que el valor crítico, no se tiene elementos para sospechar de heterogeneidad.

*Cálculo de los límites de confianza*

$$S_{\bar{M}} = \sqrt{1/\sum W} = \sqrt{1/1474,0198} = 0,0260$$

$$M'_s = \bar{M} \pm 1,98 \times 0,0260$$

$$M'_i$$

$$M_s = 1,4226$$

$$M_i = 1,3700$$

$$R_s = 26,5$$

$$R_i = 23,5$$



## 9 RADIOFÁRMACOS

### GLOSARIO

#### **Actividad específica (o radioactividad específica):**

Radioactividad del radionúclido relacionada a la masa unitaria del elemento o compuesto. Es comúnmente referida a la actividad de 1 g de la sustancia especificada en la monografía:

en que:

S = radioactividad específica;

N = número de Avogadro;

W = peso atómico;

M = peso molecular.

Componentes no radioactivos para marcación: preparación o conjunto de reactivos que deben ser reconstituidos o combinados con un radionúclido para la síntesis del radiofármaco final, antes de la administración al paciente. Pueden venir en la forma de reactivos liofilizados u otras sustancias y son más comúnmente conocidos como "kits" para marcación.

**Concentración radioactiva:** la concentración radioactiva de la solución es la radioactividad del radionúclido contenida en el volumen unitario y generalmente referida como actividad por 1 ml. Como ocurre con todas las especificaciones envolviendo radionúclidos, es necesario declarar la fecha y, en el caso de radionúclidos con media vida corta, la hora en la cual la concentración radioactiva fue determinada.

**Acarreador:** isótopo estable del radionúclido en cuestión, adicionado a la preparación radioactiva en la forma química idéntica a aquella en la cual el radionúclido está presente.

**Decaimiento radiactivo:** los núcleos de los elementos radioactivos – radionúclidos – sufren pérdida de partículas y/o de energía según sus características propias. Esas características incluyen la velocidad de decaimiento y el tipo de emisión. La emisión de partículas por los núcleos determina modificación de su número de masa. Cuando la partícula emitida es portadora de carga positiva o negativa el núcleo sufre cambio de número atómico y, consecuentemente, el número de electrones en la electrosfera del átomo que le corresponde, determinando cambio en las propiedades químicas del átomo. La radioactividad decae en razón exponencial, que es característica para cada radionúclido. La actividad en cualquier tiempo puede ser calculada por la expresión

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

en que:

A = actividad en el tiempo t;

A<sub>0</sub> = actividad inicial;

**Neutrino:** partícula de difícil detección, con masa insignificante, neutra, sin embargo dotada de energía,  $\lambda$  = constante de decaimiento – también denominada de constante de desintegración o constante de transformación, i.e., la fracción de átomos radiactivos que sufren transformaciones en la unidad de tiempo, siempre que este tiempo sea corto en comparación con el media vida física;

t = tiempo transcurrido;

e = base de logaritmos neperianos.

**Desintegración:** transformación en la cual el núcleo emite una o más partículas.

**Generador:** sistema que incorpora un radionúclido padre que, por decaimiento, produce un radionúclido hijo que puede ser retirado por elución o por algún otro método para ser utilizado como parte integrante de un radiofármaco.

**Isótopos:** nucleidos de un mismo elemento químico cuyos núcleos tienen el mismo número atómico y masa atómica diferente.

**Material de Partida:** todos los constituyentes que son utilizados en la preparación de radiofármacos.

**Media vida biológica:** tiempo necesario para que un organismo retire, por eliminación biológica, mitad de la cantidad de una sustancia administrada.

**Media vida efectiva:** tiempo necesario para que un radionúclido en un organismo disminuya su actividad por la mitad como un resultado combinado de la eliminación biológica y del decaimiento radioactivo. La media vida efectiva es importante para el cálculo de la dosis óptima del radiofármaco a ser administrada y en el monitoreo de la cantidad de exposición a la radiación.

Puede ser calculado a partir de la fórmula:

$$T_{1/2e} = \frac{T_{1/2p} \times T_{1/2b}}{T_{1/2p} + T_{1/2b}}$$

en que:

T<sub>1/2e</sub> = tiempo de media vida efectiva del radiofármaco;

T<sub>1/2p</sub> = tiempo de media vida física del radionúclido;

T<sub>1/2b</sub> = tiempo de media vida biológica del radiofármaco.

**Media vida física:** tiempo necesario que para mitad de una población de átomos de un radionúclido decaiga para otra forma nuclear. La media vida está relacionada a la constante de decaimiento (1) por la ecuación:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

**Neutrino:** partícula de difícil detecção, com massa desprezível, neutra, porém dotada de energia, emitida simultáneamente a la emisión de partícula beta. La suma de las energías de la partícula beta y del neutrino corresponde a valor cuantificado para cada proceso de desintegración beta.

**Nucleídos:** especies de átomos caracterizados por la constitución de su núcleo, en particular por su número de protones y neutrones y, también, por su estado de energía nuclear.

**Precusores o materia prima para síntesis:** generalmente, esos precusores no son producidos en larga escala. Algunos precusores son sintetizados por el laboratorio de producción de radiofármacos, otros son suministrados por laboratorios productores especializados. Pruebas para identidad, para pureza química y ensayo deben ser realizados por medio de procedimientos validados. Cuando lotes de precusores son aceptados utilizándose los certificados de análisis, evidencias adecuadas deben ser establecidas para demostrar la confiabilidad del análisis del proveedor y por lo menos una prueba de identidad debe ser realizada. Se recomienda probar materiales precusores antes de su uso en la rutina de producción del radiofármaco, para garantizar que bajo condiciones de producción especificadas, el precursor posibilita la preparación del radiofármaco en la cantidad y calidad especificada.

**Pureza Radionucléidica:** es la razón, expresada en porcentaje, de la radioactividad del radionúclido con relación a la radioactividad total del radiofármaco. Las impurezas radionucléidicas relevantes están listadas, con sus límites, en las monografías individuales.

**Radioactividad Específica:** la radioactividad de un radionúclido por unidad de masa del elemento o del producto químico de interés.

**Radioactividad Total:** la radioactividad del nucleído por unidad de masa del elemento o del producto químico de interés.

**Radioisótopos:** isótopos radioactivos o radionucléidos. Son isótopos inestables los cuales sufren decaimiento radioactivo y se transmutan en nuevo elemento. Son átomos que se desintegran por emisión de radiación corpuscular (partícula) o electromagnética. Todo radioisótopo está caracterizado por su tiempo de media vida ( $T_{1/2}$ ), expresado en unidades de tiempo (segundos, minutos, horas, días y años) y por la naturaleza y energía de su radiación. La energía puede ser expresada en electronvoltios (eV), kilo-electronvoltios (keV) o mega-electronvoltios (MeV).

**Pureza química:** puede ser entendida como la razón expresada en porcentaje de la masa de la molécula del compuesto de interés en su estado químico indicado, con relación a la masa total de la preparación. Las impurezas químicas relevantes están listadas con sus límites en las monografías individuales.

**Pureza Radioquímica:** puede ser entendida como la razón expresada en porcentaje de radioactividad del radionúclido de interés en su estado químico indicado, con relación a la

radioactividad total de la preparación radio farmacéutica. Las impurezas radioquímicas relevantes están listadas, con sus límites, en las monografías individuales.

## INTRODUCCIÓN

Radiofármacos son preparaciones farmacéuticas con finalidad diagnóstica o terapéutica que, cuando están listas para el uso, contienen uno o más radionucléidos.

Los radiofármacos comprenden, también, los componentes no-radioactivos para marcación y los radionucléidos, incluyendo los componentes extraídos de los generadores de radionucléidos.

La producción de los radiofármacos deberá atender los requisitos de las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de Radiofármacos, además de atender a las especificaciones farmacopeicas. Los radiofármacos tienen su producción, suministro, almacenamiento, uso y volteo reglamentados por la legislación nacional vigente.

El radiofármaco contiene el radionucléidos en una de las siguientes formas:

- como un elemento atómico o molecular;
- como un ion;
- incluido o ligado las moléculas orgánicas, por proceso de quelación o por conexión covalente.

Las formas de obtención de radionucléidos, usados en la producción de radiofármacos son:

- bombardeo de neutrones en reactores nucleares;
- bombardeo con partículas cargadas en aceleradores de partículas;
- fisión nuclear de nucleídos pesados después de bombardeo con neutrones o con partículas;
- sistemas generadores de radionucléidos que envuelven la separación física o química de un radionúclido hijo, de media vida más corta que el radionúclido padre.

## ALMACENAMIENTO

Los radiofármacos deben ser mantenidos en recipientes vedados y en local suficientemente protegido para evitar irradiación del personal por emisiones primarias o secundarias, de acuerdo con regulaciones nacionales e internacionales sobre manipulación de sustancias radioactivas.

## ESTABILIDAD

Las preparaciones de radiofármacos tienden a ser menos estables que sus correspondientes inactivos, ocurriendo su descomposición por radiólisis y, por eso, deben ser utilizadas en corto plazo. Los efectos de la radiación primaria incluyen la desintegración del átomo radioactivo y la descomposición de moléculas cuando la fracción de energía de partícula emitida o del rayo gama es adsorbida por esas moléculas.

La estabilidad de los radiofármacos depende de muchos factores, incluyendo la energía y la naturaleza de la ra-

diación, la actividad específica y el tiempo de almacenamiento. Los efectos de radiación primaria pueden inducir efectos secundarios debido a la formación de especies excitadas, que pueden degradar otras moléculas, por ejemplo, las de los solventes o conservantes.

También, debe ser considerada la susceptibilidad a la oxidación y reducción de pequeña cantidad de especies químicas presentes. La exclusión inicial de todos los trazos de agentes de oxidación y reducción ni siempre es suficiente, porque tales agentes pueden formarse continuamente por efectos de la radiación. Durante el almacenamiento, recipientes y soluciones pueden oscurecer debido a la radioactividad emitida. Tal hecho no indica, necesariamente, el deterioro de la preparación.

#### Conservantes

Preparaciones radiofarmacéuticas inyectables son generalmente envasadas en recipientes multidosis. Los conservantes antimicrobianos pueden sufrir descomposición por la influencia de la radiación y eso restringe su uso para algunos radiofármacos inyectables. Por tanto, la exigencia de que preparaciones inyectables contengan un conservante antimicrobiano adecuado, en concentración adecuada, no se aplica necesariamente, a las preparaciones radiofarmacéuticas.

Las preparaciones radiofarmacéuticas inyectables con período de vida útil mayor que un día y que no contengan un conservante antimicrobiano deben ser suministradas en frascos de dosis única. Si, sin embargo, la preparación es suministrada en un recipiente multidosis, debe ser utilizada dentro de 24 horas después de la retirada de la primera dosis, de forma aséptica.

Las preparaciones radiofarmacéuticas inyectables para las cuales el período de vida útil es mayor que un día y que contengan conservante antimicrobiano pueden ser suministradas en recipientes multidosis. Después de la retirada de la primera dosis, de forma aséptica, el recipiente debe ser almacenado en temperatura en la banda de 2 °C a 8 °C y los contenidos utilizados en el plazo de 7 días.

#### DILUICIÓN

En el caso necesario de hacer diluición es preferible utilizar vehículos de misma composición que los presentes en la preparación. En caso de radiofármacos inyectables deben ser utilizados soluciones y materiales estériles, libres de partículas y de trazos de materia orgánica.

La cantidad de material radioactivo presente en la preparación es frecuentemente muy pequeña para ser medida por los métodos químicos o físicos disponibles.

Considerando la fórmula

$$S_{\max} = \frac{1,16 \times 10^{20} \text{ Bq g}^{-1}}{W \times T_{1/2}}$$

En que:

$S_{\max}$  = actividad específica mínima

W = peso atómico

$T_{1/2}$  = tiempo de media vida en horas

Se verifica que, por ejemplo, para solución de pertecnato de sodio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) con la concentración radioactiva de 37 MBq (1 mCi) por ml, la concentración del pertecnato puede ser tan baja como  $3 \times 10^{-10}$  g ml<sup>-1</sup>.

El comportamiento de masas tan pequeñas en soluciones muy diluidas puede requerir la adición de acarreador inerte para limitar la adsorción a la superficie del recipiente así como facilitar las reacciones químicas de preparación de radiofármacos.

#### CONTROL BIOLÓGICO

##### Esterilidad

Radiofármacos inyectables deben ser preparados de acuerdo con las BPF para asegurar la esterilidad, atendiendo a los criterios de la prueba de esterilidad (5.5.3.2.1). Por causa de las características radioactivas de las preparaciones, no es practicable atrasar la liberación de algunos productos farmacéuticos radioactivos por cuenta de la prueba de esterilidad. En tales casos, los resultados de las pruebas de esterilidad dan apenas evidencia retrospectiva confirmatoria para la garantía de la esterilidad, que por tanto, depende de los métodos iniciales establecidos en la fabricación y en los procedimientos de validación/certificación. En el caso de radiofármacos preparados en pequeños lotes y para los cuales la ejecución de la prueba de esterilidad presenta grado elevado de riesgo radiológico, la cantidad de muestra requerida en la prueba de esterilidad debe ser considerada. Si la preparación radiofarmacéutica es esterilizada por filtración o procesada asépticamente, la validación del proceso es necesaria.

##### Endotoxinas Bacterianas

Cuando especificado, una monografía individual para una preparación radiofarmacéutica requiere conformidad con la prueba para endotoxinas bacterianas, descrito en Métodos Biológicos – Endotoxinas Bacterianas (5.5.2.2). En la realización de la prueba se deben tomar las precauciones necesarias para limitar la irradiación del personal que realiza la prueba.

El límite de endotoxinas bacterianas es indicado en las monografías de los radiofármacos. La validación de la prueba es necesaria para excluir cualquier interferencia debido a la naturaleza del radiofármaco. Niveles de radioactividad deben ser estandarizados ya que algunos tipos de radiación y radionucléidos, especialmente altos niveles de actividad, pueden interferir con la prueba. El pH de algunas preparaciones radiofarmacéuticas deberá ser ajustado a pH 6,5 – 7,5 para promover resultados óptimos.

Cuando la naturaleza de la preparación radiofarmacéutica resulte en una interferencia por inhibición o potencialización y no fuese posible eliminar el factor interferente, la conformidad con la prueba para endotoxinas bacterianas

debe ser especificada. En algunos casos es difícil concluir la prueba antes de la liberación del lote para uso, cuando la media vida del radionúclido en la preparación es corta. La prueba entonces se constituye un control de la calidad de la producción.

#### PLAZO DE VALIDEZ

Fecha límite especificada por el fabricante para la utilización de un radiofármaco, antes y después de la reconstitución y/o marcación radioactiva del producto, levando en cuenta productos de degradación químicos, radioquímicos y radionucléidos, siendo mantenidas las condiciones de almacenamiento y transporte establecidos.

#### RADIOACTIVIDAD

Propiedad que ciertos nucleídos tienen de emitir radiación por transformaciones espontáneas de sus núcleos. Generalmente el término "radioactividad" es usado para describir el fenómeno de decaimiento radioactivo y para expresar la cantidad física (actividad) de ese fenómeno. La actividad de una preparación es el número de transformaciones nucleares por unidad de tiempo que ocurren en la preparación. Esas transformaciones pueden envolver la emisión de partículas cargadas, captura de electrones o transición isomérica. Las partículas cargadas emitidas por el núcleo pueden ser partículas alfa (núcleos de helio, de número de masa 4) o partículas beta (electrones de carga negativa o positiva, respectivamente  $_{-1}\beta$  – negatrón o  $_{+1}\beta$  – positrón). La emisión de partículas beta es acompañada de la emisión de neutrino.

La emisión de partículas cargadas puede ser acompañada de rayos gama, los cuales, también, son emitidos en el proceso de transición isomérica. Esa emisión de rayos gama puede ser parcialmente sustituida por la expulsión de electrones, conocidos como electrones de conversión interna. Ese fenómeno, así como el proceso de captura de electrones, causa emisión secundaria de rayos X, debido a la reorganización de electrones en el átomo. Esa emisión secundaria causa, también, la expulsión de electrones de baja energía conocidos como electrones Auger. Rayos X, eventualmente acompañados por los rayos gama, son emitidos en el proceso de captura de electrones. Partículas  $_{+1}\beta$  son aniquiladas en contacto con otro electrón ( $_{-1}e$ ) presente en la materia, siendo ese proceso acompañado por la emisión de dos fotones gama, cada uno con energía de 511 keV, generalmente emitidos a 180° uno del otro y que se denomina radiación de aniquilación.

El poder penetrante de cada radiación varía considerablemente de acuerdo con su naturaleza y energía. Partículas alfa son completamente absorbidas por espesores de sólidos o líquidos que varían de algunos a decenas de micrómetros; partículas beta son absorbidas completamente en el espesor de algunos milímetros a varios centímetros. Rayos gama no son completamente absorbidos, sino solamente atenuados, y una reducción de diez veces puede requerir, por ejemplo, algunos centímetros de plomo. Cuanto más denso es el absorbente, menor es el alcance de partículas alfa y beta y mayor la atenuación de rayos gama.

#### Medida de la radioactividad

La medida absoluta de la radioactividad de una muestra puede ser efectuada si el esquema de decaimiento del nucleído es conocido, pero en la práctica muchas correcciones son requeridas para obtener resultados precisos. Por esa razón es común realizar medidas utilizándose una fuente estándar primaria.

Estándares primarios pueden no existir para radionucléidos de media vida corta, como por ejemplo, emisores de positrones. Los instrumentos de medida son calibrados utilizándose estándares apropiados para radionucléidos emisores de partículas.

El contador Geiger-Müller puede ser utilizado para medir emisores beta y beta-gama. Contadores de centelleo, semiconductores o cámaras de ionización pueden ser utilizados para medir rayos gama. Emisores beta de baja energía necesitan de contador de centelleo líquido.

En ese caso, la muestra es disuelta en la solución de una o más (generalmente dos) sustancias orgánicas fluorescentes (centelladores primarios y secundarios), que convierten parte de la energía de desintegración en fotones de luz, los cuales son detectados y convertidos en impulsos eléctricos en el fotomultiplicador. Cuando se utiliza el contador de centelleo líquido, medidas comparativas deben ser corregidas debido a los efectos de interferencia de la luz. Medidas directas deben ser hechas en condiciones que aseguren que las condiciones geométricas sean constantes (volúmenes idénticos de los recipientes y soluciones).

Cualquiera que sea el equipo usado es esencial que se trabaje en condiciones geométricas extremadamente bien definidas, de modo que la fuente radioactiva esté siempre en la misma posición en el aparato y, consecuentemente, su distancia del dispositivo de medición sea constante y permanezca la misma, mientras la muestra es sustituida por el estándar.

Todas las medidas de radioactividad deben ser corregidas por la sustracción de la actividad de la radiación de fondo, debido a la radioactividad del medio y a las señales espurias generadas en el propio aparato. En ciertos equipos, en los cuales el conteo está hecho en altos niveles de actividad, la corrección puede ser necesaria en razón de las pérdidas por coincidencia, debidas al tiempo de resolución del detector y del equipo electrónico asociado.

Para sistema de conteo con tiempo muerto fijo ( $\tau$ ), después de cada conteo la corrección está dada por la ecuación:

$$N = \frac{N_0}{1 - N_0\tau}$$

$N$  = tasa de conteo real por segundo;

$N_0$  = tasa de conteo medida por segundo;

$\tau$  = tiempo muerto en segundos.

En ciertos equipos, la corrección está hecha automáticamente. Correcciones de la pérdida por coincidencia deben ser hechas antes de las correcciones para radiación de fondo.

En las determinaciones de radioactividad hay variaciones estadísticas porque están relacionadas a la probabilidad de desintegración nuclear. Un número suficiente de conteos deben ser hechos para compensar variaciones en el número de desintegraciones por unidad de tiempo. Por lo menos 10 000 conteos son necesarios para obtener desvío estándar de no más de 1%.

La actividad decae en razón exponencial, que es característica de cada radionúclido. Su determinación solamente es verdadera en el tiempo de referencia especificado. La actividad en otros tiempos puede ser calculada a partir de la ecuación exponencial o por la tabla de decaimiento o, además, puede ser obtenida gráficamente de la curva establecida para cada radionúclido. Todas las determinaciones de actividad deben ser acompañadas de declaración de la fecha y, si necesario, de la hora en que las medidas fueron hechas. La medida de la actividad de muestra en solución es calculada en relación a su volumen original y expresada por unidad de volumen – concentración radioactiva.

#### Unidades de Radioactividad

En el Sistema Internacional (SI) la radioactividad es expresada en becquerel (Bq) que significa una transformación por segundo. La unidad histórica de actividad es el curie (Ci) que es equivalente a  $3,7 \times 10^{10}$  Bq.

Los factores de conversión entre becquerel y curie y sus submúltiplos son señalados en la **Tabla 1**.

**Tabla 1 - Unidades de radioactividad utilizadas en radiofarmacia y las conversiones entre unidades SI y unidades históricas.**

Número de átomos transformados por segundo	Unidad SI: becquerel (Bq)	Unidad Histórica: curie (Ci)
1	1 Bq	27 picocurie (pCi)
1000	1 kilobecquerel (KBq)	27 nanocurie (nCi)
$1 \times 10^6$	1 megabecquerel (MBq)	27 microcurie (µCi)
$1 \times 10^9$	1 gigabecquerel (GBq)	27 millicurie (mCi)
37	37 Bq	1 (nCi)
37.000	37 KBq	1 (µCi)
$3,7 \times 10^7$	37 MBq	1 (mCi)
$3,7 \times 10^{10}$	37 GBq	1 Ci

#### Identificación de radionucléidos

El radionúclido es, generalmente, identificado por la media-vida física o por la naturaleza y energía de su radiación o radiaciones, o por ambos.

#### Medida del tiempo de media vida

La media vida es medida con auxilio de aparatos de detección tales como cámara de ionización, contador Geiger-Müller, contador de centelleo o detector semiconductor. La

cantidad de radioactividad, consideradas las condiciones experimentales, debe ser suficientemente alta para permitir la detección durante varias medias-vidas presumibles, sin embargo no alta demás, para evitar el fenómeno de pérdida por coincidencia debida, por ejemplo, al tiempo muerto del equipo.

La fuente radioactiva es preparada para evitar pérdidas durante su manipulación. Muestras líquidas deben estar contenidas en frascos o tubos sellados. Productos sólidos deben ser protegidos por capa de hoja adhesiva de acetato de celulosa, u otro material cuya masa por unidad de área sea insignificante para evitar la atenuación de cantidad significativa de la radiación en estudio. La misma fuente es medida en condiciones geométricas idénticas y en intervalos que corresponden usualmente a la mitad de la media vida y por el tiempo correspondiente a aproximadamente tres medias-vidas. El funcionamiento correcto del equipo es verificado por medio del uso de una fuente permanente y las variaciones del conteo son corregidas, si necesario, conforme descrito en *Medida de la radioactividad*. Se traza una curva lanzándose el tiempo en el eje de las abscisas y en el eje de las ordenadas, el logaritmo del número de conteos por unidad de tiempo, o la corriente eléctrica, conforme el tipo del equipo usado. La media vida calculada a partir de esa curva debe atender a la especificación descrita en la respectiva monografía.

#### Determinación de la naturaleza y de la energía de la radiación

La naturaleza y la energía de la radiación emitida pueden ser determinadas por diversos procedimientos que incluyen la elaboración de la curva de atenuación y el uso de espectrometría. La curva de atenuación es usada generalmente para la determinación de la energía de la radiación beta y la espectrometría es usada principalmente para determinación de la energía de la radiación gamma.

La curva de atenuación es elaborada para emisores beta puros o para emisores beta-gama cuando no hay disponibilidad de espectrómetro de rayos gama. Ese método de determinación de energía máxima de la radiación beta da apenas valores aproximados.

La fuente, montada convenientemente para proporcionar condiciones geométricas constantes, es colocada en frente a la ventana delgada del contador Geiger-Müller y protegida conforme descrito en *Medida del tiempo de media vida*. El conteo de la fuente es, entonces, medido. Entre la fuente y el contador son colocados por lo menos seis absorbentes de aluminio, de masa creciente por unidad de área, hasta que la tasa de conteo no sea afectada por la adición de absorbentes adicionales. Los absorbentes son insertados de modo tal que las condiciones geométricas sean mantenidas constantes.

Se construye una curva colocando en abscisas la masa por unidad de área del absorbente expresada en  $\text{mg cm}^{-2}$  y, en ordenadas, el logaritmo del número de conteos por unidad de tiempo para cada uno de los absorbentes utilizados. Curva idéntica es elaborada utilizándose el estándar. El coeficiente de atenuación de masa es calculado con relación a la parte mediana, prácticamente rectilínea, de las curvas.



El coeficiente de atenuación de la masa, expresado en  $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$ , depende de la energía de la emisión beta y de las propiedades físicas y químicas del absorbente. Eso posibilita la identificación de emisión beta y el coeficiente es calculado, a partir de curvas construidas como descrito anteriormente, por la expresión:

$$\mu_m = \frac{2,303}{m_2 - m_1} (\log A_1 - \log A_2)$$

en que:

$m_1$  = masa por unidad de área, del absorbente más leve;  
 $m_2$  = masa por unidad de área, del absorbente más pesado (medir  $m_1$  y  $m_2$  dentro de la parte rectilínea de la curva);  
 $A_1$  = tasa de conteo para masa por unidad de área  $m_1$ ;  
 $A_2$  = tasa de conteo para masa por unidad de área  $m_2$ .

El coeficiente de atenuación así calculado no debe diferir en más de 10% del coeficiente obtenido en condiciones idénticas con el estándar del mismo radionúclido.

La espectrometría gama es usada para identificar radionucléidos por la energía e intensidad de los rayos X o gama. Se basa en la propiedad de que ciertas sustancias (centelladores) tienen de emitir luz cuando interactúan con radiación electromagnética. El número de fotones producido es proporcional a la energía adsorbida por el centellador. La luz es transformada en impulsos eléctricos de amplitud aproximadamente proporcional a la energía disipada por los fotones gama.

Con el análisis de los impulsos de salida por porcentaje se obtiene, con auxilio del analizador de pulsos, el espectro de energía de la fuente. En los espectros de centelleo de rayos gama hay uno o más picos característicos correspondientes a las energías de la radiación gamma en la fuente. Esos picos son acompañados por otros, más o menos anchos, debido a efectos secundarios de la radiación en el centellador o al material en torno a él. La forma del espectro varía de acuerdo con el equipo utilizado, tornándose necesario calibrarlo con auxilio de estándar del radionúclido en cuestión.

El espectro de rayos gama del radionúclido que los emite es propio de él, siendo caracterizado por el número de rayos gama de energía individualizada producida por transformación. Esa propiedad puede ser utilizada para identificar cuales radionucléidos están presentes en la fuente y las cantidades de cada uno de ellos. Posibilita, también, evaluar el grado de impurezas presentes, por la detección de los picos extraños a aquellos esperados.

El detector preferido para a espectrometría de rayos gama es un detector semiconductor de germanio activado con litio. Los detectores de centelleo de yoduro de sodio activados con talio, a pesar de que presenten resolución menor, también, pueden ser usados. La salida de cada uno de esos detectores ocurre en la forma de pulsos eléctricos, cuya amplitud es proporcional a la energía de los rayos gama detectados. Después de amplificación, esos pulsos son analizados en analizador multicanal, que da el espectro de energía gama de la fuente. La relación entre energía gama y

el número del canal puede ser fácilmente establecida utilizándose fuentes de rayos gama de energía conocida. El sistema de detección debe ser calibrado, pues la eficiencia del detector es función de la energía de la radiación gamma, de la forma de la fuente y de la distancia de la fuente al detector. La eficiencia de la detección puede ser medida con auxilio de fuente calibrada del radionúclido en cuestión o, para trabajo más genérico, puede ser construida una curva de eficiencia contra energía gama a partir de una serie de fuentes calibradas de varios radionúclidos.

La utilización de detector de baja resolución podrá traer alguna dificultad en identificar las impurezas, pues, los picos en el espectro pueden no estar bien resueltos. En ese caso, es recomendable la determinación de la media vida por medidas repetidas de la muestra.

Si, en una fuente, la impureza radioactiva de media vida diferente está presente, ella es fácilmente detectable por la identificación de picos característicos, cuyas amplitudes decrecen en tasas diferentes de aquellas del radionúclido esperado. La determinación de la media vida de picos interferentes por medidas repetidas de la muestra ayudará en la identificación de la impureza. Es posible establecer la tasa de decaimiento de la radioactividad usando espectrometría gama desde que los picos disminuyan en amplitud en función de la media vida.

Informaciones sobre las características físicas de los radionucléidos de relevancia en la producción de radiofármacos son suministradas en la **Tabla 2**.

## PUREZA RADIONUCLÉIDICA

Para establecer a pureza radionucléidica de la preparación, la radioactividad y la identidad de cada radionúclido presente deben ser conocidas. El método más comúnmente utilizado para examinar la pureza radionucléidica es el de la espectrometría gama. No es un método totalmente preciso porque las impurezas alfa y beta-emisoras generalmente no son detectables y, cuando son empleados detectores de yoduro de sodio, los picos debido a las impurezas son frecuentemente encubiertos por el espectro del radionúclido principal.

En la monografía están establecidas las exigencias generales para la pureza radionucléidica (por ejemplo, el espectro de rayos gama no debe diferir significativamente de aquel de la fuente estándar) y puede establecer límites para impurezas radionucléidicas específicas (por ejemplo, molibdeno-99 en tecnecio-99m). Esas exigencias son necesarias a pesar de que ellas por sí solas no sean suficientes para asegurar que la pureza radionucléidica de la preparación sea adecuada para uso humano. El fabricante debe analizar sus productos, especialmente las preparaciones de radionucléidos de media-vida corta, cuanto a la presencia de impurezas de media vida larga, después de período conveniente de decaimiento. De esa manera, pueden ser obtenidas informaciones sobre la adecuación de los procesos de fabricación y de los procedimientos de control.

Debido a las diferencias en las medias vidas de los diferentes radionucléidos presentes en la preparación farmacéu-

tica, la pureza radionucléidica cambia con el tiempo. La especificación de pureza radionucléidica debe ser garantizada durante todo el plazo de validez. A veces es difícil realizar esta prueba antes de la liberación para uso de un lote producido, cuando la media vida del radionúclido en la preparación es corta. La prueba se constituye, en ese caso, un control de calidad de producción.

#### PUREZA RADIOQUÍMICA

La determinación de la pureza radioquímica requiere la separación de las sustancias químicas diferentes conteniendo el radionúclido y la estimativa del porcentaje de la radioactividad asociada a la sustancia química declarada.

En la determinación de la pureza radioquímica pueden ser usados métodos analíticos de separación, tales como métodos cromatográficos (cromatografía en papel, en camada delgada, de exclusión molecular, cromatografía gaseosa o cromatografía a líquido de alta eficiencia), electroforesis y extracción por solventes.

En la cromatografía, el volumen de la muestra a ser utilizado depende de la técnica adoptada. Es preferible no diluir la preparación en análisis, pero es importante utilizar cantidad de radioactividad tal que pérdidas de conteo por coincidencia no vengán a ocurrir durante la medida de la radioactividad.

Considerando las masas muy pequeñas del material radioactivo aplicado a los cromatogramas, el uso de acarreadores es, a veces, necesario y ellos pueden ser añadidos cuando la monografía así lo prescriba.

Después del desarrollo de la cromatografía en papel o en camada delgada, el soporte es seco y las posiciones de las áreas radioactivas son detectadas o por la autorradiografía o por la medida de la radioactividad a lo largo del cromatograma, con auxilio de contadores debidamente colimados, o por el corte de las cintas y conteo de cada porción.

Las posiciones de las manchas o áreas permiten identificación química por comparación con soluciones de las mismas sustancias químicas (no radioactivas), visualizadas por reacción de color o examen bajo luz ultravioleta. La visualización por la reacción de color directo de la muestra radioactiva no siempre es posible o deseable, ya que la revelación puede causar difusión de la sustancia radioactiva para más allá de las manchas o áreas identificadas.

Medidas de radioactividad pueden ser hechas por integración, utilizándose equipo automático o contador digital. Las proporciones de las áreas abajo de los picos dan las relaciones de las concentraciones radioactivas de las sustancias químicas. Cuando las cintas son cortadas en porciones, las razones de las cantidades de radioactividad medidas dan las proporciones de las concentraciones de especies químicas radioactivas.

Como la pureza radioquímica puede cambiar con el tiempo, principalmente por causa de la descomposición por radiación, el resultado de la prueba debe indicar que el producto presenta valores especificados durante todo el plazo de validez del radiofármaco.

#### ACTIVIDAD ESPECÍFICA

La actividad específica es calculada relacionándose la concentración radioactiva (radioactividad por unidad de volumen) con la concentración de la sustancia química en análisis, después de verificación de que la radioactividad es debida solamente al radionúclido (pureza radionucléidica) y a la especie química (pureza radioquímica) en cuestión.

La actividad específica cambia con el tiempo, debiendo estar expresada teniendo como referencia la fecha y, si necesario, la hora. La especificación debe ser garantizada durante todo el período de validez del radiofármaco.

Tabla 2 - Informaciones sobre las características físicas de los radionúclidos de relevancia en la producción de radiofármacos.

Radionúclido	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fótón (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)
Césio-137	30,1 a	$\beta^+$	0,512 1,174	94,6 5,4	Via 2,6 min <sup>137m</sup> Ba 0,662 0,032-0,038	85,1 8 (Ba K Raio-X)	9,5
Carbono-11	1223,1s	$\beta^+$	0,960	99,76	-	Proveniente de aniquilación	-
Carbono-14	5730 a	$\beta^-$	0,158	100	-	-	-
Cromio-51	27,7d	c.e.	-	100	-	-	-
Cobalto-57	270d	c.e.	-	100	0,320 0,005-0,006 0,114 0,122 0,136 0,570 0,692 outros 0,006-0,007	9,83 ~22 (V K Raio X) 9,4 85,2 11,1 0,02 0,16 baixa intensidad ~55% (Fe K Raio-X)	-
Cobalto-58	70,8d	$\beta^+$ c.e.	0,475	15,0 85	0,511 0,811 0,864 1,675 0,006-0,007	$\beta^+$ 99,4 0,7 0,5 ~26 (Fe K Raio-X)	0,02 0,01
Cobalto-60	5,27a	$\beta^-$	0,318 1491	99,9 0,1	1,173 1,333 outros	99,86 99,98 <0,01	-
Disproseo-165	2,32h	$\beta^+, \gamma$	0,205 0,290 1,190 1,285	0,1 1,6 14,6 83,4	0,046 0,047 0,053 0,094 0,279 0,361 0,545 0,008	2,5 4,6 1,8 3,5 0,5 0,8 0,16 0,15	-
Érbio-169	9,4d	$\beta^+, \gamma$	0,341 0,350	45 55	-	Proveniente de aniquilación	-
Fluorine-18	111min	$\beta^+, K$	0,649	97	0,511	Proveniente de aniquilación	-

Tabla 2 (continuación)

Radionucléido	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fótón (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)
Galio-67	78,3h	c.e.	0,091	100	0,091	3,6	0,3
			0,185		0,185	23,5	0,4
			0,209		0,209	2,6	0,02
			0,300		0,300	16,7	0,06
			0,394		0,394	4,4	0,01
			0,494		0,494	0,1	
			0,704		0,704	0,02	
			0,795		0,795	0,06	
			0,888		0,888	0,17	
			0,008-0,010 via $9,2 \mu\text{s } ^{67m}\text{Zn}$		0,008-0,010 via $9,2 \mu\text{s } ^{67m}\text{Zn}$	43 (Zn Ratio-X)	
Holmio-166	27,3h	$\beta^-$ ; $\gamma$	0,093		0,093	37,6	32,4
			0,008-0,010		0,008-0,010	13 (Zn Ratio-X)	
			0,007	0,2	0,007	7,6	
			0,048	1	0,048	2,8	
			0,049	48	0,049	5,0	
			0,055	51	0,055	2,0	
			0,080		0,080	6,2	
			1,379		1,379	0,9	
			1,581		1,581	0,18	
						0,12	
Indio-111	2,81 d	c.e.	1,662	100	1,662	89,6	10,4
			0,172		0,172	94	6
Indio-113 m	99,5 min	t.i.	0,247	100	0,247	64,9	35,1
			0,392		0,392	24 (em K Ratio-X)	
Iodo-123	13,2 h	c.e.	0,024-0,028	100	0,024-0,028	83,0	16,3
			0,159		0,159	0,10	
			0,347		0,347	0,35	
			0,440		0,440	0,26	
			0,506		0,506	1,05	
			0,529				
			0,539				
			0,027-0,032		~86 (Te K Ratio-X)		

Tabla 2 (continuación)

Radionuclídeo	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fótón (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)	
Iodo-124	4,1d	$\beta^-$ , $\gamma$ , K	1,53	100	0,511 and	Proveniente de aniquilación		
			2,13		0,605			66
Iodo-125	60,0d	c.e.		100	0,644	138 (Te K Ratio-X)	93	
					0,730			12
					1,320			14
					1,510			1,0
					1,695			4,2
					2,09			14
					2,26			2,0
Iodo-131	8,06d	$\beta^-$	0,247	1,8	0,035	7	3,8	
					0,304			2,4
					0,334			5,9
					0,606			81,9
					0,806			7,2
(Xenônio-131m)		t.i.	1,3% de $^{131}\text{I}$ decaem via $^{12}\text{d }^{131\text{m}}\text{Xe}$	100	0,027-0,032	2	98	
					0,080			0,164
					0,284			
					0,364			
					0,637			
					0,723			
Ferro-59	44,6d	$\beta^-$	0,084	0,1	0,143	0,8		
					0,132			2,8
					0,274			0,3
Kriptônio-81m	13s	$\gamma$	-	-	0,383	0,02		
					0,467			55,8
					1,566			43,8
								0,06
Lutécio-177	6,71d	$\beta^-$ , $\gamma$	0,175	12,3	0,192	82	0,16	
					0,384			0,071
					0,497			0,113
					6,3			
					11,0			
					0,250			
					0,321			



Tabla 2 (continuación)

Radionuclídeo	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fótón (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)
Molibdénio-99	66,2h	$\beta^-$	0,454	18,3	0,041	1,2	4,8
			0,866	1,4	0,141	5,4	0,7
			1,232	80	0,181	6,6	1,0
			otros	0,3	0,366	1,4	
					0,412	0,02	
					0,529	0,05	
					0,621	0,02	
					0,740	13,6	
					0,778	4,7	
					0,823	0,13	
		0,961	0,1				
Nitrogênio-13	10min	$\beta^+$	1,19		0,511		
			1,723		0,511		
			1,709	100			
			0,939	22			
			1,076	71			
					0,123	0,7	
					0,137	9,5	
					0,631	1,9	
					0,768	0,8	
					0,155	14,9	
Oxigênio-15	2,04s	$\beta^+$	1,964	25,3	0,477		
			2,119	71,4	0,633	1,2	
					0,635	0,14	
					0,673	0,11	
					0,829	0,41	
					0,931	0,56	
					1,13	0,7	
					1,306	0,01	
Fósforo-32	14,3d	$\beta^-$			0,002	~0	93,9
					0,141	83,9	10
					0,143	0,03	0,8
Rênio-186	88,9h	$\beta^-, \gamma, K$			via 6,02h <sup>99m</sup> Tc em equilíbrio		
Rênio-188	18h	$\beta^-, \gamma$					

Tabla 2 (continuación)

Radionuclídeo	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fótón (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)
Rubidio-81	4,7h	$\beta^+$ , $\gamma$ , K	0,33 0,58 1,05	0,253 0,450 1,10			
Samário-153	47h	filha $^{81m}\text{Kr}$ $\beta^-$ , $\gamma$	0,26 0,632 0,702 0,81	0,1 34,1 44,1 21	0,0058 0,0409 0,0415 0,0470 0,0696 0,103 0,422 0,066 0,097 0,121 0,136 0,199 0,265 0,280 0,401 outros 0,010-0,012	11,8 17,2 31,2 12,2 5,1 28,3 0,2 1,1 2,9 15,7 54 1,5 56,9 18,5 11,7 <0,05 cada ~50 (como K Raio-X)	
Selênio-75	118,5d	c.e.		100			
Strôncio-89	50,5d	$\beta^-$ , ( $\gamma$ )	0,582 1,491	0,01 99,98	via $16,4 \text{ ms } ^{75m}\text{As}$ 0,024 0,280 0,304 0,010-0,012 0,909	0,03 5,4 1,2 ~2,6 (como K Raio-X) 0,01	5,5 0,1
Tecnécio-99m	6,02h	t.i.		100			
		filha $^{99}\text{Tc}$					
							99,1 10,6 0,87

Tabla 2 (continuación)

Radionuclídeo	Media vida física	Tipo de Decaimiento	Energía (MeV)	Probabilidad de transición (%)	Energía del Fóton (MeV)	Fotones Emitidos (%)	Transiciones Internamente Convertidas (%)
Tálio-201	73,5h	c.e.		100	0,031	0,29	10,1
					0,032	0,25	9,6
					0,135	2,9	8,9
					0,166	0,13	0,2
					0,167	8,81	16
Aluminio-113	115d	c.e.		100	0,255	21	0,1
					0,024-0,028	73 (em K Raio-X)	
Tritio ( <sup>3</sup> H)	12,35a	filha <sup>131m</sup> In β <sup>-</sup>	0,0186	100			
Tungsténio-188	69,5d	β <sup>-</sup>	0,3	0,227			
				0,291			
Xenônio-131m	11,9d	filhas <sup>188m+188</sup> Re t.i.		100	0,164	2	98
					0,029-0,035	~52 (Xe K Raio-X)	
					0,080	0,4	0,5
					0,081	36,6	63,3
					0,160	0,05	
					0,030-0,036	~46 (Cs K Raio-X)	
					0,233	8	92
					0,029-0,035	~59 (Xe K Raio-X)	
Ytérbio-169	32,0d	filha <sup>133</sup> Xe c.e.		100	0,021	0,21	12,3
					0,063	45,16	50,4
					0,094	0,78	12,3
					0,110	3,82	56,2
					0,117	0,04	
					0,118	1,90	3,2
					0,131	11,42	13,5
					0,177	17,31	17,7
					0,198	26,16	25,7
					0,240	0,12	
					0,261	1,74	
					0,308	11,04	0,7
Ytrio-90	64,5h	β <sup>-</sup>	2,281	100	-	-	



# 10 EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA Y BIOEQUIVALENCIA DE MEDICAMENTOS

## INTRODUCCIÓN

En este capítulo son abordados aspectos científicos y técnicos relacionados a los ensayos de Equivalencia Farmacéutica, Disolución, Biodisponibilidad y Bioequivalencia aplicables a medicamentos, con énfasis a las formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata (FFSLI) de uso oral y suspensiones, en el contexto del intercambio entre medicamentos. Medicamentos biológicos (vacunas, sueros, derivados de sangre, etc), biotecnológicos, radiofármacos y fitoterápicos requieren otras consideraciones y, por tanto, no serán abordados.

Los actos de registro y polvos-registro de medicamentos son de la competencia de la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Los aspectos científicos y técnicos presentados en ese capítulo están en consonancia con los criterios adoptados internacionalmente y con la reglamentación técnica vigente en Brasil sobre los temas relacionados.

Los medicamentos genéricos fueron implantados en Brasil en 1999, mientras que en 2003 se publicó reglamentación técnica específica para el registro y para la adecuación del registro de medicamentos similares que ya eran comercializados en el país. Los medicamentos similares que estaban en el mercado habían sido registrados según normas que permitían su registro sanitario por medio del concepto de similitud a un medicamento anteriormente registrado, sin la necesidad de presentación, por ocasión del registro, de los resultados de ensayos *in vitro* o *in vivo* relacionados a la comprobación de la eficacia y seguridad. Las nuevas reglamentaciones para medicamentos similares publicadas en 2003 se destinan al establecimiento de la isonomía de criterios para registro y renovación de registro de medicamentos no innovadores (genéricos y similares), teniendo como base los preceptos de la garantía de la calidad, eficacia y seguridad.

La Equivalencia Farmacéutica y la Bioequivalencia son criterios aplicables a medicamentos genéricos y similares. Para el registro de un medicamento genérico, la industria farmacéutica debe solicitar a la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) la indicación del medicamento de referencia para la realización de los ensayos necesarios al desarrollo de la formulación, de la forma farmacéutica y del proceso de fabricación, estableciendo las condiciones para los pruebas de estabilidad y las especificaciones del medicamento para comprobar su Equivalencia Farmacéutica (*in vitro*) y Bioequivalencia (*in vivo*) con el medicamento de referencia, condición indispensable para la comprobación de la Equivalencia Terapéutica entre el candidato a genérico y el medicamento de referencia (generalmente el medicamento innovador cuya biodisponibilidad es conocida y la eficacia clínica y la seguridad fueron comprobadas por ocasión del registro sanitario).

La Equivalencia Terapéutica entre el genérico y el medicamento de referencia posibilita el intercambio entre ellos, lo que, también, es conocido como sustitución genérica en el acto de la dispensación del medicamento por el farmacéutico. Cuando dos medicamentos son considerados Equivalentes Terapéuticos se asume que ambos van a presentar la misma eficacia y seguridad al ser administrados al organismo, así como el mismo potencial para causar efectos adversos.

Caso una industria farmacéutica pretenda registrar un nuevo medicamento similar, debe verificar la reglamentación técnica vigente. Para medicamentos similares ya comercializados, la reglamentación técnica pertinente presenta un cronograma de adecuación con base en el criterio de riesgo sanitario, según el cual hasta el año 2014 todos los medicamentos similares del mercado se habrán adecuado a los mismos criterios exigidos para el registro de medicamentos genéricos.

## EQUIVALENCIA FARMACÉUTICA

La Equivalencia Farmacéutica corresponde a la comprobación de que dos medicamentos son equivalentes con relación a los resultados de los pruebas *in vitro*. Por definición, Equivalentes Farmacéuticos son medicamentos que contienen el mismo fármaco, eso es, la misma sal o éster de la misma molécula terapéuticamente activa, misma forma farmacéutica y vía de administración y son idénticos con relación a la potencia o concentración. Deben ser formulados para cumplir con las mismas especificaciones actualizadas de la Farmacopea Brasileña y, en la ausencia de esta, con las de otros códigos autorizados por la legislación vigente o, además, con otros estándares aplicables de calidad; relacionados a la identidad; dosificación; pureza; potencia; uniformidad de contenido; tiempo de desintegración y velocidad de disolución, cuando sea el caso. No obstante, pueden diferir en características como forma, mecanismos de liberación, embalaje, excipientes, plazo de validez y, dentro de ciertos límites, etiquetado.

Los estudios de Equivalencia Farmacéutica se destinan a la evaluación de la calidad de los medicamentos por medio de análisis comparativo entre el medicamento prueba y el medicamento de referencia y deben ser, necesariamente, realizados por laboratorios autorizados por la Anvisa. Además de eso, los estudios deben ser realizados en muestras dentro del plazo de validez, utilizándose sustancias químicas de referencia de la Farmacopea Brasileña, oficializadas por medio de Resolución de Dirección Colegiada de la Anvisa u originarias de otras farmacopeas. En el caso de inexistencia de esas sustancias, se admite el uso de sustancias químicas de trabajo con identidad, tenor y perfil de impurezas debidamente determinados.



Los métodos analíticos empleados para evaluación de la calidad de los medicamentos presentan importancia considerable en el estudio de Equivalencia Farmacéutica. Deben ser utilizados, preferencialmente, los métodos analíticos descritos en la monografía individual del medicamento presente en la Farmacopea Brasileña, siendo que, en ausencia de esta, se permite la utilización de métodos incluidos en otras farmacopeas autorizadas por la legislación vigente. Cuando no hubiere monografías para el producto en farmacopeas oficiales, el estudio debe ser realizado utilizándose métodos analíticos validados, complementándose con los ensayos descritos en métodos generales de la Farmacopea Brasileña. En el caso en que el método analítico es suministrado por el fabricante del medicamento, los parámetros de precisión, exactitud y linealidad deben ser determinados por el laboratorio autorizado por la Anvisa donde el estudio está siendo realizado.

Los pruebas de Equivalencia Farmacéutica deben ser realizadas, simultáneamente, en el medicamento candidato a genérico, o medicamento similar, y en el respectivo medicamento referencia, y se basan en la comparación de los resultados obtenidos con ambos.

Es importante resaltar que el medicamento a prueba no debe ser desarrollado y formulado para ser superior al medicamento de referencia, pero si para presentar las mismas características relacionadas a la liberación del fármaco y a la calidad ya establecidas para el medicamento de referencia. La demostración de la Equivalencia Farmacéutica entre los dos medicamentos es un indicativo de que el candidato a genérico, o similar, podrá presentar la misma eficacia y seguridad del medicamento de referencia.

#### BIODISPONIBILIDAD, BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA, BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA

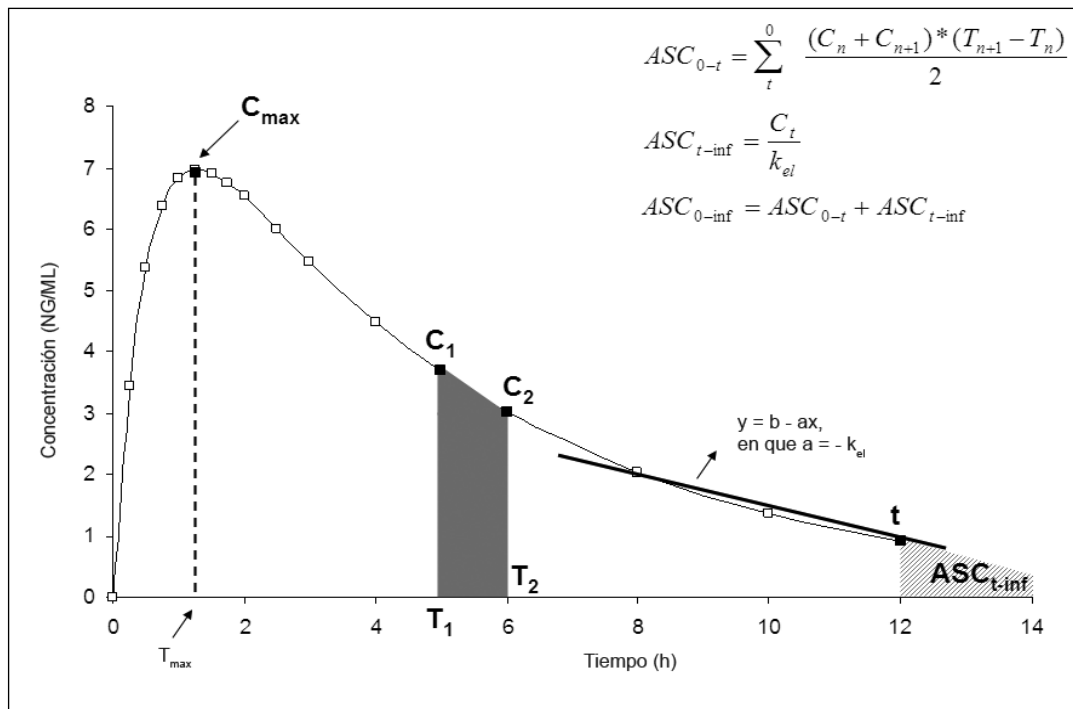
La Biodisponibilidad (BD) es definida como la velocidad y la extensión de la absorción de un fármaco, a partir de una forma farmacéutica que se torna disponible, para ejercer el efecto farmacológico pretendido. Dependiendo del objetivo y del diseño empleado en el estudio se determina la

Biodisponibilidad Absoluta (BDA) de un medicamento o la Biodisponibilidad Relativa (BDR) entre medicamentos.

La BDA se aplica a medicamentos innovadores que son desarrollados como formas farmacéuticas para administración por vías extravasculares. En general, corresponde a un ensayo cruzado, realizado en voluntarios sanos, constituido por dos períodos separados por un intervalo de tiempo denominado *washout*. En el primer período, los voluntarios son distribuidos aleatoriamente en dos grupos (A y B). Los voluntarios del grupo A reciben el medicamento a prueba por vía extravascular, mientras que a los voluntarios del grupo B se les administra, si es posible, la misma dosis del medicamento por vía intravascular. Las recolecciones de líquido biológico son realizadas de acuerdo con los procedimientos establecidos previamente y, después del intervalo de *washout*, se inicia el segundo período repitiéndose los procedimientos con los mismos voluntarios, invirtiéndose los grupos. Las concentraciones del fármaco en las muestras son cuantificadas empleándose método bioanalítico validado, lo que permite la construcción de las curvas de concentraciones *contra* tiempo para la realización de los cálculos de los parámetros farmacocinéticos relativos a la biodisponibilidad.

Cuando determinada para una forma farmacéutica administrada por vía oral, por ejemplo, la BDA corresponde a la fracción sistémica calculada con relación a la dosis administrada por vía intravascular, cuya biodisponibilidad es, por definición, igual a 100%. En el caso de que sea posible administrar la misma dosis del medicamento por las vías oral e intravascular y la BDA calculada sea igual a 80%, eso significa que el aprovechamiento de la dosis por vía oral no es completo, habiendo pérdida de 20% que puede estar relacionada a las características del fármaco (eliminación pre- sistémica) o de la formulación.

El cálculo de la biodisponibilidad es realizado utilizándose los siguientes parámetros farmacocinéticos: a) área bajo la curva de concentraciones del fármaco en el líquido biológico *contra* tiempo ( $ASC_{0-t}$ ), que expresa la cantidad de fármaco absorbido, o sea, la extensión de la absorción; b) concentración máxima alcanzada después de administración de la dosis ( $C_{max}$ ), que está relacionada a la velocidad del proceso de absorción y ocurre en el tiempo denominado T (**Figura 1**).



**Figura 1** - Representación de la curva de concentraciones plasmáticas de fármaco en función del tiempo después de administración de una dosis de medicamento por vía extravascular.

En el caso de un medicamento genérico o de un medicamento similar en adecuación, el desarrollo de la formulación debe estar dirigido a la obtención de un Equivalente Farmacéutico que, *in vivo*, no presente diferencias significativas con relación a la biodisponibilidad del medicamento de referencia, lo que es evaluado empleándose un estudio de BDR adecuadamente planeado y un criterio de aceptación aplicable.

La Bioequivalencia (BE) corresponde a un caso particular de la BDR y envuelve criterio de aceptación y análisis estadístico que posibilita concluir sobre la comparación de la biodisponibilidad entre dos medicamentos con riesgo previamente establecido. Dos medicamentos son considerados bioequivalentes y, por tanto, intercambiables, cuando los Intervalos de Confianza (IC) de 90% calculados para las razones de los promedios geométricos  $ASC_{0-t}(T) / ASC_{0-t}(R)$  y  $C_{max}(T) / C_{max}(R)$  se encuentran entre 80 y 125

considerándose T como el medicamento a prueba y R como el medicamento de referencia, criterio adoptado internacionalmente para la aceptación de la bioequivalencia.

#### FACTORES RELACIONADOS A LA BIODISPONIBILIDAD Y A LA DISOLUCIÓN DE MEDICAMENTOS

De forma general, los principales factores que pueden alterar la biodisponibilidad de medicamentos están relacionados al individuo (edad, sexo, peso corporal, factores fisiopatológicos asociados) y a las características del medicamento (fármaco, formulación y proceso de fabricación). En el caso de los factores ligados al individuo, su influencia debe ser minimizada al máximo, lo que ocurre

cuando el planeamiento del ensayo de biodisponibilidad es bien ejecutado, por medio de criterios de inclusión y exclusión bien definidos, la selección de un grupo de voluntarios representativo con relación a la población para el estudio y el empleo de un diseño experimental adecuado.

Entre los factores ligados al medicamento se citan: naturaleza química del fármaco; solubilidad; tamaño de partícula; polimorfismo; tipo y cantidad de excipientes; tiempo de mezcla y secado; técnica de granulación y compresión; inestabilidad del fármaco. En ese sentido, se considera indispensable la realización de estudios de pre-formulación y de aumento de escala para obtención de una formulación estable, a ser administrada por medio de una forma farmacéutica y una vía adecuadas al objetivo terapéutico. Así, el profesional involucrado en el desarrollo farmacotécnico debe conocer ampliamente las características físico-químicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco, seleccionando, también, los adyuvantes farmacotécnicos (excipientes) más adecuados, además de las mejores operaciones unitarias involucradas en la fabricación.

Entre las formas farmacéuticas más comúnmente utilizadas en la terapéutica, las formas sólidas de uso oral son aquellas que pueden originar problemas potenciales de biodisponibilidad debido a las características del fármaco, de la formulación, de los procesos empleados en la fabricación y de la vía de administración. En esos casos, después de la administración, el proceso de disolución del fármaco es fundamental para que él esté en solución y pueda ser absorbido, pudiendo ser un factor limitante para la absorción. No obstante, las suspensiones de uso oral o intramuscular, también, pueden ocasionar problemas, una vez que el proceso de disolución del fármaco, también, ocurre y sufre la influencia de los factores citados.

## PERFIL DE DISOLUCIÓN

El perfil de disolución puede ser definido como un ensayo *in vitro* que permite la construcción de la curva de porcentaje de fármaco disuelto en función del tiempo, empleándose, generalmente, las condiciones establecidas en la prueba de disolución descrito en la monografía del medicamento inscrita en la Farmacopea Brasileña o, en su ausencia, en otros compendios autorizados por la legislación vigente.

Para realización del perfil de disolución, en el caso de inexistencia de método de disolución farmacopeico, la empresa solicitante del registro debe desarrollar método analítico adecuado al producto evaluado de acuerdo con los parámetros descritos en la legislación vigente.

La evaluación del perfil de disolución es aplicable en los casos de desarrollo de formulaciones, control de calidad lote-a-lote, exención del estudio de bioequivalencia para

menores dosis (cuando el estudio de bioequivalencia es realizado con la mayor dosificación y los perfiles de disolución para las dosis consideradas son semejantes al perfil del biolote, las formulaciones de esas dosis son proporcionales y la farmacocinética es lineal dentro del intervalo entre la mayor y la menor dosificación) y alteraciones polvos-registro.

En el caso de medicamentos que serán sometidos al estudio de bioequivalencia, la evaluación del perfil de disolución comparativo en relación al medicamento de referencia es indispensable para el conocimiento del comportamiento de las formulaciones. Cuando los perfiles de disolución son semejantes, de acuerdo con los criterios aplicables, hay una indicación de que el medicamento prueba podrá ser bioequivalente al medicamento de referencia. No obstante, el método de disolución debe ser discriminativo, permitiendo detectar alteraciones significativas en las formulaciones y en los procesos de fabricación.

# 11 AGUA PARA USO FARMACÉUTICO

## INTRODUCCIÓN

En ese capítulo son considerados como agua para uso farmacéutico los diversos tipos de agua empleados en la síntesis de fármacos; en la formulación y producción de medicamentos; en laboratorios de ensayos; diagnósticos y demás aplicaciones, relacionados al área de la salud, inclusive como principal componente en la limpieza de utensilios, equipos y sistemas.

La estructura química del agua es peculiar, con un momento dipolo y gran facilidad en formar conexiones de hidrógeno. Esas propiedades tornan el agua un excelente medio para solubilizar, absorber, adsorber o suspender diversos compuestos, inclusive para llevar contaminantes y sustancias indeseables, que van a alterar la pureza y eficacia de un producto farmacéutico.

En vista de sus características, los procesos de purificación; almacenamiento y distribución deben garantizar que las especificaciones farmacopeicas sean atendidas, mantenidas y controladas adecuadamente.

Los requisitos de calidad del agua dependerán de su finalidad y empleo, y la elección del sistema de purificación destina atender al grado de pureza establecido. El usuario es responsable de la selección del tipo de agua adecuado a sus objetivos, así como por los controles y verificaciones necesarios, en intervalos que garanticen el mantenimiento de la calidad deseada. Él debe asegurar que el sistema presenta desempeño adecuado y capacidad para suministrar agua con el nivel de calidad establecido, para atender a los parámetros especificados en las monografías correspondientes.

En este capítulo no se abarca todo el tema y no hay propósito de sustituir la legislación, guías o monografías oficiales ya existentes sobre agua para fines farmacéuticos. Se tiene como finalidad presentar subsidios que posibilitan a los usuarios un mejor entendimiento de puntos fundamentales relativos a la calidad del agua en el momento de la obtención y durante la distribución y uso.

El control de la contaminación del agua es crucial, una vez que el agua tiene gran capacidad de agregar compuestos diversos y, también, de contaminarse nuevamente después de la purificación. Los contaminantes del agua son representados por dos grandes grupos: químico y microbiológico.

### Contaminantes químicos

Los contaminantes orgánicos e inorgánicos tienen orígenes diversos: de la fuente de alimentación; de la extracción de materiales con los cuales el agua entra en contacto; de la absorción de gases de la atmósfera; de residuos contaminantes, o residuos de productos utilizados en la limpieza y sanitización de equipos, entre muchos otros. Se incluyen aquí las endotoxinas bacterianas, resultantes de microorganismos

acuáticos gram negativos, contaminantes críticos que deben ser retirados adecuadamente.

Esos contaminantes pueden ser evaluados, principalmente, por los ensayos de carbono orgánico total – COT (5.2.30) y de conductividad (5.2.24). La conductividad, medida en microsiemens/cm, es recomendada para evaluar agua con gran cantidad de iones y su recíproco, la resistividad, en megohm.cm, es medida cuando hay baja concentración de iones disueltos.

La mayoría de los compuestos orgánicos puede ser retirada por ósmosis reversa, no obstante, aquellos con bajo peso molecular demandan técnicas adicionales, como la resina de cambio iónico, carbón activado u oxidación por ultravioleta u ozono, para ser retirados.

Los límites establecidos para los parámetros de los contaminantes químicos orgánicos e inorgánicos se destinan a proteger la salud y evitar que compuestos químicos críticos puedan interferir en la fase de pre-tratamiento de los sistemas de agua, considerando que, posteriormente, pueden ser de difícil eliminación.

### Contaminantes microbiológicos

Son representados principalmente por bacterias y presentan un gran desafío a la calidad del agua. Son originarios de la propia microbiota de la fuente de agua y, también, de algunos equipos de purificación. Pueden surgir, también, debido a procedimientos de limpieza y sanitización inadecuados, que llevan a la formación de biopelículas y, por consecuencia, instalan un ciclo continuo de crecimiento a partir de compuestos orgánicos que, en último análisis, son los propios nutrientes para los microorganismos. Son detectados y cuantificados por filtración en porosidad de 0,45 µm, para cultivo posterior del filtro en medio adecuado.

Las bacterias pueden afectar la calidad del agua por desactivar reactivos o alterar sustratos por acción enzimática, aumentar el contenido en COT, alterar la línea de base (ruido de fondo) en análisis espectrales y producir pirogénicos y endotoxinas.

El conteo de bacterias es reportado en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y, en general, aumenta con el tiempo de almacenamiento del agua. Los contaminantes más frecuentes son bastones gram- negativos, principalmente de los géneros *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Aeromonas* y *Acinetobacter*.

El estándar microbiológico es especificado, en paralelo a los contaminantes químicos, y consiste en la ausencia de coliformes totales y termotolerantes (microorganismos patogénicos de origen fecal), además de enterovirus, quistes y ooquistes de protozoarios, como *Giardia sp* y *Cryptosporidium sp* en muestra de 100 ml.

Para atender a esos límites, las estaciones de tratamiento utilizan procesos de desinfección con sustancias químicas conteniendo cloro u otros oxidantes, empleadas hace décadas, y consideradas relativamente seguras para los seres humanos. No obstante, esos oxidantes pueden reaccionar con el material orgánico de origen natural y generar productos secundarios de la desinfección, como trihalometanos, cloraminas o además dejar residuos de los propios desinfectantes. Esos productos indeseables requieren atención especial, por parte de los legisladores y usuarios.

Las cloraminas, en particular, pueden dañar irreversiblemente un equipo de dechloración integrante de un sistema de purificación, además de presentar riesgo de formación y liberación de amoníaco.

Además de esos dos grupos fundamentales de contaminantes, existen los particulados, constituidos por sílice, residuos de la tubería o coloides y que, además de ser un riesgo a la calidad del agua purificada, pueden provocar taponos y perjudicar gravemente el proceso de purificación, por reducir su desempeño, o hasta también causar daños irreversibles a los equipos. Pueden ser detectados por filtración, combinada con gravimetría o microscopía. Pero en general no es necesario identificar el tipo de partícula, apenas removerla.

En ese capítulo son abordadas algunas consideraciones acerca de los principales sistemas de purificación normalmente utilizados en la producción del agua para uso farmacéutico; sus principales aplicaciones; monitoreo y mantenimiento. Abarca, también, los parámetros de pureza establecidos para aquellos tipos de agua que no son cubiertos por la legislación vigente.

## TIPOS DE AGUA

Básicamente, hay tres tipos de agua para uso farmacéutico: el agua purificada (AP); el agua para inyectables (API) y el agua ultrapurificada (AUP), cuyas monografías se encuentran en esta Farmacopea. Compendios oficiales de otros países o internacionales especifican, además de estos, otros tipos de agua, como: envasadas en frascos, estériles o bacteriostáticas, para irrigación o inhalación. Sin embargo, todas poseen características de pureza semejante a los tipos fundamentales ya mencionados.

Además de eso es importante comentar, también, sobre el agua potable y el agua reactiva, que son ampliamente utilizadas y tienen aplicación directa en instalaciones farmacéuticas, principalmente en procedimientos generales de limpieza. Así, son considerados los cinco tipos de agua a continuación, con relación a sus características principales y las sugerencias de aplicación. Las monografías específicas, cuando disponibles, detallan los parámetros de pureza establecidos para cada tipo.

### *Agua potable*

Como directriz fundamental, el punto de partida para cualquier proceso de purificación de agua para fines farmacéuticos es el agua potable. Esa es obtenida por tratamiento del agua retirada de manantiales, por medio de procesos adecuados para atender a las especificaciones de la legislación brasileña relativa a los parámetros físicos, químicos, micro-

biológicos y radioactivos, para un determinado estándar de potabilidad y, por tanto, no posee monografía específica en ese compendio.

El agua potable es empleada, normalmente, en las etapas iniciales de procedimientos de limpieza y como fuente de obtención de agua de más alto grado de pureza. Puede ser utilizada, también, en la climatización térmica de algunos aparatos y en la síntesis de ingredientes intermediarios.

El control riguroso y el mantenimiento de conformidad de los parámetros de potabilidad del agua son fundamentales, críticos y de responsabilidad del usuario del sistema de purificación que será alimentado. El control debe ser periódico para garantizar que el sistema de purificación utilizado esté apropiado para las condiciones de la fuente de alimentación y que no hubo alteración en la calidad del agua suministrada. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones requiere tratamiento adicional del agua potable, sea por destilación, desionización, cambio iónico, ósmosis reversa, aislados o acoplados, u otro proceso adecuado para producir agua purificada, libre de la interferencia de contaminantes que puedan afectar la calidad de los medicamentos producidos. Otra variante del agua potable es el agua reactiva, descrita a continuación, con carácter informativo, pues no posee monografía específica.

### *Agua reactiva*

Es producida por uno o más procesos, como destilación simple, desionización, filtración, dechloración u otro, adecuado a las características específicas de su uso. Generalmente el agua reactiva es empleada en la limpieza de materiales y de algunos equipos y en la fase final de la síntesis de ingredientes activos y de excipientes. También, tiene aplicación en el abastecimiento de equipos, autoclaves, baño- maría y en histología. Deben ser adoptadas medidas para evitar la proliferación microbiana en los puntos de circulación, distribución y almacenamiento. Los principales parámetros que caracterizan el agua reactiva son: conductividad de 1,0 a 5,0  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (resistividad  $> 0,2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ ) y carbono orgánico total (COT)  $< 0,20 \text{ mg}/\text{L}$ .

### *Agua purificada (AP)*

El agua purificada es producida a partir del agua potable o del agua reactiva y debe atender a las especificaciones establecidas en la respectiva monografía. No contiene cualquier otra sustancia adicionada. Es obtenida por una combinación de sistemas de purificación, en una secuencia lógica, tales como múltiple destilación; cambio iónico; ósmosis reversa; electrodeionización; ultra filtración, u otro proceso capaz de atender, con la eficiencia deseada, a los límites especificados para los diversos contaminantes.

Es empleada como excipiente en la producción de formas farmacéuticas no parenterales y en formulaciones magistrales, siempre que no haya ninguna recomendación de pureza superior en su uso o que no necesite ser pirogénica. También, puede ser utilizada en el lavado de material, preparado de soluciones reactivas, medios de cultivo, tampones, diluciones diversas, microbiología en general, análisis clínicos, técnicas por Elisa o radioinmunoensayo, aplicaciones diversas en la mayoría de los laboratorios, principalmente



en análisis cualitativos o cuantitativos menos exigentes (determinaciones en porcentaje). Es utilizada en los ensayos y determinaciones que indiquen el empleo de agua, a no ser que haya especificación al contrario cuanto al nivel de pureza requerido, como por ejemplo, algunos métodos analíticos instrumentales y análisis que exijan agua pirogénica o de pureza química superior. Puede ser empleada en cromatografía a líquido de alta eficiencia, cuando confirmado que su empleo no afecta la exactitud ni la precisión de los resultados.

Dependiendo de la aplicación, puede ser esterilizada, sin necesariamente alcanzar el límite de endotoxinas bacterianas establecido para el *Agua para Inyectables*.

Necesita monitoreo de conteo del total de organismos aeróbicos viables, en la producción y almacenamiento, dado que no posee ningún inhibidor de crecimiento adicionado. Mínimamente, está caracterizada por conductividad de 0,1 a 1,3  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25,0 °C (resistividad > 1,0  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ) y COT < 0,50 mg/L, endotoxinas < 0,25 UI de endotoxina/ml y conteo total de bacterias < 100 UFC/ml, a no ser que especificado de forma diferente. Todo el sistema de obtención; almacenamiento y distribución debe ser debidamente validado y monitoreado cuanto a los parámetros de conductividad y conteo microbiano.

Aunque sea especificado un conteo microbiano máximo de 100 UFC/ml en la monografía, cada instalación o instalación productiva deberá establecer su límite de alerta o de acción, caso las características específicas de utilización sean más restrictivas, y definir límites apropiados.

#### *Agua ultrapurificada (A UP)*

El agua ultrapurificada posee baja concentración iónica, baja carga microbiana y bajo nivel de COT. Esa modalidad de agua es requerida en aplicaciones más exigentes, principalmente en laboratorios de ensayos, para dilución de sustancias de referencia, en control de calidad y en la limpieza final de equipos y utensilios utilizados en procesos que entren en contacto directo con la muestra que requiera agua con ese nivel de pureza. Es ideal para métodos de análisis que exigen mínima interferencia y máxima precisión y exactitud. La utilización de agua ultrapurificada en análisis cuantitativos de bajos contenidos de analito es esencial para obtención de resultados analíticos precisos. Otros ejemplos de aplicación del agua ultrapurificada son: análisis de residuos, entre ellos los trazos de elementos minerales, endotoxinas, preparaciones de calibradores, controles, sustancia química de referencia, espectrometría de absorción atómica en general, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometría de masa, procedimientos enzimáticos, cromatografía a gas, cromatografía a líquido de alta eficiencia (determinación de residuos en ppm o ppb), métodos en biología molecular y con cultivo celular etc. Debe ser utilizada en el momento en que es producida, o en el mismo día de la recolección.

El laboratorio debe utilizar el mismo tipo de agua requerida para la lectura final del análisis en la preparación de las muestras, en la obtención de la curva estándar, de controles, preparado de soluciones, blancos, lavado final del material y en todos los elementos de vidrio que estarán en contacto directo con la muestra, siempre que sea apropiado.

El agua ultrapurificada se caracteriza por conductividad de 0,055 a 0,1 a  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25,0 oC  $\pm$  0,5 oC (resistividad > 18,0  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ ), COT < 0,05 mg/L (algunos casos < 0,03 mg/L), endotoxinas < 0,03 UI de endotoxina/ml y conteo total de bacterias < 1 UFC/100 ml.

#### *Agua para Inyectables (API)*

Agua para Inyectables es utilizada como excipiente en la preparación de productos farmacéuticos parenterales de pequeño y gran volumen, en la fabricación de principios activos de uso parenteral, de productos estériles, demás productos que requieran el control de endotoxinas y no son sometidos a la etapa posterior de eliminación, así como en la limpieza y preparación de procesos, equipos y componentes que entran en contacto con las formas parenterales en la producción de fármacos. Esa modalidad engloba, también, el agua esterilizada para inyección, utilizada en la administración parenteral y el agua estéril para inyección, que es embalada en frasco hermético y esterilizada por tratamiento de calor.

El proceso de purificación de primera elección es la destilación, en equipo cuyas paredes internas sean fabricadas en metal apropiado, como el acero inoxidable AISI 316L, vidrio neutro o cuarzo. Alternativamente, el API, también, puede ser obtenida por proceso equivalente o superior a la destilación para la eliminación de contaminantes químicos y microorganismos, siempre que sea validado y monitoreado cuanto a los parámetros establecidos. El agua de alimentación debe ser, como mínimo, potable y, en general, necesitará ser pre-tratada para alimentar los equipos. El proceso es así especificado en razón de la robustez que tales equipos presentan cuanto a la operación y al desempeño.

El sistema de obtención, distribución y almacenamiento del agua debe ser validado y apropiado, para impedir la contaminación microbiana y la formación de endotoxinas bacterianas. Debe atender los requisitos establecidos en la monografía específica. El control será más riguroso cuando la aplicación sea para inyectables, que no permiten la ocurrencia de contaminación microbiana, ni de endotoxinas. La adición de uno o más agentes antimicrobianos al agua purificada estéril origina a agua bacteriostática estéril, que es empleada como diluyente de algunas preparaciones parenterales, embaladas en dosis individuales.

Otra variedad de agua es el agua de hemodiálisis, que es tratada para obtener la máxima reducción de contaminantes químicos y microbiológicos. Posee reglamento propio, con especificaciones de calidad y periodicidad específicas para el control, y no es contemplada en esta farmacopea.

El agua para inyectables debe atender a los ensayos físico-químicos aconsejados para el agua purificada, además de las pruebas de conteo total de bacterias < 10 UFC/100 ml, esterilidad, particulados y de endotoxinas bacterianas, cuyo valor máximo es de 0,25 UI de endotoxina/ml.

Algunos parámetros de calidad y sugerencias de aplicaciones son registrados, en la **Tabla 1**, para cada tipo de agua para uso farmacéutico.

Tabla 3 - Tabla 1 - Tipos de agua para uso farmacéutico y parámetros de calidad.

Tipo de Agua	Características	Parámetros críticos sugeridos	Ejemplos de Aplicación
Agua Potable	Obtenida de manantiales o de la red de distribución pública.	Posee legislación específica,	Limpieza en general y fuente de alimentación de sistemas de tratamiento
Agua Reactiva	Agua potable tratada por desionización o proceso. Posee baja exigencia de pureza	Conductividad de 1 a 5,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C $\pm$ 0,5 °C (resistividad > 0,2 M $\Omega$ -cm) COT < 0,20 mg/L	Lavado de material, abastecimiento de equipos, autoclaves, baño maría, histología, usos diversos.
Agua purificada	Niveles variables de contaminación orgánica y bacteriana. Exige cuidados para evitar la contaminación química y microbiológica. Puede ser obtenida por ósmosis inversa o por una combinación de técnicas de purificación a partir de la potable o de la reactivo.	Conductividad de 0,1 a 1,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C $\pm$ 0,5°C (resistividad > 1,0 M $\Omega$ -cm); COT < 0,50 mg/L; Conteo total de bacterias < 100 UFC/ml Ausencia de Pseudomonas y otros patógenos, agua	Producción de medicamentos y cosméticos en general, farmacias, lavado de material, preparado de soluciones reactivos, medios de cultivo, tampones, diluciones, microbiología en general, análisis clínicos, técnicas por Elisa, radioinmunoensayo, aplicaciones diversas en la mayoría de los laboratorios, principalmente en análisis cualitativos o cuantitativos menos exigentes (en %). En CLAE (en %).
Agua para inyectables	Agua purificada tratada por destilación o proceso y similar	Atiende a los requisitos químicos del agua purificada exige control de endotoxina, partículas y esterilidad de. Conteo microbiológico < 10UFC/100 ml. Endotoxinas < 0,25 UI de endotoxina/ml; COT < 0,50 mg/L	Como vehículo o solvente de inyectables, fabricación de principios activos de uso parenteral, lavado final de equipos, tubería y recipientes usados en preparaciones parenterales. Usada como diluyente de preparaciones parenterales.
Agua ultrapurificada	Para análisis que exigen mínima interferencia y máxima precisión y exactitud. Baja concentración iónica, baja carga microbiana y bajo nivel de carbono orgánico total. Agua purificada tratada por proceso complementario	Conductividad de 0,055 a 0,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25,0 °C $\pm$ 0,5 °C (resistividad > 18,0 M $\Omega$ -cm) COT < 0,05 mg/L (algunos casos < 0,003 mg/L) Conteo total de mesófilos < 1 UFC/100mL (se utilizada para fines farmacéuticos).	Dosificación de residuos minerales u orgánicos, endotoxinas, preparaciones de calibradores, controles, SQR, espectrometría de absorción atómica, ICP/IOS, ICP/MS, espectrometría de masa, procedimientos enzimáticos, cromatografía a gas, CLAE (ppm o ppb), biología molecular y cultivo celular etc. Eventualmente en preparaciones farmacéuticas que requieren agua de alta pureza

COT = Carbono orgánico total;

UFC/100 mL = Unidades formadoras de colonias; población microbiológica viable

**SISTEMAS DE PURIFICACIÓN DE AGUA – TECNOLOGÍAS DE PURIFICACIÓN** Los proyectos, instalaciones y operación de sistemas para producción de agua purificada, agua para inyectables y el agua ultrapurificada poseen componentes, controles y procedimientos similares. La diferencia reside en la presencia del parámetro endotoxinas bacterianas en el agua para inyectables y en sus métodos de preparación, específicamente en la última etapa. Esas similitudes de parámetros de calidad posibilitan establecer una base común para el proyecto de sistemas destinados a la obtención de AP, API o AUP, siendo el punto diferencial crítico, el grado de control del sistema y las etapas finales de purificación necesarias para retirar bacterias, endotoxinas bacterianas y reducir la conductividad.

Los procesos de obtención emplean operaciones unitarias secuenciales – las etapas de purificación – que están centradas en la eliminación de determinados contaminantes y en la protección de etapas de purificación subsiguientes. Nótese que la operación unitaria final para obtención de agua para inyectables es limitada a la destilación u otro proceso equivalente o superior, en la eliminación de contaminantes químicos, así como microorganismos y sus componentes. La tecnología de destilación es consagrada por su largo histórico de confiabilidad y puede ser validada para producción de agua para inyectables. Sin embargo, otras tecnologías o combinación de tecnologías pueden igualmente ser efectivas y validadas para esa finalidad. La ultrafiltración colocada en una secuencia después de otras tecnologías de purificación de contaminantes químicos puede ser adecuada para la producción de agua para inyectables demostrar la misma eficacia y confiabilidad de la destilación, en la validación. Actualmente, con la disponibilidad de nuevos materiales para tecnologías como ósmosis inversa y ultrafiltración, lo que permite operar y sanitizar en temperatura más elevada, para la reducción microbiana, surgen nuevas y promisoras aplicaciones validables para producir agua para inyectables.

El proyecto de instalación de un sistema de purificación de agua debe tener en cuenta la calidad del agua de suministro y del agua deseada al final, el caudal necesario, la distancia entre el sistema de producción y los puntos de uso, la disposición (*layout*) de la tubería y conexiones, el material empleado, facilidades de asistencia técnica y mantenimiento y los instrumentos adecuados para el monitoreo.

Las tecnologías de purificación aquí descritas se destinan a la eliminación de contaminantes en las diversas etapas de la secuencia de purificación. La elección y la orden en que son aplicadas dependerán principalmente de la calidad del agua potable de entrada, que determinará cuales etapas serán necesarias efectivamente. Las principales tecnologías son presentadas a continuación en una orden secuencial lógica, sin embargo ni todas son necesariamente obligatorias y son utilizadas conforme a la calidad del agua de entrada y el tipo de agua que se busca obtener.

#### *Pre-filtración*

También, conocida como filtración de profundidad o filtración inicial, se destina a retirar contaminantes particulados en la banda de tamaño entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , esencialmente para

proteger las tecnologías subsiguientes, utilizando filtros de arena o combinación de filtros.

#### *Adsorción por carbón vegetal activado*

Esa tecnología emplea la capacidad de adsorción del carbón vegetal activado en contacto con compuestos orgánicos o contaminantes, como las cloraminas. Además de eso, remueve agentes oxidantes por reducción química, en especial el cloro libre, que afecta otras tecnologías basadas en membrana, como la ósmosis inversa o la ultrafiltración.

La retirada de agentes desinfectantes propicia el crecimiento bacteriano y la formación de biopelícula, lo que implica en la necesidad de sanitización del propio carbón activado, con vapor directo o agua caliente, por ejemplo, y del control de partículas y conteo microbiano de su efluente.

#### *Tratamiento con aditivos químicos*

El uso de aditivos químicos se refiere aquellos que se destinan a ajustar el pH o a retirar carbonatos y amoníaco, para la protección de otras tecnologías, entre ellas la ósmosis inversa.

Como aditivos químicos pueden ser empleados: el ozono, comúnmente usado en el control de microorganismos y el metabisulfito, aplicado como agente reductor para cloro libre, en sustitución al carbón vegetal activado.

Los aditivos químicos son, necesariamente, retirados en alguna etapa posterior de purificación y no pueden dejar residuo en el agua final.

#### *Tratamiento con ablandadores*

En los casos en que el agua de alimentación es “dura”, se torna necesario usar los ablandadores. Esa tecnología emplea resinas regeneradoras de cambio iónico, que capturan los iones calcio y magnesio, y liberan iones sodio en la agua. El ablandamiento es utilizado en la protección de tecnologías sensibles a la incrustación, como la ósmosis inversa.

Aquí, también, existe la preocupación con la formación de biopelícula y es necesario controlar el conteo microbiano, con regeneración frecuente, recirculación u otras formas de reducción de conteo microbiano.

#### *Desionización y electrodeionización continua*

La desionización y la electrodeionización continua son tecnologías eficaces para la eliminación de sales inorgánicas disueltas. Los sistemas de desionización, también, conocidos como desionización convencional, producen agua purificada de uso rutinario, por medio de resinas de cambio iónico específicas para cationes o para aniones. Son polímeros orgánicos, generalmente sulfonados, en la forma de pequeñas partículas. Las resinas catiónicas capturan los iones liberando el ion  $\text{H}^+$  en la agua y las aniónicas liberan  $\text{OH}^-$ . Son regenerables con ácidos y bases, respectivamente. Ese proceso aislado no produce agua de alta pureza, por haber fuga de pequeños fragmentos de la resina, facilidad de crecimiento microbiano y por haber baja eliminación de orgánicos.

Los sistemas de electrodeionización continua combinan resinas catiónicas y aniónicas con membranas semipermeables y la aplicación de un campo eléctrico, promoviendo así la eliminación de iones de forma continua, eso es, sin necesidad de parada para regeneración.

En ambos los casos es necesario tener un control sobre la generación de partículas derivado de las regeneraciones sucesivas, además de microorganismos. Eso puede ser realizado, controlándose las regeneraciones, en el caso de la desionización, utilizándose recirculación del agua y aplicándose radiación UV para el control de microorganismos en la salida, cuya eficacia precisa ser comprobada.

#### *Ósmosis reversa*

La ósmosis reversa es una tecnología de purificación basada en membranas semi permeables y con propiedades especiales de eliminación de iones; microorganismos y endotoxinas bacterianas. Remueve 90 a 99% de la mayoría de los contaminantes. No obstante, diversos factores, como pH; presión diferencial a lo largo de la membrana; temperatura; tipo del polímero de la membrana y la propia construcción de los cartuchos de ósmosis reversa pueden afectar significativamente esa separación.

Las membranas de ósmosis reversa deben ser debidamente controladas cuanto a la formación de incrustaciones provenientes de sales de calcio, magnesio y otros, y de biopelícula, fuente crítica de contaminación microbiana y de endotoxinas. Por eso es imprescindible instalar un sistema de pre-tratamiento antes de la ósmosis reversa, que retire partículas y agentes oxidantes, y, en paralelo, debe hacerse, periódicamente, la sanitización del sistema. Esa práctica ayuda a aumentar la vida útil de las membranas y reduce la frecuencia de su regeneración.

Existen, también, los sistemas de ósmosis reversa de doble paso, en que el agua purificada por la primera etapa alimenta la segunda etapa, incrementando y complementando la purificación.

#### *Ultrafiltración*

Sistemas de ultrafiltración son frecuentemente utilizados en sistemas de agua para uso farmacéutico, para la eliminación de endotoxinas. La ultrafiltración es realizada utilizándose una membrana especial con la propiedad de retener moléculas conforme su peso molecular y estereoquímica. Se denomina de Corte Nominal de Peso Molecular “*cut off*” la banda utilizada para la separación de las partículas, caracterizado por el tamaño del peso molecular. En la eliminación de endotoxinas son utilizados filtros en la banda de 10 000 Da, que retiene moléculas con masa molecular, mayor o igual a 10 000 Da.

Esa tecnología puede ser usada en una etapa final o intermedia del sistema de purificación, siempre que validada, y, de la misma forma que la ósmosis reversa, requiere un pre-tratamiento, un control adecuado de las condiciones operacionales y procedimientos apropiados de limpieza y sanitización, para mantener la calidad del agua conforme lo establecido.

#### *Filtración con carga electrostática*

Ese tipo de filtración emplea cargas positivas en la superficie de las membranas y se destina a reducir los niveles de endotoxinas que poseen naturaleza eléctrica negativa. Presentan una capacidad marginal de eliminación de microorganismos, sin embargo su mayor eficiencia es debido a la eliminación de endotoxinas. Presenta una limitación importante: cuando las cargas están totalmente neutralizadas, por saturación por la captura de las endotoxinas, la eliminación se paraliza. Por esa razón, filtros con carga electrostática son extremadamente difíciles de validar, dada esa imprevisibilidad, cuanto al momento en que efectivamente no más retiene esos contaminantes.

#### *Microfiltración – retención de microorganismos*

Esa tecnología utiliza membranas microporosas, con una especificación de tamaño de poro de 0,2, o 0,22  $\mu\text{m}$ . Deben ser validadas cuanto a la retención, por medio de una prueba bacteriológica, que determina el valor de la reducción logarítmica de los microorganismos en las membranas. El modelo usado actualmente emplea una suspensión de *Brevundimonas diminuta* a 107 UFC/cm<sup>2</sup> de área filtrante, y prueba la esterilidad del filtrado. Aunque la membrana sea especificada como 0,2 o 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, no necesariamente será esterilizante, si no produce un filtrado estéril por medio de esa prueba, o sea, un valor de reducción logarítmica igual a 7. En el caso que la reducción logarítmica obtenida no sea de siete, la membrana puede ser utilizada para reducir la flora microbiana, sin embargo no sirve para esterilizar.

La microfiltración es aplicada, igualmente, en la filtración de gases, o ventilación de tanques de almacenamiento, para evitar contaminación del agua en ellos contenida. En esos casos, se utilizan membranas hidrofóbicas, para que el filtro opere sin acumulación de agua condensada, a partir de la humedad del propio aire.

#### *Radiación ultravioleta (UV)*

La radiación UV es utilizada en sistemas de purificación de agua en dos largos de onda: 185 nm + 254 nm, que promueven dos efectos:

- 185 nm + 254 nm – Oxidación de compuestos orgánicos y consecuente reducción de su concentración, para atender a los límites de la AP, AUP y API;
- 254 nm – Acción germicida en los diversos puntos de la secuencia de purificación, donde es necesario reducir el conteo microbiano.

Para la oxidación de orgánicos el agua debe estar en la etapa final de la purificación, y esa eliminación será más efectiva cuanto menor sea la carga de contaminantes. Otra limitación es la presencia de partículas, que se pueden depositar en la superficie de la lámpara, disminuyendo la intensidad de la radiación, y perjudicar la eficiencia del método. Se debe considerar además la profundidad / espesor del lecho de agua, el flujo de agua en el local de la radiación y la potencia y tiempo de uso de la fuente de radiación.



### Destilación

En instalaciones industriales puede haber destiladores simples, de múltiples efectos y los de compresión de vapor, que son usados, en general, para sistemas de producción de grandes volúmenes. El agua de alimentación para esos equipos requiere controles diferentes de aquellos usados en ósmosis reversa. En ese caso, la concentración de silicatos es crítica, como en cualquier sistema de generación de vapor. Otro aspecto importante es la posibilidad de acarreamiento de compuestos volátiles en el condensado. Eso es especialmente importante en lo que se refiere a impurezas orgánicas, como trihalometanos y gases disueltos en la agua, como dióxido de carbono y amoníaco. Así, el control del agua potable de entrada, conforme mencionado sobre el agua de alimentación para sistemas de purificación, es fundamental.

### DISTRIBUCIÓN, SANITIZACIÓN, ALMACENAMIENTO Y VALIDACIÓN

#### Distribución

El diseño del sistema de distribución debe tener en cuenta la recirculación constante del agua purificada y el mantenimiento de la temperatura del agua contenida en el tanque. Caso necesario, deberá contar con un regulador de calor para suministrar agua más fría a los puntos de uso.

Tuberías, válvulas, instrumentos y otros dispositivos deben tener construcción y acabado sanitario, para no contribuir para que ocurra la contaminación microbiana y ser sanitizados.

No deben ser utilizados filtros de retención microbiológica en la salida, o en el retorno de los sistemas de distribución, pues son repositorios de microorganismos retenidos y, por tanto, una fuente crítica para la formación de endotoxinas.

Los puntos de uso deben ser proyectados para evitar volúmenes muertos y posibilitar que el agua recircule totalmente en ellos cuando estén cerrados.

#### Sanitización

Diversos son los métodos de sanitización de los sistemas de producción, almacenamiento o distribución

El material de construcción del sistema debe ser resistente a los agentes empleados y la temperatura utilizada en el proceso es crítica. Es común utilizar temperaturas de 80 °C o de 65 °C, con circulación continua del agua. Sin embargo, para impedir la formación de biopelículas normalmente es empleada una combinación de calor y agentes químicos en la sanitización. El procedimiento de sanitización debe ser debidamente validado.

Como agentes químicos, generalmente son usados oxidantes, como los compuestos halogenados, peróxido de hidrógeno, ozono o una combinación de esos. La frecuencia de la sanitización es determinada por el histórico de los resultados del monitoreo y de las curvas de tendencia, de forma que el sistema funcione sin exceder el límite de alerta.

### Almacenamiento

Las condiciones de almacenamiento deben ser adecuadas a la calidad del agua. El agua ultrapurificada no debe ser almacenada por período superior a 24 horas.

La directriz fundamental para el almacenamiento del agua purificada, del agua ultrapurificada, o del agua para inyectables es tener en cuenta que, cuanto mayor el grado de purificación del agua, más rápidamente ella tiende a recontaminarse.

Siendo así, el agua debe ser mantenida en recirculación constante, por medio de su sistema de distribución, siempre que sea aplicable. Las primeras porciones de agua producida por un sistema de purificación que haya quedado inactivo por más de cuatro horas deben ser descartadas, proporcionalmente al volumen muerto del recipiente. Esas variables deben ser validadas, para las condiciones específicas de cada sistema, así como, establecidos los parámetros a ser evaluados en la validación.

El depósito utilizado para su mantenimiento debe ser apropiado a los fines a que se destina, compuesto por material inerte, limpio y no servir de fuente de contaminación al contenido. El material de construcción debe presentar características y rugosidad apropiadas para dificultar la adherencia de residuos, la formación de biopelícula y corrosión por los agentes sanitizantes. El acero inoxidable 316L electropulido, con rugosidad menor que 0,5 microRA, es la elección más frecuente para atender a esas exigencias. El depósito debe estar protegido de fuentes de luz y calor impropios y la geometría debe permitir su agotamiento total por el fondo, sin volúmenes muertos.

Procedimientos adecuados deben ser adoptados para evitar la contaminación por particulados, orgánicos o microorganismos. Debe poseer un filtro de "respiración" / ventilación para evitar que haya contaminación del volumen del tanque por la admisión de aire / humedad, contaminados y evitar una recontaminación por esa vía.

En particular, pero no exclusivamente, depósitos de agua para inyectables deben ser encamisados, para mantener el agua circulante en temperatura superior a 80° C, que restringe significativamente el crecimiento bacteriano.

#### Validación

El propósito fundamental de la validación es asegurar la confiabilidad de un sistema de purificación de agua, envolviendo su obtención, almacenamiento, distribución y calidad en el punto de uso.

La validación incluye la calificación del proyecto (QP); de la instalación (QI); de la operación (QO) y del desempeño (QD).

El plano de validación para un sistema de agua envuelve las siguientes etapas:



- a) conocer el estándar de calidad de la fuente de alimentación;
- b) establecer el estándar de calidad del agua purificada;
- c) definir las tecnologías de purificación y su secuencia, a partir de la calidad del agua de entrada;
- d) seleccionar los materiales de construcción de los sistemas de producción, almacenamiento, distribución y monitoreo de los puntos de uso;
- e) desarrollar los protocolos de calificación de proyecto, instalación, operación y desempeño;
- f) establecer los parámetros críticos, niveles de alerta y de acción y la periodicidad de sanitización y de monitoreo;
- g) establecer un plan de mantenimiento de la validación, que incluirá mecanismos para el control de cambios en los sistemas de agua y proporcionará subsidios para un programa de mantenimiento preventivo.

Los protocolos de calificación deben estar previamente aprobados antes de su ejecución.

#### MONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA

El proceso empleado en la producción de agua para uso farmacéutico debe ser validado y, sistemáticamente, los parámetros establecidos en la legislación y en las monografías específicas de cada tipo de agua deben ser verificados.

El monitoreo de la calidad del agua debe envolver todos los puntos críticos y representativos del sistema, de acuerdo con el planeamiento establecido, de forma consistente y continua.

Así, deben ser establecidos procedimientos operacionales y de sanitización, un programa de monitoreo completo, con mantenimiento preventivo y un sistema de control de cambios, que determine cuidadosamente si el sistema necesitará ser revalidado después de cualquier modificación.

Las cuestiones temporales que pueden afectar la calidad del agua de la fuente de suministro deben ser consideradas en la elaboración del plan. La frecuencia de recolección de las muestras es definida en la validación del sistema, así como los ensayos necesarios para garantizar el mantenimiento de la calidad del agua requerida. Cualquier alteración en el plan original debe ser re evaluada.

Los equipos y aparatos utilizados en las verificaciones deben ser capaces de suministrar la lectura en la banda requerida para la pureza establecida. Los equipos utilizados deben estar debidamente calibrados. Las verificaciones realizadas deben ser registradas en formulario propio, en que conste, por lo menos, el(los) parámetro(s) medido(s), la fecha de la medición, el valor obtenido, la banda de aceptación y el responsable de la lectura. El personal que realiza esa tarea debe conocer el plan de muestreo y los métodos utilizados, así como los límites de alerta y de acción establecidos. Caso el usuario externalice ese control, debe garantizar que el De acuerdo con definición de la OMS, estándares de referencia farmacopeicos (PRef) son productos de uniformidad reconocida, destinados al uso en ensayos donde una o más de sus propiedades será(n) com-

parada(s) con la(s) de la sustancia en examen. Poseen un grado de pureza adecuado al uso al cual se destinan.

El PRef es establecido y distribuido por autoridades farmacopeicas, cuyo valor atribuido a una o más de sus propiedades es aceptado sin necesitar comparación con otro estándar, destinado al uso en ensayos específicos descritos en las monografías farmacopeicas. Incluyen sustancias químicas de referencia, productos biológicos, extractos y polvos vegetales, radiofármacos, entre otros. La expresión relacionada más usada es: Sustancia Química de Referencia Farmacopeica. Es establecida y distribuida por autoridades respectivo cumpla con los requisitos y procedimientos definidos.

Los datos obtenidos son comparados con las especificaciones típicas y los límites de alerta y de acción. Esos son establecidos por el usuario, que conoce tanto el histórico del sistema de purificación y distribución, como las exigencias de calidad para una determinada aplicación, y basado en la validación.

En la mayoría de las aplicaciones, el monitoreo del agua de uso farmacéutico se basa en el control microbiológico y en los parámetros que aseguren el mantenimiento de la calidad del agua deseada. En general, no es necesario identificar los microorganismos presentes, pero si, proceder al conteo total de bacterias, por medio de método adecuado para cubrir una amplia gama de organismos. Muestras conteniendo agentes sanitizantes deben ser neutralizadas antes de proceder al análisis. Los ensayos microbiológicos deben ser realizados después de corto intervalo de tiempo de la recolección de la muestra, o esa deberá ser refrigerada adecuadamente y por tiempo determinado, para preservar las características originales.

El monitoreo físico-químico acompaña, principalmente, la conductividad y el carbono orgánico total, que también pueden ser medidos en línea. Esos ensayos abarcan una amplia gama de contaminantes inorgánicos. En el caso que la muestra no sea analizada luego de la recolección, debe ser preservada y almacenada en condiciones que garanticen su integridad y conservación y por período adecuado. Dependiendo de la aplicación requerida los parámetros críticos a ser monitoreados pueden variar.

El usuario debe definir los límites de alerta y de acción, para evitar la utilización del producto con especificación de calidad inferior a la requerida para una dada aplicación. El límite de alerta indica un aviso de desvío de la calidad y no necesariamente requiere una medida correctiva. Puede ser establecido con base en un análisis estadístico del histórico de tendencias, utilizando dos desvíos-estándar, por ejemplo, o cerca de 70% del límite de acción, o a 50% del conteo del número de unidades viables, lo que fuese menor. El límite de acción indica que el desvío de la calidad excedió los parámetros tolerables y requiere interrupción de la actividad para la corrección farmacopeicas, y es ampliamente reconocida como teniendo grado de pureza apropiado, dentro de un contexto específico y cuyo valor, cuando utilizado como referencia analítica, es aceptado sin requerir comparación con otra sustancia química.

# 12 SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA

De acordo com definição da OMS, padrões de referência farmacopeicos (PRef) são produtos de uniformidade reconhecida, destinados ao uso em ensaios onde uma ou mais de suas propriedades será(ão) comparada(s) com a(s) da substância em exame. Possuem um grau de pureza adequado ao uso ao qual se destinam.

O PRef é estabelecido e distribuído por autoridades farmacopeicas, cujo valor atribuído a uma ou mais de suas propriedades é aceito sem necessitar comparação com outro padrão, destinado ao uso em ensaios específicos descritos nas monografias farmacopeicas. Incluem substâncias químicas de referência, produtos biológicos, extratos e pós vegetais, radiofármacos, entre outros. A expressão relacionada mais usada é: Substância Química de Referência Farmacopeica. É estabelecida e distribuída por autoridades farmacopeicas, e é amplamente reconhecida como tendo grau de pureza apropriado, dentro de um contexto específico e cujo valor, quando utilizado como referência analítica, é aceito sem requerer comparação com outra substância química.

## SUSTANCIA QUÍMICA DE REFERENCIA DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA (SQR-FB)

Es establecida y distribuida por la Dirección de la Farmacopea Brasileña, siguiendo los principios de la OMS, y oficializada por la Anvisa, siendo su uso obligatorio en todo territorio nacional. En la ausencia de una SQR-FB es permitido el uso de SQR establecida por otras farmacopeas reconocidas, conforme legislación vigente.

## SUSTANCIA QUÍMICA DE TRABAJO

Es establecida por comparación con una SQR Farmacopeica, por medio de ensayos farmacopeicos, o debidamente validados, y registrados por el propio laboratorio que irá a utilizarla. En esa situación, deberán ser mantenidos los registros analíticos y realizados controles periódicos, empleándose una SQR Farmacopeica.

## SUSTANCIA QUÍMICA CARACTERIZADA

SQR utilizada en la inexistencia de una SQR Farmacopeica. Esa SQR debe ser caracterizada por medio de ensayos adecuados y los valores obtenidos deben ser debidamente documentados.

## ASPECTOS GENERALES DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS DE REFERENCIA DE LA FARMACOPEA BRASILEÑA (SQR-FB)

Las Sustancias Químicas de Referencia de la Farmacopea Brasileña (SQR-FB) son estándares de referencia farmacopeicos, cuya producción está bajo la coordinación del Comité Técnico Temático de Material de Referencia (CTT

– MR) de la Farmacopea Brasileña, en consonancia con las directrices de la Comisión de la Farmacopea Brasileña.

Las SQR-FB son establecidas y monitoreadas de acuerdo con los principios de la OMS, con la colaboración de laboratorios públicos y privados, por medio de estudios interlaboratoriales que utilizan un protocolo analítico previamente desarrollado y validado, originando un producto de elevada calidad, cuyo valor atribuido a una o más de sus propiedades físicas y/o químicas no necesita comparación con otra SQR.

Métodos analíticos utilizan, frecuentemente, equipos sofisticados para facilitar la precisión y rapidez del procedimiento utilizado, basándose en medidas relativas, que necesitan de estándares de referencia para obtención de los resultados.

Las SQR-FB son desarrolladas para auxiliar en la ejecución de ensayos descritos en las monografias de la FB. Su grado de pureza puede variar de acuerdo con el ensayo al cual se destina. El valor declarado es específico para el ensayo descrito en la FB.

Las SQR-FB deben ser almacenadas y manipuladas adecuadamente a fin de obtener resultados confiables cuando utilizadas. Deben ser almacenadas en los frascos originales, cerrados y en condiciones de temperatura y humedad de acuerdo con las especificaciones constantes en el rótulo y/o certificado de análisis.

Las cantidades suministradas en cada frasco de SQR-FB son adecuadas para un determinado número de análisis, a fin de evitar problemas con la exposición excesiva del material. Sin embargo, las cantidades y su valor destinan estimular el uso directo de SQR-FB, sin la necesidad del establecimiento de estándares derivados.

Cuando indicada a secado del material antes del uso, ese procedimiento nunca será realizado en su embalaje original, pero sí transfiriendo parte del material para otro recipiente. Después del uso, el material desecado no debe ser retornado al frasco original, evitando posibles contaminaciones.

La validez de determinado lote debe ser acompañada por el usuario a través de la página web de la Farmacopea Brasileña en internet, que informará el lote vigente, la retirada de lotes en uso y la disponibilidad de nuevos lotes. En esta página web constan, también, las informaciones para la adquisición de los estándares de referencia farmacopeicos.



# 13 SUSTANCIAS COLORANTES

13

Sustancia colorante es cualquier compuesto orgánico o inorgánico, natural o sintético que, independiente de poseer o no actividad farmacológica, es adicionado a las formas farmacéuticas con la finalidad única de colorearlas o de alterar su color original.

Las sustancias colorantes utilizadas son de dos tipos:

- colorantes;
- pigmentos.

La diferencia básica entre pigmentos y colorantes está en el tamaño de partícula y en la solubilidad en el medio en que es insertado. Los pigmentos poseen, en el general, tamaño de partícula mayor y son insolubles en agua, mientras que colorantes son moléculas solubles en agua. Puede afirmarse que los colorantes son empleados en soluciones y los pigmentos en suspensiones. Además de eso, los pigmentos tienen mayor estabilidad química y térmica que los colorantes.

La solubilidad del colorante puede ser determinada por la presencia de ciertos grupos químicos en la estructura del compuesto, los cuales pueden ocasionar las diferencias entre pigmentos y colorantes.

Los colorantes utilizados son, en su mayoría, de origen sintético y pueden ser, de modo general, clasificados en uno de los siete grupos químicos, descritos a continuación:

- Grupo Indigoide;
- Grupo Xantina;
- Grupo Azo;
- Grupo Nitro;
- Grupo Trifenilmetano;
- Grupo Quinolina;

- Grupo Antraquinona;

Los colorantes también pueden ser subdivididos en colorantes azoicos (los que contienen agrupamientos  $-N=N-$ ) y no azoicos (que pertenecen a una amplia variedad de clases químicas). La mayoría de los colorantes de uso más frecuente es del tipo no azoico, siendo la eritrosina, el índigo / carmín y el amarillo de quinolina los tres más ampliamente conocidos.

De los pigmentos, dos son los tipos utilizados: óxido de hierro (negro, rojo y amarillo), y dióxido de titanio, que es blanco y también es empleado en el revestimiento de comprimidos, para prevenir la fotodegradación de componentes de la formulación sensibles a la luz, o además, para obtener envoltorios de cápsulas opacos.

Los colorantes pueden ser clasificados, de acuerdo con el Food and Drug Administration (*FDA*) en:

- colorantes designados como FD&C pueden ser empleados en alimentos, medicamentos y cosméticos;
- colorantes designados como D&C son autorizados para uso en medicamentos y cosméticos;
- colorantes D&C de uso externo presentan empleo restringido a los medicamentos y cosméticos aplicados externamente;

A los medicamentos destinados a la aplicación por vía oral, rectal, vaginal o cutánea pueden ser añadidas sustancias colorantes constantes de la relación a continuación (**Tabla 1**) o de la mezcla de estas sustancias en los casos y en cantidades compatibles con las buenas prácticas de fabricación farmacéutica. Las sustancias colorantes empleadas deben satisfacer las exigencias descritas en las respectivas monografías.

Tabla 1 - Relación de colorantes permitidos.

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
AMARILLO	AMARILLO CREPÚSCULO	2783-94-0	AMARILLO 6 INS 110	FD&C YELLOW #6	DISODIUM (5E)-6-OXO-5-[(4-SULFONATOPHENYL)HYDRAZINYLIDENE]NAPHTHALENE-2-SULFONATE	15985	741706	E110	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos en general. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	AMARILLO CREPÚSCULO, LACA DE ALUMINIO	15790-07-5	AMARILLO 6 LACA DE ALUMINIO INS 110	FD&C YELLOW #6 ALUMINUM LAKE	ALUMINUM 6-OXIDO-5-(4-SULFONATOPHENYL) DIAZENYL NAPHTHALENE-2-SULFONATE	15985:1	741706	E110	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos en general. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	AMARILLO DE QUINOLINA	8004-92-0	AMARILLO 10	D&C YELLOW #10; QUINOLINE YELLOW	2-(2-QUINOLYL)-1,3-INDANDIONE DISULFONIC ACID DISODIUM SALT	47005	741710	E104	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	AMARILLO DE QUINOLINA, LACA DE ALUMINIO	68814-04-0	AMARILLO 10 LACA DE ALUMINIO	D&C YELLOW #10 ALUMINUM LAKE; QUINOLINE YELLOW ALUMINUM LAKE	ALUMINUM 2-(2-QUINOLYL)-1,3-INDANDIONE DISULFONIC ACID DISODIUM SALT	47005:1	741710	E104	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	AMARILLO DE QUINOLINA SOLUBLE	92874-95-8	AMARILLO 11	D&C YELLOW # 11	2-QUINOLIN-2-YLINDENE-1,3-DIONE	4700	741711	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de aplicación tópica. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	AMARILLO FLUORESCÉINA	6417-85-2	FLUORESCÉINA; AMARILLO 7	D&C YELLOW # 7; FLUORESCÉINE	3'',6''-DIHYDROXYSPIRO[2-BENZOFURAN-3,9''-XANTHENE]-1-ONE	45350:1	741707	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de aplicación tópica. No permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.



Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
AMARILLO	CURCUMINA	458-37-7	AMARILLO CURCUMINA; CÚRCUMA	TURMERIC OLEORESIN	(1E,6E)-1,7-BIS(4-HYDROXY-3-METHOXYPHENYL) HEPTA-1,6-DIENE-3,5-DIONE	75300	73615	E100	Permitidas para todos los tipos de productos, incluyendo alimentos
AMARILLO	ÓXIDO DE HIERRO AMARILLO	51274-00-1	ÓXIDO DE HIERRO AMARILLO	YELLOW IRON OXIDE	ÓXIDOS DE HIERRO OBTENIDOS POR SÍNTESIS, INCLUSIVE SUS FORMAS HIDRATADAS O COMBINACIONES DE MÁS DE UN DE ESTOS ÓXIDOS	77492	731200	E172	Utilizado en medicamentos de administración oral (no excediendo dosis diaria de 5 mg de Fe) y uso tópico. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	RIBOFLAVINA	83-88-5	VITAMINA B2 LACTOFLAVINA	RIBOFLAVIN	7,8-DIMETHYL-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-TETRAHYDROXYPENTYL] BENZO[G]PTERIDINE-2,4-DIONE	N/C	73450	E101	Permitidas para todos los tipos de productos, incluyendo alimentos
AMARILLO	TARTRAZINA	1934-21-0	AMARILLO DE TARTRAZINA; AMARILLO 5 INS 102	FD&C YELLOW #5	TRISODIUM (4E)-5-OXO-1-(4-SULFONATOPHENYL)-4-[(4-SULFONATOPHENYL) HYDRAZINYLDENE] PYRAZOLE-3-CARBOXYLATE	19140	741705	E102	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de uso externo e interno. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AMARILLO	TARTRAZINA, LACA DE ALUMINIO	12225-21-7	AMARILLO DE TARTRAZINA LACA DE ALUMINIO; AMARILLO 5 LACA DE ALUMINIO INS 103	FD&C YELLOW #5 ALUMINUM LAKE	ALUMINUM; 4-[[3-CARBOXY-5-OXO-1-(4-SULFOPHENYL)-4H-PYRAZOL-4-YL] DIAZENYL] BENZENESULFONATE; 4-[[3-CARBOXY-5-OXO-1-(4-SULFOPHENYL)-4H-PYRAZOL-4-YL] DIAZENYL] BENZENESULFONATE	19140:1	741705	E102	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de uso externo e interno. No permitido en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AZUL	AZUL BRILLANTE	3844-45-9	AZUL N. 1 INS 133	FD&C BLUE #1	DISODIUM 2-[[4-[ETHYL-(3-SULFONATOPHENYL) METHYL] AMINO]PHENYL]-[4-[ETHYL-(3-SULFONATOPHENYL) METHYL] AZANIUMYLIDENE] CYCLOHEXA-2,5-DIEN-1-YLIDENE] METHYL] BENZENESULFONATE	42090	741101	E133	Utilizado en medicamentos de uso externo e interno cosméticos y alimentos. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
AZUL	AZUL BRILLANTE, LACA DE ALUMINIO	68921-42-6	AZUL N.1 LACA DE ALUMINIO INS 133	FD&C BLUE #1 ALUMINUM LAKE	3-[[ETHYL-[[4-[[4-ETHYL-[[3-SULFOPHENYL]METHYL]AMINO]PHENYL]-(2-SULFOPHENYL)METHYLIDENE]CYCLOHEXA-2,5-DIEN-1-YLIDENE]AZANIUMYL]METHYL] BENZENESULFONATE	42090:2	741101	E133	Utilizado en medicamentos de uso externo e interno cosméticos y alimentos. No permitido en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
AZUL	AZUL DE INDIGOTINA	860-22-0	AZUL N. 2; INDIGOTINA; ÍNDIGO CARMIN; INS 132	FD&C BLUE #2	DISODIUM (2E)-3-OXO-2-(3-OXO-5-SULFONATO-1H-INDOL-2-YLIDENE)-1H-INDOLE-5-SULFONATE	73015	741102	E132	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de administración por vía oral
AZUL	AZUL DE INDIGOTINA, LACA DE ALUMINIO	16521-38-3	AZUL N. 2 LACA DE ALUMINIO INS 132	FD&C BLUE #2 ALUMINUM LAKE	ALUMINUM (2E)-3-OXO-2-(3-OXO-5-SULFO-1H-INDOL-2-YLIDENE)-1H-INDOLE-5-SULFONIC ACID	73015	741102	E132	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de administración por vía oral
AZUL	AZUL PATENTE, SAL DE CALCIO	3536-49-0	AZUL PATENTE V; ACID BLUE 3;	ACID BLUE 3	ETHANAMINIUM, N-[[4-[[4-(DIETHYLAMINO)PHENYL]PHENYL]-(5-HYDROXY-2,4-	42051	1356	E131	Permitido para todos los tipos de productos.
AZUL	AZUL PATENTE, SAL DE SODIO	129-17-9	ACID BLUE 1; FOOD BLUE 3; CARMINE BLUE; AZUL PATENTE VS	ACID BLUE 1	ETHANAMINIUM, N-[[4-[[4-(DIETHYLAMINO)PHENYL] (2,4-DISULFOPHENYL)METHYLENE]-2,5-CYCLOHEXADIEN-1-YLIDENE]N-ETHYL-, INNER SALT, SODIUM SALT (1:1)	42045	1355	E131	Permitido para todos los tipos de productos.
AZUL	CLORURO DE METILTIONINIO	61-73-4	AZUL DE METILENO	METHYLTHIONIUM CHLORIDE; BASIC BLUE 9	3,7-BIS(DIMETHYLAMINO)PHENOTHIAZIN-5-IUM CHLORIDE	52015			Utilizado en medicamentos, incluyendo como contraste.

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
BLANCO	CARBONATO DE CALCIO	72608-12-9	CARBONATO DE CALCIO	CALCIUM CARONATE	CALCIUM CARBONATE	72220	731070	N/C	Utilizado en medicamentos. Permitido para uso general, no siendo permitida la utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
BLANCO	DIÓXIDO DE TITANIO	13463-67-7	DIÓXIDO DE TITANIO	TITANIUM DIOXIDE	DIOXOTITANIUM	77891	731575	E171	Utilizado en medicamentos. Permitido para uso general incluyendo el área de los ojos, no siendo permitida la utilización en suturas quirúrgicas, formas farmacéuticas inyectables.
NARANJA	ANNATTO	8015-67-6	NARANJA N. 4	ANNATTO	(2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E,16Z,18E)-4,8,13,17-TETRAMETHYLI COSA-2,4,6,8,10,12,14,16,18-NONAENEDIOIC ACID	75120	731030	E160B	Utilizado en medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos) e interno (excluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
NARANJA	BETA CAROTENO	9000-07-1	NARANJA ALIMENTO 5	BETACAROTENE	1,3,3-TRIMETH YL-2-[(1E,3E,5E,7E,9E,11E,13E,15E,17E)-3,7,12,16-TETRAMETHYL-18-(2,6,6-TRIMETHYLCYCLOHEXEN-1-YL)OCTADEC-1,3,5,7,9,11,13,15,17-NONAENYL]CYCLOHEXENE	48800	731095	E160E	Utilizado en medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos) e interno (excluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
NARANJA	BETA-APO-CAROTENAL	4172-46-7	INS 160E	ALL-TRANS-BETA-APO-8"-CAROTENAL	(2E,4E,6E,8E,10E,12E,14E,16E)-2,6,11,15-TETRAMETHYL-17-(2,6,6-TRIMETHYLCYCLOHEXEN-1-YL)HEPTADEC-2,4,6,8,10,12,14,16-OCTAENAL	40820	N/C	E160E	Utilizado en medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos) e interno (excluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
NARANJA	NARANJA SOLAR	633-96-5	NARANJA PERSIA	D&C ORANGE # 5	SODIUM 4-[(2E)-2-(2-OXONAPHTHALEN-1-YLIDENE)HYDRAZINYL] BENZENESULFONATE	15510	741255	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos) no excediendo dosis diaria de la droga de 5mg. No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
MARRON	CARAMELO	8028-89-5	MARRON NATURAL 10	CARAMEL	EN LA			E150A	Utilizado en medicamentos de uso tópico y de administración oral. No permitida la utilización en la área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables
NEGRO	OXIDO DE HIERRO NEGRO	12227-89-3	OXIDO DE HIERRO NEGRO	BLACK IRON OXIDE	OXIDOS DE HIERRO OBTENIDOS POR SINTESIS, INCLUSIVE SUS FORMAS HIDRATADAS O COMBINACIONES DE MÁS DE UN DE ESTOS ÓXIDOS	40800	731095	E160E	Utilizado en medicamentos de uso tópico y de administración oral (no excediendo dosis diaria de 5 mg de Fe). No permitida a utilización en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables
VERDE	CLOROFILA	1406-65-1	CLOROFILA INS 1401	CHLOROPHYLL	MEZCLA DE CLOROFILASA EB, CLOROFILA A:C55H72MGN405, ÉSTER FITILICODEL COMPLEJO MAGNESIANO [1,3,5,8-TETRAMETIL-4-ETIL-2-VINIL-9-OXO-10-METOXICARBONIL)FORBINIL]-7-PROPIONATO, CLOROFILA B: C55H70MGN406, ÉSTER FITÍLICO DEL COMPLEJO MAGNESIANO DE [1,5, MAGNESIUM;3-[18-(DIOXIDOMETHILIDENE)-8-ETHENYL-13-ETHYL-3,7,12,17-TETRAMETHYL-20-(2-OXIDO-2-OXOETHYL)-2,3-DIHYDROPORPHYRIN-23-ID-2-YL]PROPANOATE; HYDRON	75.810	N/C	E140(I)	Utilizado en medicamentos.
VERDE	CLOROFILINA	48240-36-4	INS 140II	CHLOROPHYLLINS		75.810	N/C	E140(II)	Utilizado en medicamentos.
VERDE	VERDE BRILLANTE	4403-90-1	VERDE ALIZARINA	D&C GREEN # 5	DISODIUM 5-METHYL-2-[[4-(4-METHYL-2-SULFONATOANILINO)-9,10-DIOXO ANTHRACEN-1-YL] AMINO] BENZENESULFONATE	61570	741205	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
VERDE	VERDE SOLIDO	2353-45-9	VERDE ALIMENTO 3	FD&C GREEN # 3	DISODIUM 2-[[4-[ETHYL-(3-SULFONATOPHENYL)METHYL]AMINO]PHENYL]-4-[ETHYL-(3SULFONATOPHENYL)METHYL]AZANIUMYLIDENE]CYCLOHEXA-2,5-DIEN-1-YLIDENE[METHYL]-5-HYDROXYBENZENESULFONATE	42053	741203	N/C	Utilizado en alimentos y medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
VERDE	VERDE SOLUBLE	128-80-3	VERDE ANTRAQUINONA	D&C GREEN # 6	1,4-BIS(4-METHYLANILINO)ANTHRACENE-9,10-DIONE	61565	741206	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
VERDE	VERDE SOLVENTE	6358-69-6	VERDE PIRANINA	D&C GREEN # 8	TRISODIUM 8-HYDROXYPYRENE-1,3,6-TRISULFONATE	59040	741208	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo (incluyendo área de los ojos). No permitida la utilización en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables. No más que 0,01% de la dosis.
ROJO	AMARANTO	915-67-3	BORDEAU S INS 123	AMARANTH; D&C RED 2; ACID RED 27, TRISODIUM SALT	TRISODIUM (4Z)-3-OXO-4-[(4-SULFONATONAPHTHALEN-1-YL)HYDRAZINYLIDENE]NAPHTHALENE-2,7-DISULFONATE	16185	N/C	E123	Permitido para todos los tipos de productos.
ROJO	AMARANTO, LACA DE ALUMINIO	12227-62-2	BORDEAU S LACA DE ALUMINIO	AMARANTH ALUMINUM LAKE; PIGMENT RED 193; ACID RED 27 ALUMINUM LAKE; FD AND C RED EN EL 2 ALUMINUM LAKE	ALUMINIUM; TRISODIUM (4Z)-3-OXO-4-[(4-SULFONATONAPHTHALEN-1-YL)HYDRAZINYLIDENE]NAPHTHALENE-2,7-DISULFONATE	16185:1	N/C	E123	Permitido para todos los tipos de productos.
ROJO	AZORRUBINA	3567-69-9	CARMOISINA	CARMOISINE	DISODIUM (3Z)-4-OXO-3-[(4-SULFONATONAPHTHALEN-1-YL)HYDRAZINYLIDENE]NAPHTHALENE-1-SULFONATE	14720	N/C	E122	Permitido para todos los tipos de productos.



Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
ROJO	AZORRUBINA, LACA DE ALUMINIO	84041-67-8	CARMOISINA LACA DE ALUMINIO	CARMOISINE ALUMINUM LAKE	SAL DISÓDICO DEL ÁCIDO 2-(4'-SULFO-1'-NAFTILAZO)-1-NAFTOL-4-SULFÓNICO	14720	N/C	E122	Permitido para todos los tipos de productos.
ROJO	ERITROSINA	16423-68-0	ERITROSINA; ROJO N.º 3; ERITROSINA SÓDICA INS 127	FD&C RED #3; ERYTHROSINE	DISODIUM 2-(2,4,5,7-TETRAIODO-4,5,7,8-TETRAIODO-6-OXOXANTHEN-9-YL) BENZOATE	450430	741303	E127	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de administración oral
ROJO	ERITROSINA, LACA DE ALUMINIO	12227-78-0	ERITROSINA LACA DE ALUMINIO; ROJO N. 3 LACA DE ALUMINIO; ERITROSINA SÓDICA LACA DE ALUMINIO INS 127	FD&C RED #3 ALUMINUM LAKE	DIALUMINUM; 1',3'',6'',8''-TETRAIODO-3-OXOSPIRO[2-BENZOFURAN-1,9'-XANTHENE]-2'',7''-DIOLATE; 1',3'',6'',8''-TETRAIODO-3-OXOSPIRO[2-BENZOFURAN-1,9'-XANTHENE]-2'',7''-DIOLATE	45430	741303	E127	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de administración oral
ROJO	OXIDO DE HIERRO ROJO	1309-37-1	ÓXIDO DE HIERRO ROJO	RED IRON OXIDE	ÓXIDOS DE HIERRO OBTENIDOS POR SÍNTESIS, INCLUSIVE SUS FORMAS HIDRATADAS O COMBINACIONES DE MÁS DE UN DE ESTOS ÓXIDOS	77491	73.1200	E172	Utilizado en medicamentos de administración oral (no excediendo dosis diaria de 5 mg de Fe) y uso tópico. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
ROJO	ROJO PIGMENTO ROJO 63	74336-37-1	ROJO 34	D&C RED # 34	CALCIUM (4Z)-3-OXO-4-[(1-SULFONATON APHTHALEN-2-YL) HYDRAZINYLDENE]NAPHTHALENE-2-CARBOXYLATE	15880	741334	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
ROJO	ROJO PONCEAU SX	4548-53-2	ROJO 4	FD&C RED #4	DISODIUM (3E)-3-[(2,4-DIMETHYL-5-SULFONATOPHENYL) HYDRAZINYLDENE]-4-OXONAPHTHALENE-1-SULFONATE	14700	741304	N/C	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos de uso externo. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
ROJO	ROJO 27	13473-26-2	ROJO PHLOXINE EI	D&C RED #27	DISODIUM 2',4',5'',7'-TETRABROMO-4,5,6,7-TETRACHLORO-3-OXOSPIR[0]2-BENZOFURAN-1,9'-XANTHENE]-3',6'-DIOLATE	45410:2	741327	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO 30	2379-74-0	ROJO 30	D&C RED #30; INDANTHREN BRILLIANT PINK R	(2Z)-6-CHLORO-2-(6-CHLORO-4-METHYL-3-OXO-1-BENZOTHIOPHEN-2-YLIDENE)-4-METHYL-1-BENZOTHIOPHEN-3-ONE	73360	741330	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO 33	3567-66-6	ROJO ESPANICO	D&C RED #33	DISODIUM (3E)-5-AMINO-4-OXO-3-(PHENYLHYDRAZINYLDENE)NAPHTHALENE-2,7-DISULFONATE	17200	741333	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de administración oral y tópico. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables. No exceder más que 0,75 mg de la dosis diaria de la dosis cuando utilizado en medicamentos odontológicos.
ROJO	ROJO 40	25956-17-6	FD&C ROJO N. 40; ROJO ALURAAAC INS 129	FD&C RED #40	DISODIUM (5E)-5-[(2-METHOXY-5-METHYL-4-SULFONATOPHENYL)HYDRAZINYLDENE]-6-OXONAPHTHALENE-2-SULFONATE	16035	741340	E129	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos en general. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO 40, LACA DE ALUMINIO	68583-95-9	ROJO 40 LACA DE ALUMINIO; ROJO ALURAAAC LACA DE ALUMINIO	FD&C RED #40 ALUMINUM LAKE	LACA DE ALUMINIO O DE CALCIO Y ALUMINIO, EN SUSTRATO DE SAL DISÓDICO DEL ÁCIDO 6-HIDROXI-5-(2-METOXI-5-METIL-4-SULFOFENIL) AZO-2-NAFTALENUESTRULFÓNICO	16035:1	741340	E129	Utilizado en alimentos, cosméticos y medicamentos en general. No permitido en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO 7, LACA DE CALCIO	5281-04-9	ROJO 7 LACA DE CALCIO; ROJO LITIO RUBIM LACA DE CALCIO	D&C RED #7 CALCIUM LAKE; D&C RED # 7	CALCIUM (4Z)-4-[(4-METHYL-2-SULFONATOPHENYL)HYDRAZINYLDENE]-3-OXONAPHTHALENE-2-CARBOXYLATE	15850:1	741307	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. El total de D&C Red n. 6 no debe ser más que 0,01% en 5mg/ dosis diaria de medicamento

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
ROJO	ROJO BETERABA; BETANINA	7659-95-2	ROJO DE BETERABA; BETANINA IN S 162	BEET POWDER BEETROOT RED	(2S,4-[2-[(2S)-2-CARBOXY-6-HYDROXY-5-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3A5-TRIHIDROXY-6-(HYDROXYMETHYL)OXAN-2-YL] OXY-2,3-DIHIIDROINDOL-1-YL] ETHENYL]-2,3-DIHYDROPIRIDINE-2,6-DICARBOXYLIC ACID	N/C	N/C	E162	Utilizado en alimentos
ROJO	ROJO DE COCHINILLA	1390-65-4	CARMIN DE COCHINILLA; CARMIN; NATURAL RED 4 INS 120	CARMINE	3,5,6,8-TETRAHIDROXY-1-METHYL-9,10-DIOXO-7-[3,4,5-TRIHIDROXY-6-(HYDROXYMETHYL) OXAN-2-YL] ANTHRACENE-2-CARBOXYLIC ACID)	75470	731100	E120	Permitido para todos los tipos de productos.
ROJO	ROJO EOSINA	62342-51-2	ROJO 21	D&C RED # 21	2'',4'',5'',7''-TETRABROMO-3'',6''-DIHIIDROXISPIRO[2-BENZOFURAN-3,9'-XANTHENE]-1-ONE	45380:2	741321	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitido en la área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO EOSINA PURA	95917-83-2	ROJO 22	D&C RED # 22	DISODIUM 2-(2,4,5,7-TETRABROMO-3-OXIDO-6-OXOXANTHEN-9-YL) BENZOATE	45380	741322	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. No permitido en la área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas
ROJO	ROJO PERMANENTE	70632-40-5	ROJO 36	D&C RED # 36	(1Z)-1-[(2-CHLORO-4-NITROFENYL) HYDRAZINYLDENE] NAPHTHALEN-2-ONE	12085	741336	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos de uso externo. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables. No más que 1,7 mg/dosis diaria de la droga prescritos por menos de 1 año o 1,0 mg/dosis diaria de la droga prescrita por más de 1 año.
ROJO	ROJO PONCEAU 4R	2611-82-7	PONCEAU 4R; ROJO 2 INS 124	PONCEAU 4R	TRISODIUM (8Z)-7-OXO-8-[(4-SULFONATON APHTHALEN-1-YL) HYDRAZINYLDENE]EN LA PHTHALENE-1,3-DISULFONATE	16255	N/C	E124	Permitido para todos los tipos de productos.

Tabla 1 (continuación)

Color	Sustancia	CAS	Sinónimo	Denominación en inglés	Descripción (IUPAC)	Color index	Referencia 21 CFR	Referencia Unión Europea	Usos, restricciones y requisitos
ROJO	ROJO PONCEAU 4R LACA ALUMINIO	15876-47-8	PONCEAU 4R LACA DE ALUMINIO; ROJO 2 LACA DE ALUMINIO	PONCEAU 4R ALUMINUM LAKE	LACA DE ALUMINIO O DE CALCIO Y ALUMINIO, EN SUSTRATO DE SAL TRISÓDICO DEL ÁCIDO 1-(4'-SULFO-1'-NAFTILAZO)-2-NAFTOL-6,8-DISSULFÓNICO	16255	N/C	E124	Permitido para todos los tipos de productos.
ROJO	ROJO RUBI	5858-81-1	ROJO 6	D&C RED # 6	DISODIUM (4E)-4-[(4-METHYL-2-SULFONATOPHENYL)HYDRAZINYLIDENE]-3-OXONAPHTHALENE-2-CARBOXYLATE	15850	741306	N/C	Utilizado en cosméticos y medicamentos en general. El total de D&C Red n. 7 no debe ser más que 0,01% en 5mg/ dosis diaria de medicamento
ROJO	ROJO SCARLET	85-86-9	ROJO 17	D&C RED # 17	(1Z)-1-[(4-PHENYLDIAZENYLPHENYL)HYDRAZINYLIDENE]NAPHTHALEN-2-ONE	26100	741317	N/C	Utilizado en medicamentos de uso externo. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.
VIOLETA	VIOLETA ALIZARINA	81-48-1	VIOLETA 2	D&C VIOLET # 2	1-HYDROXY-4-(4-METHYLANILINO)ANTHRACENE-9,10-DIONE	60725	741602	N/C	Utilizado en medicamentos de uso externo. No permitido en el área de los ojos, en suturas quirúrgicas y formas farmacéuticas inyectables.

14



# 14 REACTIVOS

14

## 14.1 INDICADORES Y SOLUCIONES INDICADORAS

Indicadores son colorantes empleados para indicar el punto final de un análisis volumétrico o para evaluar el pH de soluciones no coloreadas. Los indicadores de uso más frecuente están en la **Tabla 1**, en orden creciente del límite inferior de su banda transición de pH. En seguida, están descritos los indicadores y las soluciones indicadoras (SI) utilizadas en la Farmacopea.

**Tabla 2 - Tabla 1 – Indicadores de uso más frecuente**

<i>Indicador</i>	<i>Banda de transición</i>	<i>Cambio de color</i>
Verde de malaquita	0,0 a 2,0	Amarillo a verde
Rojo de cresol	0,2 a 1,8	Rojo a amarillo
Púrpura de metacresol	0,5 a 2,5	Rojo a amarillo
Tropeolina OO	1,0 a 2,8	Rojo a amarillo
Azul de timol	1,2 a 2,8	Rojo a amarillo
Amarillo naftol	2,0 a 3,2	Incoloro a amarillo
Amarillo de dimetilo	2,8 a 4,6	Rojo a amarillo
Azul de bromofenol	2,8 a 4,6	Amarillo a azul-violeta
Naranja de metilo	2,9 a 4,0	Rojo a amarillo
Rojo de metilo	3,0 a 4,4	Rojo a amarillo
Rojo congo	3,0 a 5,0	Azul a rojo
Verde de bromocresol	3,6 a 5,2	Amarillo a azul
Resazurina	5,0 a 7,0	Rosa a violeta
Tornasol	5,0 a 8,0	Rojo a azul
Púrpura de bromocresol	5,2 a 6,8	Amarillo a azul-violeta
Azul de bromotimol	6,0 a 7,6	Amarillo a azul
Rojo de fenol	6,8 a 8,4	Amarillo a rojo
Rojo de cresol	7,2 a 8,8	Amarillo a rojo
Púrpura de metacresol	7,5 a 9,2	Amarillo a violeta
Azul de timol	8,0 a 9,6	Amarillo a azul
Fenolftaleína	8,3 a 10,0	Incoloro a violeta intenso
Azul Nilo A	9,0 a 13,0	Azul a roja
Timolftaleína	9,3 a 10,5	Incoloro a azul
Amarillo alizarina GG	10,0 a 12,0	Amarillo pálido a marrón
Tropeolina O	11,0 a 12,7	Amarillo a naranja
Amarillo titán	12,0 a 13,0	Amarillo a rojo

### Naranja de metilo (CI 13025)

CAS – [547-58-0]

Fórmula y masa molecular –  $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$  – 327,34

Descripción – Polvo cristalino amarillo-anaranjado.

Solubilidad – Poco soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol a 96% (v/v).

### Naranja de metilo SI

Preparación – Disolver 0,1 g en 100 ml de etanol a 20% (v/v).

Banda de pH – 2,9 – 4,0

Cambio de color – Da coloración roja en medio moderadamente ácido y coloración amarilla en medio levemente ácido y alcalino.

Ensayo de sensibilidad – La mezcla de 0,1 ml de solución indicadora con 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono presenta color amarillo. Son necesarios no más que 0,1 ml de ácido clorhídrico 0,1 M para determinar el cambio de color para rojo.

### Naranja de metilo, solución

Preparación – Disolver 20 mg de naranja de metilo y 0,1 g de verde de bromocresol en 1 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y completar con agua hasta el volumen de 100 ml.

Banda de pH – 3,0 – 4,0

Cambio de color – Da coloración naranja en soluciones moderadamente ácidas y coloración verde-oliva en soluciones levemente ácidas y alcalinas.

### Anaranjado de xilenol

CAS – [3618-43-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$  – 760,59

Descripción – Polvo cristalino marrón-rojizo.

Solubilidad – Soluble en agua y etanol

### Anaranjado de xilenol SI

Preparación – Disolver 0,1 g en 100 ml de etanol. Cambio de color – En medio ácido presenta color amarillo-pálido. Reaccionando con ciertos metales (tales como plomo y zinc), forma complejo de color rojo intenso. En presencia de exceso de edetato disódico adquiere color amarillo.

### Alizarina

CAS – [130-22-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_{14}H_7NaO_7S \cdot H_2O$  – 360,26

Descripción – Polvo amarillo-anaranjado.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y en etanol. Alizarina SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de agua.

#### **Amarillo de alizarina GG (CI 14025)**

*CAS* – [584-42-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{13}H_8N_3NaO_5$  – 309,21

*Descripción* – Polvo amarillo.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua fría y soluble en agua caliente.

#### **Amarillo de alizarina GG SI**

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de agua.

*Banda de pH* – 10,0 – 12,0

*Cambio de color* – Da coloración amarilla-pálida en soluciones levemente alcalinas y coloración marrón en soluciones fuertemente alcalinas.

#### **Amarillo de dimetilo (CI 11020)**

*CAS* – [60-11-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_{15}N_3$  – 225,29

*Descripción* – Cristales amarillos.

*Solubilidad* – Insoluble en agua, soluble en etanol, benceno, cloroformo, éter etílico y ácidos minerales diluidos.

#### **Amarillo de dimetilo SI**

*Preparación* – Disolver 0,2 g en 100 ml de etanol a 90% (v/v).

*Banda de pH* – 2,8 – 4,6

*Cambio de color* – Da coloración roja en soluciones moderadamente ácidas y coloración amarilla en soluciones levemente ácidas y alcalinas.

*Ensayo de homogeneidad* – Preparar solución a 0,01% (p/v) en cloruro de metileno y aplicar 0,01 ml de esta solución en cromatoplaqueta de gel de sílice G. Usar como eluyente el cloruro de metileno. El cromatograma debe mostrar una única mancha.

*Ensayo de sensibilidad* – Preparar solución de 2 g de cloruro de amonio en 25 ml de agua exenta de dióxido de carbono. Esta solución, adicionada de 0,1 ml de amarillo de dimetilo SI, debe presentar color amarilla. La coloración pasa a roja por la adición de no más que 0,1 ml de ácido clorhídrico 0,1 M.

#### **Amarillo de metanilo (CI 13065)**

*CAS* – [587-98-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$  – 375,38

*Descripción* – Polvo amarillo amarronado.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

#### **Amarillo de metanilo SI**

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de metanol.

*Cambio de color* – En titulaciones desarrolladas en medio acuoso cambia la coloración de amarilla (medio básico) para carmín (medio ácido).

*Ensayo de sensibilidad* – Disolver 0,1 ml de amarillo de metanilo SI en 50 ml de ácido acético glacial anhidro. Esta solución debe presentar coloración rojo-rosada. Añadir 0,05 ml de ácido perclórico 0,1 M. La coloración debe cambiar para violeta.

#### **Amarillo naftol (CI 10315)**

*CAS* – [887-79-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_5N_2NaO_5$  – 256,16

*Descripción* – Polvo o cristales amarillo-anaranjados.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol a 96% (v/v).

*Banda de pH* – 2,0 – 3,2

*Cambio de color* – Da solución incolora en medio fuertemente ácido y coloración amarilla en soluciones menos ácidas.

#### **Amarillo titán (CI 19540)**

*CAS* – [1829-00-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{19}N_5Na_2O_6S_4$  – 695,72

*Descripción* – Polvo marrón-amarillento.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en etanol.

#### **Amarillo titán SI**

*Preparación* – Disolver 0,05 g en agua y completar el volumen para 100 ml.

*Banda de pH* – 12,0 – 13,0

*Cambio de color* – En soluciones ácidas y moderadamente alcalinas da coloración amarilla. En soluciones fuertemente alcalinas presenta color rojo.

*Ensayo de sensibilidad* – Preparar mezcla de 10 ml de agua, 0,2 ml de solución estándar de magnesio (10 ppm de Mg) y 10 ml de hidróxido de sodio M. Añadir 0,1 ml de amarillo titán SI. Preparar prueba en blanco de manera análoga, sin embargo omitiendo el estándar de magnesio. Comparar las dos soluciones: coloración rosa intensa se desarrolla en comparación a la prueba en blanco.

#### **Amarillo titán, papel**

*Preparación* – Impregnar papel de filtro común con solución de amarillo titán SI. Secar al aire a temperatura ambiente.

#### **Almidón (Almidón soluble)**

*CAS* – [9005-84-9]

*Fórmula molecular* –  $(C_6H_{10}O_5)_x$

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco.

#### **Almidón SI**

*Especificación* – Solución de almidón soluble a 2% (p/v) en agua caliente. La solución puede presentar pequeña opalescencia.

*Ensayo de sensibilidad* – Mezclar 1 ml de almidón SI, 20 ml de agua, aproximadamente 50 mg de yoduro de potasio

y, finalmente, 0,05 ml de yodo 0,01 M. Hay desarrollo de color azul.

#### Almidón yodado SI

*Preparación* – Impregnar papel de filtro con almidón SI, recién preparado, enriquecido con 0,5 g de yoduro de potasio.

#### Almidón exento de yoduro SI

*Preparación* – Triturar 1 g de almidón soluble con 5 ml de agua y añadir, con agitación constante, agua hirviendo suficiente para 100 ml.

*Estabilidad* – Preparar inmediatamente antes del uso.

#### Almidón yodado, papel

*Preparación* – Impregnar papel de filtro con almidón SI, recién preparado, enriquecido con 0,5 g de yoduro de potasio.

#### Azul de bromofenol

CAS – [115-39-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$  – 670,02

*Descripción* – Polvo amarillo-anaranjado claro.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, poco soluble en etanol y fácilmente soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos.

#### Azul de bromofenol SI

*Preparación* – Disolver, calentando suavemente, 0,2 g de azul de bromofenol en 3 ml de hidróxido de sodio 0,1 M y 10 ml de etanol a 96% (v/v). Dejar enfriar y completar el volumen para 100 ml con etanol a 96% (v/v).

*Banda de pH* – 2,8 – 4,6

*Cambio de color* – Da color amarillo en soluciones moderadamente ácidas y color azul-violeta en soluciones levemente ácidas y alcalinas.

#### Azul de bromotimol

CAS – [76-59-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$  – 624,38

*Descripción* – Polvo marrón o rojo claro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

#### Azul de bromotimol SI

*Preparación* – Calentar 1 g de azul de bromotimol con 3,2 ml de hidróxido de sodio 0,05 M y 5 ml de etanol. Después de disolución, completar el volumen a 250 ml con etanol.

*Banda de pH* – 6,0 – 7,0

*Cambio de color* – Da coloración amarilla en soluciones levemente ácidas y coloración azul en soluciones levemente alcalinas. En medio neutro da coloración verde.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,3 ml de azul de bromotimol SI y 100 ml de agua exenta de dióxido de car-

bono presenta coloración amarilla. La coloración cambia para azul por la adición de no más que 0,1 ml de solución de hidróxido de sodio 0,02 M.

#### Azul de hidroxinaftol

CAS – [63451-35-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$  – 620,47

#### Azul de hidroxinaftol SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en etanol para 100 ml.

*Cambio de color* – En la banda de pH entre 12,0 y 13,0, su solución posee coloración rosa-rojiza en presencia de iones calcio. Frente al exceso de edetato disódico, presenta color azul intenso.

#### Azul de oracet B

CAS – [12769-16-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{16}N_2O_2$  – 328,36

*Especificación* – Se constituye de una mezcla de 1-metilamino-4-anilinantraquinona y de 1-amino-4-anilinantraquinona.

#### Azul de oracet B SI

*Preparación* – Disolver 0,5 g en ácido acético glacial anhidro y completar el volumen para 100 ml.

*Cambio de color* – Cuando utilizado en titulaciones en medio no acuoso cambia de coloración azul (medio básico) para púrpura (medio neutro) y para rosa (medio ácido).

#### Azul de timol

CAS – [76-61-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{27}H_{30}O_5S$  – 466,60

*Descripción* – Polvo cristalino verde-amarronado o azul-verdoso.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en etanol a 96% (v/v) y en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

#### Azul de timol SI

*Preparación* – Calentar 0,1 g del indicador con 4,3 ml de hidróxido de sodio a 0,05% (p/v) y 5 ml de etanol a 90% (v/v). Después de disolución, completar el volumen a 250 ml con etanol a 20% (v/v).

*Banda de pH* – 1,2 – 2,8 y 8,0 – 9,6

*Cambio de color* – Presenta coloración roja en soluciones fuertemente ácidas (banda de pH: 1,2 – 2,8), coloración amarilla en soluciones levemente ácidas y alcalinas y coloración azul en soluciones más alcalinas (banda de pH: 8,0 – 9,6).

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,1 ml de azul de timol SI, 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono y 0,2 ml de hidróxido de sodio 0,02 M presenta color azul. La coloración cambia para amarilla por la adición de no más que 0,1 ml de ácido clorhídrico 0,2 M.

**Azul Nilo A (CI 51180)**

CAS – [3625-57-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_{40}H_{40}N_6O_6S$  – 732,85

Descripción – Polvo cristalino verde con brillo de bronce.

Solubilidad – Ligeramente soluble en etanol, en ácido acético glacial y en piridina.

**Azul Nilo A SI**

Preparación – Disolver 1 g en ácido acético glacial anhidro para 100 ml.

Banda de pH – 9,0 – 13,0

Cambio de color – Otorga coloración azul a soluciones levemente alcalinas y coloración roja a soluciones levemente alcalinas.

Ensayo de sensibilidad – La mezcla de 0,25 ml de Azul Nilo A SI en 50 ml de ácido acético glacial anhidro presenta color azul. La coloración pasa a azul-verdosa por la adición de no más que 0,1 ml de ácido perclórico 0,1 M en ácido acético glacial.

Ensayo de identificación – La solución a 0,0005% (p/v) en etanol a 50% (v/v) presenta máximo de absorción (5.2.14) en 640 nm.

**Chalcona**

CAS – [2538-85-4]

Fórmula y masa molecular –  $C_{20}H_{13}N_2NaO_5S$  – 416,4

Descripción – Polvo pardo-negro con tonos violáceos.

Solubilidad – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol y acetona.

**Chalcona SI**

Preparación – Disolver 0,1 g en 100 ml de metanol anhidro.

Cambio de color – Da color rojo-púrpura con iones calcio en medio alcalino. En presencia de exceso de edetato disódico, la solución adquiere color azul.

**Chalcona, mezcla compuesta**

Preparación – Mezclar una parte de chalcona con 99 partes de sulfato de sodio.

Ensayo de sensibilidad – Disolver 0,2 g de mezcla compuesta de chalcona en 5 ml de agua. Mezclar 1 ml de la solución del colorante, 50 ml de agua, 10 ml de hidróxido de sodio M y 1 ml de sulfato de magnesio a 1% (p/v). La solución formada es azul, tornándose violeta por la adición de 0,1 ml de cloruro de calcio a 0,15% (p/v). La adición de 0,1 ml de edetato disódico 0,01 M da color azul intenso.

**Cloruro de metilosanilina (CI 42555)**

CAS – [548-62-9]

Sinonimia – Violeta cristal

Fórmula y masa molecular –  $C_{25}H_{30}ClN_3$  – 408,00

Descripción – Polvo o cristales verde oscuros.

Solubilidad – Soluble en agua y en etanol a 96% (v/v).

**Cloruro de metilosanilina SI**

Preparación – Disolver 0,5 g en 100 ml de ácido acético glacial anhidro.

Cambio de color – En titulaciones en medio no acuoso la coloración cambia de violeta (medio básico) para azul-verdosa (medio neutro) y para verde-amarillenta (medio ácido).

Ensayo de sensibilidad – La mezcla de 0,1 ml de cloruro de metilosanilina SI con 50 ml de ácido acético glacial anhidro muestra coloración púrpura azulada. La adición de 0,1 ml de ácido perclórico 0,1 M en ácido acético altera la coloración para verde.

**Cloruro férrico**

CAS – [10025-77-1]

Sinonimia – Cloruro de hierro.

Fórmula y masa molecular –  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 270,30

Descripción – Masa cristalizada amarillo-naranja, frágil.

Solubilidad – Muy soluble en agua y soluble en etanol y éter etílico. La sal y sus soluciones, expuestas a la luz, sufren reducción parcial.

**Cloruro férrico SI (aproximadamente 0,4 M)**

Especificación – Contiene 10,5 g en agua para 100 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Colorante BVF**

Preparación – Disolver 0,1 g de azul de bromotimol, 0,02 g de rojo de metilo y 0,2 g de fenolftaleína en etanol. Completar con el mismo solvente para hacer 100 ml. Filtrar.

**Difenilcarbazida**

CAS – [140-22-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{14}N_4O$  – 242,29

Descripción – Polvo cristalino blanco o casi blanco, gradualmente se torna rosa con la exposición al aire.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua, soluble en acetona y en etanol a 96% (v/v) y en ácido acético glacial.

**Difenilcarbazida SI**

Preparación – Disolver 1 g de difenilcarbazida en 100 ml de etanol en caliente. Almacenar al abrigo de la luz.

**Difenilcarbazona**

CAS – [538-62-5]

Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{12}N_4O$  – 240,27

Descripción – Cristales o polvo cristalino naranja-amarillo.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en etanol a 96% (v/v).

**Difenilcarbazona SI**

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de etanol. Almacenar al abrigo de la luz.

**Eosina Y (CI 45380)**

*CAS* – [17372-87-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_6Br_4NA_2O_5$  – 691,91

*Descripción* – Polvo marrón.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

**Eosina Y SI**

*Preparación* – Disolver 1 g en 100 ml en agua.

*Cambio de color* – La adición de 20 ml de hidróxido de sodio a 40% (p/v) sobre 10 ml de eosina Y SI a 1% (p/v) forma precipitado rojo.

**Éster etílico de tetrabromofenoltaleína**

*CAS* – [1176-74-5]

*Nombre químico* – Éster etílico del ácido 2-[(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)(3,5-dibromo-4-oxo-2,5-ciclohexadien-1-ildeno)metil]-benzoico

*Sinonimia* – Bromofenoltaleína magenta Y

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{22}H_{14}Br_4O_4$  – 661,96

**Éster etílico de tetrabromofenoltaleína SI**

*Preparación* – Disolver 0,1 g de éster etílico de tetrabromofenoltaleína en 90 ml de ácido acético glacial y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente. Preparar inmediatamente antes del uso.

**Fenoltaleína**

*CAS* – [77-09-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{14}O_4$  – 318,33

*Descripción* – Polvo cristalino o amorfo, blanco o levemente amarillento. Inodoro.

*Solubilidad* – Insoluble en agua y soluble en etanol

**Fenoltaleína SI**

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de etanol a 80% (v/v). *Banda de pH* – 8,3 – 10,0

*Cambio de color* – Da soluciones incoloras en medio ácido y levemente alcalino. Presenta coloración violeta intensa en soluciones alcalinas más fuertes. *Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,1 ml de fenoltaleína SI en 1000 ml de agua exenta de dióxido de carbono es incolora. Son necesarios no más que 0,2 ml de hidróxido de sodio 0,02 M para el apareamiento de coloración rosa.

**Fenoltaleína, papel**

*Preparación* – Sumergir tiras de papel de filtro común en fenoltaleína SI por algunos minutos y secar al aire a temperatura ambiente.

**Ferroina**

*CAS* – [14634-91-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{36}H_{24}FeN_6O_4S$  – 692,52

**Ferroina SI**

*Preparación* – Disolver 0,7 g de sulfato ferroso heptahidratado y 1,49 g de 1,10-fenantrolina en 70 ml de agua y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente.

*Ensayo de sensibilidad* – A 50 ml de ácido sulfúrico *M* añadir 0,15 ml de tetróxido de osmio SR y 0,1 ml de ferroina SI. Después de la adición de 0,1 ml de sulfato cérico amoniacal 0,1 *M* SV, el color pasa de rojo-anaranjado para verde pálido.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Magneson**

*CAS* – [74-39-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_9N_3O_4$  – 259,22

*Descripción* – Polvo castaño-rojizo.

**Magneson SI**

*Preparación* – Disolver 0,2 g en 100 ml en tolueno.

*Cambio de color* – En titulaciones de medio no acuoso muda la coloración naranja (medio ácido) para azul (medio básico), pasando por la coloración rosa.

**Magneson, reactivo**

*Preparación* – Solubilizar 0,1 g de magneson en 100 ml de hidróxido de sodio a 1% (p/v).

**1-Naftolbenceína**

*CAS* – [6948-88-5]

*Sinonimia* – Fenilbis (4-hidroxinaftil) metanol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{27}H_{20}O_3$  – 392,50

*Descripción* – Polvo marrón-rojizo.

*Solubilidad* – Insoluble en agua; soluble en benceno, en éter etílico y en ácido acético glacial.

**1-Naftolbenceína SI**

*Preparación* – Disolver 0,2 g de 1-naftolbenceína en 100 ml de ácido acético glacial.

*Cambio de color* – Cuando utilizado en titulaciones no-acuosas, cambia la coloración azul o verde-azulada (medio básico) para naranja (medio neutro) y para verde-oscura (medio ácido).

*Ensayo de sensibilidad* – Añadir 0,25 ml de solución de 1-naftolbenceína SI a 50 ml de ácido acético glacial anhidro. Son necesarios no más que 0,05 ml de ácido perclórico 0,1 *M* en ácido acético glacial para efectuar el cambio de la coloración amarilla-marrón para verde.

**1-Naftoltaleína**

*CAS* – [596-01-0]



*Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{18}O_4$  – 418,42

*Descripción* – Polvo incoloro cuando puro, usualmente es rojo grisáceo.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

### 1-Naftoltaleína SI

*Preparación* – Disolver 0,5 g en 100 ml de etanol a 96% (v/v).

*Cambio de color* – Da solución incolora o roja pálida en los medios ácido y neutro y coloración azul en soluciones moderadamente alcalinas.

### Negro de eriocromo T (CI 14645)

*CAS* – [1787-61-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$  – 461,38

*Descripción* – Polvo marrón oscuro.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol a 96% (v/v).

### Negro de eriocromo T SI

*Preparación* – Disolver 0,5 g de negro de eriocromo T y 4,5 g de Clorhidrato de hidroxilamina en metanol a 100 ml. Preparar en el momento del uso.

*Cambio de color* – En medio ácido clorhídrico produce precipitado violeta-marrón; tratado con ácido sulfúrico forma precipitado azul-oscuro que, diluido, muda para color marrón. En solución acuosa de hidróxido de sodio presenta color violeta.

### Oxalato de amonio

*CAS* – [6009-70-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_8N_2O_4 \cdot H_2O$  – 142,11

*Descripción* – Cristales incoloros transparentes o polvo cristalino blanco. Inodoro.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

### Oxalato de amonio SI

*Especificación* – Contiene 4 g de oxalato de amonio en agua para 100 ml.

### Púrpura de bromocresol

*CAS* – [115-40-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$  – 540,24

*Descripción* – Polvo cristalino blanco para rosa.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol a 96% (v/v) y soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

### Púrpura de bromocresol SI

*Preparación* – Calentar 0,1 g de púrpura de bromocresol con 5 ml de etanol a 90% (v/v) hasta disolución. Añadir 3,7 ml de hidróxido de sodio 0,05 M y etanol a 20% (v/v) para completar el volumen de 250 ml.

*Banda de pH* – 5,2 – 6,8

*Cambio de color* – Da coloración amarilla en soluciones levemente ácidas y coloración azul-violeta en soluciones alcalinas, neutras y ácidas muy próximas a la neutralidad.

*Ensayo de sensibilidad* – Mezclar 0,2 ml de púrpura de bromocresol SI y 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono. Añadir 0,05 ml de hidróxido de sodio 0,02 M. Esta solución posee la coloración azul violácea. Para alterar la coloración para amarillo son necesarios no más que 0,2 ml de ácido clorhídrico 0,02 M.

### Púrpura de bromocresol, reactivo

*Solución A* – Disolver 38 g de fosfato de sodio monobásico y 2 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en agua y completar el volumen a 1000 ml. Ajustar el pH a 5,3.

*Solución B* – Disolver 0,4 g de púrpura de bromocresol en 30 ml de agua, añadir 6,3 ml de hidróxido de sodio 0,1 M y completar el volumen a 500 ml con agua.

*Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de la *Solución A*, *Solución B* y cloroformo. Agitar durante 5 minutos, dejar decantar y descartar la camada clorofórmica.

### Púrpura de metacresol

*CAS* – [2303-01-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{16}O_5S$  – 382,44

*Descripción* – Polvo cristalino verde oliva.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en etanol, ácido acético glacial y en metanol.

### Púrpura de metacresol SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de hidróxido de sodio 0,001 M.

*Banda de pH* – 0,5 – 2,5 y 7,5 – 9,2

*Cambio de color* – Presenta coloración roja en soluciones fuertemente ácidas (banda de pH: 0,5 – 2,5), coloración amarilla en soluciones menos ácidas y neutras y coloración violeta en soluciones moderadamente alcalinas (banda de pH: 7,5 – 9,2).

### Resazurina

*CAS* – [550-82-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_7NO_4$  – 229,19

*Descripción* – Cristales pequeños rojo-oscuros con brillo verdoso.

*Solubilidad* – Insoluble en agua y éter etílico, poco soluble en etanol y soluble en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

### Resazurina SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de hidróxido de sodio 0,02 M. Esta solución indicadora debe ser de preparación reciente.

*Banda de pH* – 5,0 – 7,0

*Cambio de color* – Da coloración rosa en soluciones levemente ácidas y coloración violeta en soluciones levemente alcalinas.

### Resorcinol

CAS – [108-46-3]

*Sinonimia* – Resorcina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_6O_2$  – 110,11

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino incoloro o amarillo pálido; expuesto a la luz y al aire, adquiere coloración rosa.

*Solubilidad* – Soluble en agua y etanol.

### Resorcinol SI

*Preparación* – Disolver 0,2 g de resorcinol en 100 ml de benceno. Dejar decantar.

### Timolftaleína

CAS – [125-20-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{30}O_4$  – 430,54

*Descripción* – Polvo blanco o amarillo claro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y en soluciones de hidróxidos alcalinos.

### Timolftaleína SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de etanol a 96% (v/v).

*Banda de pH* – 9,3 – 10,5

*Cambio de color* – Es incoloro en medio ácido y levemente alcalino. Da coloración azul en soluciones alcalinas más intensas.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,05 ml de timolftaleína SI con 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono es incolora. Son necesarios no más que 0,05 ml de hidróxido de sodio 0,1 M para cambiar la coloración para azul.

### Tiocianato de amonio

CAS – [1762-95-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $NH_4SCN$  – 76,12

*Descripción* – Cristales incoloros y frágiles.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

### Tiocianato de amonio SI

*Preparación* – Disolver 7,6 g en 100 ml de agua.

### Tornasol

CAS – [1393-92-6]

*Especificación* – Es constituido de pigmento índigo azul preparado a partir de varias especies de *Rocella*, *Lecanosa* u otros líquenes. El pigmento posee olor característico

### Tornasol SI

*Preparación* – Hervir bajo reflujo, durante una hora, 25 g de tornasol, finamente pulverizado, con 100 ml de etanol a 90% (v/v). Descartar el etanol y repetir la operación dos veces, utilizando en cada extracción 75 ml de etanol a 90% (v/v). Tratar el tornasol extraído con 250 ml de agua. Filtrar.

*Banda de pH* – 5,0 – 8,0

*Cambio de color* – Da coloración roja con los ácidos y azul con los álcalis.

### Tornasol azul, papel

*Preparación* – Hervir 10 partes de tornasol, finamente pulverizado, con 100 partes de etanol a 96% (v/v), bajo reflujo, por una hora. Decantar y descartar el etanol, añadir al residuo mezcla de 45 partes de etanol y 15 partes de agua. Dejar macerando por dos días. Decantar el sobrenadante e impregnar tiras de papel de filtro común con el extracto. Secar a temperatura ambiente.

*Ensayo de sensibilidad* – Sumergir tira de papel de tornasol azul, midiendo 10 mm x 60 mm, en 100 ml de mezcla de 10 ml de ácido clorhídrico 0,02 M y 90 ml de agua. Agitar. El papel adquiere color rojo al fin de 45 segundos.

### Tornasol rojo, papel

*Preparación* – Añadir ácido clorhídrico 2 M al extracto obtenido en el proceso de preparación del papel azul, gota a gota, hasta que la solución presente coloración roja. Impregnar tiras de papel de filtro con esta solución y dejar secar a temperatura ambiente.

*Ensayo de sensibilidad* – Sumergir tira de papel de tornasol rojo en 100 ml de hidróxido de sodio 0,002 M. Agitar. El papel debe quedar azul al final de 45 segundos.

### Tropeolina O (CI 14270)

CAS – [547-57-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_9N_2NaO_5S$  – 316,27

*Descripción* – Polvo marrón.

*Solubilidad* – Soluble en agua y etanol.

### Tropeolina O SI

*Preparación* – Disolver 25 mg en 50 ml de metanol y agua para completar 100 ml

*Banda de pH* – 11,0 – 12,7

*Cambio de color* – Da soluciones de coloración amarilla en medio moderadamente alcalino y coloración naranja en soluciones fuertemente alcalinas.

*Ensayo de homogeneidad* – Aplicar 0,01 ml de tropeolina O SI en cromatoplaque de celulosa G. Desarrollar el cromatograma con la mezcla alcohol *n*-propílico, acetato de etilo y agua (5:1:4). El cromatograma debe mostrar una única mancha con Rf aproximadamente 0,9.

### Tropeolina OO (CI 13080)

CAS – [554-73-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$  – 375,38

*Descripción* – Polvo amarillo o amarillo anaranjado.

*Solubilidad* – Soluble en agua. *Banda de pH* – 1,0 – 2,8

*Cambio de color* – Da coloración roja en soluciones fuertemente ácidas y coloración amarilla en soluciones menos ácidas.

#### Verde de bromocresol

*CAS* – [76-60-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$  – 698,02

*Descripción* – Polvo blanco amarronado.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en etanol y soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

#### Verde de bromocresol SI

*Preparación* – Calentar 0,1 g del colorante con 2,9 ml de hidróxido de sodio 0,05 M y 5 ml de etanol a 90% (v/v). Después de disolución, añadir etanol a 20% (v/v) hasta el volumen de 250 ml.

*Banda de pH* – 3,6 – 5,2

*Cambio de color* – Da coloración amarilla en soluciones moderadamente ácidas y azul en soluciones levemente ácidas y alcalinas.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,2 ml de verde de bromocresol SI y 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono presenta color azul. Son necesarios no más que 0,2 ml de ácido clorhídrico 0,02 M para alterar la coloración para amarilla.

#### Verde de malaquita, oxalato

*CAS* – [2437-29-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{48}H_{30}N_4O_4 \cdot 2HC_2O_4$  – 927,10

*Descripción* – Sólido cristalino verde.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua.

#### Verde de malaquita SI

*Preparación* – Disolver 1 g de oxalato de verde de malaquita en 100 ml de ácido acético glacial.

*Banda de pH* – 0,0-2,0

*Cambio de color* – Da coloración amarilla en soluciones ácidas y verde en soluciones menos ácidas y alcalinas.

#### Verde de metilo (CI 42590)

*CAS* – [14855-76-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{27}H_{35}BrClN_3$  – 516,94

*Descripción* – Polvo verde. Normalmente, se presenta en la forma de sal con  $ZnCl_2$ .

*Solubilidad* – Soluble en agua.

#### Verde de metilo SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de agua.

*Cambio de color* – En solución de ácido sulfúrico presenta color amarillo. Por la dilución retorna a la coloración verde.

#### Rojo cresol

*CAS* – [1733-12-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{18}O_5S$  – 382,43

*Descripción* – Polvo cristalino marrón rojizo.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en etanol y soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.

#### Rojo cresol SI

*Preparación* – Calentar 50 mg de rojo cresol con 2,65 ml de hidróxido de sodio 0,05 M y 5 ml de etanol a 90%. Después de disolución, añadir etanol a 20% hasta completar 250 ml.

*Banda de pH* – 0,2 – 1,8 y 7,2 – 8,8

*Cambio de color* – Da, coloración roja en soluciones fuertemente ácidas (banda de pH: 0,2 – 1,8), coloración amarilla en soluciones menos ácidas y neutras; en soluciones moderadamente alcalinas presenta color roja (banda de pH: 7,2 – 8,8).

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,1 ml de rojo cresol SI y 1000 ml de agua, exenta de dióxido de carbono, adicionada de 0,15 ml de hidróxido de sodio 0,02 M presenta coloración roja púrpura. La coloración cambia para amarilla por la adición de no más que 0,15 ml de ácido clorhídrico 0,02 M.

#### Rojo congo (CI 22120)

*CAS* – [573-58-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$  – 696,67

*Descripción* – Polvo rojo amarronado.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

#### Rojo congo SI

*Preparación* – Disolver 0,25 g de rojo congo en 50 ml de etanol a 90% (v/v) y agua hasta completar 250 ml.

*Banda de pH* – 3,0 – 5,0

*Cambio de color* – Presenta coloración azul en soluciones moderadamente ácidas y coloración roja en soluciones levemente ácidas y alcalinas.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,2 ml de rojo congo SI, 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono y 0,3 ml de ácido clorhídrico 0,1 M posee coloración azul. Son necesarios no más que 0,3 ml de hidróxido de sodio 0,1 M para alterar la coloración para rosa.

#### Rojo congo, papel

*Preparación* – Sumergir tiras de papel de filtro común en rojo congo SI y dejar secar a temperatura ambiente.

#### Rojo de fenol

*CAS* – [143-74-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{19}H_{14}O_5S$  – 354,38

*Descripción* – Polvo cristalino rojo claro u oscuro.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y poco soluble en etanol.

#### Rojo de fenol SI

*Preparación* – Calentar 0,1 g de rojo de fenol con 1,42 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y 5 ml de etanol a 90% (v/v). Después de disolución, añadir etanol a 20% (v/v) para completar 250 ml. Banda de pH – 6,8-8,4

*Cambio de pH* – Da coloración amarilla en medio neutro y roja en solución levemente alcalina.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,1 ml de rojo de fenol SI y 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono presenta color amarillo. Son necesarios no más que 0,1 ml de hidróxido de sodio 0,02 M para alterar la coloración para violeta-rojiza.

#### Rojo de metilo (CI 13020)

*CAS* – [493-52-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{15}H_{15}N_3O_2$  – 269,30

*Descripción* – Cristales violetas o polvo rojo oscuro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

#### Rojo de metilo SI

*Preparación* – Calentar 0,1 g de rojo de metilo con 1,85 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y 5 ml de etanol a 90% (v/v). Después de disolución, completar el volumen de 250 ml con etanol a 50% (v/v).

*Banda de pH* – 3,0 – 4,4

*Cambio de color* – Da coloración roja en soluciones levemente ácidas y coloración amarilla en soluciones muy levemente ácidas y alcalinas.

*Ensayo de sensibilidad* – La mezcla de 0,1 ml de rojo de metilo SI, 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono y 0,05 ml de ácido clorhídrico 0,02 M presenta color rojo. Son necesarios no más que 0,1 ml de hidróxido de sodio 0,02 M para cambiar la coloración para amarilla.

#### Rojo de quinaldina

*CAS* – [117-92-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{23}IN_2$  – 430,33

*Descripción* – Polvo azul oscuro.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

#### Rojo de quinaldina SI

*Preparación* – Disolver 0,1 g en 100 ml de metanol.

*Cambio de color* – Ocurre cambio de coloración carmín para casi incoloro. Utilizado en titulaciones de bases con ácido perclórico.

## 14.2 REACTIVOS Y SOLUCIONES REACTIVOS

Reactivos son sustancias utilizadas, como tales, o como constituyentes de soluciones, en la realización de los ensayos farmacopeicos.

#### Acetal

*CAS* – [105-57-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{14}O_2$  – 118,17

*Descripción* – Líquido incoloro, límpido y volátil.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,824. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,382. Temperatura de ebullición: cerca de 103 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

#### Acetaldehído

*CAS* – [75-07-0]

*Sinonimia* – Etanal.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_4O$  – 44,05

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,788. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,332. Temperatura de ebullición: cerca de 21 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Seguridad* – Inflamable!

#### Acetanilida

*CAS* – [103-84-4]

*Nombre químico* – N-Fenilacetamida

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_9NO$  – 135,17

*Descripción* – Polvo blanco cristalino, inodoro.

*Característica física* – Banda de fusión: 114 °C a 116 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en cloroformo y etanol, soluble en agua hirviendo, éter etílico y glicerina.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

#### Acetato de amonio

*CAS* – [631-61-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_7NO_2$  – 77,08

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros, muy frágiles, de suave olor acético.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.



**Acetato de amonio SR**

*Especificación* – Contiene 15 g de acetato de amonio en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Estabilidad* – Preparar para uso inmediato.

**Acetato de bornilo**

*CAS* – [5655-61-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{20}O_2$  – 196,29

*Descripción* – Cristales incoloros o líquido incoloro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 28 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y soluble en etanol.

**Acetato de butilo**

*CAS* – [123-86-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{12}O_2$  – 116,16

*Descripción* – Líquido incoloro y inflamable con olor dulce de fruta.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,88. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,395. Banda de ebullición: 125 °C a 126 °C.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua. Miscible en etanol y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

**Acetato de celulosa**

*CAS* – [9004-35-7]

*Especificación* – Celulosa parcialmente acetilada, con grados de acetilación variados.

*Descripción* – Sólido amorfo blanco.

*Categoría* – Adsorbente en cromatografía en camada delgada.

**Acetato de plomo, trihidratado**

*CAS* – [6080-56-4]

*Sinonimia* – Acetato de plomo (II) trihidratado.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6PbO_4 \cdot 3H_2O$  – 379,33

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros, transparentes o polvo cristalino blanco, de olor acético suave. Eflorescente.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: 75 °C (calentamiento rápido); se descompone completamente a 200 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Tóxico. Contaminante.

**Acetato de plomo, papel**

*Preparación* – Impregnar papel adecuado (generalmente en el tamaño 6 mm x 80 mm) con solución de acetato de plomo SR. Secar el papel reactivo a 100 °C, evitando contacto con metal.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y de la humedad. Acetato de plomo SR (aproximadamente 0,25 M)

*Especificación* – Contiene 9,5 g de acetato de plomo en 100 ml de agua exenta de dióxido de carbono.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico. Contaminante.

**Acetato de plomo, solución saturada**

*Especificación* – Contiene aproximadamente 35 g de acetato de plomo en 50 ml de agua exenta de dióxido de carbono.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico. Contaminante.

**Acetato de clorhexidina**

*CAS* – [56-95-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$  – 625,58

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco a crema pálido; inodoro.

*Característica física* – Banda de fusión: 154 °C a 155 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Irritante.

*Categoría* – Antimicrobiano.

**Acetato de clorhexidina a 0,1% (p/v)**

*Especificación* – Contiene 0,1 g de acetato de clorhexidina en 100 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico.

*Categoría* – Antimicrobiano.

**Acetato de cobre**

*CAS* – [142-71-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$  – 199,65

*Descripción* – Polvo o cristales verde-azulados.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua hirviendo, soluble en agua y en etanol poco soluble en glicerol.

**Acetato de cortisona**

*CAS* – [50-04-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{23}H_{30}O_6$  – 402,49

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.



*Descripción* – Cristales incoloros levemente amarillentos o polvo cristalino blanco o casi blanco. Inodoro; inicialmente insípido, después amargo.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: aproximadamente 240 °C. Rotación óptica: + 209° a + 219° (determinar en solución a 1,0% (p/v) en dioxano).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Categoría* – Corticosteroide.

#### **Acetato de cortisona, inyectable**

*Descripción* – Consiste de una suspensión en medio acuoso adecuado, con pH entre 5,0 y 7,0.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 90,0% (p/p).

*Conservación* – En ampollas de dosis única.

#### **Acetato de desoxicortona**

*CAS* – [56-47-3]

*Sinonimia* – Acetato de desoxicorticosterona.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{23}H_{32}O_4$  – 372,50

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco. Inodoro.

*Características físicas* – Banda de fusión: 157 °C a 161 °C.

Rotación óptica: +171° a +179° (determinar en solución a 1,0% (p/v) en dioxano).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Categoría* – Corticosteroide.

#### **Acetato de etilo**

*CAS* – [141-78-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_8O_2$  – 88,11

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,9% (p/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 0,90. Temperatura de ebullición: aproximadamente 77 °C. Índice de refracción (20 °C): 1,371 a 1,373.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Inflamable.

#### **Acetato de fenilmercurio**

*CAS* – [62-38-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_8HgO_2$  – 336,74

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales pequeños o polvo cristalino blanco o color crema, brillante.

*Característica física* – Banda de fusión: 149 °C a 153 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Tóxico. Contaminante.

#### **Acetato de indofenol SR**

*Sinonimia* – 2,6-Diclorofenolindofenol sódico en tampón acetato.

*Preparación* – Diluir 12 ml de la solución estándar de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico en 100 ml de agua. A esta solución juntar 100 ml de tampón acetato pH 7,0.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Estabilidad* – Utilizar en como máximo dos semanas.

*Almacenamiento* – Mantener bajo refrigeración.

#### **Acetato de magnesio**

*CAS* – [16674-78-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$  – 214,45

*Descripción* – Cristales incoloros y delicuescentes.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Acetato de mentilo**

*CAS* – [2623-23-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{22}O_2$  – 198,30

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,92. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,447. Temperatura de ebullición: cerca de 228 °C.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua y miscible en etanol.

#### **Acetato de mercurio**

*CAS* – [1600-27-7]

*Sinonimia* – Acetato mercúrico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6HgO_4$  – 318,68

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, o casi blancos, con suave olor acético.

*Característica física* – Banda de fusión: 178 °C a 180 °C (sobrecalentamiento resulta en descomposición).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Tóxico.

#### **Acetato de mercurio SR**

*Preparación* – Disolver 6 g de acetato de mercurio en ácido acético glacial a 100ml

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz solar directa.

### Acetato de metilo

*CAS* – [79-20-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_6O_2$  – 74,07

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,933. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,361. Banda de ebullición: 56 °C a 58 °C.

*Miscibilidad* – Soluble en agua y miscible en etanol.

### Acetato de potasio

*CAS* – [127-08-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_3KO_2$  – 98,14

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro o de olor acético suave. Delicuescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 292 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Acetato de potasio SR

*Especificación* – Contiene 10 g de acetato de potasio en 100 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Acetato de prednisolona

*CAS* – [52-21-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{23}H_{30}O_6$  – 402,49

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p) calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco. Inodoro. Amargo.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: aproximadamente 247 °C. Rotación óptica: +112° a +119° (determinar en solución a 1,0% (p/v) en dioxano).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Corticosteroide.

### Acetato de sodio

*CAS* – [6131-90-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  – 136,08 (se anhidro – 82,03)

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro o de olor acético suave. Eflorescente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Acetato de sodio SR (aproximadamente 0,02 M)

*Especificación* – Contiene 0,272 g de acetato de sodio trihidratado en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Acetato de uranilo

*CAS* – [6159-44-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6O_6U \cdot 2H_2O$  – 424,15.

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo, de olor acético suave.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Sustancia radioactiva.

### Acetato de uranilo y zinc SR

*Preparación* – Disolver 10 g de acetato de uranilo en 50 ml de agua caliente y 5 ml de ácido acético 30% (p/v). Disolver 30 g de acetato de zinc en 30 ml de agua caliente y 3 ml de ácido acético 30% (p/v). Mezclar las preparaciones anteriores. Dejar enfriar. Filtrar.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Sustancia radioactiva.

### Acetato de zinc

*CAS* – [5970-45-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$  – 219,50

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o blancos, o escamas cristalinas o gránulos, de olor acético suave, de sabor metálico astringente. Eflorescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 237 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante.

### Acetilacetona

*CAS* – [123-54-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_8O_2$  – 100,11

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro o amarillento, de olor aromático.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 139 °C. Densidad: aproximadamente 0,97. Índice de refracción (20 °C): 1,4505 a 1,4525.

*Miscibilidad* – Miscible en acetona y etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Inflamable.

### Acetona

*CAS* – [67-64-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_6O$  – 58,08

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico.

*Características físicas* – Densidad: 0,790 a 0,793. Índice de refracción (20 °C): 1,358 a 1,360. Temperatura de ebullición: aproximadamente 56 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Inflamable. Irritante y tóxico.

### Acetona deshidratada

*Especificación* – Acetona, deshidratada en sulfato de sodio anhidro.

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

### Acetona tamponada SR

*Preparación* – Disolver 8,15 g de acetato de sodio trihidratado y 42 g de cloruro de sodio en agua, añadir 68 ml de ácido clorhídrico 0,1 M 150 ml de acetona. Completar el volumen con agua para 500 ml.

### Acetonitrilo

CAS – [75-05-8]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N – 41,05

*Descripción* – Líquido límpido y incoloro. Olor semejante al éter.

*Características físicas* – Densidad (20°C): cerca de 0,78. Índice de Refracción (20 °C): cerca de 1,344.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, acetona y metanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable!

### Ácido acético M

*Especificación* – Contiene 6 g de ácido acético glacial en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes herméticos. *Información adicional* – Al usar, confirmar el título.

### Ácido acético 6 M

*Especificación* – Contiene 348 g de ácido acético glacial en agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Corrosivo e inflamable.

### Ácido acético diluido

*Especificación* – Contiene 12 g de ácido acético glacial en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

### Ácido acético SR

*Especificación* – Contiene 30 g de ácido acético glacial en agua a 100 ml. Corresponde al ácido acético 5 M.

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, de olor irritante.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

### Ácido acético glacial

CAS – [64-19-7]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – 60,05

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor irritante y característico. Cristalizable a bajas temperaturas.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,05. Temperatura de ebullición: aproximadamente 118 °C. Temperatura de congelamiento: aproximadamente 14 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Corrosivo. Inflamable. Proteger ojos, piel y mucosas.

### Ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico

CAS – [22252-43-3]

*Sinonimia* – 7-ADCA

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S- 214,24

### Ácido ascórbico

CAS – [50-81-7]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> – 176,13

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco. Inodoro.

*Características físicas* – Solución a 5% (p/v) presenta pH de 2,2 a 2,5. Temperatura de fusión: aproximadamente 190 °C, con descomposición. Rotación óptica específica: entre +20,5° y +21,5°, determinar en solución acuosa a 1% (p/v).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, no metálicos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Ácido benzoico

CAS – [65-85-0]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> – 122,12

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, de olor característico.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 122 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en agua hirviendo y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido bórico

CAS – [10043-35-3]

*Fórmula y masa molecular* – H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> – 61,83

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros brillantes o polvo fino cristalino blanco, untuoso al tacto, de sabor levemente ácido y amargo.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol, fácilmente soluble en agua hirviendo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

Ácido bórico, solución saturada

*Preparación* – Disolver 5 g en 100 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido bromhídrico

CAS – [10035-10-6]

*Fórmula y masa molecular* – HBr – 80,91

*Especificación* – Contiene 48,0% (p/v).

*Descripción* – Líquido incoloro o levemente amarillo, de olor fuerte e irritante. Oscurece lentamente por la exposición al aire y a la luz.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del aire y de la luz.

*Seguridad* – Irritante. Corrosivo.

### Ácido cafeico

CAS – [331-39-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_8O_4$  – 180,16

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 225 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua caliente y etanol, ligeramente soluble en agua fría.

### Ácido calconcarboxílico

CAS – [3737-95-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{14}N_2O_7S$  – 438,40

*Descripción* – Polvo marrón-negro.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, muy poco soluble en acetona y en etanol, ligeramente soluble en soluciones diluidas de hidróxido de sodio.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido ciclobutano-1,1-dicarboxílico

CAS – [5445-51-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{10}O_4$  – 144,13

*Descripción* – Cristales blancos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 160 °C.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Ácido 1,2-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético

CAS – [125572-95-4]

*Sinonimia* – Ácido 1,2-ciclohexileno-diamino-tetracético, CDTA.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_{22}N_2O_8 \cdot H_2O$  – 364,35.

*Descripción* – Polvo blanco.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados, protegidos del calor.

*Seguridad* – Irritante.

### Ácido cinámico

CAS – [140-10-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_8O$  – 148,16

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 133 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

### Ácido cítrico, monohidratado

CAS – [5949-29-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  – 210,14

*Descripción* – Cristales o gránulos incoloros, o polvo cristalino blanco o casi blanco. Eflorescente.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido clorhídrico

CAS – [7647-01-0]

*Sinonimia* – Cloruro de hidrógeno y ácido clorhídrico concentrado.

*Fórmula y masa molecular* – HCl – 36,46

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 35,0% (p/p) constituido de solución de HCl gaseoso en agua.

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, humeante, de olor irritante.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,18.

*Conservación* – En recipientes herméticos, de material inerte al reactivo.

*Almacenamiento* – Proteger del calor (mantener en temperaturas menores que 20 °C).

*Seguridad* – Corrosivo. Evitar contacto externo, ojos y piel, inhalación e ingestión.

### Ácido clorhídrico bromado SR

*Preparación* – Añadir 1 ml de bromo SR en 100 ml de ácido clorhídrico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido clorhídrico diluido

*Especificación* – Usar ácido clorhídrico SR.

Ácido clorhídrico *M*

*Especificación* – Contiene 103 g de ácido clorhídrico en 1000 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Corrosivo.

*Información adicional* – Al usar, confirme el título.

### Ácido clorhídrico SR

*Especificación* – Contiene 27,4 g de ácido clorhídrico concentrado en 100 ml de agua.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,05.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Corrosivo.

### Ácido clorhídrico metanólico 0,01 M

*Preparación* – Transferir 0,85 ml de ácido clorhídrico para balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con metanol.

Ácido clorhídrico-estaño SR

*Preparación* – Mezclar 1 ml de cloruro de estaño SR1 con 100 ml de ácido clorhídrico.

### Ácido clorogénico

CAS – [327-97-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{16}H_{18}O_9$  – 354,34

*Descripción* – Agujas o polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 208 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua hirviendo, en acetona y en etanol.

### Ácido cloroplatínico

CAS – [18497-13-7]

*Sinonimia* – Cloruro platínico, cloruro de platino, ácido cloroplatínico (IV).

*Fórmula y masa molecular* –  $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$  – 517,90

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 37,0% (p/p) de platino.

*Descripción* – Masa cristalina amarilla amarronada, muy delicuescente.

*Características físicas* – Densidad: 2,431. Temperatura de fusión: 60 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Tóxico.

### Ácido crómico

Donde conste, usar trióxido de cromo ( $CrO_3$ ).

Ácido 3,5-dinitrobenzoico

CAS – [99-34-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_4N_2O_6$  – 212,12

*Descripción* – Cristales prácticamente incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 206 °C.

### Ácido edético

CAS – [60-00-4]

*Sinonimia* – Ácido etilenodiaminotetracético, EDTA.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{16}N_2O_8$  – 292,24

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Característica física* – Se descompone alrededor de 220 °C, pudiendo descarboxilar a 150 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Preparación* – Disolver 2,5 g de fenol en 15,0 ml de ácido sulfúrico. Juntar 7,5 ml de ácido sulfúrico humeante. Calentar a 100 °C por dos horas. Transferir el producto fluido para recipiente adecuado. Para uso, licuar en baño de agua.

*Conservación* – Recipiente de vidrio con tapa esmerilada.

*Seguridad* – Irritante y corrosivo.

### Ácido fenoxiacético

CAS – [122-59-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_8O_3$  – 152,15

*Descripción* – Cristales casi blancos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 98 °C.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua y fácilmente soluble en etanol y ácido acético glacial.

### Ácido fluorhídrico

CAS – [7664-39-3]

*Fórmula y masa molecular* – HF – 20,01

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 40% (p/p) de HF.

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Conservación* – En recipientes de polietileno bien cerrados.

### Ácido fórmico

CAS – [64-18-6]

*Sinonimia* – Ácido metanoico.

*Fórmula y masa molecular* –  $CH_2O_2$  – 46,03



*Especificación* – La forma anhidra contiene, como mínimo, 98,0% (p/p). El comercial contiene en torno de 90,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido incoloro, muy cáustico, de olor picante.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 100,5 °C. Densidad: aproximadamente 1,22. Índice de refracción (20 °C): 1,3714. Solidifica a 70 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Cáustico.

#### Ácido fosfomolibdico

CAS – [51429-74-4]

*Sinonimia* – Ácido molibdofosfórico.

*Fórmula molecular* – Aproximadamente  $12\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ .

*Descripción* – Cristales levemente amarillentos.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### Ácido fenoldisulfónico SR

CAS – [96-77-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7\text{S}_2$  – 254,24

*Descripción* – Líquido límpido a marrón claro.

#### Ácido fosfomolibdico SR

*Preparación* – Disolver 4 g de ácido fosfomolibdico en 40 ml de agua bajo calentamiento. Después de enfriamiento añadir 60 ml de ácido sulfúrico.

#### Ácido fosfórico

CAS – [7664-38-2]

*Sinonimia* – Ácido ortofosfórico

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_3\text{PO}_4$  – 98,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 85,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, inodoro. Higroscopio; consistencia de jarabe.

*Característica física* – Densidad: aproximadamente 1,7.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Corrosivo! Evitar contacto con piel, mucosas, membranas.

#### Ácido fosfórico SR

*Preparación* – Mezclar cantidad correspondiente a 15 g de ácido fosfórico concentrado con agua hasta alcanzar 100 ml.

*Característica física* – Densidad: aproximadamente 1,15.

#### Ácido fosfotúngstico SR

*Preparación* – Calentar bajo reflujo por 3 horas, la mezcla de 10 g de tungstato de sodio con 8 ml de ácido fosfórico y 75 ml de agua. Dejar enfriar y diluir para 100 ml con agua.

#### Ácido ftálico

CAS – [88-99-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$  – 166,14

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua caliente y en etanol.

#### Ácido gálico

CAS – [5995-86-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5\text{H}_2\text{O}$  – 188,14

*Descripción* – Agujas largas o polvo cristalino incoloro o amarillo claro.

*Características físicas* – Pierde agua de cristalización a temperatura de 120 °C y se funde en cerca de 206 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en agua, fácilmente soluble en agua caliente, en etanol y en glicerol.

#### Ácido p-hidroxibenzoico

CAS – [99-96-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$  – 138,13

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Característica física* – Banda de fusión: 213-214 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### Ácido hipofosforoso

CAS – [6303-21-5]

*Sinonimia* – Ácido hipofosforoso diluido.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_3\text{PO}_2$  – 66,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 48% (p/v) de  $\text{H}_3\text{PO}_2$

*Descripción* – Líquido incoloro o ligeramente amarillo.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y etanol.

#### Ácido yodhídrico

CAS – [10034-85-2]

*Fórmula y masa molecular* – HI – 127,91

*Descripción* – Solución acuosa de ácido yodhídrico. Cuando recién preparado, es incoloro, pero con la exposición al aire y a la luz, presenta color amarillento a marrón.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del contacto con el aire. Mantener en temperaturas menores que 30 °C.

#### Ácido láctico

CAS – [50-21-5]

*Sinonimia* – Ácido 2-hidroxiopropanoico

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$  – 90,08

*Especificación* – Mezcla del ácido 2-hidroxiopropanoico y sus productos de condensación. El equilibrio entre el ácido láctico y los ácidos polilácticos es dependiente de la concen-

tración y de la temperatura. El ácido láctico normalmente es un racemato (R,S-ácido láctico).

*Descripción* – Líquido viscoso incoloro o levemente amarillo.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Ácido metafosfórico

*CAS* – [10343-62-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $(\text{HPO}_3)_n$ , monómero – 79,98.

*Especificación* – Contiene cierta proporción de metafosfato de sodio.

*Descripción* – Sólido o masa vítrea, incoloro. Higroscópico. En solución acuosa, se transforma lentamente en ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).

*Característica física* – Volatiliza bajo calentamiento intenso.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

### Ácido metafosfórico-acético SR

*Especificación* – Contiene 3 g de ácido metafosfórico y 8 ml de ácido acético glacial en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Limitada a dos días.

*Almacenamiento* – Mantener bajo refrigeración.

### Ácido metanosulfónico

*CAS* – [75-75-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_4\text{O}_3\text{S}$  – 96,11

*Descripción* – Líquido límpido y incoloro (solidifica a 20 °C).

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,48. Índice de refracción: cerca de 1,430. Temperatura de fusión: 20 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, poco miscible en tolueno y prácticamente inmisible en hexano.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante!

### Ácido nítrico

*CAS* – [7697-37-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{HNO}_3$  – 63,01

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 63,0% (p/p).

*Descripción* – Solución límpida, prácticamente incolora, de olor característico.

*Característica física* – Densidad: 1,384 a 1,416.

*Conservación* – En recipientes herméticos, al abrigo de la luz.

**Seguridad – Corrosivo.**

### Ácido nítrico humeante

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido límpido, levemente amarillento, humeante en el aire.

### Ácido nítrico SR

*Especificación* – Contiene cerca de 12,5% (p/v) de  $\text{HNO}_3$ .

*Característica física* – Densidad: aproximadamente 1,5.

### Ácido oxálico

*CAS* – [6153-56-6]

*Sinonimia* – Ácido etanodioico.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 126,07

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 101 °C.

*Seguridad* – Veneno!

### Ácido oxálico SR

*Especificación* – Solución de ácido oxálico a 6,3% (p/v).

Ácido perclórico

*CAS* – [7601-90-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{HClO}_4$  – 100,46

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 70,0% (p/p) y, como máximo, 72,0% de  $\text{HClO}_4$ .

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil y de olor picante. Higroscópico.

*Característica física* – Densidad: aproximadamente 1,7.

*Conservación* – Se descompone espontáneamente, pudiendo explotar especialmente en contacto con sustancias oxidables.

*Seguridad* – Irritante. Corrosivo!

### Ácido perclórico M

*Especificación* – Contiene 8,5 ml de  $\text{HClO}_4$  en agua, hasta 100 ml.

*Estabilidad* – Usar solución recién preparada.

### Ácido perclórico SR

Usar ácido perclórico M.

### Ácido perfórmico

*CAS* – [107-32-4]

*Sinonimia* – Ácido peroxifórmico.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_2\text{O}_3$  – 62,03

*Preparación* – Mezclar 1 ml de peróxido de hidrógeno a 30,0% (v/v), o 9,0% (p/p), con 90 ml del ácido fórmico.

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Irritante. Puede explotar en contacto con metales, sus óxidos, sustancias reductoras, o en la destilación.

### Ácido periódico

*CAS* – [10450-60-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $H_5IO_6$  – 227,94

*Descripción* – Cristales blancos a incoloros.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: 122 °C. Se descompone entre 130 °C y 140 °C, formando  $I_2O_5$ ,  $H_2O$  y  $O_2$ .

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

### Ácido pícrico

*CAS* – [88-89-1]

*Sinonimia* – 2,4,6-Trinitrofenol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_3N_3O_7$  – 229,10

*Especificación* – Cristales amarillos o placas humedecidas con agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, mezclado con igual masa de agua.

*Almacenamiento* – En temperatura ambiente.

*Seguridad* – Explota cuando es calentado rápidamente o sometido a choque. Para transporte seguro, 10% a 20% de agua son generalmente añadidos.

### Ácido pícrico SR

*Preparación* – Añadir 0,25 ml de hidróxido de sodio 10 M en 100 ml de solución saturada de ácido pícrico en agua.

### Ácido pícrico SRI

*Preparación* – Disolver el equivalente a 1 g de ácido pícrico en 100 ml de agua caliente. Enfriar y filtrar, si necesario.

### Ácido rosmarínico

*CAS* – [20283-92-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{18}H_{16}O_8$  – 360,31

*Descripción* – Polvo rojo anaranjado.

*Característica física* – Banda de fusión: 170 °C a 174 °C.

### Ácido salicílico

*CAS* – [69-72-7]

*Sinonimia* – Ácido 2-hidroxibenzoico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_6O_3$  – 138,12

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre base seca.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o agujas cristalinas incoloros. Inodoro y sabor ácido dulce e irritante.

*Característica física* – Banda de fusión: 156-160 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol a 96% (v/v), ligeramente soluble en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido selenioso

*CAS* – [7783-00-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $H_2SeO_3$  – 128,97

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 93% (p/p) de  $H_2SeO_3$ .

*Descripción* – Cristales blancos o incoloros. Eflorescente al aire seco y higroscópico al aire húmedo.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ácido sulfámico

*CAS* – [5329-14-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $H_3NO_3S$  – 97,09

*Sinonimia* – Ácido amidosulfónico.

*Especificación* – Cristales blancos o polvo cristalino.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 205 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, ligeramente soluble en acetona, en etanol y en metanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados de vidrio ámbar.

*Seguridad* – Moderadamente irritante para piel y mucosas.

### Ácido sulfanílico

*CAS* – [6101-32-2]

*Sinonimia* – Ácido 4-aminobenzenosulfónico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_7NO_3 \cdot S.H_2O$  – 191,20; anhidro – 173,84.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo blanco.

*Característica física* – El ácido monohidratado se descompone sin fundirse a aproximadamente 288 °C.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol.

### Ácido sulfanílico diazotado SR

*Preparación* – Disolver, cuidadosamente, 0,2 g de ácido sulfanílico en 20 ml de ácido clorhídrico M, enfriar en baño de hielo y añadir, gota a gota, con agitación continua, 2,2 ml de solución de nitrito de sodio a 4% (p/v). Dejar en baño de hielo por 10 minutos y añadir 1 ml de solución de ácido sulfámico a 5% (p/v).

### Ácido sulfanílico SR

*Preparación* – Disolver 0,5 g de ácido sulfanílico finamente pulverizado, en agua. Añadir 6 ml de ácido clorhídrico 6 M. Completar con agua hasta 100 ml.

**Ácido sulfúrico**

CAS – [7664-93-9]

Fórmula y masa molecular –  $\text{H}_2\text{SO}_4$  – 98,07

Especificación – Contiene, como mínimo 95,0% (p/p).

Descripción – Líquido incoloro, cáustico, de consistencia oleosa, muy higroscópico.

Característica física – Densidad: 1,834 a 1,839.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Irritante. Corrosivo!

**Ácido sulfúrico diluido**

Usar ácido sulfúrico SR.

**Ácido sulfúrico libre de nitrógeno**

Especificación – Cumple la siguiente prueba: en 5 ml de agua, añadir, cuidadosamente, 45 ml de ácido sulfúrico, esperar enfriar para 40 °C y añadir 8 mg de difenilbencidina. La solución resultante es levemente rosa o un azul pálida.

**Ácido sulfúrico metanólico 0,1 M**

Preparación – Diluir 5,4 ml de ácido sulfúrico con 20 ml de metanol. Completar para 1000 ml con el mismo solvente.

Informaciones adicionales – Preparar 24 horas antes del uso.

**Ácido sulfúrico/metanol SR**

Preparación – Añadir lentamente 10 ml de ácido sulfúrico en 90 ml de metanol. Observación – Mantener el sistema frío.

**Ácido sulfúrico metanólico SR**

Preparación – A 30 ml de metanol anhidro frío en baño de hielo añadir, cuidadosamente, ácido sulfúrico en pequeñas cantidades, bajo agitación. Enfriar a temperatura ambiente y completar para 100 ml con ácido sulfúrico. Homogeneizar.

**Ácido sulfúrico, solución etanólica**

Preparación – Cuidadosamente y con constante enfriamiento, añadir 20 ml de ácido sulfúrico en 60 ml de etanol. Continuar el enfriamiento y diluir para 100 ml con etanol. Preparar inmediatamente antes del uso.

**Ácido sulfúrico SR**

Especificación – Contiene ácido sulfúrico a 10% (p/v) en agua.

Preparación – Añadir, cuidadosamente, 57 ml de ácido sulfúrico en 100 ml de agua, enfriar y diluir para 1000 ml con agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Ácido sulfuroso**

CAS – [7782-99-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{H}_2\text{SO}_3$  – 82,07

Especificación – Contiene 5,0 a 6,0% (p/p) de dióxido de azufre puro. Preparar de acuerdo con el consumo.

Descripción – Líquido ácido, límpido, incoloro, de olor sofocante de dióxido de azufre. Al aire se oxida paulatinamente a ácido sulfúrico.

Conservación – En recipientes casi llenos, bien cerrados, en local frío.

**Ácido tartárico**

CAS – [87-69-4]

Sinonimia – Ácido L-(+)-tartárico.

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  – 150,09

Descripción – Cristales o polvos cristalinos blancos.

Características físicas – Banda de fusión: 168 °C a 170 °C. Densidad (20 °C): 1,756.

Solubilidad – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Ácido tioglicólico**

CAS – [68-11-1]

Sinonimia – Ácido mercaptoacético. Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{S}$  – 92,11

Especificación – Contiene, como mínimo, 79,0% (p/p).

Descripción – Líquido incoloro o próximo a incoloro, de olor fuerte desagradable.

Característica física – Densidad: aproximadamente 1,33.

Miscibilidad – Miscible en agua y en etanol.

Conservación – Proteger del aire.

Seguridad – Puede causar graves quemaduras en la piel.

Información adicional – Su descomposición libera gas sulfhídrico.

**Ácido p-toluenosulfónico**

CAS – [6192-52-5]

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$  – 190,21Especificación – Contiene, como mínimo, 87% de  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{S}$ .

Descripción – Cristales o polvo cristalino blanco o casi blanco.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

**Ácido tricloroacético**

CAS – [76-03-9]

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$  – 163,39

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o masa cristalina, delicuescente, de olor característico levemente penetrante, irritante.

*Característica física* – Banda de fusión: 55 a 61 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor y de la humedad.

*Seguridad* – Ácido muy corrosivo.

### Ácido tricloroacético-cloramina-T SR

*Solución A* – Cloramina-T a 3% (p/v).

*Solución B* – Ácido tricloroacético a 25% (v/v) en etanol absoluto.

*Preparación* – Mezclar 10 ml de la *Solución A* con 40 ml de la *Solución B*.

### Ácido trifluoroacético

*CAS* – [76-05-1]

*Sinonimia* – Ácido trifluoroacético.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2HF_3O_2$  – 114,02

*Descripción* – Líquido incoloro, volátil, de olor irritante y característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 72,4 °C. Densidad: 1,535.

*Miscibilidad* – Miscible en acetona, benceno, etanol, éter etílico, hexano y tetracloruro de carbono.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Corrosivo. Inflamable. Proteger ojos, piel y mucosas.

### Acrilamida

*CAS* – [79-06-1]

*Sinonimia* – 2-Propenamida.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_5NO$  – 71,08

*Especificación* – Calidad apropiada para electroforesis.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o casi blanco, o escamas incoloras o blancas.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 84 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en metanol, fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Altamente tóxico e irritante. Causa parálisis del sistema nervioso central. Puede ser adsorbido por la piel íntegra.

### Acrilamida/bisacrilamida (29:1) a 30% (p/v) SR

*Preparación* – Preparar una solución conteniendo 290 g de acrilamida y 10 g de metilbisacrilamida por 1000 ml de agua caliente. Filtrar.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Agar

*CAS* – [9002-18-0]

*Sinonimia* – Agar-agar, gelosa.

*Especificación* – Polisacárido extraído de *Gelidium cartilagineum* (L) Gaillon (Gelidiaceae), *Gracilaria confervoides* (L) Greville (Sphaerococcaceae) y algas rojas afines (Rhodophyceae).

*Descripción* – Polvo fino, incoloro o ligeramente amarillento, seco, hidrofílico.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

### Agarosa, gel

*CAS* – [9012-36-6]

*Especificación* – Polisacárido lineal, neutro, componente del agar.

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua fría y muy poco soluble en agua caliente.

*Uso* – Electroforesis.

### Agarosa-DEAE para cromatografía de cambio iónico

*Especificación* – Agarosa reticulada conteniendo agrupamientos dietilaminoetilo. Se presenta en forma de esferas.

### Agua de bromo SR

*Preparación* – Mezclar 3 ml de bromo con 100 ml de agua hasta saturación. Agitar antes del uso. Después de decantación, usar la solución sobrenadante límpida.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Conservar con exceso de bromo y al abrigo de la luz.

*Seguridad* – Tóxico.

### Agua de cloro SR

*Especificación* – Solución saturada de cloro en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire. Mantener en local frío y oscuro.

### Agua exenta de dióxido de carbono

*Especificación* – Agua hervida vigorosamente por 5 minutos o más y protegida de la atmósfera, durante enfriamiento y conservación.

*Conservación* – Proteger del aire (de la absorción de  $CO_2$ ).

### Agua exenta de amoníaco

*Preparación* – Transferir 0,1 ml de ácido sulfúrico 96% (p/p) para 100 ml de agua y destilar empleando equipo con paredes exentas de amoníaco.



**Agua exenta de nitrato**

*Preparación* – Transferir 5 mg de permanganato de potasio y 5 mg de hidróxido de bario para 100 ml de agua y destilar empleando equipo con paredes exentas de nitrato.

**Agua libre de partículas**

*Especificación* – Agua obtenida por filtración en membrana de porosidad de 0,22 µm.

**Albúmina bovina**

*CAS* – [9048-46-8]

*Sinonimia* – Albúmina sérica de origen bovina.

*Descripción* – Polvo blanco o marrón amarillento claro.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96% de proteínas. *Agua (5.2.20.3)* – Determinar en 0,8 g de la muestra. Como máximo, 30%.

*Almacenamiento* – En temperaturas entre 2 °C y 8 °C.

**Albúmina humana**

*Sinonimia* – Albúmina sérica humana.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96% de albúmina.

**Albúmina Humana, solución reactiva**

*Preparación* – Diluir la solución de albúmina humana con 15% a 25% (p/v) en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) hasta una concentración de 0,1% (p/v) en proteínas. Ajuste el pH para 3,5-4,5 con ácido acético glacial.

**Alcohol isoamílico**

*CAS* – [123-51-3]

*Sinonimia* – 3-Metilbutano-1-ol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_{12}O$  – 88,15

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Característica física* – Temperatura de ebullición: cerca de 130 °C.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua y miscible en etanol.

**Alcohol isobutílico**

*CAS* – [78-83-1]

*Sinonimia* – 2-Metilpropanol, 2-metil-1-propanol, isobutanol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{10}O$  – 74,12

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,80. Índice de refracción (15 °C): 1,397 a 1,399. Temperatura de ebullición: cerca de 107 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

**Alcohol isopropílico**

*CAS* – [67-63-0]

*Sinonimia* – Isopropanol, 2-propanol. *Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_8O$  – 60,10

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0%.

*Descripción* – Líquido incoloro, de olor característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 82 °C. Densidad: aproximadamente 0,785. Índice de refracción (20 °C): 1,376 a 1,378.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y con etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

**Alcohol n-amílico**

*CAS* – [71-41-0]

*Sinonimia* – 1-Pentanol, pentan-1-ol

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_{12}O$  – 88,15

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,41. Temperatura de ebullición: cerca de 137 °C. Temperatura de fusión: cerca de -79 °C.

*Miscibilidad* – Ligeramente soluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados

*Seguridad* – Irritante!

**Alcohol n-propílico**

*CAS* – [71-23-8]

*Sinonimia* – 1-Propanol, propanol. *Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_8O$  – 60,10

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, de suave olor alcohólico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 97 °C Densidad: 0,803 a 0,805.

*Miscibilidad* – Miscible con agua y con etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

**Alcohol polivinílico**

*CAS* – [9002-89-5]

*Fórmula molecular* –  $(C_2H_4O)_n$

*Descripción* – Polvo blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua y insoluble en solventes orgánicos.

**Alcohol terc-amílico**

*CAS* – [75-85-4]

*Sinonimia* – 2-Metil-2-butanol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_{12}O$  – 88,15

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro. Volátil.

**Características físicas** – Densidad relativa (20 °C): cerca de 0,81. Temperatura de fusión: cerca de -8 °C. Temperatura de ebullición: 102 °C.

**Miscibilidad** – Fácilmente miscible en agua. Miscible en etanol y en glicerol.

**Conservación** – En recipientes bien cerrados.

**Almacenamiento** – Proteger de la luz.

**Seguridad** – Inflamable.

### Alcohol terc-butílico

**CAS** – [75-65-0]

**Sinonimia** – 2-Metil-2-propanol.

**Fórmula y masa molecular** –  $C_4H_{10}O$  – 74,12

**Descripción** – Líquido incoloro y límpido, o masa cristalina de olor alcanforado.

**Características físicas** – Densidad (25 °C): 0,778 a 0,782. Temperatura de fusión: 25,7 °C. Temperatura de ebullición: 82,5 °C a 83,5 °C.

**Miscibilidad** – Soluble en agua, miscible con etanol y éter etílico.

### Aluminio, metálico

**CAS** – [7429-90-5]

**Elemento y masa atómica** – *Al* – 26,98

**Descripción** – Metal blanco o casi blanco a azulado, maleable, flexible. Disponible en barra, polvo, tiras o hilos.

### Aluminón

**CAS** – [569-58-4]

**Fórmula y masa molecular** –  $C_{22}H_{23}N_3O_9$  – 473,43

**Descripción** – Cristales marrones rojizos.

**Solubilidad** – Fácilmente soluble en agua.

### Amaranto (CI 16185)

**CAS** – [915-67-3]

**Fórmula y masa molecular** –  $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$  – 604,06

**Descripción** – Polvo fino, fácilmente soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol, acetona, éter etílico y cloroforno.

**Conservación** – En recipientes bien cerrados.

### Almidón yodado SR

Usar almidón yodado SI.

### Almidón yodado SR1

**Preparación** – Disolver 0,75 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua. Calentar hasta ebullición y añadir, agitando constantemente, una solución conteniendo 0,5 g de almidón soluble en 35 ml de agua. Dejar hervir por 2 minutos y enfriar.

### Almidón exento de yoduro SR

Usar almidón exento de yoduro SI.

### Almidón soluble

**Sinonimia** – Amilodextrina, amilogenio.

**Descripción** – Polvo blanco, fino, inodoro, insípido.

**Conservación** – En recipientes bien cerrados.

**Almacenamiento** – Proteger de la humedad.

### Almidón SR

Usar almidón SI.

### Almidón

**Descripción** – Extraídos de cariopses maduras de *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. u *oryza sativa* L. (fam. *Graminae*). Polvo blanco, fino, inodoro, insípido y que produce ligera crepitación cuando es comprimido.

**Conservación** – En recipientes bien cerrados.

**Almacenamiento** – Proteger de la humedad. **Información adicional** – El etiquetado debe indicar el origen botánico.

### 4-Aminoantipirina

**CAS** – [83-07-8]

**Sinonimia** – Aminopirazolona

**Fórmula y masa molecular** –  $C_{11}H_{13}N_3O$  – 203,24

**Descripción** – Cristales o polvo cristalino, amarillo-claro.

**Característica física** – Temperatura de fusión: aproximadamente 109 °C.

**Conservación** – En recipientes bien cerrados.

### Aminobutanol

**CAS** – [96-20-8]

**Nombre químico** – 2-Amino-1-butanol

**Fórmula y masa molecular** –  $C_4H_{11}NO$  – 89,14

**Descripción** – Líquido oleoso.

**Característica física** – Temperatura de ebullición: en torno de 180 °C.

**Miscibilidad** – Miscible con agua, soluble en alcoholes.

### 2-Aminoheptano

**CAS** – [123-82-0]

**Sinonimia** – 2-Heptanamina; 2-heptilamina; 1-metilhexanamina

**Fórmula y masa molecular** –  $C_7H_{17}N$  – 115,22

**Descripción** – Líquido volátil.

**Característica física** – Temperatura de ebullición: en torno de 143 °C.

**Miscibilidad** – Poco miscible en agua, fácilmente miscible en cloroforno, etanol y éter etílico.

**4-Aminofenol**

CAS – [123-30-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_7H_7NO$  – 109,13

Descripción – Polvo cristalino blanco o un poco colorido debido a exposición al aire y luz.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 186 °C, con descomposición.

Solubilidad – Ligeramente soluble en agua y soluble en etanol.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**2-Aminopiridina**

CAS – [504-29-0]

Sinonimia –  $\alpha$ -Aminopiridina, 2-piridinamina.

Descripción – Cristales grandes.

Característica física – Temperatura de fusión: en torno de 58 °C.

**Amoníaco SR**

Descripción – Contiene 37,5 ml de la solución concentrada de amoníaco en 100 ml de solución acuosa. Esta contiene, como mínimo, 10% (p/v) de hidróxido de amonio (aproximadamente 6 M).

**Amoníaco 6 M**

Usar amoníaco SR.

**Amoníaco 10 M**

Preparación – Diluir 56 ml de amoníaco para 100 ml con agua.

**Amoníaco, solución concentrada**Sinonimia – Hidróxido de amonio. Fórmula y masa molecular –  $NH_3$  – 17,03

Especificación – Contiene, como mínimo, 28,0% (p/p) y, como máximo, 30,0% (p/p).

Descripción – Líquido límpido, incoloro, de olor característico y asfixiante.

Conservación – En recipientes herméticos, no completamente llenos.

Almacenamiento – Proteger del aire y de la luz.

Seguridad – Cáustico.

**Anetol**

CAS – [4180-23-8]

Sinonimia – trans-Anetol.

Descripción – Masa cristalina blanca o casi blanca en temperatura entre 20 °C y 21 °C, líquido en temperatura arriba de 23 °C.

Características físicas – Índice de refracción (25 °C): cerca de 1,56. Temperatura de ebullición: cerca de 230 °C.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol y soluble en acetato de etilo y éter de petróleo.

**Anhídrido acético**

CAS – [108-24-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_4H_6O_3$  – 102,09

Especificación – Contiene, en el mínimo, 97,0% (p/p).

Descripción – Líquido móvil, incoloro, olor acético intenso e irritante.

Características físicas – Densidad: aproximadamente 1,075. Banda de ebullición: 136 a 142 °C.

Conservación – En recipientes herméticos.

Seguridad – Fácilmente combustible. Irritante fuerte.

**Anhídrido acético-piridina SR**

Sinonimia – Mezcla anhídrido acético-piridina SR

Descripción – Mezclar cuidadosamente, y bajo refrigeración, 25 g (o 23 ml) de anhídrido acético en 50 ml de piridina anhidra.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger del aire y de la luz. Estabilidad – Preparar en el momento de uso.

Seguridad – Tóxico.

**Anhídrido ftálico**

CAS – [85-44-9]

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_4O_3$  – 148,12

Descripción – Copos blancos o casi blancos.

Característica física – Banda de fusión: 130 °C a 132 °C.

Solubilidad – Poco soluble en agua y soluble en etanol.

Conservación – En recipientes cerrados.

**Anhídrido propiónico**

CAS – [123-62-6]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_{10}O_3$  – 130,14

Descripción – Líquido incoloro de olor penetrante.

Características físicas – Densidad: 1,01. Temperatura de ebullición: en torno de 167 °C.

Solubilidad – Soluble en etanol.

**Anisaldehído**

CAS – [123-11-5]

Sinonimia – Aldehído anísico y p-metoxibenzaldehído.

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_8O_2$  – 136,14

Descripción – Líquido oleoso, incoloro y amarillento, de olor aromático.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,12. Temperatura de ebullición: aproximadamente 248 °C.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua, miscible con etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Anisaldehído, solución

*Preparación* – Mezclar, en orden, 0,5 ml de anisaldehído, 10 ml de ácido acético glacial, 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico.

### Anisaldehído SR

*Preparación* – A 10 ml de anisaldehído añadir 90 ml de etanol, mezclar, añadir 10 ml de ácido sulfúrico y homogeneizar.

### Anisaldehído SR1

*Preparación* – Mezclar 25 ml de ácido acético glacial con 25 ml de etanol, añadir 0,5 ml de anisaldehído y 1 ml de ácido sulfúrico.

### Antitrombina III

CAS – [90170-80-2]

*Especificación* – La antitrombina III es purificada a partir del plasma humano por cromatografía en gelosa heparina y debe tener actividad específica de, como mínimo, 6 UI/mg.

### Antitrombina III SR

*Preparación* – Reconstituir la antitrombina III según las indicaciones del fabricante y diluir con tampón de tris-cloruro de sodio de pH 7,5, para obtener solución a 1 UI/ml.

### Aprotinina

CAS – [9087-70-1]

*Descripción* – Polvo casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en soluciones isotónicas, prácticamente insoluble en solventes orgánicos.

### Asiaticoside

CAS – [16830-15-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{48}H_{78}O_{19}$  – 958,51

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco. Higroscópico.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 232 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en metanol, poco soluble en etanol e insoluble en acetonitrilo.

### Asparagina

CAS – [5794-13-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$  – 150,13

*Descripción* – Cristales incoloros, inodoros.

*Características físicas* – Isómero L: Temperatura de fusión: 234-235 °C. Isómero D: Temperatura de fusión: 215 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol y en cloruro de metileno.

### Azida sódica

CAS – [26628-22-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaN_3$  – 65,01

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

### Azul ácido 83

CAS – [6104-59-2]

*Sinonimia* – Azul brillante.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$  – 825,99.

*Descripción* – Polvo castaño.

*Solubilidad* – Insoluble en agua fría, poco soluble en agua hirviendo y en etanol, soluble en ácido sulfúrico y en ácido acético glacial, soluble en soluciones diluidas de los hidróxidos de metales alcalinos.

### Azul ácido 90

CAS – [6104-58-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$  – 854,04.

*Descripción* – Polvo castaño oscuro, con reflejos violáceos y partículas con reflejos metálicos.

*Solubilidad* – Soluble en la agua y en el etanol.

### Azul de astra

CAS – [82864-57-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{47}H_{52}CuN_{14}O_6S_3$  – 1068,75

### Azul de Coomassie SR

*Preparación* – Preparar una solución de azul ácido 83 a 0,125% (p/v) en una mezcla de ácido acético glacial, metanol y agua (1:4:5) y filtrar.

### Azul de disulfina (CI 42045)

CAS – [129-17-9]

*Sinonimia* – Azul ácido I.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$  – 566,68

*Descripción* – Polvo violeta. En soluciones diluidas, presenta coloración azul. Después de adición de ácido clorhídrico concentrado, hay cambio de color para amarillo.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

### Azul de tetrazolio

CAS – [1871-22-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{40}H_{32}N_8O_2Cl_2$  – 727,65

*Descripción* – Cristales amarillos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 245 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en cloroformo, etanol y metanol, insoluble en acetona y éter etílico.

### Bálsamo de Canadá

CAS – [8007-47-4]

*Descripción* – Líquido oleoso amarillo o verdoso, extraído de la *Abies balsames* L., Pinaceae. Con olor agradable de pino. Si es expuesto al aire, se solidifica gradualmente en masa no cristalina.

*Características físicas* – Densidad: 0,987 a 0,994. Índice de refracción: 1,53.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, benceno, cloroformo y xileno.

*Información adicional* – Usado para fijar de láminas para microscopio.

### Barbaloína

CAS – [1415-73-2]

*Sinonimia* – Aloína.

*Descripción* – Agujas amarillas o polvo cristalino amarillo a amarillo oscuro. Oscurece con la exposición al aire y a la luz.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua y en etanol, soluble en acetona, en amoníaco y soluciones hidróxido-alcalinas.

### Barbital

CAS – [57-44-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{12}N_2O_3$  – 184,19

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor levemente amargo.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 190 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en agua hirviendo y en etanol.

### Barbital sódico

CAS – [144-02-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{11}N_2NaO_3$  – 206,18

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalizado blanco, inodoro, de sabor amargo y levemente cáustico.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Bario SRA – 1 mg/ml

*Especificación* – Contiene 1,775 g de cloruro de bario en agua a 1000 ml

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

### Benceno

CAS – [71-43-2]

*Sinonimia* – Benzol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_6$  – 78,11

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, refractivo, volátil, de olor característico.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 79 °C a 81 °C. Densidad: 0,878 a 0,880. Índice de refracción: 1,5016.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Altamente inflamable. Cancerígeno. *Información adicional* – Siempre que posible usar tolueno.

### Bencenosulfonamida

CAS – [98-10-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_5SO_2NH_2$  – 157,19

*Descripción* – Cristales blancos o beige pálidos.

*Característica física* – Banda de fusión: 150 °C a 153 °C.

### Bencilo

CAS – [134-81-6]

*Nombre químico* – Difeniletanodiona

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_{10}O_2$  – 210,23

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 95 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol, acetato de etilo y tolueno.

### Benzoato de bencilo

CAS – [120-51-4]

*Descripción* – Líquido oleoso, límpido e incoloro. Por el enfriamiento, forma cristales incoloros.

*Características físicas* – Temperatura de congelamiento: cerca de 17 °C. Temperatura de ebullición: cerca de 324 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y glicerol, miscible en etanol, éter etílico y cloroformo.

### Benzoato de colesterilo

CAS – [604-32-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{34}H_{50}O_2$  – 490,76

*Descripción* – Sólido blanco.

*Solubilidad* – Insoluble en agua.



**Benzoato de metilo**

CAS – [93-58-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_8O_2$  – 136,15

Descripción – Líquido incoloro.

Características físicas – Densidad (20 °C): 1,088. Temperatura de ebullición: cerca de 200 °C.

**Benzofenona**

CAS – [119-61-9]

Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{10}O$  – 182,22

Descripción – Polvo cristalino blanco.

Características – Temperatura de fusión: en torno de 48 °C.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol.

**Benzoína**

CAS – [119-53-9]

Nombre químico – 2-Hidroxi-1,2-difeniletanona

Fórmula y masa molecular –  $C_{14}H_{12}O_2$  – 212,25

Descripción – Cristales ligeramente amarillos.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua, fácilmente soluble en acetona, soluble en etanol calentado

**Bicarbonato de sodio**

CAS – [144-55-8]

Sinonimia – Carbonato ácido de sodio, hidrogenocarbonato de sodio.

Fórmula y masa molecular –  $NaHCO_3$  – 84,01

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% y, como máximo 101,0% (p/p), calculado en base seca.

Descripción – Polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salado y levemente alcalino. Por el calentamiento, se transforma en carbonato de sodio.

Solubilidad – Soluble en agua, prácticamente insoluble y etanol.

**Bicinconinato disódico**

CAS – [979-88-4]

Fórmula y masa molecular –  $C_{20}H_{10}N_2Na_2O_4$  – 388,28**Biftalato de potasio**

CAS – [877-24-7]

Sinonimia – Ftalato ácido de potasio, hidrogenoftalato de potasio, potasio biftalato.

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_5KO_4$  – 204,22

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,9% y, como máximo, 100,3% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada a 120 °C durante dos horas.

Descripción – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

Solubilidad – Soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Biftalato de potasio 0,05 M**

Preparación – Disolver 10,21 g en agua a 1000 ml

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Bisulfato de potasio**

CAS-[7646-93-7]

Sinonimia – Hidrogenosulfato de potasio; sulfato ácido de potasio.

Fórmula y masa molecular –  $KHSO_4$  – 136,16.

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Cristales incoloros o masa blanca; higroscópico.

Características físicas – Solución acuosa con carácter fuertemente ácido. Temperatura de fusión: 197 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, resultando en una solución muy ácida.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Bisulfato de sodio**

CAS – [7681-38-1]

Sinonimia – Sulfato ácido de sodio, hidrogenosulfato de sodio, persulfato de sodio.

Fórmula y masa molecular –  $NaHSO_4$  – 120,06

Característica física – Temperatura de fusión: en torno de 315 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo. Se descompone en etanol, formando sulfato de sodio y ácido sulfúrico libre.

**Bisulfito de sodio**

CAS – [7631-90-5]

Sinonimia – Hidrogeno sulfito de sodio, sulfito ácido de sodio.

Fórmula y masa molecular –  $NaHSO_3$  – 104,06

Descripción – Polvo cristalino blanco o casi blanco. A exposición al aire, puede causar pérdida de dióxido de azufre y la sustancia es gradualmente oxidada para sulfato.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

**Bitartrato de sodio**

CAS – [6131-98-2]

Sinonimia – Ácido tartrato de sodio.

Fórmula y masa molecular –  $C_4H_5NaO_6 \cdot H_2O$  – 190,08

Descripción – Cristales o polvo cristalino blanco.

Solubilidad – Soluble en agua.

**Bitartrato de sodio SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de bitartrato de sodio en agua y completar el volumen para 10 ml. Preparar la solución para uso inmediato.

**Biuret**

*CAS* – [108-19-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_5N_3O_2$  – 103,08

*Descripción* – Cristales blancos, o casi blancos. Higroscópicos.

*Característica física* – Banda de fusión: 188 °C a 190 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en agua, ligeramente soluble en etanol, muy poco soluble en el éter etílico.

*Conservación* – En recipiente cerrado.

**Biuret, reactivo**

*Preparación* – Disolver 1,5 g de sulfato cúprico pentahidratado y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua. Añadir 300 ml de solución de hidróxido de sodio a 10% (p/v) exenta de carbonato, completar 1000 ml con la misma solución y mezclar.

**Boldina**

*CAS* – [476-70-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{19}H_{21}NO_4$  – 327,37

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 163 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, soluble en etanol y en soluciones ácidas diluidas.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

**Borneol**

*CAS* – [507-70-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{18}O$  – 154,25

*Descripción* – Cristales incoloros, subliman rápidamente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 208 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol y en éter de petróleo

**Bromuro de potasio**

*CAS* – [7758-01-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $KBrO_3$  – 167,00

*Descripción* – Cristales o polvo granulado blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua y poco soluble en etanol.

**Bromelina**

*CAS* – [37189-34-7]

*Especificación* – Concentrado de enzimas proteolíticas derivadas de la *Ananas comosus* Merr.

*Descripción* – Polvo amarillento.

**Bromelina SR**

*Preparación* – Solubilizar 1 g de bromelina en 100 ml de una mezcla de tampón fosfato pH 5,5 y solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v) (1:9).

**Bromuro de dimidio**

*CAS* – [518-67-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{18}BrN_3$  – 380,28

*Descripción* – Cristal rojo-oscuro.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua a 20 °C, ligeramente soluble en agua a 60 °C y en etanol.

**Bromuro de dimidio-azul de disulfina SR**

*Preparación* – Disolver, separadamente, 0,5 g de bromuro de dimidio y 0,25 g de azul de disulfina en 30 ml de una mezcla en caliente de etanol y agua (1:9) (v/v) y agitar. Mezclar las dos soluciones y completar a 250 ml con la misma mezcla de solventes. Mezclar 20 ml de esta solución con 20 ml de una solución de ácido sulfúrico a 14 % (v/v), diluida previamente con cerca de 250 ml de agua y completar a 500 ml con agua.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

**Bromuro de hexadimetrina**

*CAS* – [28728-55-4]

*Fórmula molecular* –  $(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$

*Descripción* – Polvo blanco, o casi blanco. Higroscópico. Polímero amorfo.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

**Bromuro de yodo**

*CAS* – [7789-33-5]

*Fórmula y masa molecular* – IBr – 206,81

*Descripción* – Cristales marrones oscuros o azules oscuros.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: cerca de 116 °C. Temperatura de fusión: cerca de 40 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, en etanol y en ácido acético glacial.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Bromuro de yodo SR**

*Preparación* – Disolver 13,2 g de yodo en ácido acético glacial a 1000 ml. Determinar el tenor de yodo en 20 ml de esta solución, mediante titulación con tiosulfato de sodio 0,1 M SV. A lo restante de la solución de yodo (980 ml), añadir cantidad de bromo equivalente al yodo determinado.

*Conservación* – En recipientes de vidrio bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### **Bromuro de potasio**

*CAS* – [7758-02-3]

*Fórmula y masa molecular* – KBr – 119,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, de sabor acentuadamente salado.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en glicerol, poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Bromuro de tetrabutilamonio**

*CAS* – [1643-19-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{16}H_{36}BrN$  – 322,37

*Descripción* – Polvo blanco cristalino.

*Característica física* – Banda de fusión: entre 103 °C y 105 °C.

### **Bromuro de tetraheptilamonio**

*CAS* – [4368-51-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{60}BrN$  – 490,69

*Descripción* – Polvo blanco, escamoso.

*Característica física* – Banda de fusión: entre 89 °C y 91 °C.

### **Bromuro mercúrico**

*CAS* – [7789-47-1]

*Sinonimia* – Bromuro de mercurio (II)

*Fórmula y masa molecular* –  $Br_2Hg$  – 360,39

*Descripción* – Cristales blancos o polvo cristalino, sensible a la luz.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: en torno de 237 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Veneno!

### **Bromo**

*CAS* – [7726-95-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $Br_2$  – 159,80

*Descripción* – Líquido rojo marrón, irritante, sofocante y humeante.

*Característica física* – Densidad (20 °C): aproximadamente 3,1.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos o ampollas.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Bromo 0,2 M en ácido acético glacial**

*Preparación* – Juntar 15 g de bromuro de potasio y 5,5 ml de bromo en ácido acético glacial a 1000 ml. Agitar y dejar en reposo por 24 horas. Titular antes del uso.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Bromo SR**

*Preparación* – Disolver 30 g de bromo y 30 g de bromuro de potasio en cantidad suficiente de agua para hacer 100 ml.

### **1-Butanol**

*CAS* – [71-36-3]

*Sinonimia* – Alcohol butílico normal o primario, *n*-butanol, alcohol *n*-butílico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{10}O$  – 74,12

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, retractorio, de olor característico.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 117 °C a 118 °C. Densidad (20 °C): 0,810. Índice de refracción (20 °C): 1,3993.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Inflamable.

### **Betanosulfonato de sodio**

*CAS* – [2386-54-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_9NaO_3S$  – 160,17

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: mayor que 300 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

### **Butilhidroxianisol**

*CAS* – [25013-16-5] *Sinonimia* – BHA.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{11}H_{16}O_2$  – 180,24

*Especificación* – Mezcla de dos isómeros: 2-terc-butil-4-hidroxianisol y 3-terc-butil-4-hidroxianisol

*Descripción* – Sólido de aspecto ceroso.

*Característica física* – Banda de fusión: de 48 °C a 55 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en éter de petróleo.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### **Butilamina**

*CAS* – [109-73-9] *Sinonimia* – *n*-Butilamina

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{11}N$  – 73,14

*Descripción* – Líquido incoloro, de olor amoniacal.

*Característica física* – Temperatura de ebullición: en torno de 78 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y etanol. *Información adicional* – Destilar y utilizar en, como máximo, 30 días.

### Butilparabeno

*CAS* – [94-26-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{11}H_{14}O_2$ , – 194,23

*Descripción* – Polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: de 68 °C a 69 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y fácilmente soluble en acetona, éter etílico y cloroformo.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Calciferol

*CAS* – [50-14-6]

*Sinonimia* – Ergocalciferol, vitamina D<sub>2</sub>. *Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{44}O$  – 396,65

*Especificación* – Un gramo corresponde en actividad anti-raquítica a 40 millones de UI.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol, soluble en aceite grasos.

*Conservación* – En recipientes herméticos, bajo gas inerte.

*Almacenamiento* – Proteger del calor y de la luz.

### Calcio SRA – 400 µg/ml

*Especificación* – Contiene 1,001 g de carbonato de calcio en 25 ml de ácido clorhídrico M. Hervir. Completar con agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

### Canfeno

*CAS* – [79-92-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{16}$  – 136,23

### Alcanfor

*CAS* – [76-22-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{16}O$  – 152,23

### Caolín leve

*CAS* – [1332-58-7]

*Especificación* – Silicato de aluminio natural, hidratado, purificado. Contiene un agente dispersante apropiado.

*Descripción* – Polvo blanco, poco denso, exento de partículas granuladas, untuoso al tacto.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en la agua y en los ácidos inorgánicos.

*Partículas gruesas* – Añadir 5 g de la muestra en una probeta con tapón (de 160 mm de largo y 35 mm de diámetro interno) y junte 60 ml de solución de pirofosfato de sodio a 1% (p/v). Agitar vigorosamente y dejar en reposo durante 5 minutos. Utilizando una pipeta, retirar 50 ml del líquido sobrenadante, a partir de una posición en torno de 5 cm abajo de la superficie de la preparación. Al líquido restante junte 50 ml de agua, agitar, dejar en reposo durante 5 minutos y retire 50 ml del líquido en las condiciones prescritas anteriormente. Repetir el proceso hasta retirar un total de 400 ml. Transferir la suspensión para una cápsula de porcelana, evaporar hasta sequedad en baño maría y desecar a 100-105 °C hasta masa constante. La masa del residuo no es superior a 25 mg (0,5%). *Partículas finas* – Esparcir 5 g de la muestra en 250 ml de agua, agitar vigorosamente durante 2 minutos y transferir, inmediatamente, para una probeta de vidrio (de 50 mm de diámetro interno). Utilizando una pipeta, transferir 20 ml del líquido para un vidrio de reloj. Evaporar hasta sequedad en baño maría y desecar a 100-105 °C hasta masa constante (m). Dejar en reposo a 20 °C durante 4 horas la suspensión restante. Retirar 20 ml del líquido, a partir de una posición en torno de 5 cm abajo de la superficie de la preparación, evitando dispersar el sedimento. Transferir para un vidrio de reloj, evaporar hasta sequedad en baño maría y desecar a 100-105 °C hasta masa constante (m<sub>2</sub>). El valor de m<sub>2</sub> no es inferior a 70% del valor de m<sup>1</sup>.

### Carbonato de amonio

*CAS* – [506-87-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $(NH_4)_2CO_3$  – 96,09

*Especificación* – Mezcla en proporciones variables de bicarbonato de amonio ( $NH_4HCO_3$  – 79,06) y carbamato de amonio ( $H_2NCOONH_4$  – 78,07). Contiene, como mínimo, 30,0% de  $NH_3$  (MM – 17,3) (p/p).

*Descripción* – Masas cristalinas blancas, translúcidas, de olor amoniacal fuerte.

*Solubilidad* – Soluble en agua. Se descompone en agua hirviendo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

### Carbonato de amonio SR

*Especificación* – Contiene 15,8 g de carbonato de amonio en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

### Carbonato de calcio

*CAS* – [471-34-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $CaCO_3$  – 100,09

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,5% (p/p), calculado en sustancia seca.

*Descripción* – Polvo blanco, inodoro e insípido.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Carbonato de estroncio**

CAS – [1633-05-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{SrCO}_3$  – 147,64

Descripción – Polvo blanco, inodoro y sin sabor.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Carbonato de litio**

CAS – [554-13-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  – 73,89

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,5%, calculado en base seca.

Descripción – Polvo blanco, leve, inodoro.

Solubilidad – Ligeramente soluble en agua y muy poco soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Carbonato de potasio, anhidro**

CAS – [584-08-7]

Fórmula y masa molecular –  $\text{K}_2\text{CO}_3$  – 138,21

Descripción – Polvo granulado o gránulos blancos o casi blancos. Higroscópico.

Característica física – Temperatura de fusión: 891 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Carbonato de potasio, sesquihidratado**

CAS – [6381-79-9]

Fórmula y masa molecular –  $\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$  – 165,23

Descripción – Cristales granulares pequeños.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Irritante! Cáustico!

**Carbonato de sodio, anhidro**

CAS – [497-19-8]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 105,99

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado en base seca.

Descripción – Polvo blanco, higroscópico.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger de la humedad.

**Carbonato de sodio, decahidratado**

CAS – [6132-02-1]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  – 286,09

Especificación – Contiene, en el mínimo, 36,7% (p/p).

Descripción – Cristales transparentes, incoloros, eflorescentes, o polvo cristalino blanco; inodoro, de sabor alcalino y salado.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, y prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Carbonato de sodio, monohidratado**

CAS – [5968-11-6]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 124,00

Especificación – Contiene, como mínimo, 83,0% (p/p)

Descripción – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco; inodoro, de sabor alcalino y salado.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, y prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Información adicional – Cuando prescrito carbonato de sodio para mezcla en polvo, usar  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .**Carbonato de sodio SR**

Especificación – Contiene 10,6 g de carbonato de sodio anhidro en 100 ml de agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Carvona**

CAS – [2244-16-8]

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$  – 150,24

Descripción – Líquido incoloro.

Características físicas – Densidad (20 °C): cerca de 0,965. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,500. Temperatura de ebullición: cerca de 230 °C. Poder rotatorio (20 °C): cerca de +61°.

Miscibilidad – Prácticamente insoluble en agua, miscible en etanol.

**Catequina**

CAS – [154-23-4]

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  – 290,27 (para la sustancia anhidra)

Características físicas – Banda de fusión: 93 °C a 96 °C, o 175 °C a 177 °C cuando en la forma anhidra.

**Cefalina**

Especificación – Consiste en ésteres de ácido glicerofosfórico con ácidos grasos de cadena larga, siendo el grupo fosfato esferificado con etanolamina.

Descripción – Sustancia amorfa amarillenta, de olor y sabor característicos.

Categoría – Hemostático local y reactivo laboratorial en pruebas de función hepática.



**Cefalina SR**

*Preparación* – Añadir 20 ml de acetona a una cantidad de 0,5 a 1 g de polvo de cerebro de buey, dejar en reposo durante 2 horas. Centrifugar durante 2 minutos y decantar el líquido sobrenadante. Secar el residuo a presión reducida. Juntar 20 ml de cloroformo al material seco. Dejar en reposo durante 2 horas, agitar frecuentemente. Después de eliminar el material sólido, por filtración o centrifugación, evaporar el cloroformo a presión reducida. Colocar el residuo en suspensión en 5 a 10 ml de solución de cloruro de sodio a 0,9 % (p/v). Los solventes utilizados para preparar este reactivo contienen un antioxidante apropiado, tal como el Butilhidroxianisol a 0,002% (p/v).

*Conservación* – Utilizar en hasta 3 meses, después de congelamiento o liofilización.

**Celulosa cromatográfica**

*CAS* – [9004-34-6]

*Sinonimia* – Celulosa para cromatografía.

*Descripción* – Polvo fino, blanco, homogéneo. Tamaño medio de partículas no es menor que 30 µm.

*Categoría* – Soporte para cromatografía.

**Plomo SRA – 100µg/ml**

*Especificación* – Contiene 0,16 g de nitrato de plomo (II) en 5 ml de ácido nítrico. Completar con agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**Cianuro de potasio**

*CAS* – [151-50-8]

*Fórmula y masa molecular* – KCN – 65,12

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino, masas o gránulos blancos; delicuescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 634 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Estabilidad* – Se descompone gradualmente por exposición al aire, dióxido de carbono y humedad.

*Seguridad* – Veneno!

**Cianuro de potasio SR**

*Preparación* – Disolver 50 g de cianuro de potasio en agua destilada, completar el volumen para 100 ml. Retirar el plomo de esa solución por la extracción con porciones sucesivas de solución extractora de ditizona. Extraer la ditizona remanente en la solución de cianuro agitando con cloroformo. Diluir la solución de cianuro con agua destilada suficiente para que, cada 100 ml, contenga 10 g de cianuro de potasio

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Veneno!

**Cianuro-amoníaco SR**

*Preparación* – Disolver 2 g de cianuro de potasio en 15 ml de hidróxido de amonio y diluir para 100 ml con agua destilada.

**Cianoacetato de etilo**

*CAS* – [105-56-6]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub> – 113,11

*Descripción* – Líquido incoloro o amarillo pálido.

*Características físicas* – Densidad (25 °C): 1,056. Banda de ebullición: 205 °C a 209 °C, con descomposición.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua y miscible en etanol y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Ciclohexano**

*CAS* – [110-82-7]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> – 84,16

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico (semejante al de la gasolina).

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 80 °C. Densidad: aproximadamente 0,78. Índice de refracción (20 °C): 1,426 a 1,427.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua. Miscible en solventes orgánicos.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

**Cinamato de bencilo**

*CAS* – [103-41-3]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub> – 238,28

*Descripción* – Cristales incoloros o amarillentos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 39 °C.

**Cinamato de metilo**

*CAS* – [103-26-4]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> – 162,19

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Características físicas* – Banda de fusión: 34 °C a 36 °C. Temperatura de ebullición: cerca de 260 °C. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,56.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

**Cinchonina**

*CAS* – [118-10-5]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O – 294,39

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o casi blanco.

*Características físicas* – Poder rotatorio específico (20 °C): +225° a +230°, determinado en una solución a 5% (p/v) en etanol a 96% (v/v). Temperatura de fusión: cerca de 263 °C.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### 1,8-Cineol

CAS – [470-82-6]

*Sinonimia* – *Eucaliptol*.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{18}O$  – 154,25

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): 0,922 a 0,927. Índice de refracción (20 °C): 1,456 a 1,459.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

### Citral

CAS – [5392-40-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{16}O$  – 152,24

*Descripción* – Líquido amarillo claro.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol y glicerol.

### Citrato de amonio SR

*Preparación* – Disolver 40 g de ácido cítrico en 90 ml de agua destilada. Añadir dos o tres gotas de rojo de fenol a 0,1% (p/v) en etanol. Añadir, cuidadosamente, hidróxido de amonio hasta que la solución adquiera coloración rojiza. Retirar cualquier plomo presente por la extracción con porciones de 20 ml de solución extractora de ditizona hasta que la coloración verde anaranjada en la solución de ditizona sea mantenida.

### Citrato cúprico alcalino SR

*Preparación* – Bajo calentamiento, disolver 173 g de citrato de sodio y 177 g de carbonato de sodio monohidratado en 700 ml de agua. Filtrar si necesario para obtener una solución límpida. En un frasco separado, disolver 17,3 g de sulfato cúprico pentahidratado en 100 ml de agua. Añadir (lentamente y bajo agitación constante) sobre esta solución, la primera solución preparada. Completar para el volumen de 1000 ml con agua.

### Citrato de sodio

CAS – [6132-04-3] S

*inonimia* – *Citrato trisódico*.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  – 294,10

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salado, refrescante. Delicuescente.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Citronelal

CAS – [106-23-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{18}O$  – 154,25

*Descripción* – Líquido incoloro o amarillo claro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): 0,848 a 0,856. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,446.

*Miscibilidad* – Muy poco soluble en agua y soluble en etanol.

### Citronelol

CAS – [106-22-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{20}O$  – 156,26

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): 0,857. Índice de refracción (20 °C): 1,456. Banda de ebullición: 220 °C a 222 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

### Cloramina-T

CAS – [7080-50-4]

*Sinonimia* – Sal sódica trihidratada de la N-cloro-p-toluenosulfonamida.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_7ClNNaO_2 \cdot 3H_2O$  – 281,69

*Descripción* – Cristales eflorescentes blancos o levemente amarillentos o polvo cristalino.

*Característica física* – Banda de fusión: 167 °C a 170 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, soluble en etanol con descomposición, insoluble en benceno, cloroformo y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes perfectamente cerrados, protegidos de la luz, en refrigerador.

### Clorato de potasio

CAS – [3811-04-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $KClO_3$  – 122,55

*Descripción* – Cristales o gránulos, o polvo blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 368 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Evitar el contacto con materiales orgánicos u otras sustancias oxidables.

### Cloruro cobaltoso

CAS – [7791-13-1]

*Sinonimia* – Cloruro de cobalto (II).

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 237,93

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino o cristales rojo violáceos.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro cobaltoso SR**

*Especificación* – Contiene 6,5 g, añadidos de 70 ml de ácido clorhídrico SR, en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro de acetilo**

*CAS* – [75-36-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}$  – 78,50

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro. Inflamable. Se descompone en contacto con agua y con etanol.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,10. Temperatura de ebullición: 52 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en cloruro de etileno, éter etílico y ácido acético glacial.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante para los ojos!

#### **Cloruro de aluminio hexahidratado**

*CAS* – [7784-13-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 241,43

*Descripción* – Polvo blanco o levemente amarillento o cristales incoloros, delicuescente.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol, soluble en glicerol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

#### **Cloruro de aluminio SR**

*Preparación* – Disolver 2 partes de cloruro de aluminio hexahidratado en agua suficiente para 3 partes. Tratar la solución con carbón activado, filtrar y, si necesario, ajustar el pH para 1,5 con hidróxido de sodio a 1% (p/v).

#### **Cloruro de amonio**

*CAS* – [12125-02-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 53,49

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salado. Higroscópico.

*Característica física* – Sublima sin fundir a 338 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

#### **Cloruro de amonio SR**

*Especificación* – Contiene 10,7 g en agua a 100 ml (aproximadamente 2 M).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro de amonio-hidróxido de amonio SR**

*Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de hidróxido de amonio y agua y saturar con cloruro de amonio.

#### **Cloruro de bario**

*CAS* – [10326-27-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 244,27.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico!

#### **Cloruro de bario SR**

*Especificación* – Contiene 10 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro de benzalconio**

*CAS* – [8001-54-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $[\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{R}]^+\text{Cl}^-$  – 360,00 (media)

*Composición química* – Mezcla de cloruros de alquildimetilbencilamonio, en que R representa alquila, a partir de n- $\text{C}_8\text{H}_{17}$  y homólogos superiores: n- $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ , n- $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ , n- $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ , en mayor proporción.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% con relación a la mezcla desecada. Contenido de los homólogos alquilados presentes, en relación al total calculado sobre base seca: n- $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$ : como mínimo 40,0% (p/p); n- $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ : como mínimo 10,0% (p/p); la suma de los dos homólogos arriba: como mínimo 70,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo amorfo o masa gelatinosa blanca o blanco-amarillenta, de olor aromático y de sabor amargo.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol. En solución acuosa, forma espuma bajo agitación.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.

*Categoría* – Desinfectante. Detergente. Conservante.

#### **Cloruro de bencetonio**

*CAS* – [121-54-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{ClNO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 466,09

*Descripción* – Cristales incoloros, o polvo fino blanco, o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 163 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua y etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### Cloruro de bencilo

*CAS* – [100-44-7]

*Sinonimia* – Clorometilbenceno

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_7Cl$  – 126,58

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): 1,100. Temperatura de ebullición: 179 °C. Banda de fusión: -48 °C a -43 °C.

*Miscibilidad* – Insoluble en agua. Miscible en etanol, cloroformo y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

### Cloruro de calcio

*CAS* – [10035-04-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  – 147,02

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino o gránulos blancos, inodoro, de sabor salado y fuertemente amargo. Higroscópico.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Cloruro de calcio, anhidro

*CAS* – [10043-52-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $CaCl_2$  -110,99

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0%(p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Gránulos blancos y secos. Delicuescentes.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y en metanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad

*Categoría* – Desecante

### Cloruro de calcio SR

*Especificación* – Contienen 7,35 g de cloruro de calcio en agua a 100 ml (aproximadamente 0,5 M).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Cloruro de cesio

*CAS* – [7647-17-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $CsCl$  – 168,36

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en metanol y prácticamente soluble en acetona.

### Cloruro de estaño (II) SR

*Preparación* – Calentar 20 g de estaño con 85 ml de ácido clorhídrico hasta que no haya más liberación de hidrógeno.

### Cloruro de magnesio

*CAS* – [7791-18-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  – 203,30

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0 % (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros, de sabor amargo. Higroscópico.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Cloruro de mercurio (II)

*CAS* – [7487-94-7]

*Sinonimia* – Cloruro mercúrico.

*Fórmula y masa molecular* –  $HgCl_2$  – 271,50

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0%(p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o casi blanco, o masa cristalizada; inodoro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 277 °C (volatiliza a temperatura de aproximadamente 300 °C).

*Solubilidad* – Soluble en agua y en glicerol, fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Irritante. Cáustico. Tóxico. Contaminante.

*Información adicional* – Antídoto: dimercaprol.

### Cloruro de metileno

*CAS* – [75-09-2]

*Sinonimia* – Diclorometano.

*Fórmula y masa molecular* –  $CH_2Cl_2$  – 84,94

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor semejante al del cloroformo.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 40 °C. Densidad: aproximadamente 1,32. Índice de refracción (20 °C): 1,424.

*Miscibilidad* – Ligeramente soluble en agua, miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Irritante. Tóxico.

#### **Cloruro de metileno saturado con amoníaco**

*Preparación* – Mezclar 100 ml de cloruro de metileno con 30 ml de solución concentrada de amoníaco en embudo de separación. Dejar separar las fases y utilizar la camada inferior.

#### **Cloruro de metiltioninio**

*CAS* – [7220-79-3]

*Sinonimia* – Cloruro de metiltioninio trihidratado, azul de metileno.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{16}H_{18}ClN_3 \cdot 3H_2O$  – 373,90

*Descripción* – Polvo cristalino verde-oscuro o bronce. Puede ser encontrado en diferentes formas hidratadas.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en etanol.

#### **Cloruro de metiltioninio SR**

*Sinonimia* – Azul de metileno SR

*Preparación* – Disolver 23 mg de cloruro de metiltioninio en cantidad suficiente de agua para hacer 100 ml.

#### **Cloruro de metiltioninio SR1**

*Sinonimia* – Azul de metileno SR1

*Preparación* – Disolver 125 mg de cloruro de metiltioninio en 100 ml de etanol y diluir en etanol para hacer 250 ml.

#### **Cloruro de níquel(II)**

*CAS* – [7791-20-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $NiCl_2 \cdot 6H_2O$  – 237,71

*Descripción* – Polvo cristalino verde, higroscópico.

#### **Cloruro de nitrobenzoilo**

*CAS* – [122-04-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_4ClNO_3$  – 185,57

*Descripción* – Cristales amarillos, de olor penetrante.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 73 °C.

#### **Cloruro de oro**

*CAS* – [16961-25-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  – 393,83

*Descripción* – Cristales monoclinicos amarillo-rojizo a amarillo-dorado. Muy higroscopio y delicuescente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### **Cloruro de oro SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de cloruro de oro en 35 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### **Cloruro de paladio**

*CAS* – [7647-10-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $PdCl_2$  – 177,31

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 59,0% (p/p) en paladio.

*Descripción* – Polvo cristalino marrón rojizo.

*Característica física* – En altas temperaturas se descompone en paladio y cloro.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico!

#### **Cloruro de potasio**

*CAS* – [7447-40-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $KCl$  – 74,55

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0%(p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salino, levemente amargo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro de potasio, solución saturada**

*Especificación* – Contiene 17 g en agua a 50 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Cloruro de sodio**

*CAS* – [7647-14-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaCl$  – 58,44

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p) calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salino.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol anhidro.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Información adicional* – Sal exenta de aditivo.

#### **Cloruro de sodio a 0,9% (p/v)**

*Sinonimia* – Cloruro de sodio aproximadamente 0,15 M, solución de cloruro de sodio isotónica, solución fisiológica, solución salina.

*Descripción* – Contiene 9 g de cloruro de sodio en agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

#### **Cloruro de estaño**

*CAS* – [10025-69-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$  – 225,63

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o casi incoloros.



*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol, en ácido acético glacial, y en ácido clorhídrico diluido y concentrado.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del aire y del calor.

#### **Cloruro de estaño SR**

*Especificación* – Contiene 10 g de cloruro de estaño en ácido clorhídrico a 100 ml.

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### **Cloruro de estaño SR1**

*Nombre alternativo* – Cloruro de estaño (II) SR. *Preparación* – Calentar 20 g de estaño con 85 ml de ácido clorhídrico hasta que no haya más liberación de hidrógeno.

#### **Cloruro férrico**

*CAS* – [10025-77-1]

*Sinonimia* – Cloruro de hierro hexahidratado.

*Fórmula y masa molecular* –  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  – 270,30

*Especificación* – Contiene, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Masa cristalizada, amarillo-anaranjada o marrón. Delicuescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 37 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### **Cloruro férrico SR (aproximadamente 0,4 M)**

Usar cloruro férrico SI.

#### **Cloruro férrico ácido SR**

*Preparación* – Disolver 15 mg de cloruro férrico hexahidratado en 20 ml de mezcla de ácido acético glacial y ácido sulfúrico (1:1).

#### **Cloruro férrico metanólico**

*Preparación* – Disolver 1 g de cloruro férrico en 100 ml de metanol.

#### **Cloruro mercúrico SR (aproximadamente 0,2 M)**

*Especificación* – Contiene 5,4 g de cloruro de mercurio (II) en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico. Contaminante.

#### **Cloruro platínico SR**

*Sinonimia* – Cloruro de platino SR

*Preparación* – Disolver 2,6 g de ácido cloroplatínico en agua a 20 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### **Clorhidrato de benzoilo**

*CAS* – [98-88-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_5ClO$  – 140,57

*Descripción* – Líquido incoloro. Se descompone en agua y etanol.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,21. Temperatura de ebullición: cerca de 197 °C.

#### **Clorhidrato de (2-cloroetil) dietilamina**

*CAS* – [869-24-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{14}ClN.HCl$  – 172,10

*Descripción* – Polvo cristalino, blanco, muy soluble en agua y en metanol, fácilmente soluble en cloruro de metileno, prácticamente insoluble en n-hexano.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 211 °C.

#### **Clorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina**

*CAS* – [536-46-9]

*Sinonimia* – Diclorhidrato de N, N-dimetil-p-fenilendiamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{12}N_2 \cdot 2HCl$  – 209,12

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco. Higroscópico.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Clorhidrato de o-fenilendiamina**

*CAS* – [615-28-1]

*Sinonimia* – Diclorhidrato de 1,2-benzenodiamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$  – 181,14

*Descripción* – Polvo blanco o levemente rosado.

#### **Clorhidrato de p-fenilendiamina**

*CAS* – [624-18-0]

*Sinonimia* – Diclorhidrato de 1,4-benzenodiamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_8N_2 \cdot 2HCl$  – 181,14

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, se torna rojizo en contacto con el aire.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, poco soluble en etanol y éter etílico.

#### **Clorhidrato de fenilhidracina**

*CAS* – [59-88-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_8N_2.HCl$  – 144,60

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco, volviéndose marrón por la exposición al aire.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 245 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Protegido de la luz.

### Clorhidrato de fenilhidracina SR

*Preparación* – Disolver 0,9 g de Clorhidrato de fenilhidracina en 50 ml de agua. Decolorar con carbón activado y filtrar. Recolectar el filtrado en balón volumétrico de 250 ml, añadir 30 ml de ácido clorhídrico y completar para volumen con agua.

### Clorhidrato de hidrastina

*CAS* – [5936-28-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{22}ClNO_6$  – 419,86

*Descripción* – Polvo blanco, o casi blanco. Higroscópico.

*Características físicas* – Poder rotatorio (17 °C): cerca de +127°. Temperatura de fusión: cerca a 116 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol.

### Clorhidrato de hidroxilamina

*CAS* – [5470-11-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $NH_4ClO$  – 69,49

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 151 °C

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Clorhidrato de hidroxilamina SR

*Preparación* – Disolver 5 g en 5 ml de agua caliente. Completar a 100 ml con etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

### Clorhidrato de hidroxilamina SR1

*Preparación* – Disolver 20 g de Clorhidrato de hidroxilamina en agua destilada para obtener, aproximadamente, 65 ml. Transferir para embudo de separación. Añadir cinco gotas de azul de timol SI y añadir hidróxido de amonio hasta que la solución adquiera color amarilla. Añadir 10 ml de solución acuosa de dietilditiocarbamato de sodio a 4% (p/v), agitar, y dejar en reposo por 5 minutos. Extraer esa solución con sucesivas porciones de 10 a 15 ml de cloroformo hasta que una porción de 5 ml del extracto de cloroformo no adquiera coloración amarilla cuando agitada con sulfato cúprico a 12,5% (p/v). Añadir ácido clorhídrico 3 M hasta obtener coloración rosa (se necesario, añadir una o dos

gotas de azul de timol SI) y diluir en 100 ml con agua destilada.

### Cloro SR

*Especificación* – Solución saturada de cloro en agua.

*Conservación* – En frascos completamente llenos y bien cerrados.

*Almacenamiento* – En local frío, protegido de la luz y del aire.

*Observaciones* – La solución tiende a deteriorarse a pesar de estar protegida de la luz y del aire.

*Estabilidad* – Utilizar solución recién preparada.

### p-Cloroacetanilida

*CAS* – [539-03-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_8ClNO$  – 169,61

*Descripción* – Polvo cristalino.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 178 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

### Clorobenceno

*CAS* – [108-90-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_5Cl$  – 112,56

*Descripción* – Líquido incoloro, refringente, de olor característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 132 °C. Densidad: aproximadamente 1,11. Índice de refracción (20 °C): 1,5251.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

### 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno

*CAS* – [97-00-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_3ClN_2O_4$  – 202,55

*Descripción* – Cristales amarillos pálidos o polvo cristalino.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 51 °C.

### Cloroformo

*Sinonimia* – Triclorometano *Fórmula y masa molecular* –  $CHCl_3$  – 119,40.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,9 % (p/p).

*Descripción* – Líquido móvil, incoloro, olor dulce.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,48. Temperatura de ebullición: aproximadamente 62 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico.

**Cloroformo exento de alcohol**

*Preparación* – Preparar inmediatamente antes del uso. Agitar cuidadosamente 20 ml de cloroformo con 20 ml de agua por 3 minutos. Retirar con cuidado la fase orgánica y lavar con dos porciones de 20 ml de agua. Filtrar el cloroformo a través de papel seco. Añadir 5 g de sulfato de sodio anhidro, agitar por 5 minutos y dejar en reposo por 2 horas. Decantar o filtrar.

**Clorotiazida**

*CAS* – [58-94-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_6ClN_3O_4S_2$  – 295,73

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 340 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, ligeramente soluble en acetona, poco soluble en etanol. Disuelve en soluciones diluidas de hidróxidos-alcalinos.

**Cobaltinitrito de sodio**

*CAS* – [13600-98-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $Na_3CoN_6O_{12}$  – 403,94

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo-anaranjado.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados

**Cobaltinitrito de sodio SR**

*Especificación* – Contiene 10 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

**Cobre**

*CAS* – [7440-50-8]

*Elemento y masa atómica* – Cu – 63,546.

*Descripción* – Lámina, hilo, polvo o fragmento, de color rojizo y brillo metálico.

*Conservación* – En recipientes no metálicos.

**Cobre SRA – 1 mg/ml**

*Especificación* – Contiene 1 g de cobre disuelto en el menor volumen posible de ácido nítrico a 50% (v/v). Completar con ácido nítrico a 1% (v/v) a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**o-Cresol**

*CAS* – [95-48-7]

*Sinonimia* – 2-Metilfenol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_8O$  – 108,14.

*Descripción* – Líquido o sólido, incoloro a amarillo-marrón, que se colorea por la luz y en la presencia de oxígeno; de olor fenólico. Delicuescente.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: aproximadamente 30 °C. Temperatura de ebullición: aproximadamente 191 °C. Densidad: aproximadamente 1,03. Índice de refracción (20 °C): 1,540 -1,550.

*Miscibilidad* – Miscible con etanol anhidro, ligeramente soluble en agua y soluble en soluciones hidróxido-alcalinas.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz, humedad y oxígeno.

*Seguridad* – Irritante. Cáustico. Tóxico.

*Categoría* – Desinfectante.

**Cromato de potasio**

*CAS* – [7789-00-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $K_2CrO_4$  – 194,19

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino amarillo.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Oxidante. Contaminante.

**Cromato de potasio SR**

*Especificación* – Contiene 10 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Oxidante. Contaminante.

**Cromotropato disódico**

*CAS* – [5808-22-0]

*Sinonimia* – Sal disódica del ácido cromotrópico dihidratado.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot H_2O$  – 400,29

*Descripción* – Polvo blanco amarillento.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

**Desoxicolato de sodio**

*CAS* – [302-95-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{24}H_{39}NaO_4$  – 414,55

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

**Dextrosa**

Ver glucosa.

**Dextrosa 0,1% (p/v)**

Ver glucosa 0,1% (p/v) en piridina.

**Diacetato de clorhexidina**

Usar acetato de clorhexidina.

**1,8-Diaminonaftaleno**

CAS – [479-27-6]

Sinonimia – 1,8-Naftalenodiamina.

Fórmula y masa molecular –  $C_{10}H_{10}N_2$  – 158,20

Descripción – Cristales sublimables.

Característica física – Banda de fusión: 63 °C a 67 °C.

**Diaveridina**

CAS – [5355-76-S]

Nombre químico – 5-[(3,4-Dimetoxifenil)metil]-2,4- piri-  
midinodiamina Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{16}N_4O_2$   
– 260,30

Característica física – Temperatura de fusión: en torno de  
233 °C.

**2,6-Dibromoquinona-4-clorimida**

CAS – [537-45-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_2Br_2ClNO$  – 299,35

Descripción – Polvo cristalino amarillo.

Característica física – Banda de fusión: entre 82 °C y  
84°C.

Solubilidad – Insoluble en agua y soluble en etanol y en  
soluciones hidróxido-alcalinas diluidas.

Conservación – En recipientes cerrados.

**Dibutilamina**

CAS – [111-92-2]

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_{19}N$  – 129,24

Descripción – Líquido incoloro.

Características físicas – Temperatura de ebullición: cerca  
de 159 °C. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,417.

Miscibilidad – Soluble en agua y etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Dicloruro de etileno**

CAS – [107-06-2]

Sinonimia – 1,2-Dicloroetano

Fórmula y masa molecular –  $C_2H_4Cl_2$  – 98,96

Descripción – Líquido incoloro y límpido, de olor similar  
al del cloroformo.

Características físicas – Temperatura de ebullición: en torno  
de 83 °C. Densidad (20 °C): en torno de 1,25. Índice de  
refracción (20 °C): 1,444.

Solubilidad – Poco soluble en agua y fácilmente soluble  
en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Irritante. Tóxico. Inflamable.

**Diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina**

CAS – [1465-25-4]

Sinonimia – Diclorhidrato de N-1-naftalenil-1,2- etanodia-  
mina.

Fórmula y masa molecular –  $C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$  – 259,18

Descripción – Polvo blanco o blanco amarillento.

Característica física – Banda de fusión: 188 °C a 190 °C.

Solubilidad – Soluble en agua y poco soluble en etanol.

**Diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina SR**

Sinonimia – Reactivo de Bratton-Marshall Preparación –  
Disolver 0,1 g de diclorhidrato de N-(1- naftil) etilendiami-  
na en 100 ml de agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**2,6-Dicloroquinona-4-clorimida**

CAS – [101-38-2]

Sinonimia – Reactivo de Gibbs, 2,6-dicloro-4- (cloroimi-  
no)-2,5-cicloexadien-1-ona.

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_2Cl_3NO$  – 210,45

Descripción – Polvo cristalino amarillo o anaranjado.

Característica física – Temperatura de fusión: en torno de  
66 °C.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua, soluble en  
etanol y en soluciones alcalinas diluidas.

**1-(2,6-Diclorofenil)-1,3-dihidro-2fl-indol-2-ona  
(Impureza A del diclofenaco)**

CAS – [15362-40-0]

Sinonimia – 1-(2,6-diclorofenil) indolin-2-ona Fórmula y  
masa molecular –  $C_{14}H_9Cl_2NO$  – 278,14

Descripción – Polvo cristalino blanco.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la exposición a la luz.

**2,6-Dicloroindofenol sódico**

CAS – [620-45-1]

Sinonimia – 2,6-Diclorofenolindofenol sódico.

Fórmula y masa molecular –  $Cl_2H_6Cl_2NNaO_2$  – 290,08.

Descripción – Polvo verde oscuro.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y en etanol anhi-  
dro. La solución acuosa presenta coloración azul oscura y  
cuando acidificada se torna rosa.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Dicromato de potasio**

CAS – [7778-50-9]

Fórmula y masa molecular –  $K_2Cr_2O_7$  – 294,18

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,8%el (p/p),  
calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales rojo anaranjados, e inodoro.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Cáustico. Oxidante. Contaminante.

### Dicromato de potasio SR

*Especificación* – Contiene 5 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Cáustico. Oxidante. Contaminante.

### Dietilamina

*CAS* – [109-89-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{11}N$  – 73,14

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor amoniacal. Reacción fuertemente alcalina.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 55 °C a 58 °C. Índice de refracción (20 °C): 1,386. Densidad: aproximadamente 0,707.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Inflamable.

### Dietilaminoetildextrano

*CAS* – [9015-73-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{28}N_2O$  – 216,36

*Descripción* – Polvo.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

### Dietilditiocarbamato de plata

*CAS* – [1470-61-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_{10}AgNS_2$  – 256,13

*Descripción* – Polvo amarillo claro a amarillo grisáceo.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en piridina.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Dietilditiocarbamato de plata SR

*Especificación* – Contiene 0,25 g en piridina para 50 ml.

*Estabilidad* – Preparar para uso inmediato.

*Seguridad* – Tóxico.

### Dietilditiocarbamato de sodio

*CAS* – [20624-25-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$  – 225,33

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos o inodoros.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

### N,N-dietiletilendiamina

*CAS* – [100-36-7]

*Nombre químico* – N,N-Dietil-1,2-diaminoetano

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{16}N_2$  – 116,21

*Descripción* – Líquido de apariencia levemente oleosa, incoloro o levemente amarillento, con fuerte olor amoniacal, irritante para La piel, ojos y membranas mucosas.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): 0,827. Banda de ebullición: 145 °C a 147 °C.

*Agua (5.2.20.1)* – Determinar en 0,5 g. como máximo 1,0%.

### Dietilftalato

*CAS* – [84-66-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{14}O_4$  – 222,24

*Descripción* – Líquido oleoso incoloro y prácticamente inodoro.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Características físicas* – densidad 1,118. Temperatura de ebullición: 295 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, etanol, éter etílico y otros solventes orgánicos.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante!

### Difenilamina

*CAS* – [122-39-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{11}N$  – 169,22

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: cerca de 55 °C. Temperatura de ebullición: 302 °C. Pierde el color en presencia de la luz.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol. Forma sal en solución con ácidos fuertes.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Difenilamina SR

*Preparación* – Disolver 1 g de difenilamina en 100 ml de ácido sulfúrico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### Difenilbencidina

*CAS* – [531-91-9]

*Sinonimia* – N,N'-Difenilbencidina. *Fórmula y masa molecular* –  $C_{24}H_{20}N_2$  – 336,43

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o levemente gris.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 248 °C.



*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, poco soluble en acetona y en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

#### Difenilborato de aminoetanol

*CAS* – [524-95-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_{16}BNO$  – 225,09

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o amarillento.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 193 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

#### Difenilborato de aminoetanol SR

*Preparación* – Disolver 1 g de difenilborato de aminoetanol en metanol y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente.

#### Difenilcarbazida

*CAS* – [140-22-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{13}H_{14}N_4O$  – 242,28

*Descripción* – Polvo cristalino blanco; se torna rosa por la exposición al aire.

*Característica física* – Banda de fusión: 168 °C a 171 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, soluble en acetona, en etanol y ácido acético glacial.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.

#### Difenilcarbazida SR

*Especificación* – Contiene 1 g de difenilcarbazida en etanol para 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Inflamable.

#### Difenilcarbazona

*CAS* – [538-62-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{13}H_{12}N_4O$  – 240,26

*Descripción* – Cristales de color anaranjado-rojizo.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 157 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### Difenilcarbazona-azul de bromofenol SR

*Preparación* – En balón volumétrico de 25 ml, disolver 12 mg de difenilcarbazona y 12,5 mg de azul de bromofenol en 15 ml de etanol. Completar el volumen con etanol.

*Conservación* – Acondicionar la solución en recipiente de vidrio ámbar a la temperatura de 4 °C a 8 °C.

#### Difenilcarbazona mercúrica SR

*Solución A* – Disolver 0,1 g de difenilcarbazona en etanol y completar el volumen para 50 ml con el mismo solvente.

*Solución B* – Disolver 1 g de cloruro de mercurio (II) en etanol y completar el volumen para 50 ml con el mismo solvente. *Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de las *Soluciones A* y *B* en el momento del uso.

#### N,N'-Diisopropiletlenodiamina

*CAS* – [4013-94-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{20}N_2$  – 144,26

*Descripción* – Líquido incoloro o amarillento. Corrosivo, inflamable e higroscópico.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,798. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,429. Temperatura de ebullición: cerca de 170 °C.

#### Dimetilacetamida

*CAS* – [127-19-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_9NO$  – 87,12

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: cerca de 165 °C. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,437. Densidad (20 °C): cerca de 0,94.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

#### p-Dimetilaminobenzaldehído

*CAS* – [100-10-7]

*Sinonimia* – 4-Dimetilaminobenzaldehído y Reactivo de Ehrlich.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_{11}NO$  – 149,19

*Descripción* – Polvo cristalino, blanco a levemente amarillento.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 74 °C.

*Solubilidad* – Soluble en etanol y en soluciones ácidas diluidas.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

#### p-Dimetilaminobenzaldehído SR

*Preparación* – Disolver, sin calentamiento, 0,2 g de p-Dimetilaminobenzaldehído en mezcla de 4,5 ml de agua y 5,5 ml de ácido clorhídrico. Preparar en el momento de uso.

#### p-Dimetilaminobenzaldehído SR1

*Preparación* – Disolver 0,2 g de p-Dimetilaminobenzaldehído en 20 ml de etanol y añadir 0,5 ml de ácido clorhídrico.

drico. Agitar la solución con carbón activado y filtrar. La coloración de la solución es menos intensa que una solución de yodo a 0,0001 M recientemente preparada. Utilizar inmediatamente después de preparado.

#### **p-Dimetilaminobenzaldehído SR2**

*Sinonimia* – Reactivo de Wasicky.

*Preparación* – Disolver 0,5 g de p-Dimetilaminobenzaldehído en 8,5 ml de ácido sulfúrico y añadir, cuidadosamente, 8,5 ml de agua.

#### **4-Dimetilaminocinamaldehído**

*CAS* – [6203-18-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{11}H_{13}NO$  – 175,22

*Descripción* – Cristales anaranjados o marrón-anaranjados o polvo.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 138 °C.

*Solubilidad* – Soluble en etanol, acetona y benceno.

#### **2,6-Dimetilanilina**

*CAS* – [87-62-7]

*Sinonimia* – 2,6-Xilidina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{11}N$  – 121,18

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Característica física* – Densidad (20 °C): cerca de 0,98

#### **N,N-Dimetilanilina**

*CAS* – [121-69-7]

*Sinonimia* – N,N-Dimetilbencenamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{11}N$  – 121,18

*Descripción* – Líquido oleoso, límpido, prácticamente incoloro, oscurece durante el almacenamiento.

*Característica física* – Banda de destilación: 192 °C a 194 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol y éter etílico.

#### **1,1-Dimetiletilamina**

*CAS* – [75-64-9]

*Sinonimia* – terc-Butilamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{11}N$  – 73,14

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,694. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,378. Temperatura de ebullición: cerca de 46 °C.

#### **2,5-Dimetilfenol**

*CAS* – [95-87-4]

*Sinonimia* – p-Xileno.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{10}O$  – 122,16

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 74,5 °C.

#### **Dimetilformamida**

*CAS* – [68-12-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_7NO$  – 73,09

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, con olor semejante al de aminas.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 153 °C. Densidad: aproximadamente 0,95. Índice de refracción (20 °C): 1,428.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Tóxico.

#### **Dimetilsulfóxido**

*CAS* – [67-68-5]

*Sinonimia* – DMSO.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_6OS$  – 78,13

*Descripción* – Líquido incoloro e inodoro. Higroscópico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 189 °C. Densidad: aproximadamente 1,10. Índice de refracción (20 °C): 1,479.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y de la exposición a la luz.

*Seguridad* – Irritante.

#### **1,3-Dinitrobenceno**

*CAS* – [99-65-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_4N_2O_4$  – 168,11

*Descripción* – Cristales amarillentos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 89 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **1,3-Dinitrobenceno SR**

*Especificación* – Contiene 1 g de 1,3-dinitrobenceno en etanol para 100 ml.

*Conservación* – Recipiente bien cerrado.

Dioxano

*CAS* – [123-91-1]

*Sinonimia* – 1,4-Dioxano, dióxido de etileno, dioxano.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_8O_2$  – 88,11

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, con olor semejante al de éter etílico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: en torno de 101 °C. Densidad: en torno de 1,03. Índice de refracción (20 °C): 1,421 a 1,424.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Tóxico. Inflamable.

### **Dióxido de azufre**

*CAS* – [7446-09-5]

*Sinonimia* – Anhídrido sulfuroso.

*Fórmula y masa molecular* –  $SO_2$  – 64,06

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0%(v/v)

*Descripción* – Gas incoloro, de olor característico, sofocante.

*Conservación* – En cilindros presurizados.

*Seguridad* – Irritante. Tóxico.

### **Dióxido de manganeso**

*CAS* – [1313-13-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $MnO_2$  – 86,94

*Descripción* – Polvo fino negro o marrón oscuro.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Oxidante energético.

### **Dipropilenglicol**

*CAS* – [25365-71-8]

*Sinonimia* – 1,1'-Óxido-2-propanol

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{14}O_3$  – 134,17

*Descripción* – Líquido incoloro, prácticamente sin olor.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,02. Temperatura de ebullición: aproximadamente 230 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – En locales bien ventilados.

### **Disulfuro de carbono**

*CAS* – [75-15-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $CS_2$  – 76,14

*Descripción* – Líquido incoloro o amarillento. Inflamable.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,26. Banda de ebullición: 46 °C a 47 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Venenoso!

### **Ditiol**

*CAS* – [496-74-2]

*Sinonimia* – 1,2-Dimercapto-4-metilbenceno; tolueno -3,4-ditiol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_8S_2$  – 156,27

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 31 °C.

*Solubilidad* – Soluble en metanol y en soluciones hidróxido- alcalinas.

### **Ditiol SR**

*Especificación* – Contiene 0,5 g en 100 ml de etanol.

*Estabilidad* – Preparar en el momento de uso.

*Seguridad* – Inflamable.

### **Ditiotreitol**

*CAS* – [3483-12-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{10}O_2S_2$  – 154,26

*Descripción* – Cristales blancos.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, en acetona y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Ditizona**

*CAS* – [60-10-6]

*Sinonimia* – Difeniltiocarbazona.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{13}H_{12}N_4S$  – 256,32

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino marrón oscuro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 168 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### **Ditizona SR**

*Especificación* – Contiene 0,05 g en 100 ml de tetracloruro de carbono.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Veneno!

### **Ditizona, solución concentrada**

*Preparación* – Disolver 35 mg de ditizona en 80 ml de cloroformo (para análisis con ditizona). Transferir para balón volumétrico de 500 ml completar el volumen con cloroformo.

*Conservación* – En recipientes cerrados y ámbar.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz y mantener a la temperatura de 4° a 8 °C.

*Estabilidad* – Esta solución es estable por cinco meses

### Ditizona, solución diluida

*Preparación* – Diluir la solución concentrada de ditizona en cloroformo (1:7).

### Ditizona, solución extractora

*Preparación* – Disolver 30 mg de ditizona en 1000 ml de cloroformo y añadir 5 ml de etanol. Antes del uso, agitar un volumen adecuado de la solución extractora de ditizona con mitad de su volumen de ácido nítrico a 1% (v/v) descartando la fase ácida.

*Almacenamiento* – En refrigerador.

### Edetato disódico

*CAS* – [6381-92-6]

*Sinonimia* – EDTA disódico; Sal disódica di-hidratada del ácido(etilenodinitrila) acético

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$  – 372,24

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, de sabor salino suave.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Quelante.

### Edetato disódico, solución 0,05 M

*Especificación* – Contiene 1,861 g, añadidos de 10 ml de hidróxido de sodio M, y diluir en agua para 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Emodina

*CAS* – [518-82-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{15}H_{10}O_5$  – 270,25

*Descripción* – Agujas rojo-anaranjadas.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y en soluciones hidróxido-alcalinas.

### Azufre

*CAS* – [7704-34-9]

*Elemento y masa atómica* – S – 32,1

*Descripción* – Polvo leve, amarillo grisáceo, o amarillo verdoso.

### Escina

*CAS* – [11072-93-8]

*Especificación* – Mezcla de saponinas obtenidas de semillas de *Aesculus hippocastanum* L.

*Descripción* – Polvo amorfo, fino, casi blanco, o rojizo, o amarillento.

### Estaño metálico

*CAS* – [7440-31-5]

*Elemento y masa atómica* – Sn – 118,71

*Especificación* – Pureza de, como mínimo, 99,5%.

*Descripción* – Gránulos grises.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 231,9 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz y del calor.

*Seguridad* – Irritante.

### Estearato de metilo

*CAS* – [112-61-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{19}H_{38}O_2$  – 298,50

*Descripción* – Cristales blancos o masa cristalina blanca o amarillo-pálida.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 38 °C.

*Solubilidad* – Soluble en etanol y éter de petróleo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Éster etílico de tetrabromofenoltaleína

*CAS* – [1176-74-5]

*Sinonimia* – Bromofenoltaleína magenta E

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{22}H_{14}Br_4O_4$  – 661,96

### Estolato de eritromicina

*CAS* – [3521-62-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{52}H_{97}NO_{18}S$  – 1056,43.

*Característica física* – Banda de fusión: 135 °C a 138 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, fácilmente soluble en etanol, soluble en acetona. Es prácticamente insoluble en ácido clorhídrico diluido.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y calor.

*Categoría* – Antibiótico.

### Estroncio SRA – 1 mg/ml

*Especificación* – Contiene 1,685 g de carbonato de estroncio en 10,0 ml de ácido clorhídrico a 50% (v/v). Completar con agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

### Etanol

*CAS* – [64-17-5]

*Sinonimia* – Alcohol etílico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_6O$  – 46,07

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (v/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 78 °C. Densidad: 0,803 a 0,808.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

### **Etanol absoluto**

*CAS* – [64-17-5]

*Sinonimia* – Alcohol anhidro.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_6O$  – 46,07

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (v/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico. Higroscópico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 78-79 °C. Densidad: 0,790 a 0,794. Índice de refracción: (20 °C): 1,361.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor y de la humedad.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

### **Etanol glicerinado**

*Preparación* – Mezclar 20 ml de glicerina y 80 ml de etanol a 70% (v/v).

### **Éter de petróleo**

*CAS* – [8032-32-4]

*Sinonimia* – Bencina.

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, volátil, de olor característico. No fluorescente.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 40 °C a 60 °C. Densidad: 0,630 a 0,656.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Inflamable.

### **Éter etílico**

*CAS* – [60-29-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{10}O$  – 74,12

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 96,0% (v/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, muy volátil, de olor característico, penetrante. Higroscópico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 35 °C. Densidad: aproximadamente 0,715. Índice de refracción (20 °C): 1,355.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor (no exceder 15 °C).

*Categoría* – Anestésico.

*Seguridad* – Inflamable. Riesgo de explosión!

### **Éter isopropílico**

*CAS* – [108-20-3]

*Sinonimia* – Éter diisopropílico.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{14}O$  – 102,17

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 67 °C a 69 °C. Densidad (20 °C): 0,723 a 0,728.

*Miscibilidad* – Muy poco miscible en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Inflamable

### **Etilenglicol**

*CAS* – [107-21-1]

*Nombre químico* – 1,2-Etanodiol

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_6O_2$  – 62,07

*Descripción* – Líquido viscoso, incoloro.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: en torno de 196 °C. Densidad: 1,113 a 1,115.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

### **Etilparabeno**

*CAS* – [120-47-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_{10}O_3$  – 166,17

*Descripción* – Cristales pequeños e incoloros o polvo blanco.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: 116 °C. Banda de ebullición: 297 °C a 298 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua. Fácilmente soluble en acetona, etanol y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Categoría* – Conservante.

### **Eugenol**

*CAS* – [97-53-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{12}O_2$  – 164,20



*Descripción* – Líquido oleoso, incoloro o levemente amarillento. Oscurece, y se torna más viscoso, con la exposición a la luz y con el contacto con el aire.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,07. Temperatura de ebullición: cerca de 250 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua miscible en etanol, en aceites grasos y aceites esenciales.

### Verde rápido (CI 42053)

*CAS* – [2353-45-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$  – 808,86

*Descripción* – Polvo o gránulo verde oscuro, con brillo metálico.

*Solubilidad* – Soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Factor Xa de la coagulación sanguínea bovina

*Especificación* – Enzima que posibilita la conversión de la protrombina en trombina. La sustancia semi-purificada es obtenida a partir de plasma bovino líquido y es preparada por activación del zimógeno del Factor X por medio de un agente apropiado, tal como el veneno de víbora de Russel.

*Almacenamiento* – La preparación liofilizada debe ser almacenada a una temperatura de -20 °C. La preparación congelada debe ser almacenada a una temperatura inferior a -20 °C.

### Factor Xa bovino, solución

*Preparación* – Reconstituir, según las instrucciones de fabricante, y diluir con la solución tampón de trometamina cloruro de sodio de pH 7,4.

*Absorbancia (5.2.14)* – Cualquier modificación de la absorbancia de la solución en 405 nm, usando el tampón de trometamina-cloruro de sodio de pH 7,4, como blanco, no es superior a 0,15-0,20 por minuto.

### 1,10-Fenantrolina

*CAS* – [5144-89-8]

*Sinonimia* – Ortofenantrolina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_8N_2H_2O$  – 198,22

*Descripción* – Polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: 100 °C a 104 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, soluble en acetona y en etanol.

*Categoría* – Indicador para sistemas de oxidación reducción; reactivo para colorimetría.

### DL-Fenilalanina

*CAS* – [150-30-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_{11}NO_2$  – 165,19

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0%.

*Descripción* – Cristales monoclinicos.

*Característica física* – Sublima en el vacío.

### Fenol

*CAS* – [108-95-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_6O$  – 94,11

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p).

*Descripción* – Masa cristalina o cristales incoloros o levemente rosados o amarillentos, de olor característico. Deliquescente.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: aproximadamente 43 °C. Temperatura de ebullición: aproximadamente 180 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua, muy soluble en etanol, en glicerol y en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

*Etiquetado* – Debe indicar el nombre y la cantidad del estabilizante.

*Seguridad* – Cáustico. Tóxico.

*Categoría* – Desinfectante.

### Fenoltaleína

*CAS* – [77-09-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{14}O_4$  – 318,33

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino o amorfo, blanco o levemente amarillento. Inodoro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 258 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Indicador ácido-base.

### Fenoltaleína a 0,1% (p/v)

*Especificación* – Contiene 0,1 g en etanol a 80% (v/v) a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Inflamable.

*Información adicional* – Para preparación de papel indicador.

### 2-Fenoxietanol

*CAS* – [122-99-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{10}O_2$  – 138,17

*Descripción* – Líquido incoloro, levemente viscoso, de olor aromático suave y de sabor ardiente.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,11. Temperatura de ebullición: aproximadamente 245 °C.

Índice de refracción (20 °C): 1,534.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Conservante.

### Ferricianuro de potasio

*CAS* – [13746-66-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $K_3Fe(CN)_6$  – 329,25

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,9% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales rojos.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Ferricianuro de potasio SR

*Especificación* – Contiene 5 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Ferricianuro de potasio amoniacal

*Preparación* – Disolver 2 g de ferricianuro de potasio en 75 ml de agua. Añadir 25 ml de hidróxido de amonio y homogeneizar.

### Ferrocianuro de potasio

*CAS* – [14459-95-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  – 422,39

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales transparentes o polvo cristalino, amarillo. Eflorescente. Se torna anhidro a 100 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Ferrocianuro de potasio SR

*Especificación* – Contiene 5,3 g en agua a 100 ml (aproximadamente 0,125 M).

*Conservación* – Preparar en el momento de uso.

### Fibrinógeno

*CAS* – [9001-32-5]

*Ver monografía* Fibrinógeno humano liofilizado.

### Floroglucina SR

*Preparación* – Disolver 1 g de floroglucinol en etanol y diluir para 100 ml con el mismo solvente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Floroglucinol

*CAS* – [6099-90-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_6O_3 \cdot 2H_2O$  – 162,14

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, o amarillo claro.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol y éter etílico.

### Fluido gástrico simulado

*Preparación* – Disolver 2 g de cloruro de sodio y 3,2 g de pepsina purificada en 7 ml de ácido clorhídrico y completar el volumen para 1000 ml con agua. Presenta pH de cerca de 1,2.  $\mu m$

### Fluido gástrico simulado (sin enzima)

*Preparación* – Disolver 2 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua. Añadir 7 ml ácido clorhídrico y diluir para 1000 ml con agua. Ajustar el pH en  $1,2 \pm 0,1$  con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 10 M.

### Fluido intestinal simulado sin pancreatina pH 7,5

*Preparación* – Disolver 6,8 g de fosfato de potasio monobásico en 900 ml de agua, añadir 77 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y ajustar el pH en  $7,5 \pm 0,1$  con hidróxido de sodio 0,2 M. Completar para 1000 ml con agua y homogeneizar.

### Fluoruro de amonio

*CAS* – [12125-01-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $NH_4F$  – 37,04

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 100 °C.

*Conservación* – Proteger de la luz, calor y humedad.

*Seguridad* – Irritante.

### Fluoruro de calcio

*CAS* – [7789-75-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $CaF_2$  – 78,08

*Descripción* – Cristales o polvo blanco.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Fluoruro de sodio

*CAS* – [7681-49-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaF$  – 41,99

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo blanco o casi blanco.

*Características físicas* – Densidad: 2,78. Temperatura de fusión: 993 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Venenoso!

### Fluoruro de sodio SR

*Preparación* – Secar aproximadamente 0,5 g de fluoruro de sodio a 200 °C, por 4 horas. Pesar exactamente 0,222 g de material seco y disolver agua, completando el volumen a 100 ml. Pipetear 10 ml de esta solución para balón volumétrico de 1000 ml y completar el volumen con agua. Cada ml de esta solución equivale a 10 µg de flúor.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Formaldehído, solución

*Sinonimia* – Formol, formalina.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_2\text{O}$  – 30,03

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 34,0% (p/v) y, como máximo, 37,0% (p/v).

*Descripción* – Líquido incoloro, límpido; vapores irritantes.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,08. Índice de refracción (20 °C): 1,374.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz, del aire y de temperatura abajo de 9 °C.

*Estabilidad* – Puede contener metanol como estabilizante.

*Seguridad* – Irritante. Tóxico.

*Categoría* – Desinfectante.

### Formamida

*CAS* – [75-12-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_3\text{NO}$  – 45,04

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, viscoso, de olor amoniacal suave.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 210 °C. Densidad: aproximadamente 1,13. Índice de refracción (20 °C) 1,447.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Seguridad* – Irritante.

### Formato de amonio

*CAS* – [540-69-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_3\text{NO}_2$  – 63,06

*Descripción* – Gránulos y cristales delicuescentes.

*Característica física* – Banda de fusión: entre 119 °C a 121 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Fosfatasa alcalina, solución

*Solución A* – Disolver 3,1 g de ácido bórico en 500 ml de agua. Añadir 21 ml de hidróxido de sodio *M* y 10 ml de cloruro de magnesio 0,1 M. Diluir con agua para 1000 ml.

*Preparación* – Disolver 95 mg de enzima fosfatasa alcalina en *Solución A*. Diluir para 50 ml con el mismo solvente.

### Fosfato de amonio dibásico

*CAS* – [7783-28-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 132,06

*Descripción* – Gránulos o cristales blancos o casi blancos. Higroscópico.

*Característica física* – Presenta pH de cerca de 8,0 en solución acuosa a 20% (p/v).

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Fosfato de amonio monobásico

*CAS* – [7722-76-1]

*Sinonimia* – Dihidrógeno fosfato de amonio. *Fórmula y masa molecular* –  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$  – 115,03

*Descripción* – Cristales blancos o polvo cristalino.

*Característica física* – El pH de solución a 0,2 M es aproximadamente 4,0.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, poco soluble en etanol, insoluble en acetona.

### Fosfato de codeína

*CAS* – [41444-62-6]

*Sinonimia* – Fosfato de codeína hemi-hidratado.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  – 406,37

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco, o cristales pequeños y incoloros.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua. Poco o muy poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Fosfato de potasio

*CAS* – [7778-53-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{K}_3\text{PO}_4$  – 212,27

*Sinonimia* – Fosfato de potasio tribásico.

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, delicuescente.

*Solubilidad* – Soluble en agua y insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Fosfato de potasio monobásico

*CAS* – [7778-77-0]

*Sinonimia* – Bifosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, fosfato ácido de potasio, fosfato monopotásico, fosfato potásico de Sorensen. *Fórmula y masa molecular* –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 136,09

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0%, calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de potasio dibásico**

*CAS* – [7758-11-4]

*Sinonimia* – Fosfato de potasio monoácido.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 174,18

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo blanco o casi blanco. Muy higroscópico.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, muy poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de sodio dibásico, anhidro**

*CAS* – [7558-79-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 141,96

*Descripción* – Polvo blanco higroscópico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

#### **Fosfato de sodio dibásico, dihidratado**

*CAS* – [10028-24-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 178,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor y de la humedad.

#### **Fosfato de sodio dibásico, dodecahidratado**

*CAS* – [10039-32-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 358,08

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,5% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales o gránulos incoloros, transparentes, inodoros, de sabor salino, levemente alcalino. Eflorescente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

#### **Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado SR**

*Especificación* – Contiene 9 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de sodio dibásico, heptahidratado**

*CAS* – [7782-85-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 268,07

*Descripción* – Polvo granulado o cristal incoloro o blanco. Es estable al aire. La solución acuosa es alcalina.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de sodio dibásico heptahidratado SR**

*Especificación* – Contiene 12 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado en 100 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de sodio monobásico**

*CAS* – [7558-80-7]

*Sinonimia* – Di-hidrogeno-ortofosfato de sodio.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – 119,98

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco. Higroscopio.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

#### **Fosfato de sodio monobásico, monohidratado**

*CAS* – [10049-21-5]

*Fórmula y masa molécula* –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 137,99

*Descripción* – Cristales o gránulos blancos o casi blancos, un poco delicuescentes.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y prácticamente soluble en etanol. La solución acuosa es ácida.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Fosfato de sodio monobásico, dihidratado**

*CAS* – [13472-35-0]

*Fórmula y masa molécula* –  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 156,01

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 60 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y muy poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

#### **Fosfato de sodio tribásico, dodecahidrato**

*CAS* – [10101-89-0]

*Sinonimia* – Fosfato tribásico sódico, fosfato trisódico.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 380,12

*Descripción* – Cristales incoloros o blancos. Eflorescente.

*Característica física* – Funde a 75 °C por calentamiento rápido.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

**Fosfato de tetrabutilamonio**

CAS – [5574-97-0]

Fórmula y masa molecular –  $C_{16}H_{38}NO_4P$  – 339,46

Descripción – Polvo blanco o casi blanco. Higroscópico.

Solubilidad – Soluble en agua.

Conservación – En recipientes cerrados.

**Fosfato-púrpura de bromocresol SR**

*Solución A* – Disolver 38 g de fosfato de sodio monobásico y 2 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en agua y diluir para 1000 ml con el mismo solvente. Ajustar el pH, si necesario, en  $5,3 \pm 0,1$  utilizando hidróxido de sodio 5 M o ácido fosfórico.

*Solución B* – Disolver 400 mg de púrpura de bromocresol en 30 ml de agua, añadir 6,3 ml de hidróxido de sodio 0,1 M y diluir con agua para 500 ml.

*Preparación* – En el día de la utilización, mezclar las *Soluciones A y B* y cloroformo (1:1:1) en embudo de separación. Agitar y descartar la fase orgánica. Repetir la extracción con porciones iguales de cloroformo hasta que la camada orgánica se presente incolora. Utilizar la fase acuosa.

**Fósforo rojo**

CAS – [7723-14-0]

Descripción – Polvo rojo oscuro.

Solubilidad – Insoluble en agua y en ácidos diluidos.

Seguridad – Inflamable!

**Fructosa**

CAS – [57-48-7]

Sinonimia – b-D-Fructosa, levulosa.

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_{12}O_6$  – 180,16

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0%, calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Polvo cristalino blanco, inodoro, de fuerte sabor dulce.

Característica física – Temperatura de fusión con descomposición: aproximadamente 103 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua y soluble etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Fructosa a 0,1 % (p/v)**

Especificación – Contiene 0,1 g en piridina a 100 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Tóxico.

**Fosfato de tributilo**

CAS – [126-73-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_{12}H_{27}O_4P$  – 266,31

Descripción – Líquido incoloro, o poco amarillento, inodoro.

Miscibilidad – Poco miscible en agua.

**Fosfato equimolar 0,05 M**

Especificación – Contiene 3,53 g de fosfato de sodio dibásico y 3,39 g de fosfato de potasio monobásico en agua para 1000 ml.

Conservación – En recipientes cerrados.

**Ftalaldehido**

CAS – [643-79-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_6O_2$  – 134,14

Descripción – Polvo cristalino amarillo.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 55 °C.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la exposición a la luz y del contacto con el aire.

**Ftalato de dibutilo**

CAS – [84-74-2]

Fórmula y masa molecular –  $C_{16}H_{22}O_4$  – 278,3

Sinonimia – Éster dibutílico del ácido ftálico, ftalato de di-n-butilo y dibutil ftalato.

Descripción – Líquido oleoso, límpido, incoloro o ligeramente colorido.

Características físicas – Temperatura de ebullición: 340 °C. Densidad: 1,043 a 1,048.

Miscibilidad – Muy poco soluble en agua, muy soluble en acetona, benceno, etanol y éter etílico.

**Ftalazina**

CAS – [253-52-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_8H_6N_2$  – 130,15

Descripción – Cristales amarillos pálidos.

Característica física – Banda de fusión: entre 90 °C y 91 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol anhidro, en acetato de etilo y en metanol.

**Fucsina básica (CI 42510)**

CAS – [632-99-5]

Sinonimia – Magenta I, Clorhidrato de rosalina. Fórmula y masa molecular –  $C_{20}H_{20}ClN_3$  – 337,85

Descripción – Cristales brillantes de color verde metálico.

Característica física – Se descompone en temperaturas arriba de 200 °C.

Solubilidad – Soluble en agua y en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.



*Categoría* – Colorante. Antifúngico.

### **Fucsina decolorada SR**

*Sinonimia* – Reactivo de Schiff.

*Preparación* – Disolver 1 g de fucsina básica en 600 ml de agua, añadir 100 ml de sulfito de sodio anhidro a 10% (p/v). Enfriar externamente con hielo, bajo agitación. Añadir, lentamente, 10 ml de ácido clorhídrico, diluir con agua para 1000 ml y filtrar. Si la solución oscurece, agitar con 0,2 a 0,3 g de carbón activado hasta decoloración, filtrando inmediatamente. Si además permanece la coloración rosa, añadir de 2 a 3 ml de ácido clorhídrico y agitar.

*Conservación* – Dejar en reposo durante 1 hora antes de la utilización, mantener al abrigo de la luz.

### **Glactosa**

*CAS* – [59-23-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{12}O_6$  – 180,16

*Descripción* – Polvo blanco cristalino.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 167 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Glactosa a 0,1% (p/v) en piridina**

*Especificación* – Contiene 0,1 g en piridina a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Gelatina**

*CAS* – [9000-70-8]

*Especificación* – Es mezcla de proteínas hidrosolubles obtenidas por extracción de material que contiene colágeno.

*Descripción* – Polvo, gránulos, escamas u hojas transparentes, brillantes, incoloras o levemente amarillentas. Higroscópico, de olor característico y sabor poco pronunciado.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor y humedad.

### **Gelatina glicerizada**

*Preparación* – Disolver 1 g de gelatina en 100 ml de agua calentada a una temperatura no superior a 30 °C. Añadir 1 ml de salicilato de sodio a 2% (p/v) y 15 ml de glicerina; agitar bien y filtrar la mezcla calentada en lana de vidrio.

### **Gelatina SR**

*Preparación* – Disolver 2,5 g de gelatina en 100 ml de agua caliente. Utilizar después de enfriamiento hasta temperatura ambiente.

### **Glicerol**

*CAS* – [56-81-5]

*Sinonimia* – Glicerina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_8O_3$  – 92,09

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido viscoso, límpido, incoloro, inodoro, higroscópico, de sabor dulce.

*Características físicas* – Densidad: 1,255 a 1,263. Índice de refracción (20 °C): 1,470 a 1,474.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol, poco soluble en acetona y prácticamente insoluble en aceites grasos y aceites esenciales.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de oxidantes.

### **Glicina**

*CAS* – [56-40-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_5NO_2$  – 75,07

*Descripción* – Polvo cristalino blanco y inodoro.

*Característica física* – Banda de fusión: 232 °C a 236 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, poco soluble en etanol y muy poco soluble en éter etílico.

### **Glucosa**

*CAS* – [50-99-7]

*Sinonimia* – Dextrosa.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{12}O_6$  – 180,16

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, inodoro, sabor dulce.

*Característica física* – Poder rotatorio específico (20 °C): + 52,5° a + 53,0° (disolver 10 g de glucosa en 100 ml de agua y añadir 0,2 ml de amoníaco).

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Glucosa a 0,1% (p/v) en piridina**

*Especificación* – Contiene 0,1 g en piridina a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Glutaraldehído**

*CAS* – [111-30-8]

*Fórmula de masa molecular* –  $C_5H_8O_2$  – 100,12

*Descripción* – Líquido oleoso.

*Características físicas* – Índice de refracción (25 °C): cerca de 1,434. Temperatura de ebullición: cerca de 188 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua.

**Guayacol**

CAS – [95-05-1]

Sinonimia – 2-metoxifenol, metilcatecol.

Fórmula y masa molecular –  $C_7H_8O_2$  – 124,14

Descripción – Cristales blancos o levemente amarillentos, o líquido incoloro o levemente amarillento. Higroscópico.

Características físicas – Temperatura de fusión: cerca de 28 °C. Temperatura de ebullición: cerca de 205 °C. Poco soluble en agua, muy soluble en cloruro de metileno y fácilmente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Guanina**

CAS – [73-40-5]

Fórmula y masa molecular –  $C_5H_5N_5O$  – 151,13

Descripción – Polvo blanco o casi blanco, amorfo.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol. Se disuelve en soluciones hidróxido-alcalinas diluidas.

**Heparina sódica**

CAS – [9041-08-1]

Descripción – Consiste en mezcla de principios activos, que poseen la propiedad de prolongar el tiempo de coagulación de la sangre. Obtenida, normalmente, de mucosa intestinal, pulmones u otro tejido adecuado de mamíferos domésticos usados para alimento del hombre.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.

Conservación – En recipientes herméticos. Etiquetado – El etiquetado debe indicar el órgano y la especie de origen. La potencia debe ser indicada en UI.

Categoría – Anticoagulante.

**Heptano**Especificación – Contiene usualmente mezcla de hidrocarburos – fracción de petróleo – con predominio de *n*-heptano.

Descripción – Líquido límpido, incoloro, volátil, altamente inflamable, de olor característico.

Características físicas – Banda de ebullición: 95 a 99 °C.

Densidad: aproximadamente 0,69.

Miscibilidad – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol absoluto. Miscible en éter etílico, en cloroformo, en benceno y en la mayoría de los aceites volátiles y no volátiles.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger del calor. Mantener distante de llama/chispa.

Seguridad – Irritante del trato respiratorio. Inflamable.

**n-Heptano**

CAS – [142-82-5]

Fórmula y masa molecular –  $C_7H_{16}$  – 100,20

Especificación – Principal componente de heptano.

Descripción – Líquido límpido e inflamable.

Características físicas – Temperatura de ebullición: 98,4 °C. Densidad: 0,684. Índice de refracción (20 °C): 1,3855.

Miscibilidad – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol anhidro.

**Heptanosulfonato de sodio**

CAS – [22767-50-6]

Fórmula y masa molecular –  $C_7H_{15}NaO_3S$  – 202,25

Descripción – Masa cristalina blanca o casi blanca.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y soluble en metanol.

Conservación – En recipientes herméticos.

**Hexano**Especificación – Contiene usualmente mezcla de isómeros de  $C_6H_{14}$ , predominantemente *n*-hexano y metilciclopentano ( $C_6H_{12}$ ).

Descripción – Líquido límpido, incoloro, volátil, altamente inflamable, de olor característico.

Características físicas – Banda de ebullición: 67 a 70 °C. Densidad: 0,66.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger del calor. Mantener distante de llama/chispa.

Seguridad – Irritante del trato respiratorio. Inflamable.

**n-Hexano**

CAS – [110-54-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_{14}$  – 86,18

Especificación – Principal componente de éter de petróleo y de hexano.

Descripción – Líquido límpido, volátil, de olor semejante al del petróleo.

Características físicas – Temperatura de ebullición: 69 °C. Densidad: 0,66. Índice de refracción (20 °C): 1,375.

Miscibilidad – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol anhidro.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger del calor. Mantener distante de llama/chispa.

Seguridad – Inflamable.

**1-Hexanosulfonato de sodio**

CAS – [2832-45-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_{13}NaO_3S$  – 188,22

*Descripción* – Polvo blanco o casi blanco.

### Hexilamina

*CAS* – [111-26-2]

*Sinonimia* – Hexanamina.

*Fórmula y masa molar* –  $C_6H_{15}N$  – 101,19

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,766. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,418. Temperatura de ebullición: 127 °C a 131 °C.

*Miscibilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol.

### Hidrato de cloral

*CAS* – [302-17-0]

*Sinonimia* – Cloral hidratado.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_3Cl_3O_2$  – 165,40

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,5% (p/p).

*Descripción* – Cristales transparentes, incoloros, de olor penetrante característico y de sabor picante y levemente amargo. Delicuescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 57 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

*Seguridad* – Irritante a la piel.

*Categoría* – Sedativo, hipnótico.

### Hidracina, hidrato

*CAS* – [7803-57-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $N_2H_4 \cdot H_2O$  – 50,06

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Miscibilidad* – Miscible en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Hidróxido de amonio

Usar amoníaco, solución concentrada.

### Hidróxido de bario

*CAS* – [12230-71-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$  – 315,46.

*Descripción* – Cristales incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 78 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Hidróxido de calcio

*CAS* – [1305-62-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $Ca(OH)_2$  – 74,09

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 93,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo o gránulos blancos blandos, inodoros.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del dióxido de carbono.

### Hidróxido de calcio, solución saturada

Usar hidróxido de calcio SR.

### Hidróxido de calcio SR

*Especificación* – Contiene 0,15 g en agua exenta de dióxido de carbono a 100 ml (solución saturada).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Estabilidad* – Preparar en el momento de uso.

*Almacenamiento* – Proteger del dióxido de carbono.

*Categoría* – Astringente.

### Hidróxido de litio

*CAS* – [1310-66-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $LiOH \cdot H_2O$  – 41,96

*Descripción* – Polvo granulado blanco, o casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua, formando una solución fuertemente alcalina. Ligeramente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Corrosivo.

### Hidróxido de potasio

*CAS* – [1310-58-3]

*Fórmula y masa molecular* – KOH – 56,11

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 85,0% (p/p), calculado como KOH, y, como máximo, 3,5% de  $K_2CO_3$ .

*Descripción* – Masa blanca, dura, seca, de estructura cristalina, inodora, muy higroscópica y ávida por  $CO_2$ . Se licúa al aire. Presentado en las formas de lentejas, cilindros o escamas.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos, inertes.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y del dióxido de carbono.

*Seguridad* – Muy cáustico.

### Hidróxido de potasio etanólico SR (aproximadamente 0,5 M)

*Preparación* – Disolver 34,04 g de hidróxido de potasio en 20 ml de agua; completar a 1000 ml con etanol (exento de aldehído). Reposo de 24 horas En recipientes herméticos. Decantar. Usar el sobrenadante límpido.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Hidróxido de potasio etanólico 2 M**

*Preparación* – Disolver 6,6 g de hidróxido de potasio en 5 ml de agua, enfriar y completar el volumen para 50 ml con etanol. Decantar por 24 horas y utilizar el sobrenadante límpido.

**Hidróxido de sodio**

*CAS* – [1310-73-2]

*Sinonimia* – Soda cáustica.

*Fórmula y masa molecular* – NaOH – 40,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% (p/p) de álcali total, calculado como NaOH, y, como máximo, 3,0% (p/p) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

*Descripción* – Masa dura, de estructura cristalina, blanca bajo la forma de pedazos, lentejas y bastones. Delicuescente y absorbe dióxido de carbono.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y del dióxido de carbono.

*Seguridad* – Cáustico, corrosivo.

**Hidróxido de sodio SR**

*Especificación* – Contiene 8% (p/v) de NaOH en agua.

*Conservación* – Ver hidróxido de sodio M.

**Hidróxido de sodio M**

*Especificación* – Contiene 40 g en agua exenta de dióxido de carbono a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes de vidrio álcali resistentes o de polietileno.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y del dióxido de carbono.

**Hidróxido de sodio, solución concentrada SR (aproximadamente 10 M)**

*Especificación* – Contiene 20 g de hidróxido de sodio en agua a 50 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del dióxido de carbono.

*Seguridad* – Cáustico.

**Hidróxido de tetrabutilamonio**

*CAS* – [2052-49-5]

*Fórmula y masa molecular* – (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>NOH – 259,47

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

**Hidróxido de tetrametilamonio**

*CAS* – [75-59-2]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>4</sub>H<sub>13</sub>NO – 91,15

*Descripción* – Es una base más fuerte que el amoníaco y absorbe rápidamente dióxido de carbono del aire. Una preparación en medio acuoso a 25% (p/v), es límpida e incolora.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 63 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**D α-4-hidroxifenilglicina**

*CAS* – [22818-40-2]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub> – 167,16

*Descripción* – Folhetos brillantes.

*Característica física* – Banda de descomposición: entre 220 °C y 247 °C.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua, en etanol, éter etílico y acetona. Soluble en minerales alcalinos y ácidos.

**Hidroxiquinoleína**

*CAS* – [148-24-3]

*Sinonimia* – 8-hidroxiquinoleína

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO – 145,16

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o levemente amarillento.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 75 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en acetona, en etanol y en soluciones diluidas de ácidos minerales.

**Hidroxitolueno butilado**

*CAS* – [128-37-0]

*Sinonimia* – BHT.

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O – 220,34

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o blanco amarillento.

*Características físicas* – Temperatura de congelamiento: no menos del que 69,2 °C. Temperatura de ebullición: 265 °C. Densidad: 1,048.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, muy soluble en acetona, fácilmente soluble en etanol y en aceites vegetales.

*Seguridad* – Puede causar dermatitis por contacto.

**Hiperósido**

*CAS* – [482-36-0]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub> – 464,38

*Descripción* – Agujas amarillas pálidas.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 240 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en metanol.

### Hipoclorito de sodio

CAS – [7681-52-9]

*Fórmula y masa molecular* – NaClO – 74,44

*Descripción* – Cristales blancos. Normalmente es obtenido en la forma pentahidratada, siendo que su forma anhidra es explosiva.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 18 °C (forma pentahidratada)

*Solubilidad* – Muy soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante!

### Hipoclorito de sodio SR

*Ver monografía* Hipoclorito de sodio solución diluida.

### Hipofosfito de sodio

CAS – [10039-56-2]

*Fórmula y masa molecular* – NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O – 105,99

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo granulado o cristalino blanco o cristales incoloros, inodoros, de sabor salino. Higroscópico.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

### Hipofosfito de sodio SR

*Especificación* – Contiene 5 g de hipofosfito de sodio en 10 ml de agua, aumentados a 50 ml con ácido clorhídrico. Separar eventuales cristales formados. La solución debe ser límpida e incolora.

### Imidazol

CAS – [288-32-4]

*Sinonimia* – Glioxalina.

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub> – 68,08

*Descripción* – Polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: 90 a 91 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

### Iminodibencilo

CAS – [494-19-9]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N – 195,26

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo pálido.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 106 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en acetona.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Yodato de potasio botar em orden alfabético

CAS – [7758-05-6]

*Fórmula y masa molecular* – KIO<sub>3</sub> – 214,00

*Descripción* – Cristales blancos, inodoros, o polvo cristalino.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 560 °C, con descomposición parcial.

*Solubilidad* – Soluble en agua, insoluble en etanol.

*Categoría* – Agente oxidante.

### Yoduro de mercurio(II)

CAS – [7774-29-0]

*Sinonimia* – Bi-yoduro de mercurio, yoduro de mercurio rojo.

*Fórmula y masa molecular* – HgI<sub>2</sub> – 454,40

*Descripción* – Polvo cristalino, rojo escarlata, denso, inodoro y casi insípido.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 259 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, ligeramente soluble en acetona y en etanol, soluble en solución de yoduro de potasio en exceso.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Categoría* – Veneno!

### Yoduro de potasio

CAS – [7681-11-0]

*Fórmula y masa molecular* – KI – 166,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros, o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salado y amargo. Levemente deliquescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 680 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en glicerol, soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y humedad.

### Yoduro de potasio aproximadamente M

Usar yoduro de potasio SR.

### Yoduro de potasio SR

*Especificación* – Contiene 16,5 g de yoduro de potasio en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes opacos bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.



**Yoduro de potasio mercúrico alcalino SR**

*Sinonimia* – Reactivo de Nessler, solución alcalina de tetrayodomercurato (II) de potasio, yoduro de potasio- cloruro de mercurio SR.

*Preparación* – Disolver 5 g de yoduro de potasio en 5 ml de agua, añadir poco a poco solución de cloruro de mercurio (II) a 25% (p/v), controlándose la adición, para que el precipitado formado en el inicio no quede completamente disuelto. Dejar enfriar. En seguida, añadir solución de hidróxido de potasio a 50% (p/v), diluir con agua hasta completar el volumen de 100 ml y añadir 0,5 ml de la solución de cloruro de mercurio (II) a 25% (p/v). Dejar decantar y usar el sobrenadante.

**Yoduro de potasio mercúrico alcalino SRI**

*Nombre alternativo* – Tetrayodomercurato de potasio alcalino SR.

*Preparación* – Disolver en agua, 11 g de yoduro de potasio y 15 g de yoduro de mercurio (II) y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente. Inmediatamente antes del uso, mezclar la solución anterior con igual volumen de hidróxido de sodio a 25% (p/v).

**Yoduro de potasio mercurio SR**

*Sinonimia* – Reactivo de Mayer.

*Solución A* – Disolver 13,5 g de cloruro de mercurio (II) en 600 ml de agua.

*Solución B* – Disolver 50 g de yoduro de potasio en 100 ml de agua.

*Preparación* – Mezclar las *Soluciones A* y *B* y completar el volumen para 1000 ml con agua.

**Yoduro de sodio**

*CAS* – [7681-82-5]

*Fórmula y masa molecular* – NaI – 149,89

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o cristales incoloros, higroscópicos, inodoros.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

**Yoduro de sodio en ácido acético**

*Especificación* – Contiene 10 g en ácido acético glacial a 50 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Yoduro de tetrabutylamonio**

*CAS* – [311-28-4]

*Sinonimia* – Yoduro de tetra-n-butylamonio.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{16}H_{36}IN$  – 369,38

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco o poco colorido.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y soluble en etanol.

**Carmín de Índigo botar no alfabeto**

*CAS* – [860-22-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{16}H_8N_2NaO_8S_2$  – 466,36

*Descripción* – Gránulos azules con brillo de cobre, o polvo azul o azul-violeta.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua, prácticamente soluble en etanol. Precipita en soluciones acuosas de cloruro de sodio.

**Carmín de Índigo SR botar no alfabeto**

*Preparación* – En una mezcla de 10 ml de ácido clorhídrico y 990 ml de ácido sulfúrico a 20% (p/v), añadir 0,2 g de índigo carmín.

**Yodo**

*CAS* – [7553-56-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $I_2$  – 253,80

*Descripción* – Escamas, placas o cristales pequeños, negro azulados o violeta grisáceos; brillo metálico, de olor irritante.

*Características físicas* – Sublima lentamente a temperatura ambiente; calentado, libera vapores violetas. Temperatura de fusión: 113,6 °C

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, soluble en etanol y poco soluble en glicerol.

*Conservación* – En recipientes herméticos de vidrio.

*Seguridad* – Vapores corrosivos!

**Yodo SR**

*Sinonimia* – Solución acuosa de yodo – yodada, reactivo de lugol.

*Especificación* – Contiene 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en agua a 100 ml.

*Preparación* – Disolver 1 g de yodo en 100 ml de agua, añadir 2 g de yoduro de potasio, agitar, dejar en reposo por algunas horas y filtrar en lana de vidrio.

*Conservación* – En recipientes de vidrio ámbar bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Yodo 0,05 M**

*Preparación* – Disolver 20 g de yoduro de potasio en la mínima cantidad de agua, añadir 13 g de yodo, en seguida, añadir agua para producir 1000 ml.

**Yodo 0,5 % (p/v) en cloroformo**

*Especificación* – Contiene 0,5 g de yodo en cloroformo a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Yodo 1 % (p/v) en etanol**

*Sinonimia* – Solución alcohólica de yodo, solución etanólica de yodo.

*Especificación* – Contiene 1% (p/v) de yodo en etanol.

*Conservación* – En recipientes de vidrio bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Inflamable.

### **Yodobismutato de potasio**

Usar yodobismutato de potasio acuo acético.

### **Yodobismutato de potasio acuo-acético**

*Preparación* – Mezclar 58 ml de agua, 1,21 g de subnitrito de bismuto, 14 ml de ácido acético glacial y 28 ml de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v).

### **Yodobismutato de potasio diluido SR**

*Preparación* – Disolver 100 g de ácido tartárico en 500 ml de agua. Separadamente, disolver 100 g de ácido tartárico en 400 ml de agua y añadir 8,5 g de subnitrito de bismuto. Agitar por una hora, añadir 200 ml de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v) y agitar bien. Dejar en reposo por 24 horas y filtrar. Mezclar la primera solución con 50 ml de la segunda.

### **Yoduro de potasio y subnitrito de bismuto SR**

*Sinonimia* – Reactivo de Dragendorff

*Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v) en agua y de solución preparada disolviendo 0,85 g de subnitrito de bismuto en mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua. Diluir 1 volumen de esa mezcla con 2 volúmenes de ácido acético glacial y 10 volúmenes de agua inmediatamente antes del uso.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### **Yodobismutato de potasio SR**

*Preparación* – Disolver 16,6 g de ácido tartárico en 67 ml de agua y juntar 1,41 g de subnitrito de bismuto. Agitar durante una hora, añadir 33 ml de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v). Agitar durante una hora más. Dejar en reposo por 24 horas. Filtrar.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### **Yodobismutato de potasio SR1**

*Preparación* – Disolver 10 g de ácido tartárico en 40 ml de agua y añadir 0,85 g de subnitrito de bismuto. Agitar durante una hora. Añadir 20 ml de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v) y homogeneizar. Dejar en reposo durante 24 horas y filtrar.

### **Yodobismutato de potasio SR2**

*Preparación* – Suspender 1,7 g de subnitrito de bismuto y 20 g de ácido tartárico en 40 ml de agua. Añadir, a la suspensión, 40 ml de solución de yoduro de potasio a 40% (p/v). Agitar por una hora y filtrar. Proteger la solución de la exposición a la luz. Inmediatamente antes de usar, mezclar 5 ml de la solución anterior con 15 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### **Yodo sulfuroso SR**

*Preparación* – Utilizar balón redondo de 3000 ml a 4000 ml, con tres tubuladuras, provisto de un agitador, un termómetro y un tubo de secado. El balón deberá estar seco y cerrado durante la preparación. Mezclar 700 ml de piridina anhidra con 700 ml de metoxietanol; juntar, con agitación, 220 g de yodo, finamente pulverizado y seco anteriormente, bajo pentóxido de fósforo. La agitación debe ser mantenida hasta completa disolución (por cerca de 30 minutos.). Enfriar a -10 °C y, en agitación, introducir rápidamente 190 g de dióxido de azufre líquido. La temperatura no debe pasar los 30 °C. Enfriar. *Dosificación* – Determinar el título en el momento de la utilización, trabajando siempre al abrigo de la humedad. Introducir en un matraz cerca de 20 ml de metanol anhidro y proceder a *Determinación del agua* por el método semi-micro (5.2.20.3), con la muestra, hasta al punto final de la titulación. Introducir en el matraz una cantidad de agua exactamente medida y efectuar una nueva titulación. Calcular el equivalente en agua de la muestra, en miligramos por mililitro. Cada mililitro de yodo sulfuroso SR corresponde, como mínimo, a 3,5 mg de H<sub>2</sub>O.

*Conservación* – En recipiente seco.

### **Irganox 1010**

*CAS* – [6683-19-8]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>73</sub>H<sub>108</sub>O<sub>12</sub> – 1177,81

*Descripción* – Polvo blanco a ligeramente amarillento. Inodoro, insípido.

*Características físicas* – Banda de fusión: 110 °C a 125 °C. Cristaliza en dos formas: forma alfa, banda de fusión 120 °C a 125 °C; y forma beta, banda de fusión 110 °C a 115 °C. La banda de fusión varía de acuerdo con la proporción de las formas cristalinas en la mezcla; esta proporción no influye en la eficiencia del producto.

*Información adicional* – Estabilizador para sustancias orgánicas, tales como polietileno y polipropileno, protegiéndolas contra degradación término-oxidante.

### **Irganox 1076**

*CAS* – [2082-79-3]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>O<sub>3</sub> – 530,97

*Descripción* – Polvo blanco a ligeramente amarillento. Inodoro, estable a la luz.

*Característica física* – Banda de fusión: 49 °C a 54 °C *Información adicional* – Antioxidante para sustratos orgáni-

cos, tales como polietileno y polipropileno, protegiéndolos de degradación término-oxidante.

### Irganox PS 800

CAS – [123-28-4]

Fórmula y masa molecular –  $C_{30}H_{58}O_4S$  – 514,94

Descripción – Cristales blancos.

Característica física – Banda de fusión: 38 °C a 40 °C  
Información adicional – Estabilizador de poliolefinas, especialmente polipropileno y polietileno de alta densidad.

### Isooctano

CAS – [540-84-1]

Sinonimia – 2,2,4-Trimetilpentano. Fórmula y masa molecular –  $C_8H_{18}$  – 114,23

Descripción – Líquido incoloro e inflamable.

Características físicas – Densidad (20 °C): 0,691 a 0,696.  
Índice de refracción (20 °C): 1,391 a 1,393.

Miscibilidad – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol.

Conservación – En recipientes cerrados.

### Isotiocianato de fluoresceína

CAS – [27072-45-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_{21}H_{11}NO_5S$  – 389,38

Especificación – Mezcla de isómeros: 5-isotiocianato y 6-isotiocianato.

Descripción – Sólido anaranjado, se descompone con calentamiento.

### Lactosa

CAS – [5989-81-1]

Sinonimia – Lactosa monohidratada.

Fórmula y masa molecular –  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$  – 360,31

Descripción – Polvo cristalino o gránulos blancos. Inodoro, de suave sabor dulce.

Características físicas – Rotación óptica específica (20 °C): +52,2° a + 52,8° (determinar en solución de lactosa anhidra a 0,1 g/ml). Temperatura de fusión: 202 °C

Conservación – En recipientes bien cerrados. Información adicional – Adsorbe olores extraños.

### Lactosa a 0,1% (p/v) en piridina

Especificación – Contiene 0,1% (p/v) en piridina.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Tóxico

### Laurato de metilo

CAS – [111-82-0]

Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{26}O_2$  – 214,40

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/v).

Descripción – Líquido incoloro o amarillento.

Características físicas – Densidad: aproximadamente 0,870. Índice de refracción (20 °C): aproximadamente 1,431. Temperatura de fusión: aproximadamente 5 °C

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Laurilsulfato de sodio

CAS – [151-21-3]

Sinonimia – Sulfato dodecil sódico, dodecilsulfato de sodio.

Fórmula y masa molecular –  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  – 288,38

Especificación – Mezcla de, como mínimo, 85,0% (p/p), de alquilsulfatos de sodio, que consiste principalmente de laurilsulfato de sodio [ $CH_3(CH_2)_{10}H_2SO_4Na$ ]. El contenido combinado de NaCl y  $Na_2SO_4$  es, como máximo, de 8,0% (p/p).

Descripción – Polvo, escamas o cristales blancos o amarillo claro; olor suave y característico.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, y parcialmente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Laurilsulfato de sodio SR

Descripción – Contiene 1 g en 100 ml de agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Lecitina

Especificación – Mezcla de diglicéridos, principalmente de los ácidos esteárico, palmítico y oleico, ligados al éster fosfórico de la colina. Estructura y composición variables de acuerdo con la fuente de obtención.

Descripción – Masa grasosa amarilla amarronada a marrón, de olor suave característico.

Conservación – En recipientes bien cerrados. Etiquetado – Especificar origen.

### Aleación de níquel aluminio botar em alfabeto

Descripción – Polvo fino gris.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua, soluble en ácidos minerales con formación de sal.

### Linalol

CAS – [78-70-6]

Fórmula y masa molecular –  $C_{10}H_{18}O$  – 154,25

Descripción – Líquido. Mezcla de dos estereoisómeros (lincareol y coriandrol).

Características físicas – Densidad (20 °C): cerca de 0,860. Temperatura de ebullición: cerca de 200 °C. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,462.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua.

**Litio**

CAS – [7439-93-2]

Elemento y masa atómica – Li – 6,94

*Solubilidad* – Reacciona violentamente con el agua. Soluble en metanol, formando metóxido de litio. Prácticamente insoluble en éter de petróleo.

**Litio SRA – 2 mg/ml**

*Especificación* – Contiene 1,064 g de carbonato de litio en 5 ml de ácido clorhídrico. Completar con agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**Macrogol 300**

CAS – [25322-68-3]

*Sinonimia* – PEG 300, polietilenglicol 300. *Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$  – Masa molecular no inferior a 95% del valor nominal rotulado. Presenta el número medio de grupos oxietileno:  $n = 6$  o  $7$ .

*Especificación* – Mezcla de productos de policondensación de óxido de etileno y agua.

*Descripción* – Líquido viscoso, límpido, incoloro o casi, de olor suave y característico, higroscópico.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,125. Índice de refracción (20 °C): aproximadamente 1,465. Viscosidad: aproximadamente 80 cP.

*Conservación* – En recipientes herméticos. *Etiquetado* – Debe contener la masa molecular promedio.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

**Macrogol 1000**

CAS – [25322-68-3]

*Sinonimia* – PEG 1000, polietilenglicol 1000. *Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$  – Masa molecular no inferior a 95% del valor nominal rotulado.

*Descripción* – Sólido blanco o casi blanco con apariencia de cera. Higroscópico.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 1,080. Banda de congelamiento: entre 35 °C y 40 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y en cloruro de metileno. Prácticamente insoluble en aceites grasos y en aceites minerales.

*Conservación* – En recipientes herméticos. *Etiquetado* – Debe contener la masa molecular promedio.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

**Magnesio SRA – 1 mg/ml**

*Especificación* – Contiene 9 g de cloruro de magnesio en agua a 500 ml.

*Estandarización* – En 25 ml de esta solución, añadir 25 ml de agua, 10 ml de tampón cloruro de amoníaco pH 10,7 y 0,1 g del indicador negro de eriocromo T. Titular con edetato disódico 0,05 M SV Cada ml del titulante corresponde

a 0,001215 g de Mg. Para uso diluir a la concentración de 1 mg/ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**Magneson**

CAS – [74-39-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$  – 259,22

*Descripción* – Polvo castaño-rojizo.

*Categoría* – Indicador para magnesio y molibdeno.

**Melamina**

CAS – [108-78-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$  – 126,12

*Descripción* – Polvo amorfo, blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y en etanol.

**2-Mercaptoetanol**

CAS – [60-24-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$  – 78,14

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,116. Temperatura de ebullición: cerca de 157 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua.

**Mercurio**

CAS – [7439-97-6]

Elemento y masa atómica – Hg – 200,59

*Especificación* – Metal líquido, móvil, denso, plateado, de superficie espejada.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 13,5. Temperatura de ebullición: aproximadamente 357 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Veneno! Volátil a la temperatura ambiente.

**Mercurio SRA – 1 mg/ml**

*Especificación* – Contiene 1,080 g de óxido de mercurio disuelto en el menor volumen posible de ácido clorhídrico 2 M. Completar con agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**Metabisulfito sódico**

CAS – [7681-57-4]

*Sinonimia* – Disulfito de sodio, pirosulfito de sodio. *Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  – 190,10

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95% (p/p). Contiene cantidad de metabisulfito sódico equivalente a, como mínimo, 65,0% y, como máximo, 67,4% de  $\text{SO}_2$ .

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o blanco-crema, de olor sulfuroso y de sabor ácido y salino.



*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, bien llenos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor excesivo, del aire y de la humedad.

*Estabilidad* – Oxida lentamente a sulfato, por exposición al aire y, a la humedad, con desintegración de los cristales.

### Metanol

*CAS* – [67-56-1]

*Sinonimia* – Alcohol metílico.

*Fórmula y masa molecular* –  $CH_4O$  – 32,04

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/v).

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro, inflamable, de olor característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 64 °C a 65 °C. Densidad: 0,790 a 0,793. Índice de refracción (20 °C): 1,328 a 1,330.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

### Metenamina

*CAS* – [100-97-0]

*Sinonimia* – Hexametilentetramina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{12}N_4$  – 140,19

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), después de desecación bajo pentóxido de fósforo durante 4 horas.

*Descripción* – Polvo cristalino incoloro.

*Características físicas* – Sublima sin fundir y con parcial descomposición a aproximadamente 263 °C. El pH de la solución a 0,2 M: 8,4.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Antiséptico urinario.

### Metilcelulosa 450

*CAS* – [9004-67-5]

*Especificación* – Celulosa parcialmente O-metilada con viscosidad de 450 mPa/segundo.

*Descripción* – Gránulo o polvo blanco, o blanco amarillento, o blanco grisáceo. Higroscópico.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua caliente, en acetona, etanol absoluto y tolueno.

### 4,4-Metilenobis-N,N-dimetilanilina

*CAS* – [101-61-1]

*Sinonimia* – Tetrametildiaminodifenilmetano.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{17}H_{22}N_2$  – 254,37

*Descripción* – Cristales o folhetos blancos, o blanco-azulados.

*Característica física* – Banda de fusión: 90 °C a 91 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol y soluble en ácidos minerales.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Metilenbisacrilamida

*CAS* – [110-26-9]

*Sinonimia* – N,N'-metilenbisacrilamida, metilenobispropenamida.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_{10}N_2O_2$  – 154,19

*Descripción* – Polvo fino blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: arriba de 300 °C, con descomposición.

### Metil Etil Cetona

*CAS* – [78-93-3]

*Sinonimia* – Etil metil cetona; 2-butanona.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_8O$  – 72,11

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro. Olor característico de acetona.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,81. Temperatura de ebullición: 79,6 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

### Metil Isobutil Cetona

*CAS* – [108-10-1]

*Sinonimia* – 4-Metil-2-pentanona, isopropilacetona.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{12}O$  – 100,16

*Descripción* – Líquido incoloro, de olor cetónico y alcanforado.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: en torno de 115 °C

### Metilparabeno

*CAS* – [99-76-3]

*Nombre químico* – Éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico *Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_8O_3$  – 152,15

*Descripción* – Cristales blancos, poco solubles en agua, fácilmente solubles en acetona, en etanol y en éter etílico.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol y en metanol.

*Categoría* – Conservante.

### 4-Metilpentan-2-ol

*CAS* – [108-11-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{14}O$  – 102,17

*Descripción* – Líquido incoloro, límpido y volátil.



*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,802. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,411. Temperatura de ebullición: cerca de 132 °C.

### 3-Metil-2-pentanona

CAS – [565-61-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_{12}O$  – 100,16

Descripción – Líquido incoloro e inflamable.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: cerca de 118 °C. Densidad (20 °C): cerca de 0,815. Índice de Refracción (20 °C): cerca de 1,400.

Conservación – En recipientes cerrados.

### Metoxiazobenceno

CAS – [2396-60-3]

Fórmula y masa molecular –  $C_{13}H_{12}N_2O$  – 212,3

Descripción – Láminas anaranjadas.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol, en éter de petróleo y otros solventes orgánicos. *Cromatografía en camada delgada* – Aplicar, en placa de gel de sílice G, solución de 5 mg de metoxiazobenceno en benceno y desarrollar cromatograma con el mismo solvente. Aparece una única mancha con Rf en torno de 0,6.

### Metoxiazobenceno SR

*Especificación* – Solución a 0,2% (p/v) en mezcla de 1 volumen de benceno y 4 volúmenes de éter de petróleo.

### Metóxido de potasio

CAS – [865-33-8]

Fórmula y masa molecular –  $CH_3OK$  – 70,13 *Uso* – Preparación extemporánea.

### Metóxido de sodio

CAS – [124-41-4]

Fórmula y masa molecular –  $CH_3ONa$  – 54,02

Descripción – Polvo blanco fino. Reacciona violentamente con el agua con formación de calor. Sensible al aire. Puede presentarse en la forma de:  $CH_3ONa$ ,  $2CH_3OH$ , polvo blanco. En solución puede ser preparado *in situ*.

*Solubilidad* – Soluble en etanol y en metanol.

Conservación – En recipientes herméticos.

Almacenamiento – Proteger de la humedad.

### Metoxietanol

CAS – [109-86-4]

*Sinonimia* – 2-Metoxietanol, éter etilenglicol monoetil.

Fórmula y masa molecular –  $C_3H_8O_2$  – 76,09

Descripción – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,9663. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,4028. Temperatura de ebullición: cerca de 125 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, en acetona y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Venenoso! Usar en ambientes con ventilación adecuada.

### Miristato de metilo

CAS – [124-10-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_{15}H_{30}O_2$  – 242,40

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/v).

Descripción – Líquido incoloro o levemente amarillento.

*Características físicas* – Densidad: aproximadamente 0,868. Índice de refracción (20 °C): aproximadamente 1,437. Temperatura de fusión: aproximadamente 20 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en etanol y éter de petróleo.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Mezcla de negro de eriocromo T

*Preparación* – Mezclar 0,2 partes de negro de eriocromo T con 100 partes de cloruro de sodio.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Categoría – Indicador para calcio y magnesio.

### Mezcla reductora

*Preparación* – Pulverizar las sustancias, añadidas en el siguiente orden, para obtener una mezcla homogénea: 20 mg de bromuro de potasio, 0,5 g de sulfato de hidracina y 5 g de cloruro de sodio.

### Mezcla sulfocrómica

*Preparación* – Disolver 50 g de dicromato de potasio en cerca de 50 ml de agua y añadir 1000 ml de ácido sulfúrico.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Molibdato de amonio

CAS – [12054-85-2]

Fórmula y masa molecular –  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  – 1235,86

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Cristales incoloros hasta levemente amarillos o verde azulados, brillantes.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Características físicas* – Por el calentamiento pierde agua y amoníaco.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

### Molibdato de amonio SR

*Especificación* – Contiene 10 g de molibdato de amonio en agua para 100 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Molibdato de amonio SR1**

*Preparación* – Disolver 6,5 g de ácido molibdnico, finamente molido, en mezcla de 14 ml de agua y 14,5 ml de hidróxido de amonio. Enfriar la solución y añadirla, lentamente y con agitación, a una mezcla enfriada de 32 ml de ácido nítrico y 40 ml de agua. Dejar en reposo por 48 horas y filtrar a través de crisol con fondo sinterizado de porosidad fina. Esta solución se deteriora bajo almacenamiento y es inadecuada para el uso si, después de adición de 2 ml de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado SR para 5 ml de solución, un precipitado amarillo abundante no se forma inmediatamente o después de leve calentamiento. Si hubiese formación de precipitado durante el almacenamiento, emplear solamente la solución sobrenadante límpida.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Molibdato de amonio, solución ácida**

*Preparación* – Diluir 25 ml de molibdato de amonio a 7% (p/v) para 200 ml con agua. Añadir, lentamente, 25 ml de ácido sulfúrico 3,75 M y homogeneizar.

**Molibdato de amonio a 1% (p/v) en ácido sulfúrico M**

*Preparación* – Pesar 1 g de molibdato de amonio R y disolver con 50 ml de solución de ácido sulfúrico M. Diluir a 100 ml con el mismo solvente.

**Molibdato de sodio**

CAS – [10102-40-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 241,95

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

**Molibdovanadato SR**

*Sinonimia* – Reactivo molibdatovanadato, reactivo molibdovanadato.

*Preparación* – Usando sustancias finamente pulverizadas, preparar suspensión de 4 g de molibdato de amonio y 0,1 g de vanadato de amonio en 70 ml de agua. Juntar 20 ml de ácido nítrico. Completar el volumen de 100 ml con agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Morfolina**

CAS – [110-91-8]

*Sinonimia* – Tetraidro-2H-1,4-oxazina; dietileno oximida  
*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$  – 87,12

*Descripción* – Líquido incoloro. Higroscópico.

*Característica física* – Temperatura de ebullición: en torno de 128 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

**Morina**

CAS – [6472-38-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 338,27

**Naftaleno**

CAS – [91-20-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{10}\text{H}_8$  – 128,17

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: cerca de 80 °C. Banda de ebullición: entre 217 °C y 219 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en etanol y fácilmente soluble en benceno y cloroformo.

*Conservación* – Recipiente bien cerrados.

**1,3-Naftalendiol**

CAS – [132-86-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2$  – 160,17

*Descripción* – Polvo cristalino, generalmente, violeta-amarronado.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 125 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en etanol.

**2,7-Naftalendiol**

CAS – [582-17-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_2$  – 160,17

*Descripción* – Polvo o sólido cristalino amarillo a casi blanco.

*Características físicas* – Banda de fusión: 187 °C y 191 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

**Naftalendiol, reactivo**

*Preparación* – Disolver 20 mg de 1,3-Naftalendiol en 10 ml de etanol conteniendo 0,2 ml de ácido sulfúrico.

**1-Naftilamina**

CAS – [134-32-7]

*Sinonimia* –  $\alpha$ -Naftilamina.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}$  – 143,12

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco. Por la exposición al aire y a la luz, se torna rojizo. Olor desagradable.

*Característica física* – Banda de fusión: 49 °C a 51 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.

*Seguridad* – Vapor y polvo nocivos.

**1-Naftol**

CAS – [90-15-3]

Sinonimia – Alfa-naftol,  $\alpha$ -naftol.Fórmula y masa molecular –  $C_{10}H_8O$  – 144,17

Descripción – Cristales incoloros, o blancos o casi blancos; o polvo cristalino blanco o casi blanco. Oscurece con la exposición a la luz.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 95 °C.

Solubilidad – Poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Naftol SR**

Especificación – Contiene 20% (p/v) en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados. Estabilidad – Preparar para uso inmediato.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**2-Naftol**

CAS – [135-19-3]

Sinonimia – Betanaftol,  $\beta$ -naftolFórmula y masa molecular –  $C_{10}H_8O$  – 144,17

Descripción – Polvo cristalino blanco a levemente rosa, de olor fenólico suave.

Característica física – Temperatura de fusión: aproximadamente 122 °C

Solubilidad – Muy poco soluble en agua y muy soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**2-Naftol SR**Sinonimia – Betanaftol SR,  $\beta$ -naftol SR.

Especificación – Contiene 1 g en 100 ml de hidróxido de sodio a 1% (p/v).

Conservación – En recipientes bien cerrados. Estabilidad – Preparar para uso inmediato.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**2-Naftol SR1**Sinonimia – Betanaftol SR1,  $\beta$ -naftol SR1 Preparación – Disolver 5 g de 2-naftol, recientemente recristalizado, en 40 ml de hidróxido de sodio 2 M y completar para 100 ml con agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados. Estabilidad – Preparar para uso inmediato.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Naringina**

CAS – [10236-47-2]

Fórmula y masa molecular –  $C_{27}H_{32}O_{14}$  – 580,54

Descripción – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 171 °C.

Solubilidad – Poco soluble en agua, soluble en metanol y en dimetilformamida.

**Negro de almidón 10B**

CAS – [1064-48-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$  – 616,50

Descripción – Polvo castaño oscuro a negro.

Solubilidad – Ligeramente soluble en la agua, soluble en etanol.

**Negro de almidón 10B SR**

Especificación – Solución de negro de almidón 10B a 0,5% (p/v) en una mezcla de ácido acético y metanol (10:90).

**Ninhidrina**

CAS – [485-47-2]

Sinonimia – Ninhidrina.

Fórmula y masa molecular –  $C_9H_4O_3 \cdot H_2O$  – 178,14

Especificación – Contiene, como mínimo, 96,0% (p/p).

Descripción – Polvo cristalino blanco a amarillo levemente pálido.

Solubilidad – Soluble en agua y en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Ninhidrina etanólica acética SR**

Preparación – Disolver 1 g de ninhidrina en 50 ml de etanol y añadir 10 ml de ácido acético glacial.

**Ninhidrina SR**

Sinonimia – Ninhidrina SR.

Especificación – Contiene 0,2% (p/v) en mezcla de 1-butanol y ácido acético 2 M (95:5).

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

Seguridad – Inflamable.

**Nitrato cérico amoniacal**

CAS – [16774-21-3]

Fórmula y masa molecular –  $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$  – 548,22

Descripción – Polvo cristalino amarillo-anaranjado o cristales anaranjados transparentes.

Solubilidad – Soluble en agua.

**Nitrato de aluminio, nonahidratado**

CAS – [7784-27-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  – 375,14

Descripción – Cristales delicuescentes.

Solubilidad – Muy soluble en agua y etanol, muy poco soluble en acetona.

Conservación – En recipientes herméticamente cerrados

**Nitrato de amonio**

CAS – [6484-52-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 80,04

Descripción – Cristales incoloros, delicuescentes, o polvo blanco, de sabor salado.

Características físicas – Temperatura de fusión:

aproximadamente 155 °C, se descompone alrededor de 210 °C en agua y óxidos de nitrógeno.

Solubilidad – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en metanol y soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de amonio SR**

Especificación – Contiene 5 g de nitrato de amonio en agua para 100 ml.

**Nitrato de amonio, solución saturada**

Especificación – Contiene 20,1 g en 10 ml de agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de bario**

CAS – [10022-31-8]

Fórmula y masa molecular –  $\text{BaN}_2\text{O}_6$  – 261,34

Descripción – Cristales o polvo cristalino.

Característica física – Temperatura de fusión:

aproximadamente 590 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, muy poco soluble en etanol y en acetona.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Veneno!

**Nitrato de cadmio**

CAS – [10022-68-1]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 308,47

Descripción – Cristales incoloros. Higroscópicos.

Solubilidad – Muy soluble en agua y soluble en acetona y en etanol.

**Nitrato de plomo**

CAS – [10099-74-8]

Sinonimia – Nitrato de plomo (II).

Fórmula y masa molecular –  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – 331,21

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Cristales incoloros, translúcidos o polvo cristalino blanco.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Veneno!

**Nitrato de cobalto (II)**

CAS – [10026-22-9]

Sinonimia – Nitrato cobaltoso.

Fórmula y masa molecular –  $\text{CoN}_2\text{O}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 291,03

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Cristales pequeños, rojos, higroscópicos.

Característica física – Temperatura de fusión: aproximadamente 55°C.

Solubilidad – Soluble en agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger del calor.

**Nitrato de cobalto (II) SR**

Descripción – Contiene 1,0% (p/v) en metanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Inflamable. Tóxico.

**Nitrato de lantano**

CAS – [10277-43-7]

Fórmula y masa molecular –  $\text{LaN}_3\text{O}_9 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 433,01

Descripción – Cristales incoloros, delicuescentes.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de lantano SR**

Especificación – Contiene 5% (p/v) en agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de magnesio**

CAS – [13446-18-9]

Fórmula y masa molecular –  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 256,41

Descripción – Cristales incoloros y delicuescentes.

Solubilidad – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de mercurio (I)**

CAS – [14836-60-3]

Sinonimia – Nitrato mercurioso.

Fórmula y masa molecular –  $\text{Hg}_2\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 561,22

*Descripción* – Cristales incoloros, normalmente con suave olor de ácido nítrico.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 70 °C, con descomposición.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Veneno!

### Nitrato de mercurio(I) SR

*Sinonimia* – Nitrato mercurioso SR.

*Especificación* – Contiene 15 g en mezcla de 90 ml de agua y 10 ml de ácido nítrico a 10% (v/v)

*Conservación* – En recipientes cerrados de vidrio ámbar.

*Estabilidad* – Añadir un pequeño glóbulo de mercurio metálico.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Nitrato de mercurio(II)

*CAS* – [7783-34-8]

*Sinonimia* – Nitrato mercúrico.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{HgN}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 342,62

*Descripción* – Cristales incoloros o levemente coloridos. Higroscópico.

*Solubilidad* – Soluble en agua en presencia de pequeña cantidad de ácido nítrico.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y de la humedad.

*Seguridad* – Veneno!

### Nitrato de potasio

*CAS* – [7757-79-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{KNO}_3$  – 101,10

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros y transparentes, o polvo blanco, cristalino o granulado.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Nitrato de plata

*CAS* – [7761-88-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{AgNO}_3$  – 169,87

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros transparentes, o polvo cristalino blanco. Inodoro

*Característica física* – Temperatura de fusión: 212 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes no metálicos cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Cáustico. Veneno!

### Nitrato de plata 0,1 M

*Especificación* – Contiene 17 g en agua para 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Nitrato de plata SR

*Especificación* – Contiene 4,25 % (p/v) en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Nitrato de plata SR1

*Nombre alternativo* – Reactivo de nitrato de plata.

*Preparación* – Mezclar 3 ml de solución concentrada de amoníaco y 40 ml de hidróxido de sodio *M*, añadir, gota a gota, con agitación, 8 ml de solución de nitrato de plata a 20% (p/v). Diluir para 200 ml con agua.

### Nitrato de sodio

*CAS* – [7631-99-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NaNO}_3$  – 84,99

*Descripción* – Cristales incoloros y transparentes o, gránulo o polvo blanco o casi blanco. Delicuescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 308 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Nitrato de sodio SR

*Especificación* – Contiene 10 g en agua para 100 ml. *Estabilidad* – Preparar inmediatamente antes del uso.

### Nitrato de torio

*CAS* – [13470-07-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{ThN}_4\text{O}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 552,12

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, levemente delicuescente.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Nitrato de zirconilo

*CAS* – [14985-18-3] *Sinonimia* – Nitrato de zirconio.

*Fórmula molecular* – aproximadamente,  $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

*Descripción* – Cristales, o polvo blanco, o casi blanco.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Nitrato de zirconilo SR

*Preparación* – Disolver 0,1 g de nitrato de zirconilo en una mezcla de 60 ml de ácido clorhídrico y 40 ml de agua.



*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Nitrato fenilmercurio

*CAS* – [55-68-5]

*Sinonimia* – Nitrato básico de fenilmercurio y nitrato de fenilmercurio.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_5HgNO_3$  – 339,70

*Especificación* – Consiste en mezcla de nitrato y hidróxido de ión fenilmercurio ( $C_6H_5Hg^+$ ). Contiene, como mínimo, 87,9% de ión fenilmercurio (p/p) y, no menos, de 62,75% de mercurio (Hg) (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o escamas blancas lustrosas. Inodoro.

*Característica física* – Banda de fusión: entre 175 °C y 190 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol, poco soluble en agua caliente. Disuelve en glicerol y aceites grasos.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Nitrazepam

*CAS* – [146-22-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{15}H_{11}N_3O_3$  – 281,27

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo.

*Característica física* – Banda de fusión: 226 °C a 230 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

### Nitrito de sodio

*CAS* – [7632-00-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaNO_2$  – 69,00

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros, o polvo granulado blanco, o levemente amarillento. Higroscópico.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: 271 °C. Se descompone arriba de 320 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Se oxida al aire muy lentamente a nitrato.

### Nitrito de Sodio SR

*Especificación* – Contiene 10 g de nitrito de sodio en agua para 100 ml.

*Conservación* – Preparar para consumo inmediato.

### p-Nitroanilina

*CAS* – [100-01-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_6N_2O_2$  – 138,12

*Descripción* – Polvo cristalino claro.

*Característica física* – Banda de fusión: de 146 °C a 148 °C.

*Solubilidad* – Insoluble en agua y soluble en etanol y éter etílico. Forma una sal soluble en solución acuosa con ácido mineral fuerte.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### p-Nitroanilina y nitrito de sodio SR

*Solución A* – Disolver 0,3 g de p-nitroanilina en 100 ml de ácido clorhídrico 10 M. *Solución B* – Disolver 2,5 g de nitrito de sodio en 50 ml de agua.

*Preparación* – Mezclar 90 ml de la *Solución A* y 10 ml de la *Solución B* en el momento del uso.

### 2-Nitrobenzaldehído

*CAS* – [552-89-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_5NO_3$  – 151,12

*Descripción* – Cristales amarillos, de olor semejante al de aceite de almendra.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 42 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

### Nitrobencono

*CAS* – [98-95-3] *Sinonimia* – Nitrobenzol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_5NO_2$  – 123,11

*Descripción* – Líquido incoloro a amarillo pálido, de olor semejante al de aceite de almendra.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: aproximadamente 211 °C. Densidad: aproximadamente 1,20.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Veneno!

### Nitrometano

*CAS* – [75-52-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $CH_3NO_2$  – 61,04

*Descripción* – Líquido oleoso incoloro, de olor característico.

*Característica física* – Temperatura de ebullición: en torno de 102 °C.

*Miscibilidad* – Poco miscible en agua y miscible en etanol.

### Nitroprusiato de sodio

*CAS* – [13755-38-9]

*Sinonimia* – Pentacianonitrosilferrato (III) disódico dihidratado, nitroprusiato de sodio, nitroferrocianuro de sodio.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 297,95

*Descripción* – Polvo o cristales transparentes, rojos oscuros.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

#### **Nitroprusiato de sodio y piperazina SR**

*Especificación* – Contiene 0,1 g de nitroprusiato de sodio y 0,25 g de piperazina en 5 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **1-Octanosulfonato de sodio**

*CAS* – [5324-84-5]

*Fórmula molecular y masa* –  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_3\text{S}$  – 216,27

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% de  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_3\text{S}$ .

*Descripción* – copos o polvos cristalinos blancos o casi blancos.

#### **Octilsulfato de sodio**

*CAS* – [142-31-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{NaO}_4\text{S}$  – 232,27

*Descripción* – Copos o polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y soluble en metanol.

#### **Octoxinol 10**

*CAS* – [9002-93-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{10}\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$  – 647,00

*Descripción* – Líquido viscoso, límpido, amarillo claro.

*Miscibilidad* – Miscible en agua, en acetona y en etanol. Soluble en tolueno.

*Conservación* – En recipiente bien cerrado.

#### **Aceite de oliva**

*CAS* – [8001-25-0]

*Especificación* – Aceite fijo obtenido del fruto maduro de *Olea europaea* L. – Oleaceae.

*Descripción* – Aceite amarillo pálido o amarillo verdoso.

*Característica física* – Densidad: 0,910 a 0,915.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en etanol, miscible en cloroformo, éter etílico y éter de petróleo.

#### **Oxalato de amonio**

*CAS* – [6009-70-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 142,11

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros transparentes o polvo cristalino blanco. Inodoro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 212 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Cáustico. Corrosivo. Veneno!

#### **Oxalato de amonio SR**

Usar oxalato de amonio SI.

#### **Oxalato de potasio**

*CAS* – [6487-48-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 184,23, se anhidro – 166,22

*Descripción* – Cristales incoloros, inodoros, eflorescentes al aire seco y caliente.

*Característica física* – Pierde su agua a aproximadamente 160 °C

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Seguridad* – Veneno!

#### **Oxalato de sodio**

*CAS* – [62-76-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  – 134,00

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

#### **Oxalato de verde de malaquita**

*CAS* – [633-03-4]

*Sinonimia* – Verde brillante

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  – 428,64

*Descripción* – Cristales brillantes amarillos dorados.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Óxido de aluminio**

*CAS* – [1344-28-1]

*Sinonimia* – Alúmina.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 101,96

*Descripción* – Polvo granulado fino, blanco.

*Característica física* – El pH de la suspensión a 10,0% (p/v): entre 9,0 y 10,0.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

#### **Óxido de holmio**

*CAS* – [12055-62-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Ho}_2\text{O}_3$  – 377,85

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,9% (p/p).

*Descripción* – Polvo amarillento.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Óxido de magnesio

*CAS* – [1309-48-4]

*Sinonimia* – Óxido de magnesio leve o pesado. *Fórmula y masa molecular* – MgO – 40,30

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo amorfo fino, blanco, inodoro, de sabor alcalino suave.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger del contacto con el aire y con la humedad.

### Óxido de plata

*CAS* – [20667-12-3]

*Fórmula y masa molecular* – Ag<sub>2</sub>O – 231,74

*Descripción* – Polvo gris oscuro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y en etanol, fácilmente soluble en ácido nítrico diluido y en hidróxido de amonio.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Óxido mercuríco

*CAS* – [21908-53-2]

*Sinonimia* – Óxido amarillo de mercurio, óxido de mercurio (II).

*Fórmula y masa molecular* – HgO – 216,59

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p).

*Descripción* – Polvo amarillo anaranjado, denso, inodoro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y en etanol.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Veneno!

### Paladio SRA – 1 mg/ml

*Especificación* – Contiene 1,67 g de cloruro de paladio en 200 ml de ácido clorhídrico a 50% (v/v). Calentar hasta disolución completa. Enfriar y completar con agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

### Palmitato de metilo

*CAS* – [112-39-0]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> – 270,50

*Descripción* – Masa cristalina blanca o amarilla.

*Características físicas* – Densidad (30 °C): aproximadamente 0,86. Temperatura de fusión: cerca de 30 °C.

*Solubilidad* – Soluble en etanol y en éter de petróleo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Papel de plata-manganeso

*Preparación* – A la mezcla de volúmenes iguales de nitrato de plata 0,1 M y de sulfato de manganeso (1,5% (p/v) adicionarle, gota a gota, hidróxido de sodio 0,1 M hasta que se forme precipitado persistente. Filtrar. A continuación, sumergir tiras de papel de filtro (por ejemplo, Whatman No. 1) en la solución, durante 15 minutos. Secar a temperatura ambiente, al abrigo de la luz y de vapores ácidos o alcalinos. El papel de plata-manganeso debe ser incoloro.

*Ensayo de sensibilidad* – En probeta de aproximadamente 40 ml de capacidad introducir 1 ml de cloruro de amonio a 1% (p/v). Añadir 9 ml de agua y 1 g de óxido de magnesio. Cerrar inmediatamente el recipiente con tapa de polietileno, bajo la cual se coloca el papel de plata-manganeso. Agitar la solución, teniendo cuidado para que las partículas de magnesio no entren en contacto con el papel. Mantener la probeta a 50 °C a 60 °C durante 1 hora. Aparece color gris en el papel reactivo.

### Parafina líquida

*Especificación* – Mezcla purificada de hidrocarburos saturados líquidos obtenidos del petróleo.

*Descripción* – Líquido oleoso incoloro y transparente.

*Características físicas* – Densidad relativa: 0,827 a 0,890. Viscosidad: 110 mPa a 230 mPa.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y poco soluble en etanol. Miscible en hidrocarburos.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### 1-Pentanosulfonato de sodio, monohidratado

*CAS* – [207605-40-1]

*Fórmula y masa molecular* – C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>NaO<sub>3</sub>S·H<sub>2</sub>O – 192,21

*Descripción* – Sólido cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Pentóxido de fósforo

*CAS* – [1314-56-3]

*Sinonimia* – Anhídrido fosfórico.

*Fórmula y masa molecular* – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 141,94

*Descripción* – Polvo blanco, amorfo, muy delicuescente.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: 340 °C

Temperatura de sublimación: 360 °C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Seguridad* – Irritante. Corrosivo a la piel, mucosa y ojos.

### Pentóxido de vanadio

*CAS* – [1314-62-1]

*Fórmula y masa molecular* – V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 181,88

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p).

*Descripción* – Polvo fino amarillo a amarillo anaranjado.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 690 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y soluble en ácidos minerales fuertes y soluciones hidróxido-alcálicas con formación de sales.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Pepsina purificada**

*Especificación* – Derivada de la mucosa estomacal del puerco, con actividad de 800 a 2500 unidades/mg de proteína.

*Descripción* – Polvo cristalino o amorfo, blanco o poco amarillo. Higroscopio.

*Solubilidad* – Soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol. La solución en agua puede quedar un poco opalescente con una pequeña cantidad de ácido.

*Conservación* – En recipiente cerrado.

*Almacenamiento* – Protegido de la luz y en temperatura de 2 °C a 8°C.

*Etiquetado* – Debe expresar la actividad de la pepsina.

### **Peptona**

*Especificación* – Mezcla de productos de naturaleza polipeptídica oriundos de proteínas animales (carne, caseína). El origen determina las características físicas, composición y proceso de producción.

*Descripción* – Polvo amarillo claro a marrón. Olor y sabor característicos. Tenor mínimo en nitrógeno: 12,0% (p/p) de caseína y 14,2% (p/p) de carne.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Etiquetado* – Debe expresar origen y tenor en nitrógeno.

### **Perclorato de sodio**

*CAS* – [7791-07-3]

*Nombre químico* – Sal sódica monohidratada del ácido perclórico

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 140,46

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros, delicuescentes.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Peryodato de potasio**

*CAS* – [7790-21-8]

*Sinonimia* – Metaperyodato de potasio *Fórmula y masa molecular* –  $\text{KIO}_4$  – 230,00

*Descripción* – Polvo blanco cristalino o cristales incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 582 °C.

*Seguridad* – Altamente irritante a la piel, ojos y mucosas.

### **Peryodato férrico de potasio SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de peryodato de potasio en 5 ml de solución de hidróxido de potasio 12% (p/v), recientemente preparada. Añadir 20 ml de agua y 1,5 ml de cloruro férrico SR. Diluir a 50 ml con solución de hidróxido de potasio 12% (p/v) recientemente preparada.

### **Peryodato de sodio**

*CAS* – [7790-28-5]

*Sinonimia* – Metaperyodato de sodio.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NaIO}_4$  – 213,89

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% de peryodato de sodio.

*Descripción* – Cristales blancos tetragonales.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 300 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en agua, ácido acético, ácido nítrico y ácido sulfúrico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – En locales ventilados.

*Seguridad* – Oxidante fuerte.

### **Permanganato de potasio**

*CAS* – [7722-64-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{KmnO}_4$  – 158,03

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales violeta oscuros, con brillo metálico, inodoros, de sabor dulce, astringente.

*Solubilidad* – Soluble en agua fría y fácilmente soluble en agua hirviendo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – La sustancia y sus soluciones presentan riesgo de explosión, cuando en contacto con materiales oxidables.

*Categoría* – Oxidante energético.

### **Permanganato de potasio SR (aproximadamente 0,2 M)**

*Especificación* – Contiene 3% (p/v) en agua. *Estabilidad* – Preparar para consumo inmediato.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Seguridad* – Irritante. Cáustico.

### **Peróxido de carbamida**

*CAS* – [124-43-6]

*Sinonimia* – Peróxido de hidrógeno y urea.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$  – 94,07

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco. Se descompone al contacto con el aire en urea, oxígeno y agua.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Información adicional* – *Agente oxidante.*

### Peróxido de hidrógeno concentrado

*CAS* – [7722-84-1]

*Sinonimia* – *perhidrol.*

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 34,01

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 29,0% (p/p) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Corresponde a aproximadamente 100 partes en volumen. Puede contener estabilizante.

*Descripción* – Líquido incoloro, irritante, de suave olor.

*Característica física* – *Densidad: 1,11.*

*Conservación* – En recipientes llenos parcialmente, provistos de cierre de alivio.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

*Seguridad* – Oxidante fuerte.

### Peróxido de hidrógeno, 30 volúmenes, SR

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 34,01.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 9,7% (p/v) y, como máximo, 10,7% (p/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , correspondiendo a aproximadamente 30 partes en volumen. Puede contener estabilizante.

*Descripción* – Diluir el peróxido de hidrógeno, concentrado.

*Conservación* – En recipientes cerrados. *Estabilidad* – Evitar períodos largos de almacenamiento.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

### Peróxido de hidrógeno a 3% (p/v)

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 34,01

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 2,5% (p/v) y, como máximo, 3,5% (p/v) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , correspondiendo a aproximadamente 10 partes en volumen. Puede contener estabilizante.

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro.

*Conservación* – En recipientes cerrados. Evitar períodos largos de almacenamiento.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

### Peróxido de hidrógeno metanólico

*Preparación* – En el día del uso, diluir 2 ml de peróxido de hidrógeno concentrado para 100 ml con metanol y almacenar en refrigerador. Inmediatamente antes del uso, diluir 2 ml de esta solución para 100 ml con metanol.

### Peróxido de sodio

*CAS* – [1313-60-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{O}_2$  – 77,98

*Descripción* – Polvo granulado blanco-amarillento.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, formando hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno, que se descompone a gas oxígeno y agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, protegidos de compuestos orgánicos y sustancias oxidables.

### Persulfato de amonio

*CAS* – [7727-54-0]

*Sinonimia* – Peroxisulfato de amonio. *Fórmula y masa molecular* –  $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  – 228,10

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales o polvo granulado blanco. Inodoro. Estable durante meses cuando puro y seco; se descompone en presencia de humedad.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad, del calor y de materia orgánica.

*Información adicional* – Agente fuertemente oxidante.

### Persulfato de potasio

*CAS* – [7727-21-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  – 270,32

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol. En solución acuosa se descompone a la temperatura ambiente, y aumenta velocidad de descomposición con el aumento de la temperatura.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – En local ventilado.

### Persulfato de sodio

*CAS* – [7775-27-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{O}_8\text{S}_2$  – 238,13

*Descripción* – Polvo cristalino blanco. Se descompone lentamente con humedad y por el calor.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y del calor.

*Seguridad* – Irritante.

### Picrato de sodio alcalino SR

*Preparación* – Mezclar 20 ml de ácido pícrico a 1% (p/v) con 10 ml de hidróxido de sodio a 5% (p/v) y diluir para 100 ml con agua.

*Estabilidad* – Utilizar dentro de, como máximo, dos días.



**Piperazina**

CAS – [110-85-0]

Fórmula y masa molecular –  $C_3H_{10}N_2$  – 86,14

Descripción – Grumos o copos blancos o casi blancos. Olor amoniacal.

Solubilidad – Soluble en agua y en etanol, insoluble en éter etílico.

**Piridina**

CAS – [110-86-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_5H_5N$  – 79,10

Descripción – Líquido incoloro, de olor característico y desagradable.

Características físicas – Banda de ebullición: 115 °C a 116 °C Densidad (25 °C): aproximadamente 0,980. Índice de refracción (20 °C): 1,5092.

Miscibilidad – Miscible en agua y en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la humedad.

Seguridad – Inflamable. Tóxico.

**Piridina anhidra**

Especificación – Contiene, como máximo, 0,01% (p/p) de agua.

Preparación – Secar la piridina con carbonato de sodio anhidro. Filtrar y destilar.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la humedad.

Seguridad – Inflamable. Tóxico.

**Pirofosfato de sodio**

CAS – [13472-36-1]

Fórmula y masa molecular –  $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$  – 265,90

Descripción – Cristales incoloros poco eflorescentes.

Característica física – Temperatura de fusión: 79,5 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Pirogalol**

CAS – [87-66-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_6O_3$  – 126,11

Descripción – Cristales blancos o casi blancos. Tornándose marrón en exposición al aire y a la luz.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 131 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua y en etanol. Soluciones acuosas se tornan marrones en exposición al aire.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Poliacrilamida**

CAS – [9003-05-8]

Sinonimia – Polímero de acrilamida.

Fórmula y masa molecular –  $(C_3H_5NO)_n$ ; monómero – 71,08.

Especificación – Polímero de varias formas, solubles e insolubles en agua, obtenidos por el calentamiento con varios catalizadores de polimerización.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Altamente tóxico e irritante. Causa parálisis del sistema nervioso central. Puede ser absorbido por la piel íntegra.

**Polisorbato 20**

Ver monografía Polisorbato 20.

**Polisorbato 80**

Especificación – Mezcla de oleatos del sorbitol y sus anhídridos copolimerizados con aproximadamente 20 M de óxido de etileno para cada mol de sorbitol anhidro y anhídrido.

Descripción – Líquido claro, amarillento o amarillo oscuro. Oleoso. Suave olor característico.

Características físicas – Densidad: en torno de 1,08. Viscosidad: aproximadamente 400 cP.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Categoría – Tensoactivo.

**Potasio SRA – 600 µg/ml**

Especificación – Contiene 1,144 g de cloruro de potasio en agua a 1000 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

**Prednisolona**

CAS – [50-24-8]

Fórmula y masa molecular –  $C_{21}H_{28}O_5$  – 360,45

Especificación – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Polvo cristalino blanco o casi blanco. Higroscópico. Presentado en la forma anhidra o conteniendo una o media molécula de agua de hidratación.

Característica física – Temperatura de fusión: 240-241 °C, con descomposición.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua, soluble en etanol y en metanol, ligeramente soluble en acetona y poco soluble en cloruro de metileno.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Categoría – Corticoide.

**Prednisona**

CAS – [53-03-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{26}O_5$  – 358,43.

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p),  $C_{21}H_{26}O_5$ , calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 233°C, con descomposición.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y poco soluble en etanol y en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Corticoide.

### **Negro brillante BN ordenar por alfabeto**

*CAS* – [2519-30-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$  – 867,69

*Descripción* – Cristales finos, polvo azul violáceo o negro grisáceo. Indicador de óxido-reducción. Forma oxidada: azul violácea. Forma reducida: amarillo-marrón.

*Característica física* – A (1%, 1 cm) es mayor que 0,390 en 570 nm.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Propilenglicol**

*CAS* – [57-55-6]

*Sinonimia* – 1,2-Propanodiol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_3H_8O_2$  – 76,09

*Descripción* – Líquido incoloro, viscoso, higroscópico.

*Características físicas* – Densidad (25 °C): 1,035 a 1,037.

Banda de ebullición: 187 °C a 189 °C.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### **Propilparabeno**

*CAS* – [94-13-3]

*Nombre químico* – Éster propílico del ácido 4-hidroxibenzoico

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{12}O_3$  – 180,20

*Descripción* – Cristales blancos.

*Solubilidad* – Muy poco solubles en agua, fácilmente soluble en etanol y en éter etílico.

*Categoría* – Conservante.

### **Púrpura de ftaleína**

*CAS* – [2411-89-4]

*Sinonimia* – *Metalftaleína*.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{32}H_{32}N_2O_{12}$  – 636,61

*Descripción* – Polvo amarillo claro a marrón. Puede ser encontrado en la forma de sal sódica: polvo amarillo claro a rosa.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y soluble en etanol. En la forma de sal sódica es soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Ensayo de sensibilidad* – Disolver 10 mg en 1 ml de solución concentrada de amoníaco y diluir para 100 ml con agua. A 5 ml de la solución, añadir 95 ml de agua, 4 ml de solución concentrada de amoníaco, 50 ml de etanol y 0,1 ml de cloruro de bario 0,1 M SV. La solución presenta coloración azul violeta. Añadir 0,15 ml de edetato disódico 0,1 M SV. La solución quedará incolora.

### **Quinalizarina (CI 58500)**

*CAS* – [81-61-8]

*Sinonimia* – Mordiente violeta 26

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_8O_6$  – 272,20.

*Descripción* – Polvo rojo oscuro.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Quinidina**

*CAS* – [56-54-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{24}N_2O_2$  – 324,42

*Descripción* – Cristales blancos, o casi blancos.

*Características físicas* – Poder rotatorio específico (20 °C): cerca de +260°, determinado y una solución a 1% (p/v) en etanol. Temperatura de fusión: cerca de 172 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, ligeramente soluble en etanol y poco soluble en metanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz

### **Quinidrona**

*CAS* – [106-34-3]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{10}O_4$  – 218,21

*Descripción* – Cristales lustrosos o polvo cristalino verde oscuro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 170 °C, puede sublimar y descomponerse parcialmente.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua fría, soluble en agua caliente, amoníaco y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### **Quinina**

*CAS* – [130-95-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{20}H_{24}N_2O_2$  – 324,42

*Descripción* – Polvo microcristalino blanco, o casi blanco.

*Características físicas* – Poder rotatorio específico (20 °C): cerca de -167°, determinado y una solución a 1% (p/v) en etanol. Temperatura de fusión: cerca de 175 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, poco soluble en agua hirviendo y muy soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Raponticina

*CAS* – [155-58-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{21}H_{24}O_9$  – 420,41

*Descripción* – Polvo cristalino gris amarillento.

*Solubilidad* – Soluble en etanol y en metanol.

### Reactivo de aluminón

*Solución A* – Disolver 250 g de acetato de amonio en 500 ml de agua bidestilada. Añadir 40 ml de ácido acético glacial, 0,5 g de aluminón disuelto en 50 ml de agua bidestilada, 1 g de ácido benzoico disuelto en 150 ml de alcohol isopropílico y 225 ml de alcohol isopropílico. Completar el volumen para 1000 ml con agua bidestilada. *Solución B* – Disolver 5 g de gelatina en 125 ml de agua bidestilada caliente y mezclar con 250 ml de agua bidestilada fría. Filtrar y completar a 500 ml con agua bidestilada.

*Preparación* – Mezclar con agitación las *Soluciones A* y *B*. La mezcla debe estar completamente límpida cuando esté fría. Almacenar en frasco de polietileno, protegida de la luz.

### Reactivo de coloración

*Preparación* – Mezclar 50 ml de ácido acético glacial y 50 ml de ácido sulfúrico. Dejar en reposo de 2 horas antes del uso. Estocar en heladera por, como máximo, 24 horas.

### Reactivo de Erlich modificado

*Preparación* – Disolver 0,1 g de p-Dimetilaminobenzaldehído en 1 ml de ácido clorhídrico y diluir con etanol para 100 ml.

### Reactivo de Folin-Denis

*Preparación* – A 75 ml de agua añadir 10 g de tungstato de sodio, 2 g de ácido fosfomolibdico y 5 ml de ácido fosfórico. Mantener la mezcla en reflujo por 2 horas, enfriar y diluir a 100 ml con agua. La solución presenta coloración verdosa.

### Reactivo de Hantzsch

*Preparación* – Disolver 150 g de acetato de amonio en 500 ml de agua destilada conteniendo 3 ml de ácido acético y 2 ml de acetilacetona. Completar el volumen para 1000 ml.

*Conservación* – En recipiente cerrado de vidrio ámbar.

### Reactivo de Jones

*Preparación* – A 40 ml de agua añadir 5,3 g de trióxido de cromo y 24 ml de mezcla de agua y ácido sulfúrico (1:1).

### Reactivo de Marquis

*Preparación* – Mezclar 4 ml de solución de formaldehído con 100 ml de ácido sulfúrico.

### Reactivo de xantidrol

*Preparación* – Disolver 0,125 g de xantidrol en 100 ml de ácido acético glacial. Añadir 1 ml de ácido clorhídrico antes de usar.

### Reactivo fosfomolibdotúngstico

*Preparación* – Disolver 100 g de tungstato de sodio y 25 g molibdato de sodio en 700 ml de agua. Añadir 100 ml de ácido clorhídrico y 50 ml de ácido fosfórico. Calentar la mezcla bajo reflujo en aparatos de vidrio, durante 10 horas. Añadir 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua y algunas gotas de bromo. Hervir para retirar el exceso de bromo (por cerca de 15 minutos), dejar enfriar y diluir para 1000 ml con agua. Filtrar. El reactivo presenta coloración amarilla. Si la solución presentase coloración verdosa, no debe ser utilizada, debiendo ser regenerada con la adición de algunas gotas de bromo al reactivo en ebullición. Posteriormente hervir el reactivo para eliminar el exceso de bromo.

*Almacenamiento* – Mantener en temperatura de 2 °C a 8 °C.

### Reactivo yodoplatinado

*Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de ácido cloroplátinico a 0,3% (p/v) y de yoduro de potasio a 6% (p/v).

### Reactivo sulfomolibdico

*Preparación* – Disolver, con calentamiento, 2,5 g de molibdato de amonio en 20 ml de agua. Diluir 28 ml de ácido sulfúrico en 50 ml de agua y enfriar. Mezclar las dos soluciones y diluir para 100 ml con agua.

### Reineckato de amonio

*CAS* – [13573-16-5]

*Sinonimia* – Tetratiocianatodiaminocromato de amonio.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_{10}CrN_7S_4H_2O$  – 354,45

*Descripción* – Cristales rojos oscuros o polvo rojo cristalino.

*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua helada, soluble en agua caliente y etanol. Se descompone lentamente y solución.

### Reineckato de amonio SR

*Preparación* – Agitar, constantemente, cerca de 0,5 g de reineckato de amonio en 20 ml de agua durante una hora y filtrar.

*Estabilidad* – Usar en, como máximo, dos días.

### Resazurina

*CAS* – [550-82-3]

*Sinonimia* – Diazorresorcinol

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_7NO_4$  – 229,18.

*Descripción* – Cristales, o polvo cristalino rojo oscuro.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Resorcinol**

CAS – [108-46-3]

Sinonimia – Resorcina.

Fórmula y masa molecular –  $C_6H_6O_2$  – 110,11

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Cristales, o polvo cristalino incoloro o amarillo pálido. Expuesto a la luz y al aire, adquiere coloración rosa.

Característica física – Banda de fusión: 109 °C a 111 °C.

Solubilidad – Soluble en agua y etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz y del aire.

**Ristocetina**

CAS – [1404-55-3]

Sinonimia – Ristocetina A.

Fórmula y masa molecular –  $C_{94}H_{108}N_8O_{44}$  – 2053,89

Descripción – Sólido blanco. Encontrado, también, como ristocetina sulfatada.

**Rodamina B**

CAS – [81-88-9]

Sinonimia – Tetraetilrodamina, Violeta básico 10. Fórmula y masa molecular –  $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$  – 479,01

Descripción – Cristales verdes, o polvo rojizo.

Solubilidad – Muy soluble en agua y en etanol.

Conservación – Recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la exposición a la luz y del calor.

Seguridad – Irritante

**Rutina**

CAS – [153-18-4]

Fórmula y masa molecular –  $C_{27}H_{30}O_{16}$  – 610,52

Descripción – Cristales en forma de agujas amarillos pálidos. Oscurece en la presencia de la luz.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 210 °C, con descomposición.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua y soluble en piridina.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la exposición a la luz.

**Sacarosa**

CAS – [57-50-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_{12}H_{22}O_{11}$  – 342,30Especificación – Es obtenida de la *Saccharum officinarum* Linné (Familia Gramineae), *Beta vulgares* Linné (Familia Chenopodiaceae) y otras fuentes.

Descripción – Cristales blancos o incoloros; polvo cristalino o masa cristalina o bloques blancos. Inodoro. Sabor dulce. Estable al aire. Finamente dividido es higroscópico y absorbe hasta 1 % de humedad. No contiene aditivos.

Característica física – Descomposición: entre 160 °C y 186 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua, poco soluble en etanol y prácticamente insoluble en etanol anhidro.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sacarosa 0,1% (p/v) en piridina**

Especificación – Contiene 0,1 g de sacarosa en piridina a 100 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Tóxico.

**Safranina O**

CAS – [477-73-6]

Descripción – Polvo rojo oscuro. Consiste de mezcla de cloruro de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazínio ( $C_{20}H_{19}ClN_4$  – 350,85) y cloruro de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5,0-tolilfenazínio ( $C_{21}H_{21}ClN_4$  – 364,88). Indicador de óxido-reducción. Forma oxidada: pH ácido, violeta azulado; pH alcalino, parda. Forma reducida: incoloro tanto en la acidez cuanto en la alcalinidad.

Característica física – Absorción máxima: 530-533 nm.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Salicilato de sodio**

CAS – [54-21-7]

Fórmula y masa molecular –  $C_7H_5NaO_3$  – 160,10

Descripción – Cristales incoloros pequeños o polvo cristalino blanco o copos brillantes.

Característica física – Temperatura de fusión: 440 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Santonina**

CAS – [481-06-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_{15}H_{18}O_3$  – 246,30

Descripción – Cristales incoloros. Si expuestos a la luz, pueden adquirir coloración amarilla.

Característica física – Banda de fusión: 174 °C a 176 °C.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol caliente y ligeramente soluble en etanol.

**Saponinas**

CAS – [8047-15-2]

Descripción – Polvo amarillo claro.



*Solubilidad* – Soluble en agua, y bajo agitación, forma espuma.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### Sílice, seca

*CAS* – [7631-86-9]

*Fórmula y masa molecular* – SiO<sub>2</sub> – 60,08

*Especificación* – Ácido silícico coloidal, polimerizado, previamente deshidratado; contiene cloruro de cobalto como indicador.

*Descripción* – Gránulos vítreos, amorfos, de granulometría variable, con gránulos impregnados con indicador de capacidad de adsorción por el color azul a rosa.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Categoría* – Desecante.

### Gel de sílice “G”

*CAS* – [112926-00-8]

*Sinonimia* – Gel de sílice “G”.

*Especificación* – Contiene aproximadamente 13,0% (p/p) de sulfato de calcio hemihidratado.

*Descripción* – Polvo fino blanco de granulometría variable entre 10 y 40 μm, homogéneo.

*Característica física* – El pH de la suspensión a 10% (p/v) en agua exenta de dióxido de carbono, obtenida por agitación durante 15 minutos; determinación potenciométrica: aproximadamente 7,0.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Soporte para cromatografía.

### Gel de sílice “GF<sub>254</sub>”

*Sinonimia* – Gel de sílice “GF<sub>254</sub>”.

*Especificación* – Contiene aproximadamente 13,0% (p/p) de sulfato de calcio hemihidratado y aproximadamente 1,5% (p/p) de indicador de fluorescencia de intensidad máxima a 254 nm.

*Descripción* – Polvo fino blanco de granulometría variable entre 10 y 40 μm, homogéneo.

*Característica física* – Ver gel de sílice “G”.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Soporte para cromatografía.

### Gel de sílice “H”

*Sinonimia* – Gel de sílice “H”.

*Descripción* – Polvo fino blanco, de granulometría variable entre 10 y 40 μm, homogéneo.

*Característica física* – Ver gel de sílice “G”.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Soporte para cromatografía.

### Gel de sílice “HF<sub>254</sub>”

*Sinonimia* – Gel de sílice “HF<sub>254</sub>”.

*Especificación* – Contiene aproximadamente 1,5% (p/v) de indicador de fluorescencia de intensidad máxima a 254 nm.

*Descripción* – Polvo fino blanco de granulometría variable entre 10 y 40 μm, homogéneo.

*Característica física* – Ver gel de sílice “G”.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Soporte para cromatografía.

### Sílice kieselguhr

*Descripción* – Polvo blanco o amarillo claro.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluciones ácidas diluidas y solventes orgánicos.

### Sílice kieselguhr “G”

*Especificación* – Sílice kieselguhr tratada con ácido clorhídrico y calcinada, en que adicionase cerca de 15% (p/p) de sulfato de calcio hemihidratado.

*Descripción* – Polvo fino blanco grisáceo. Con tamaño medio de partículas de 10 μm a 40 μm.

### Sodio SRA – 200 μml

*Especificación* – Contiene 0,5084 g de cloruro de sodio en agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

### Solución de cloruro de estaño y ninhidrina

*Preparación* – Disolver 0,2 g de ninhidrina en 4 ml de agua caliente. Añadir 5 ml de cloruro de estaño a 0,16% (p/v) y dejar en reposo por 30 minutos. Filtrar y estocar en refrigerador. En el momento del uso, diluir 2,5 ml con 5 ml de agua y 45 ml de alcohol isopropílico.

### Solución de Jeffrey

*Preparación* – Mezclar partes iguales de ácido nítrico a 10% (p/v) y ácido crómico a 10% (p/v).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Solución de Karl Fischer

*Sinonimia* – Reactivo yodo sulfurado.

*Especificación* – Constituido de dos soluciones. *Solución 1*: a mezcla de 70 ml de metanol y 35 ml de piridina, exenta de agua, añadir, bajo refrigeración y ausencia de humedad, dióxido de azufre seco hasta obtener aumento en peso de 9 g. Mezclar. *Solución 2*: Contiene 12,6 g de yodo en metanol a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Estabilidad* – Se descompone continuamente.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad y de la luz. Mantener bajo refrigeración.



*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

*Información adicional* – Para determinación del tenor de agua.

#### **Solución de limpieza de ácido crómico**

*Preparación* – A 100 ml de ácido sulfúrico añadir, gradualmente y bajo agitación constante, 3 g de dicromato de potasio. Agitando hasta solubilización del sal y dejar enfriar hasta 40 °C y almacenar en recipiente de vidrio.

#### **Solución estándar etanólica de calcio (100 ppm Ca)**

*Preparación* – Disolver 2,5 g de carbonato de calcio, previamente desecado, en 12 ml de ácido acético 5 M diluir con agua para 1000 ml. Diluir 1 volumen de esa solución en 10 volúmenes de etanol, inmediatamente, antes del uso.

#### **Solución estándar de acetaldehído (100 ppm C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)**

*Preparación* – Disolver 1 g de acetaldehído en alcohol isopropílico y completar para 100 ml. Para uso diluir 1:100, con el mismo solvente. *Información* – Preparación extemporánea.

#### **Solución estándar de amonio (1 ppm NH<sub>4</sub>)**

*Preparación* – Disolver 0,4444 g de nitrato de amonio en 1000 ml de agua destilada, corresponde a 100 mg/ml de amonio. Para uso diluir 1:100.

#### **Solución estándar de bario (10 ppm Ba)**

*Especificación* – Contiene 1,779 g de BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O en agua 1000 ml. Para uso, diluir 1:100.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados e inertes (tipo polietileno).

#### **Solución estándar de cadmio (0,1% Cd)**

*Preparación* – Disolver cantidad de nitrato de cadmio conteniendo 0,1 g de cadmio en cantidad mínima de mezcla de agua y ácido clorhídrico (1:1) y diluir para 100 ml con ácido clorhídrico a 1% (v/v).

#### **Solución estándar de cadmio (5 ppm Cd)**

*Especificación* – Contiene 0,229 g de sulfato de cadmio en agua a 100 ml, corresponde a 1000 µg/ml de cadmio. Para uso, diluir 1:200.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados e inertes (tipo polietileno).

#### **Solución estándar de calcio (10 ppm Ca)**

*Preparación* – Disolver 0,624 g de carbonato de calcio previamente desecado en agua destilada conteniendo 3 ml de ácido acético 5 M. Diluir para 250 ml con agua. Diluir 1 volumen de esta solución en 100 volúmenes de agua destilada inmediatamente antes del uso.

#### **Solución estándar de plomo (0,1% Pb)**

*Preparación* – Disolver 0,4 g de nitrato de plomo (II) en agua y diluir para 250 ml con el mismo solvente.

#### **Solución estándar de cobre (10 ppm Cu)**

*Preparación* – Disolver 392,9 mg de sulfato cúprico pentahidratado en 100 ml de agua. Diluir 1 ml de esta solución con agua para 100 ml en el momento del uso.

#### **Solución estándar de cloruro (8 ppm Cl)**

*Especificación* – Contiene 1,318 g de cloruro de sodio en agua a 1000ml Para uso diluir 1:100.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Solución estándar de cloruro (5 ppm Cl)**

*Especificación* – Contiene 0,824 g de cloruro de sodio en agua a 1000 ml. Para uso diluir 1:100.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Solución estándar de ditizona**

*Preparación* – Disolver 10 mg de ditizona en cloroformo y completar el volumen para 1000 ml con cloroformo.

*Conservación* – Acondicionar en recipiente exento de plomo, provisto de tapa de vidrio y, adecuadamente, embalado para proteger de la luz.

*Almacenamiento* – En refrigerador.

#### **Solución estándar de estaño (5 ppm Sn)**

*Especificación* – Contiene 1,225 g de acetato de estaño hemihidratado en 25 ml de ácido clorhídrico en agua a 1000 ml. Para uso, diluir 1:100 en ácido clorhídrico 2,5% (p/v).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Solución estándar de magnesio (10 ppm Mg)**

*Preparación* – Disolver 1,010 g de sulfato de magnesio heptahidratado en agua y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente. Diluir 10 ml de esta solución para 1000 ml con agua.

#### **Solución estándar de nitrato (100 ppm NO<sub>3</sub>)**

*Preparación* – Disolver 163,1 mg de nitrato de potasio en 100 ml de agua. Diluir 10 ml de esta solución con agua para 100 ml en el momento del uso.

#### **Solución estándar de nitrato (2 ppm NO<sub>3</sub>)**

*Preparación* – Disolver 1,2903 g de nitrato de amonio en 1000 ml de agua, corresponde a 1000 mg/ml de nitrato. Para uso, diluir 1:500.

#### **Solución estándar de plata (5 ppm Ag)**

*Preparación* – Disolver 79 mg de nitrato de plata en 100 ml de agua. Diluir 1 ml de esta solución con agua para 100 ml en el momento del uso.

#### **Solución estándar de selenio (100 ppm Se)**

*Preparación* – Disolver 0,1 g de selenio en ácido nítrico, evaporar hasta sequedad, disolver el residuo en 2 ml de agua y evaporar hasta sequedad. Repetir el procedimiento por tres veces. Disolver el residuo con ácido clorhídrico

2 M y completar el volumen para 1000 ml con el mismo solvente.

#### Solución estándar de sodio (200 ppm En la)

*Preparación* – Disolver 0,509 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua. En el momento del uso, diluir 1:10.

#### Solución estándar de sulfato (10 ppm SO<sub>4</sub>)

*Preparación* – Disolver 0,182 g de sulfato de potasio en 100 ml de agua. Diluir 1 ml de esta solución en 100 ml de agua en el momento del uso.

#### Solución estándar de zinc (100 ppm Zn)

*Preparación* – Disolver 0,440 g de sulfato de zinc en agua conteniendo 1 ml de ácido acético 5 M y diluir para 100 ml con agua. Inmediatamente antes del uso, diluir 1 volumen para 10 volúmenes con agua.

#### Solución estándar de zinc (10 ppm Zn)

*Preparación* – Diluir 1 volumen de la solución estándar de zinc (100 ppm Zn) para 10 volúmenes con agua inmediatamente antes del uso.

#### Solución estándar marrón

*Preparación* – Hacer una solución compuesta por 30 ml de Solución base de cloruro férrico (5.2.12), 30 ml de Solución base de cloruro cobaltoso (5.2.12), 24 ml de Solución base de sulfato cúprico (5.2.12) y 16 ml de ácido clorhídrico a 1% (p/v).

#### Solución reductora

*Preparación* – Disolver 5 g de tetrahidroborato de sodio en 500 ml de hidróxido de sodio a 1% (p/v).

#### Subnitrato de bismuto

CAS – [1304-85-4]

*Sinonimia* – Oxinitrato de bismuto.

*Fórmula y masa molecular* – Bi<sub>5</sub>O(OH)<sub>9</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> – 1461,99.

*Especificación* – Es sal básico que contiene, en el mínimo, el equivalente a 79,0% de trióxido de bismuto (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (p/p).

*Descripción* – Polvo blanco, denso, higroscópico, inodoro y sin gusto. Presenta reacción alcalina frente al papel de tornasol.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Categoría* – Antiácido.

#### Sustituto de plaquetas

*Preparación* – A una cantidad entre 0,5 g y 1 g de fosfolípidos, añadir 20 ml de acetona, y agite la mezcla, frecuentemente, durante 2 horas. Centrifugue durante 2 minutos y elimine el líquido sobrenadante. Seque el residuo con auxilio de una trompa de agua, adicione 20 ml de cloroformo y

agite durante 2 horas. Filtre a presión reducida y suspenda el residuo obtenido en 5 ml a 10 ml de solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v). *Determinación de la actividad del Factor IX* – Prepare una dilución en solución de cloruro de sodio a 0,9% (p/v), tal que la diferencia entre los tiempos de coagulación de las diluciones sucesivas de la preparación de referencia sea cerca de 10 segundos.

*Conservación* – Las suspensiones diluidas pueden ser usadas durante las 6 semanas que siguen a la preparación, si conservadas a -30 °C.

#### Sustrato de plasma

*Preparación* – Separar el plasma de la sangre humana, o bovina recolectada en 1/9 de su volumen de solución de citrato de sodio a 3,8% (p/v), o en 2/7 de su volumen de una solución conteniendo 2% (p/v) de citrato ácido de sodio y 2,5% (p/v) de glucosa. En el primer caso, el sustrato es preparado en el día de la recolección de la sangre; en el último caso, el sustrato de plasma puede ser preparado en los 2 días que siguen a la recolección.

*Conservación* – En tubos plásticos, en pequeñas cantidades, a una temperatura igual o inferior a -20 °C.

#### Sustrato de plasma I

*Preparación* – Utilizar equipo hidrófobo fabricado en material plástico apropiado o vidrio siliconado para recolección y manipulación de la sangre. De un número adecuado (cinco por lo menos) de corderos, vivos o en el momento del sacrificio, recolecte un volumen de sangre apropiado de cada uno (es considerado como apropiado un volumen de 285 ml de sangre recolectada sobre 15 ml de solución anticoagulante). La recolección está hecha por medio de una aguja adaptada a una cánula con un largo suficiente para alcanzar el fondo del recipiente colector. Descarte los primeros mililitros y recolecte, únicamente, la sangre que drena libremente. Mezcle la sangre con una cantidad suficiente de solución anticoagulante conteniendo 8,7 g de citrato de sodio y 4 mg de aprotinina en 100 ml de agua para obtener una proporción final de 19 volúmenes de sangre para 1 volumen de solución anticoagulante. Durante e inmediatamente después de la recolección dele al recipiente un movimiento rotatorio a fin de que la mezcla se haga sin formación de espuma. Luego que termine la recolección cierre el balón y deje enfriar a 10-15 °C. Después del enfriamiento reúna el contenido de todos los frascos, a excepción de aquellos que presenten señales de evidente hemólisis o coagulación, y mantenga la sangre recolectada a 10-15 °C. Lo más temprano posible y dentro de las 4 horas siguientes a la recolección, centrifugue la sangre recolectada a 1000-2000 g a 10-15 °C, durante 30 minutos. Separe el líquido sobrenadante y centrifúguelo a 5000 g, durante 30 minutos. Si necesario, haga una centrifugación más rápida, por ejemplo, a 20 000 g, durante 30 minutos, para clarificar el plasma (no utilice procesos de filtración). Separe los líquidos sobrenadantes e, inmediatamente, mezcle, cuidadosamente, y distribuya el sustrato de plasma por pequeños recipientes, que son cerrados al fin de la operación, en cantidades suficientes que permitan una titulación completa de la heparina (por ejemplo, 10 ml a 30 ml). Inmediatamente congele, rápidamente, a una temperatura

inferior a -70 °C (por ejemplo, sumergiendo los recipientes en nitrógeno líquido) y conserve a una temperatura inferior a -30 °C. El plasma preparado en esas condiciones puede ser utilizado como sustrato de plasma en la titulación de la heparina si en las condiciones de la titulación se obtiene un tiempo de coagulación apropiado al método de detección utilizado y si se obtienen curvas dosis-respuesta/ log reproducibles y con gran inclinación. En el momento del uso, descongele una cierta cantidad de sustrato de plasma en un baño maría a 37 °C, mezclando, lentamente, hasta licuefacción completa. Una vez licuado, el plasma es mantenido a 10-20 °C y utilizado inmediatamente. El sustrato de plasma descongelado puede ser, ligeramente, centrifugado, si necesario (no utilice procesos de filtración).

### Sustrato de plasma<sup>2</sup>

*Preparación* – Preparar a partir de la sangre humana que tenga un tenor en Factor IX inferior a 1 % del tenor normal. Recolecte la sangre en 1/9 de su volumen de una solución de citrato de sodio a 3,8% (p/v).

*Conservación* – En tubos plásticos, en pequeñas cantidades, a una temperatura igual o inferior a -30 °C.

### Sustrato de plasma deficiente en Factor V

*Especificación* – Utilizar, de preferencia, un plasma congeladamente deficiente o preparado del siguiente modo: separar el plasma de la sangre humana que haya sido recolectada en 1:10 de su volumen de una solución de oxalato de sodio a 1,34% (p/v). Incubar a 37 °C durante 24-36 horas. El plasma presenta un tiempo de coagulación de 70-100 segundos. Si el tiempo de coagulación es inferior a 70 segundos, incuba el plasma de nuevo durante 12-24 horas.

*Conservación:* en pequeñas cantidades, a temperatura igual o inferior a -20 °C.

### Sudán III

*CAS* – [85-86-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{22}H_{16}N_4O$  – 352,40

*Descripción* – Polvo rojo marrón.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Sudán III SR

*Preparación* – Disolver 0,5 g de Sudán III en 100 ml de etanol a 80% (v/v), calentado a 60 °C, enfriar y filtrar.

### Sudán IV

*CAS* – [85-83-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{24}H_{20}N_4O$  – 380,44

*Descripción* – Polvo marrón o marrón rojizo.

*Características físicas* – Banda de fusión: 181 °C a 188 °C. Se descompone completamente a 260 °C.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua. Poco soluble en acetona, etanol y benceno. Soluble en parafina y fenol

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Sudán IV SR

*Preparación* – Disolver 2 g de Sudán IV en 100 ml de etanol a 92% (v/v), calentado a 60 °C, enfriar, filtrar y añadir 5 ml de glicerina.

### Sulfamato de amonio

*CAS* – [7773-06-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $NH_4SO_3NH_2$  – 114,13

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, o cristales incoloros.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 131 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes perfectamente cerrados.

### Sulfanilamida

*CAS* – [63-74-1]

*Sinonimia* – 4-Aminobenzenosulfonamida.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_8N_2O_2S$  – 172,20

*Descripción* – Cristales o polvo fino blanco o blanco amarillentos.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 165 °C.

*Solubilidad* – Soluble en glicerol y prácticamente insoluble en cloroformo, éter etílico y benceno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Antibacteriano.

### Sulfato cérico

*CAS* – [13590-82-4]

*Sinonimia* – Disulfato cérico.

*Fórmula y masa molecular* –  $Ce(SO_4)_2$  – 332,24

*Descripción* – Cristal o polvo amarillo anaranjado.

*Característica física* – *Temperatura de fusión:* aproximadamente 350 °C.

*Conservación* – Proteger de la luz, calor y humedad.

*Seguridad* – Tóxico y oxidante.

### Sulfato cérico amoniacal

*CAS* – [10378-47-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $(NH_4)_4Ce(SO_4)_4 \cdot 2H_2O$  – 632,58

*Descripción* – Cristales amarillo anaranjados.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 130 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Categoría* – Estándar para volumetría de oxireducción.

**Sulfato cúprico, pentahidratado**

CAS – [7758-99-8]

Sinonimia – Sulfato de cobre pentahidratado.

Fórmula y masa molecular –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 249,68

Especificación – Contiene como mínimo, 98,5% (p/p) calculado sobre la sustancia desecada a 250 °C.

Descripción – Cristales, polvo o gránulos azules. En contacto con el aire efloresce lentamente.

Característica física – Calentado a 250 °C hasta peso constante, pierde entre 33,0 a 36,5% de su peso.

Solubilidad – Muy soluble en agua y poco soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger del aire.

Seguridad – Irritante.

**Sulfato cúprico SR**

Especificación – Contiene 12,5 g sulfato cúprico pentahidratado en agua a 100 ml.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato cúprico amoniacal SR**

Sinonimia – Sulfato de cobre amoniacal SR y reactivo de Schweitzer.

Preparación – Disolver 10 g de sulfato cúprico en 100 ml de agua, añadir cantidad suficiente de solución de hidróxido de sodio (1:5) para precipitar el hidróxido de cobre. Filtrar y recolectar el precipitado. Lavar con agua fría. Disolver el precipitado, que debe ser mantenido húmedo durante el proceso, en la menor cantidad de amoníaco SR necesaria para completar la solución.

**Sulfato de aluminio y potasio, dodecahidratado**

CAS – [7784-24-9]

Sinonimia – Alumen de potasio

Fórmula y masa molecular –  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 474,38

Descripción – Polvo granulado, o masa incoloro, transparente.

Solubilidad – Muy soluble en agua hirviendo, soluble en glicerina, prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados

**Sulfato de amonio**

CAS – [7783-20-2]

Fórmula y masa molecular –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 132,13

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Cristales incoloros, inodoros.

Característica física – Se descompone en temperaturas arriba de 280 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua, prácticamente insoluble en acetona y en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato de bario**

CAS – [7727-43-7]

Fórmula y masa molecular –  $\text{BaSO}_4$  – 233,39

Especificación – Contiene, como mínimo, 97,5% (p/p).

Descripción – Polvo blanco, fino y denso. Inodoro e insípido.

Solubilidad – Prácticamente insoluble en agua y solventes orgánicos, muy poco soluble en ácidos y en soluciones hidróxido-alcalinas.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Categoría – Contraste radiológico para el trato gastrointestinal.

**Sulfato de cadmio**

CAS – [7790-84-3]

Fórmula y masa molecular –  $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  – 769,49

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

Descripción – Polvo cristalino, incoloro e inodoro.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato de calcio, hemihidratado**

CAS – [10034-76-1]

Fórmula y masa molecular –  $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$  – 145,14

Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0 % (p/p), calculado sobre base seca.

Descripción – Polvo blanco, fino; contiene aproximadamente 7,0% de agua.

Solubilidad – Muy poco soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol. Cuando mezclado con mitad de su masa en agua, es rápidamente solidificado en una masa porosa y dura.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato de calcio SR**

Preparación – Agitar 5 g de sulfato de calcio hemihidratado con 100 ml de agua, durante una hora. Filtrar antes del uso.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato de N,N-dimetil-p-fenilendiamina**

CAS – [536-47-0]

Sinonimia – Sulfato de N,N-dimetil-1,4-benzenodiamina.

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$  – 234,28

Característica física – Banda de fusión: 200 °C a 205 °C, con descomposición.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

Seguridad – Tóxico.



**Sulfato de dimetilo**

CAS – [77-78-1]

Sinonimia – Dimetil sulfato, DMS.

Fórmula y masa molecular –  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$  – 126,13

Descripción – Líquido incoloro.

Características físicas – Temperatura de ebullición: cerca de 188 °C, con descomposición. Índice de refracción (20 °C): 1,3874.

Miscibilidad – Miscible en agua (con hidrólisis) y en éter etílico y acetona.

Conservación – En recipientes cerrados.

Seguridad – Corrosivo! Venenoso!

**Sulfato de hidracina**

CAS – [10034-93-2]

Fórmula y masa molecular –  $\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$  – 130,12

Descripción – Cristales incoloros.

Solubilidad – Ligeramente soluble en agua fría, soluble en agua caliente (50 °C) y fácilmente soluble en agua hirviendo. Prácticamente insoluble en etanol.

**Sulfato de litio**

CAS – [10102-25-7]

Fórmula y masa molecular –  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 127,95

Descripción – Cristales incoloros.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

**Sulfato de magnesio, heptahidratado**

CAS – [10034-99-8]

Fórmula y masa molecular –  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 246,48

Descripción – Polvo blanco cristalino o cristales incoloros brillantes, de sabor salino, soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo, prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Sulfato de manganeso**

CAS – [10101-68-5]

Fórmula y masa molecular –  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 223,14Especificación – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p) de  $\text{MnSO}_4$ , calculado sobre la sustancia desecada a 450 °C – 500 °C

Descripción – Cristales o polvo cristalino de color rosa. Inodoro. Efloresce lentamente.

Característica física – Pierde agua a aproximadamente 450 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo y prácticamente insoluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados. Información adicional – El producto comercial normalmente es mezcla de sulfato de manganeso tetra y pentahidratado.

**Sulfato de 4-metilaminofenol**

CAS – [55-55-0]

Fórmula y masa molecular –  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$  – 344,38

Descripción – Cristales incoloros.

Característica física – Temperatura de fusión: cerca de 260 °C, con descomposición.

Solubilidad – Muy soluble en agua y poco soluble en etanol.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Almacenamiento – Proteger de la luz.

**Sulfato de 4-metilaminofenol SR**

Preparación – Disolver 0,35 g de sulfato de 4-metilaminofenol en 50 ml de agua. Añadir 20 g de bisulfito de sodio y mezclar. Diluir para 100 ml con agua.

**Sulfato de potasio**

CAS – [7778-80-5]

Fórmula y masa molecular –  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 174,25

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, de sabor amargo.

Características físicas – Solución acuosa con carácter neutro. Temperatura de fusión: 1067 °C.

Conservación – En recipientes cerrados.

**Sulfato de protamina**

CAS – [9009-65-8]

Especificación – Consiste en mezcla de proteínas simples, obtenidas de esperma y testículos de especies adecuadas de peces. Posee la propiedad de neutralizar la heparina.

Descripción – Polvo cristalino fino, blanco o amorfo levemente colorido.

Conservación – En recipientes bien cerrados, bajo refrigeración.

Almacenamiento – Proteger del calor.

**Sulfato de sodio, anhidro**

CAS – [7757-82-6]

Masa y fórmula molecular –  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  – 142,0Especificación – Preparado a partir del  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  por calentamiento a aproximadamente 100 °C. Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Polvo fino, blanco, inodoro, de sabor salado levemente amargo. Higroscópico.

Característica física – Temperatura de fusión: aproximadamente 800 °C.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua.



*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Sulfato de sodio, decahidratado

*CAS* – [7727-73-3]

*Sinonimia* – Sal de Glauber.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  – 322,19

*Especificación* – Contiene como mínimo 99,0 % (p/p) de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros transparentes o polvo cristalino blanco, eflorescente, inodoro, de sabor salado levemente amargo.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 32,5 °C. Se disuelve en su propia agua de cristalización, a temperatura de aproximadamente 33 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

### Sulfato de tetrabutilamonio

*CAS* – [32503-27-8]

*Nombre químico* – Sulfato de N,N,N-tributilo-1-butanamínio, hidrogenosulfato de tetrabutilamonio

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{N} \cdot \text{HSO}_4$  – 339,53

*Descripción* – Polvo cristalino blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: 169 °C a 173 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en metanol.

### Sulfato de zinc, heptahidratado

*CAS* – [7446-20-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 287,58

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p) de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , o como mínimo, 55,6 % (p/p) de  $\text{ZnSO}_4$ .

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o cristales incoloros transparentes. Inodoro, de gusto astringente. Eflorescente.

*Característica física* – A temperatura de 280 °C, se torna anhidro.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes no metálicos bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Sulfato de zinc 0,1 M

*Descripción* – Contiene 28,75 g de sulfato de zinc heptahidratado en agua a 1000 ml.

*Conservación* – En recipientes no metálicos bien cerrados.

### Sulfato férrico

*CAS* – [10028-22-5]

*Sinonimia* – Persulfato férrico.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

*Especificación* – El producto comercial contiene normalmente cerca de 20% (p/p) de agua.

*Descripción* – Polvo blanco a amarillo, muy higroscópico; se descompone en presencia del aire.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.

### Sulfato férrico amoniacal

*CAS* – [7783-83-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 482,18

*Descripción* – Cristales transparentes incoloros a violeta pálido. Inodoro. Eflorescente.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 37 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Sulfato férrico amoniacal ácido SR

*Preparación* – Disolver 20 g de sulfato férrico amoniacal en 70 ml de agua, añadir 10 ml de ácido sulfúrico 0,05 M y completar el volumen con agua para 100 ml.

### Sulfato férrico amoniacal SR

*Especificación* – Contiene 10 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Sulfato férrico amoniacal SR1

*Preparación* – Disolver 30 g de sulfato férrico amoniacal en 40 ml de ácido nítrico y completar el volumen de 100 ml con agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Sulfato férrico amoniacal SR2

*Preparación* – Disolver 0,2 g de sulfato férrico amoniacal en 50 ml de agua, añadir 5 ml de ácido nítrico y diluir a 100 ml con agua.

### Sulfato férrico-ferricianuro de potasio SR

*Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de la solución de sulfato férrico a 0,5% (p/v) en ácido sulfúrico 0,5 M y de la solución de ferricianuro de potasio a 0,2% (p/v).

*Estabilidad* – Preparar en el momento de uso.

### Sulfato ferroso acidificado SR

*Preparación* – Disolver 0,45 g de sulfato ferroso heptahidratado en 50 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y completar el volumen para 100 ml con agua libre de dióxido de carbono.

**Sulfato ferroso amoniacal**

CAS – [7783-85-9]

Fórmula y masa molecular –  $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$  – 392,14*Descripción* – Polvo cristalino o cristales verde azulados pálidos. Se oxida lentamente al aire, tornándose eflorescente.*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 100 °C, con descomposición.*Solubilidad* – Soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol.*Conservación* – En recipientes bien cerrados.*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.**Sulfato ferroso, heptahidratado**

CAS – [7782-63-0]

*Sinonimia* – Sulfato de hierro, heptahidratado. *Fórmula y masa molecular* –  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 278,01*Especificación* – Contiene, como mínimo, 98,0% (p/p) de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ .*Descripción* – Cristales azules verdosos; o gránulos, o polvo cristalino verde. Inodoro. Eflorescente. Se oxida por la humedad y luminosidad a sulfato básico de hierro (III) de color marrón.*Característica física* – A partir de la temperatura de 65 °C, se transforma en monohidratado.*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo y prácticamente insoluble en etanol.*Conservación* – En recipientes bien cerrados.*Almacenamiento* – Proteger del aire y de la humedad. *Información adicional* – No usar cuando tenga color marrón.**Sulfato ferroso SR***Especificación* – Contiene 8 g de sulfato ferroso heptahidratado en agua fría, recientemente hervida, a 100 ml. Preparar en el momento de uso.*Conservación* – En recipientes bien cerrados.*Almacenamiento* – Proteger de la luz, del aire y del calor.**Sulfuro de amonio SR***Preparación* – Saturar 60 ml de amoníaco SR con sulfuro de hidrógeno y juntar 40 ml de amoníaco SR. Usar solución de preparado reciente.*Conservación* – En recipiente pequeño, bien lleno y cerrado.*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor. *Estabilidad* – Frente a precipitación abundante de azufre, descartar la solución.**Sulfuro de hidrógeno**

CAS – [7783-06-4]

*Sinonimia* – Ácido sulfhídrico*Fórmula y masa molecular* –  $H_2S$  – 34,08*Especificación* – Producido por el tratamiento de sulfuro ferroso (u otros sulfuros) con ácidos sulfúrico o clorhídrico diluidos.*Descripción* – Gas incoloro de olor característico y sabor dulce; más denso del que el aire.*Características físicas* – Densidad relativa al aire: 1,19. Temperatura de ignición: 260 °C.*Seguridad* – Tóxico. Veneno. Inflamable.**Sulfuro de hidrógeno SR***Especificación* – La solución acuosa saturada a 20 °C, contiene en torno de 0,4 a 0,5% (p/v). Preparada por el paso de  $H_2S$  en agua fría.*Característica física* – El pH de la solución acuosa recién preparada: 4,5.*Estabilidad* – Preparar para uso inmediato.*Seguridad* – Tóxico. Veneno. Inflamable.**Sulfuro de sodio**

CAS – [1313-84-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $Na_2S \cdot 9H_2O$  – 240,18*Descripción* – Cristales incoloros delicuescentes, que se ponen amarillos por la exposición al aire, o por la acción de la luz. Olor semejante al del sulfuro de hidrógeno.*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 50 °C.*Conservación* – Recipiente bien cerrado, en frío.*Almacenamiento* – Proteger del aire, de la luz y del calor.**Sulfuro de sodio SR***Especificación* – Contiene 1 g en agua a 10 ml. *Estabilidad* – Preparar para consumo inmediato.**Sulfuro de sodio SR1***Preparación* – Disolver, con calentamiento, 12 g de sulfuro de sodio en 45 ml de mezcla de agua y glicerol a 85% (v/v) (10:29). Enfriar y diluir para balón volumétrico de 100 ml con el mismo solvente. La solución debe ser incolora. Preparar para consumo inmediato.**Sulfito de sodio**

CAS – [7757-83-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $Na_2SO_3$  – 126,04*Descripción* – Polvo blanco, o casi blanco, inodoro.*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y muy poco soluble en etanol.*Conservación* – En recipientes bien cerrados.**Tanino**

CAS – [1401-55-4]

*Sinonimia* – Ácido tánico.

*Especificación* – Obtenido de cascaras de diversas plantas, consistiendo, especialmente, de mezcla de sustancias polifenólicas.

*Descripción* – Polvo amarillo a marrón. Olor levemente característico y sabor astringente.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y soluble en acetona.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Etiquetado* – La etiqueta debe indicar la fuente botánica.

### **Tartrato ácido de epinefrina**

*CAS* – [51-42-3]

*Sinonimia* – Bitartrato de epinefrina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{13}H_{19}NO_9$  – 333,29

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales, o polvo cristalino blanco, o gris claro. Inodoro.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 150 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del aire y de la luz. *Estabilidad* – Oscurece lentamente por la exposición al aire y a la luz.

*Categoría* – Adrenérgico.

### **Tartrato cúprico alcalino SR**

*Sinonimia* – Solución de Fehling

*Solución A* – Disolver 34,6 g de sulfato cúprico pentahidratado en 500 ml de agua.

*Solución B* – Disolver 173 g de tartrato de sodio y potasio y 50 g de hidróxido de sodio en 400 ml de agua y calentar hasta ebullición. Enfriar y completar el volumen para 500 ml con agua exenta de dióxido de carbono. *Preparación* – Mezclar volúmenes iguales de las *Soluciones A* y *B* inmediatamente antes del uso.

### **Tartrato de antimonio y potasio**

*CAS* – [28300-74-5]

*Sinonimia* – Sal de antimonio y potasio.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$  – 667,85.

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: 332 °C a 335 °C.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Tartrato de sodio**

*CAS* – [6106-24-7]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_4O_6Na_2 \cdot 2H_2O$  – 230,08

*Especificación* – Contiene 84,34% de  $C_4H_4O_6Na_2$  y 15,66% de  $H_2O$ . Calentado a 150 °C, pierde, como mínimo, 15,6% y, como máximo, 15,7% de su peso.

*Descripción* – Cristales blancos o casi blancos.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y prácticamente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Tartrato de sodio y potasio**

*CAS* – [6381-59-5]

*Sinonimia* – Sal de Rochelle o de Seignette, tartrato doble de potasio y sodio, tártaro emético.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$  – 282,22; anhidro – 210,16

*Especificación* – Contienen, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado en base seca de  $C_4H_4KNaO_6$ .

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor salado. Eflorescente al aire caliente.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

### **Tartrato de sodio y potasio SR**

*Especificación* – Contiene 20% (p/v).

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Tartrato ferroso SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de sulfato ferroso heptahidratado, 2 g de tartrato de sodio y potasio y 0,1 g de bisulfito de sodio en agua. Completar el volumen para 100 ml con agua. Preparar en el momento del uso.

### **Tetraborato sódico**

*CAS* – [1303-96-4]

*Sinonimia* – Borato sódico, borato de sodio, bórax. *Fórmula y masa molecular* –  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  – 381,37

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco, inodoro, de sabor cáustico. Eflorescente.

*Solubilidad* – Soluble en agua, muy soluble en agua hirviendo y fácilmente soluble en glicerol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados; eflorrece al aire seco.

*Almacenamiento* – Proteger del aire.

### **Tetracloruro de carbono**

*CAS* – [56-23-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $CCl_4$  – 153,82

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Descripción* – Líquido incoloro, límpido, denso y de olor característico.

*Características físicas* – Banda de ebullición: 76 °C a 77 °C. Densidad: 1,588 a 1,590. Índice de refracción (20 °C): 1,4607.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua y miscible en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del calor.

*Seguridad* – Veneno (en las formas líquida y gaseosa)!

*Información adicional* – No es inflamable, sin embargo libera fosgeno (tóxico) en presencia de llama.

### **Tetradecano**

*CAS* – [629-59-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{14}H_{30}$  – 198,39

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5% (p/p).

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,76. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,429. Temperatura de fusión: cerca de -5 °C. Temperatura de ebullición: cerca de 252 °C.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

### **Tetrafenilborato de sodio**

*CAS* – [143-66-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaB(C_6H_5)_4$  – 342,22

*Descripción* – Polvo o cristales blancos o casi blancos.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en acetona.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Tetrahidroborato de sodio**

*CAS* – [16940-66-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $NaBH_4$  – 37,83

*Descripción* – Cristales incoloros y higroscópicos.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua, soluble en etanol absoluto.

*Almacenamiento* – En recipientes bien cerrados.

### **3,3'-Tetrahidrocloruro de diaminobenzidina**

*CAS* – [7411-49-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{18}Cl_4N_4$  – 360,12

*Descripción* – Cristales blancos o amarillentos, ocasionalmente púrpura.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 280 °C, con descomposición.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, bajo refrigeración.

*Seguridad* – Irritante.

3,3'-Tetrahidrocloruro de diaminobenzidina SR

*Especificación* – Contiene 1 g de 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina en 200 ml de agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, bajo refrigeración.

*Seguridad* – Irritante.

### **Tetrahidrofurano**

*CAS* – [109-99-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_8O$  – 72,11

*Especificación* – Al producto le son añadidos estabilizantes (p-cresol, hidroquinona) en la proporción 0,05 % a 0,1 % (p/v), para evitar la formación excesiva de peróxidos.

*Descripción* – Líquido incoloro. Olor intenso y semejante al del éter etílico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 65 °C a 66 °C. Densidad: aproximadamente 0,889. Índice de refracción (20 °C): 1,4070.

*Miscibilidad* – Miscible en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados: pequeños y repletos.

*Almacenamiento* – Proteger del contacto con la luz.

*Seguridad* – Irritante a la piel, ojos y mucosas.

### **1,1,3,3-Tetrametilbutilamina**

*CAS* – [107-45-9]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_{19}N$  – 129,24

*Descripción* – Líquido incoloro y límpido.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 0,805. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,424. Temperatura de ebullición: cerca de 140 °C.

### **Tetrametiletilendiamina**

*CAS* – [110-18-9]

*Sinonimia* – N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina, TEMED.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{16}N_2$  – 116,21

*Especificación* – Calidad apropiada para electroforesis.

*Descripción* – Líquido incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): aproximadamente 1,418. Temperatura de ebullición: aproximadamente 121 °C.

*Miscibilidad* – Miscible con agua, con etanol y con éter etílico.

### **Tetraoxalato de potasio**

*CAS* – [6100-20-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_4H_3K_2O_8 \cdot 2H_2O$  – 254,20

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o cristales incoloros o blancos.



*Solubilidad* – Ligeramente soluble en agua y soluble en agua hirviendo, poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Tetróxido de osmio

*CAS* – [20816-12-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $OsO_4$  – 254,20

*Descripción* – Masa cristalina amarilla, o agujas amarillas claras, higroscópicas, sensibles a la luz.

*Solubilidad* – Soluble en agua, etanol y éter etílico.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Vapores venenosos.

### Tetróxido de osmio SR

*Especificación* – Contiene 0,25 g de tetróxido de osmio en ácido sulfúrico 0,05 M para hacer 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Timerosal

*CAS* – [54-64-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_9HgNaO_2S$  – 404,81

*Descripción* – Polvo cristalino amarillo claro.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

### Timidina

*CAS* – [50-89-5]

*Sinonimia* – 1-(2-Desoxi-β-D-ribofuranosil)-5-metiluracila.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{14}N_2O_5$  – 242,23

*Descripción* – Cristales en forma de agujas, o polvo blanco.

*Solubilidad* – Soluble en agua, en etanol a caliente y en ácido acético glacial.

### Timina

*CAS* – [65-71-4]

*Sinonimia* – 5-Metil-2,4-(1H,3H)-pirimidinodiona.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_5H_6N_2O_2$  – 126,11

*Descripción* – Placas o cristales en forma de agujas pequeñas.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua fría, soluble en agua caliente. Disuelve en soluciones diluidas de hidróxido- alcalinos.

### Timol

*CAS* – [89-83-8]

*Sinonimia* – 5-Metil-2-(1-metiletil)fenol *Fórmula y masa molecular* –  $C_{10}H_{14}O$  – 150,22

*Descripción* – Cristales incoloros, de olor aromático.

*Característica física* – Temperatura de fusión: en torno de 50 °C.

*Solubilidad* – Muy poco soluble en agua, muy soluble en etanol, fácilmente soluble en aceites esenciales y en aceites grasos, ligeramente soluble en glicerol. Disuelve en soluciones hidróxido-alcalinas.

### Tioacetamida

*CAS* – [62-55-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_5NS$  -75,13.

*Descripción* – Cristales o polvo cristalino blanco, o casi blanco. Suave olor de mercaptana.

*Característica física* – Temperatura de fusión: 113 °C a 114 °C.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Tioacetamida SR

*Preparación* – Mezclar 0,2 ml de la solución de tioacetamida a 4% (p/v) y 1 ml de la siguiente mezcla: 1,5 ml de hidróxido de sodio M, 0,5 ml de agua y 2 ml de glicerol a 85% (p/v). Calentar en baño maría durante 20 segundos *Estabilidad* – Preparar en el momento de uso.

### Tiocianato de amonio

*CAS* – [1762-95-4]

*Sinonimia* – Sulfocianuro de amonio.

*Fórmula y masa molecular* –  $NH_4SCN$  – 76,12

*Descripción* – Cristales incoloros y delicuescentes.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 149 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

### Tiocianato de amonio SR

*Especificación* – Contiene 8 g en agua a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### Tiocianato de mercurio

*CAS* – [592-85-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $Hg(SCN)_2$  – 316,76

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o casi blanco.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, poco soluble en etanol, soluble en soluciones de cloruro de sodio.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

A



**Tiocianato de mercurio SR**

*Preparación* – Disolver 0,3 g de tiocianato de mercurio en etanol. Completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Limitada en una semana.

**Tiocianato de potasio**

*CAS* – [333-20-0]

*Sinonimia* – Sulfocianuro de potasio. *Fórmula y masa molecular* – KSCN -97,18

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p).

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 173 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Puede causar erupciones cutáneas!

**Tioglicolato de sodio**

*CAS* – [367-51-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_3NaO_2S$  – 114,09

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 95,0% (p/p).

*Descripción* – Polvo cristalino blanco, higroscópico, de olor suave característico. Se oxida en contacto con el aire.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua y en metanol, poco soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz y del aire.

**Tionina (CI 52000)**

*CAS* – [135-59-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{12}H_{10}ClN_3S$  – 263,75

*Descripción* – Agujas verdes oscuras, con brillo.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en agua caliente.

**Tionina SR**

*Preparación* – Añadir 1 g de tionina a 2,5 g de fenol y completar el volumen de 100 ml con agua.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

**Tiosulfato de sodio**

*CAS* – [10102-17-7]

*Sinonimia* – Hiposulfito de sodio R.

*Fórmula y masa molecular* –  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  – 248,17

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,0% (p/p), calculado sobre la sustancia desecada.

*Descripción* – Cristales incoloros, o polvo cristalino blanco, fácilmente eflorescentes, de sabor levemente amargo.

*Características físicas* – Temperatura de fusión:

aproximadamente 48 °C. Se disuelve en su propia agua de cristalización a temperatura aproximadamente 49 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Tiosulfato de sodio 0,1 M**

*Preparación* – Disolver 2,5 g de tiosulfato de sodio y 0,02 g de carbonato de sodio en agua exenta de dióxido de carbono a 100 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Tiourea**

*CAS* – [62-56-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $CH_4N_2S$  – 76,12

*Descripción* – Cristales, o polvo cristalino blanco, o casi blanco.

*Característica física* – Banda de fusión: de 176 °C a 178 °C.

*Solubilidad* – Soluble en agua y en etanol.

*Conservación* – En recipientes cerrados.

**Torina**

*CAS* – [3688-92-4]

*Sinonimia* – Naftarson. *Fórmula y masa molecular* – 576,30

*Descripción* – Polvo rojo.

*Solubilidad* – Soluble en agua.

**Tirosina**

*CAS* – [60-18-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_9H_{11}NO_3$  – 181,19

*Descripción* – Cristales incoloros, o blancos, o casi blancos, o polvo cristalino blanco, o casi blanco.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, prácticamente insoluble en acetona y en etanol, soluble en ácido clorhídrico diluido y soluciones hidróxido-alcálicas.

**p-Tolualdehído**

*CAS* – [104-87-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_8H_8O$  – 120,15

*Descripción* – Líquido límpido, incoloro o amarillento.

*Característica física* – Índice de refracción (20 °C): entre 1,544 y 1,546.

**Tolueno**

*CAS* – [108-88-3]

*Sinonimia* – Metilbenceno, toluol.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_8$  – 92,14

*Descripción* – Líquido incoloro de olor característico.

*Características físicas* – Temperatura de ebullición: 110 °C

a 111 °C. Densidad de aproximadamente 0,87. Índice de refracción (20 °C): 1,4967.

*Miscibilidad* – Muy poco soluble en agua, miscible en etanol.

*Seguridad* – Tóxico! Inflamable!

### **p-Toluidina**

*CAS* – [106-49-0]

*Sinonimia* – 4-Metilanilina.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_7H_9N$  – 107,15

*Descripción* – Cristales o copos blancos o levemente amarillentos.

*Características físicas* – Temperatura de fusión: cerca de 44 °C. Densidad (20 °C): 1,046.

*Solubilidad* – Fácilmente soluble en etanol, metanol, acetona y en ácidos diluidos, y poco soluble en agua.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

### **Torina SR**

*Preparación* – Disolver 0,2 g de torina en agua para 100 ml.

*Conservación* – En recipiente cerrado.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Estabilidad* – Utilizar en como máximo una semana después de la preparación.

### **Tricina**

*CAS* – [5704-04-1]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{13}NO_5$  – 179,17

*Especificación* – Calidad apropiada para electroforesis.

*Característica física* – Temperatura de fusión: cerca de 183 °C.

### **1,1,1-Tricloroetano**

*CAS* – [71-55-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2H_3Cl_3$  – 133,40

*Descripción* – Líquido no inflamable.

*Características físicas* – Densidad (20 °C): cerca de 1,34. Temperatura de ebullición: cerca de 74 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en acetona y en metanol.

### **Tricloroetileno**

*CAS* – [79-01-6]

*Sinonimia* – Tricloroetano.

*Fórmula y masa molecular* –  $C_2HCl_3$  – 131,39

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 99,5 % (p/p).

*Descripción* – Líquido incoloro, olor característico.

*Características físicas* – Densidad (20°C): cerca de 1,46. Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,477. Temperatura de ebullición: aproximadamente 87 °C.

*Miscibilidad* – Prácticamente insoluble en agua, soluble en acetona y en metanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Tóxico.

### **Trietanolamina**

*CAS* – [102-71-6]

*Sinonimia* – 2,2',2''-nitrilotrietanol

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{15}NO_3$  – 149,19

*Descripción* – Líquido incoloro, viscoso, muy higroscópico,

se torna marrón por la exposición al aire.

*Característica física* – Densidad: aproximadamente 1,13.

*Miscibilidad* – Miscible con agua, acetona, etanol y metanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados al abrigo de la luz.

### **Trietilamina**

*CAS* – [121-44-8]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_6H_{15}N$  – 101,20

*Descripción* – Líquido incoloro, de olor fuertemente amoniacal.

*Características físicas* – Densidad: cerca de 0,726. Banda de ebullición: 89 °C a 90 °C.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Seguridad* – Irritante. Inflamable.

### **Trifenilmetano**

*CAS* – [76-84-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $C_{19}H_{16}O$  – 260,33

*Descripción* – Cristales incoloros, o polvo blanco, o casi blanco.

*Solubilidad* – Prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en etanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados

### **Trifluoreto de boro**

*CAS* – [7637-07-2]

*Fórmula y masa molecular* –  $BF_3$  – 67,81

*Descripción* – Gas incoloro, de olor penetrante y sofocante.

### **Trifluoreto de boro, solución metanólica**

*Especificación* – Solución comercial conteniendo cerca de 14% (p/v) de  $BF_3$  en metanol.

**Trinitrofenol SR**

Usar ácido pícrico SR1.

**Trióxido de arsénico**

CAS – [1327-53-3]

Sinonimia – Óxido arsenioso.

Fórmula y masa molecular –  $As_2O_3$  – 197,84

Descripción – Polvo cristalino blanco o transparente, o masa amorfa.

Solubilidad – Poco soluble en agua y soluble en agua hirviendo.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

Seguridad – Veneno!

**Trióxido de cromo**

CAS – [1333-82-0]

Sinonimia – Anhídrido crómico.

Fórmula y masa molecular –  $CrO_3$  – 99,99

Descripción – Cristales o polvo granulado o escamas marrones rojizas, delicuescentes.

Característica física – Temperatura de fusión: aproximadamente 197 °C.

Solubilidad – Muy soluble en agua.

Conservación – En recipientes de vidrio herméticos.

Almacenamiento – Evitar proximidad con inflamables.

Seguridad – Oxidante enérgico. Irritante.

**Trombina bovina**

CAS – [9002-04-4]

Especificación – Preparado biológico obtenido de plasma bovino, conteniendo enzima que convierte fibrinógeno en fibrina.

Descripción – Polvo blanco-amarillento.

Conservación – En recipientes cerrados.

Almacenamiento – En temperaturas abajo de 0 °C.

**Trombina humana**

CAS – [9002-04-4]

Especificación – Preparado biológico obtenido de plasma humano, por técnicas de fraccionamiento apropiadas.

Descripción – Polvo amorfo de color crema.

Conservación – En recipientes bien cerrados, bajo refrigeración, especificando fecha de preparación y potencia.

Almacenamiento – Proteger de la luz, de la humedad y del oxígeno.

Categoría – Enzima. Hemostático local.

**Tromboplastina**

CAS – [9035-58-9]

Sinonimia – Factor III (coagulación sanguínea).

Especificación – Preparado biológico de origen animal, obtenido por extracción de determinados órganos: cerebro, pulmón.

Descripción – Polvo o suspensión de color amarillenta, de olor característico.

Característica física – En la presencia de concentraciones apropiadas de iones calcio, presenta actividad tromboquinasa en la coagulación sanguínea.

Conservación – En recipientes herméticos.

Etiquetado – Especificar en la composición: iones y agentes antimicrobianos, sus concentraciones, así como origen, fecha de preparación, actividad.

Almacenamiento – Proteger del calor y humedad. Mantener bajo refrigeración.

Categoría – Preparación con actividad enzimática. Hemostático local.

**Tromboplastina, reactivo**

Preparación – Agitar 1,5 g de polvo de cerebro de buey, seco con acetona, con 60 ml de agua a 50 °C, durante 10 a 15 minutos. Centrifugar a 1500 rpm, durante 2 minutos y decantar el líquido sobrenadante.

Conservación – El extracto, almacenado en temperaturas menores que 0 °C, conserva la actividad durante varios días. Puede ser adicionado cresol, en la cantidad de 3 g/L, como antimicrobiano.

**Trometamina**

CAS – [77-86-1]

Fórmula y masa molecular –  $C_4H_{11}NO_3$  – 121,14

Sinonimia – Trometamol, tris(hidroxitometil)aminometano.

Especificación – Contiene, como mínimo, 99,0%, calculado sobre la sustancia desecada.

Descripción – Cristales o polvo cristalino blanco o casi blanco.

Características físicas – Banda de fusión: 168 °C a 172 °C. El pH de la solución 0,1 M: 10,4.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, ligeramente soluble en etanol y muy poco soluble en acetato de etilo.

Conservación – En recipientes bien cerrados.

**Tungstato de sodio**

CAS – [10213-10-2]

Fórmula y masa molecular –  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  – 329,87

Descripción – Cristales incoloros o polvo cristalino blanco o casi blanco.

Solubilidad – Fácilmente soluble en agua, formando una solución límpida, y prácticamente insoluble en etanol.

**Urea**

CAS – [57-13-6]

**Sinonimia – Carbamida.**

*Fórmula y masa molecular* –  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  – 60,06

*Descripción* – Cristales o polvo blanco, olor fuerte.

*Característica física* – Temperatura de fusión: aproximadamente 132,7 °C.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, soluble en etanol y prácticamente insoluble en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, en locales ventilados.

*Seguridad* – Puede causar daño si aspirado o inhalado.

**Vanadato de amonio**

*CAS* – [7803-55-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  – 116,98

*Descripción* – Polvo cristalino blanco o amarillo claro.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua.

**Vanilina**

*CAS* – [121-33-5]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$  – 152,15

*Descripción* – Cristales en forma de agujas, o polvo cristalino blanco, o amarillento.

*Característica física* – Banda de fusión: entre 81 °C y 84 °C.

*Solubilidad* – Poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y metanol.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Vanilina SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de vanilina en etanol y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente. Añadir, cuidadosamente, 2 ml de ácido sulfúrico y homogeneizar. Utilizar la solución en 48 horas.

**Vanilina sulfúrica SR**

*Preparación* – Disolver 1 g de vanilina en 100 ml de metanol. Añadir 4 ml de ácido clorhídrico y 5 ml de ácido sulfúrico.

**Warfarina sódica**

*CAS* – [129-06-6]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NaO}_4$  – 330,31

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 97,0% (p/p), calculado con relación a la sustancia desecada.

*Descripción* – Polvo cristalino o amorfo, de sabor levemente amargo.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua y en etanol, soluble en acetona, muy soluble en cloruro de metileno.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Categoría* – Anticoagulante.

**Verde de bromocresol SR**

*Solución A* – Disolver 0,2 g de verde de bromocresol en 30 ml de agua y 6,5 ml de hidróxido de sodio 0,1 M. *Solución B* – Disolver 38 g de fosfato de sodio monobásico y 2 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en agua y completar el volumen para 1000 ml con el mismo solvente. *Preparación* – Diluir la *Solución A* para 500 ml utilizando la *Solución B* como diluyente y homogeneizar. Si necesario, ajustar el pH en  $4,6 \pm 0,1$  con ácido clorhídrico 0,1 M.

**Rojo de fenol SR**

*Solución A* – Disolver 33 mg de rojo de fenol en 1,5 ml de hidróxido de sodio 2 M y diluir para 100 ml con agua.

*Solución B* – Disolver 25 mg de sulfato de amonio en 235 ml de agua. Añadir 105 ml de hidróxido de sodio 2 M y 135 ml de ácido acético 2 M.

*Preparación* – Añadir 25 ml de la *Solución A* en la *Solución B*.

Si necesario, ajustar el pH en 4,7.

*Conservación* – En recipientes pequeños y resistentes a álcalis.

**Vitexina**

*CAS* – [3681-93-4]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$  – 448,41

*Descripción* – Polvo amarillo.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición a la luz.

**Xantidrol**

*CAS* – [90-46-0]

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$  – 198,22

*Especificación* – Contiene, como mínimo, 90% de  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$ .

*Descripción* – Polvo blanco o amarillo claro.

*Solubilidad* – Muy soluble en agua, soluble en etanol y m ácido acético glacial.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Xileno**

*CAS* – [1330-20-7]

*Sinonimia* – Xilol.

*Fórmula y masa molecular* –  $\text{C}_8\text{H}_{10}$  – 106,17

*Especificación* – Mezcla de isómeros: *o*-, *p*- y *m*-xileno, con el predominio de *m*-xileno.

*Descripción* – Líquido límpido e incoloro.

*Características físicas* – Densidad (20°C): cerca de 0,867.

Índice de refracción (20 °C): cerca de 1,497. Temperatura de ebullición: cerca de 138°C.

*Conservación* – En recipientes herméticos.

*Seguridad* – Tóxico. Inflamable.

A

**Zinc, activado**

*Preparación* – Cubrir una cantidad de zinc granulado con solución de ácido cloroplátnico a 50 µg/ml. Dejar en reposo durante 10 minutos. Después de lavar, escurrir y secar inmediatamente.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Zinc, granulado**

*CAS* – [7440-66-6]

Elemento y masa atómica – Zn – 65,38

*Descripción* – Metal lustroso blanco azulado. Estable al aire seco. Se convierte en carbonato básico cuando expuesto a la humedad.

*Características físicas* – Se torna maleable entre 100° C y 150 °C. Quema en presencia del aire presentando llama verde azulada.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la humedad.

*Seguridad* – Tóxico!

**Zinc SRA – 5 mg/ml**

*Especificación* – Contiene 2,5 g de zinc granulado en 20 ml de ácido clorhídrico 5 M. Completar con agua a 500 ml.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

## 14.3 SOLUCIONES VOLUMÉTRICAS

Las soluciones volumétricas (SV) están acompañadas de método de estandarización, a pesar de que puedan existir otros que conduzcan al mismo grado de exactitud.

Los valores obtenidos en la estandarización son válidos para todos los usos farmacopeicos.

Los reactivos empleados deben poseer grado químicamente puro y, cuando necesario, ser sometidos a la desecación. Las soluciones volumétricas son estandarizadas y usadas a temperaturas alrededor de 25 °C. Frente a variaciones significativas de temperatura, la solución volumétrica debe tener título confirmado en la misma temperatura o ser medida mediante factor de corrección.

**Ácido clorhídrico M SV**

*Especificación* – Contiene 85 ml de ácido clorhídrico en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 1,5 g de carbonato de sodio anhidro. Juntar 100 ml de agua y dos gotas de rojo de metilo SI. Añadir el ácido lentamente, a partir de bureta, hasta coloración rosa suave. Calentar la solución hasta ebullición; enfriar y continuar la titulación. Repetir esta secuencia de operaciones hasta que el calentamiento no afecte la coloración rosa. Calcular la molaridad. Cada 52,99 mg de carbonato de sodio anhidro equivale a 1 ml de ácido clorhídrico M.

*Conservación* – Recipientes herméticos.

*Almacenamiento* – Proteger del calor.

**Ácido oxálico 0,05 M SV**

*Especificación* – Contiene 6,45 g de ácido oxálico en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Transferir 15 ml de la muestra para matraz de 250 ml. Añadir 100 ml de agua y 7 ml de ácido sulfúrico. Calentar a cerca de 70 °C y titular con permanganato de potasio 0,02 M SV recientemente estandarizado, añadido lentamente, con agitación constante, hasta apareamiento de color rosa pálido que persista por 15 segundos. La temperatura al final de la titulación no debe ser inferior a 60 °C.

*Conservación* – Recipientes de vidrio bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Ácido perclórico 0,1 M SV**

*Especificación* – Contiene 10 g de ácido perclórico en ácido acético a 1000 ml.

*Estandarización* – Disolver, bajo agitación, 8,5 ml de ácido perclórico en 200 a 300 ml de ácido acético glacial. Añadir 20 ml de anhídrido acético, diluir la mezcla a 1000,0 ml con ácido acético glacial y dejar en reposo por 24 horas. Determinar el tenor de agua, que debe situarse entre 0,02% y 0,05%. Pesar exactamente cerca de 700 mg de biftalato de potasio previamente pulverizado y desecado a 120 °C por 2 horas y disolverlo en 50 ml de ácido acético glacial en frasco de matraz de 250 ml de capacidad. Añadir 2 gotas de cloruro de metilrosanilina y titular con la solución de ácido perclórico hasta que coloración violeta cambie para verde esmeralda. Cada 20,422 mg de biftalato de potasio equivale a 1 ml de ácido perclórico 0,1 M.

**Ácido sulfúrico M SV**

*Especificación* – Contiene 98,07 g de ácido sulfúrico en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Añadir lentamente, bajo agitación, 60 ml de ácido sulfúrico sobre 1020 ml de agua. Enfriar a temperatura ambiente. Determinar la molaridad por titulación con carbonato de sodio, conforme descrito para ácido clorhídrico M, sin embargo pesando exactamente cerca de 3 g de carbonato de sodio anhidro. Cada 105,98 mg de carbonato de sodio anhidro equivale a 1 ml de ácido sulfúrico M.

**Bromato de potasio 0,1 M SV**

*Especificación* – Contiene 16,704 g de bromato de potasio en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Medir exactamente volumen en torno de 40 ml de la solución de bromato de potasio a 1,67% (p/v). Juntar 3 g de yoduro de potasio y 3 ml de ácido clorhídrico SR. Aguardar 5 minutos y titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 M SV, usando 3 ml de almidón SI como indicador. Preparar un blanco. Corregir y calcular la molaridad. Cada ml de bromato de potasio corresponde a 6 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.



**Bromo 0,05 M SV**

*Preparación* – Disolver 3 g de bromato de potasio y 15 g de bromato de potasio en agua y completar para 1000 ml con el mismo solvente.

*Estandarización* – Transferir 25 ml de la solución para matraz de 500 ml con tapa y añadir 120 ml de agua. Añadir 5 ml de ácido clorhídrico, tapar y agitar suavemente. Añadir 5 ml de yoduro de potasio SR, tapar nuevamente, agitar y dejar en reposo por 5 minutos al abrigo de la luz. Titular el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 M SV, añadiendo 3 ml de almidón SI próximo al punto final. Calcular a molaridad. Cada ml bromo 0,05 M SV equivale a 1 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV.

*Conservación* – Recipientes de vidrio ámbar bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Cloruro de bario 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver 24,4 g de cloruro de bario en agua y diluir para 1000 ml con el mismo solvente. *Estandarización* – En 10 ml de la solución de cloruro de bario, añadir 60 ml de agua, 3 ml de solución concentrada de amoníaco y 1 mg de púrpura de ftaleína. Titular con edetato disódico 0,1 M SV. Cuando la solución se destiña, añadir 50 ml de etanol y continuar la titulación hasta que la coloración azul violeta desaparezca.

**Cloruro de bencetonio 0,004 M SV**

*Preparación* – Después de desecar a 100 – 105°C hasta masa constante, disolver 1,792 g de cloruro de bencetonio en agua y completar a 1000 ml con el mismo solvente. *Estandarización* – Disolver 0,350 g de cloruro de bencetonio, después de seco a 100-105°C hasta masa constante, en 30 ml de ácido acético anhidro y añadir 6 ml de solución de acetato de mercurio SR. Titular con ácido perclórico 0,1 M SV en presencia de 0,05 ml cloruro de metilrosanilina SI. Realizar ensayo en blanco. Cada ml de ácido perclórico 0,1 M SV corresponde a 44,81 mg de  $C_{27}H_{42}ClNO_2$ .

**Diclorofenol indofenol, solución estándar**

*Preparación* – Disolver 50 mg de 2,6-dicloroindofenol sódico en 50 ml de agua con 42 mg de bicarbonato de sodio. Agitar vigorosamente. Después de disolución, completar con agua a 200 ml. Filtrar.

*Estandarización* – Pesar exactamente 50 mg de ácido ascórbico y diluir con ácido metafosfórico-acético SR a 50 ml. Para balón de 50 ml, transferir inmediatamente 2 ml de la solución de ácido ascórbico y añadir 5 ml de ácido metafosfórico-acético SR. Titular rápidamente con la solución de diclorofenol-indofenol hasta persistir color rosa por lo menos, por 5 segundos. Hacer determinación en blanco, titulando 7 ml de ácido metafosfórico-acético SR, añadida de cantidad de agua igual a la de la solución de diclorofenol-indofenol usada en la titulación del ácido ascórbico. Expresar la concentración de la solución estándar en términos de su equivalente en mg de ácido ascórbico.

*Conservación* – Recipientes de vidrio ámbar, bien cerrados. *Estabilidad* – Usar como máximo en 3 días y estandarizar inmediatamente antes del uso.

**Edetato disódico 0,05 M SV**

*Sinonimia* – EDTA disódico 0,05 M, etilendiaminotetraacetato disódico 0,05 M.

*Especificación* – Contiene 18,6 g de edetato disódico dihidratado en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 200 mg de carbonato de calcio. Transferir para vaso de precipitados de 400 ml y añadir 10 ml de agua. Agitar y cubrir el vaso con vidrio de reloj. Juntar 2 ml de ácido clorhídrico diluido y agitar hasta disolución del carbonato de calcio. Lavar las paredes del vaso de precipitados y el vidrio de reloj con agua hasta cerca de 100 ml. Continuar agitando, magnéticamente. Añadir 30 ml de la solución de edetato disódico a partir de bureta de 50,0 ml. Juntar 15 ml de hidróxido de sodio SR y 300 mg del indicador azul de hidroxinaftol. Continuar la titulación de la solución de edetato disódico hasta color azul. Calcular la molaridad.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

**Edetato disódico 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver 37,5 g en 500 ml de agua, añadir 100 ml de hidróxido de sodio M y completar para 1000 ml con agua.

*Estandarización* – Disolver 0,12 g de zinc en polvo (con grado de pureza de 99,9%) en 10 ml de ácido clorhídrico M. Juntar 0,1 ml de agua de bromo SR. Eliminar el exceso de bromo hirviendo la solución. Añadir solución de hidróxido de sodio a 8,5% (p/v) hasta reacción levemente ácida o neutra, y proceder conforme descrito en *Titulaciones complejométricas (5.3.3.4)* para Zinc. Cada ml de edetato disódico 0,1 M SV equivale a 6,536 mg de zinc.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

**Hidróxido de potasio etanólico 0,5 M SV**

*Nombre alternativo* – Hidróxido de potasio alcohólico 0,5 M SV

*Preparación* – Disolver 3 g de hidróxido de potasio en 5 ml de agua y añadir etanol para 100 ml. Dejar la solución en reposo durante aproximadamente 24 horas. Decantar el líquido límpido, y transferir para recipientes de material inerte y protegidos de la luz. *Estandarización* – Titular 20 ml de la solución con ácido clorhídrico 0,5 M SV usando 0,5 ml de fenolftaleína SI como indicador. Cada ml de ácido clorhídrico 0,5 M SV equivale a 28,060 mg de hidróxido de potasio.

**Hidróxido de potasio M SV**

*Preparación* – Disolver 60 g de hidróxido de potasio en agua a 1000 ml. Añadir solución saturada de hidróxido de bario, recientemente preparada, hasta que no se forme más precipitado. Agitar y dejar en reposo durante aproximadamente 12 horas. Decantar el líquido límpido, o filtrar, y transferir para recipientes de material inerte (tipo polietileno).

*Estandarización* – Usar el mismo procedimiento adoptado para el hidróxido de sodio M SV.

A

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

*Seguridad* – Cáustico.

#### **Hidróxido de sodio M SV**

*Preparación* – Preparar solución de hidróxido de sodio a 50% (p/v) con agua exenta de dióxido de carbono. Enfriar a temperatura ambiente y dejar sedimentar. Retirar 82 ml del sobrenadante y diluir con agua a 1000 ml. *Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 5 g de biftalato de potasio desecado y disolver en 75 ml de agua exenta

de dióxido de carbono. Juntar dos gotas de fenolftaleína SI y titular con la solución de hidróxido de sodio hasta formación permanente de color rosa. Cada ml de hidróxido de sodio M SV equivale a 204,220 mg de biftalato de potasio.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno). Tapones provistos de tubo conteniendo la mezcla hidróxido de sodio y óxido de calcio.

*Almacenamiento* – Proteger del dióxido de carbono.

*Seguridad* – Cáustico.

*Información adicional* – Verificar el título con frecuencia.

#### **Hidróxido de sodio etanólico 0,1 M SV**

*Preparación* – Preparar solución de hidróxido de sodio a 50% (p/v) en agua exenta de dióxido de carbono. Enfriar a temperatura ambiente y dejar sedimentar. Transferir 2 ml del sobrenadante para balón volumétrico de 250 ml y completar el volumen con etanol.

*Estandarización* – Pesar, exactamente, cerca de 0,2 g de ácido benzoico y disolver en mezcla de 10 ml de etanol y 2 ml de agua. Añadir dos gotas de fenolftaleína SI y titular con la solución de hidróxido de sodio etanólico hasta coloración rosa permanente. Cada ml de hidróxido de sodio 0,1 M SV equivale a 122,120 mg de ácido benzoico.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados, inertes (tipo polietileno).

*Almacenamiento* – Proteger de la exposición al dióxido de carbono.

*Seguridad* – Cáustico.

#### **Hidróxido de tetrabutylamonio 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver 40 g de yoduro de tetrabutylamonio en 900 ml de metanol anhidro, en frasco de matraz provisto de tapón esmerilado. Colocar en baño de hielo, añadir 20 g de óxido de plata pulverizado, taponar el frasco y agitar vigorosamente por 60 minutos. Retirar algunos ml y centrifugar. Verificar presencia de yoduro en el líquido sobrenadante. Si la prueba es positiva, añadir 2 g más de óxido de plata y dejar en reposo por 30 minutos, agitando ocasionalmente. Filtrar a través de embudo de placa porosa, lavar el matraz y el embudo con tres porciones de 50 ml de tolueno y juntar el tolueno de lavado al filtrado. Completar el volumen a 1000 ml con la mezcla de tres volúmenes de tolueno anhidro y un volumen de metanol anhidro. Pasar sobre la solución, por 10 minutos, corriente de nitrógeno exento de dióxido de carbono. Guardar en recipiente protegido del

dióxido de carbono y de la humedad. Consumir en 60 días. Determinar la molaridad en el día de uso, disolviendo cerca de 400 mg de ácido benzoico exactamente pesados, en 80 ml de dimetilformamida. Añadir a esta solución tres gotas de solución de azul de timol a 1% (p/v) en dimetilformamida y titular con solución de hidróxido de tetrabutylamonio hasta coloración azul. Proteger la solución del contacto con el aire durante la titulación. Utilizar bureta provista de tubo de absorción de dióxido de carbono. Efectuar ensayo en blanco. Cada ml de hidróxido de tetrabutylamonio equivale a 12,212 mg de ácido benzoico.

#### **Carmín de Índigo SV**

*Preparación* – Triturar 4 g de carmín de índigo con sucesivas porciones de agua hasta disolución, sin pasar 900 ml. Transferir para balón volumétrico de 1000 ml, añadir 2 ml de ácido sulfúrico y completar el volumen con agua.

*Estandarización* – A 10 ml de solución estándar de nitrato (100 ppm NO<sub>3</sub>) añadir 10 ml de agua, 0,05 ml de carmín de índigo SV y, cuidadosamente, 30 ml de ácido sulfúrico. Titular inmediatamente con carmín de índigo SV hasta cambiar para una coloración azul estable. El volumen total, en ml, de carmín de índigo SV requerido es equivalente a 1 mg de NO<sub>3</sub>.

#### **Yodato de potasio 0,02 M SV**

*Especificación* – Contiene 4,28 g de yodato de potasio en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Diluir 50 ml de la solución para 100 ml con agua. A 25 ml de esta solución, añadir 2 g de yoduro de potasio y 10 ml de ácido sulfúrico M. Titular con tiosulfato de sodio 0,1 M SV utilizando almidón SI, adicionado próximo al punto final, como indicador. Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV equivale a 3,566 mg de KIO<sub>3</sub>.

#### **Yodato de potasio 0,1 M SV**

*Preparación* – Pesar exactamente, 21,4 g de yodato de potasio previamente desecado a 110 °C, hasta peso constante, y disolver en agua y completar el volumen para 1000 ml con el mismo solvente. No es necesaria la estandarización, pues este reactivo es estándar primario.

#### **Yodo 0,05 M SV**

*Preparación* – Disolver 13 g de yodo en 100 ml de solución de yoduro de potasio a 20% (p/v). Añadir tres gotas de ácido clorhídrico y diluir para 1000 ml con agua. *Estandarización* – Disolver, exactamente, cerca de 0,15 g de trióxido de arsénico en 20 ml de hidróxido de sodio M. Calentar si necesario. Añadir 40 ml de agua y dos gotas de anaranjado de metilo y ácido clorhídrico hasta color rosa. Añadir 50 ml de carbonato de sodio a 4% (p/v), 3 ml de almidón SI y titular con yodo 0,05 M SV hasta color azul permanente. Cada ml de yodo 0,05 M SV equivale a 4,946 mg de trióxido de arsénico.

*Conservación* – En recipiente de vidrio bien cerrado y al abrigo de la luz.

**Yodo 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver cerca de 13 g de yodo en 100 ml de yoduro de potasio a 3,6% (p/v). Juntar tres gotas de ácido clorhídrico y completar con agua a 1000 ml. *Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 150 mg de trióxido de arsénico. Disolver en 20 ml de hidróxido de sodio *M*, calentando si necesario. Añadir 40 ml de agua, dos gotas de anaranjado de metilo *S1* y ácido clorhídrico diluido hasta color rosa. Juntar 50 ml de carbonato de sodio a 4% (p/v) y 3 ml de almidón *SI*. Titular con la solución de yodo, a partir de bureta, hasta color azul permanente.

Calcular la molaridad. Cada 4,946 mg de trióxido de arsénico equivale a 1 ml de yodo 0,1 *M*.

*Conservación* – Recipientes de vidrio bien cerrados.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Metóxido de litio 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver, cuidadosamente, en balón volumétrico de 1000 ml, 0,694 g de litio en 150 ml de metanol anhidro y completar el volumen con tolueno. *Estandarización* – Estandarizar siempre antes del uso. A 10 ml de dimetilformamida añadir 0,05 ml de azul de timol a 0,3% (p/v) en metanol y titular con metóxido de litio 0,1 *M SV* hasta coloración azul. Inmediatamente, añadir 0,2 g de ácido benzoico, agitar y titular con metóxido de litio 0,1 *M SV* hasta coloración azul. Evitar la absorción de dióxido de carbono atmosférico. El volumen de titulante gastado en la segunda titulación representa la cantidad de metóxido de litio requerido. Cada ml de metóxido de litio 0,1 *M SV* equivale a 12,212 mg de  $C_7H_6O_2$ .

**Metóxido de sodio 0,1 M SV**

*Especificación* – Contiene 5,402 g en solución tolueno metanol a 1000 ml.

*Preparación* – Enfriar en baño de hielo 150 ml de metanol, contenido en balón volumétrico de 1000 ml. Añadir, en pequeñas porciones, cerca de 2,5 g de sodio metálico recién fragmentado. Después de la disolución del metal, añadir tolueno hasta completar 1000 ml y mezclar. Mantener esta solución en recipiente al abrigo del dióxido de carbono. *Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 400 mg de ácido benzoico, disolver en 80 ml de dimetilformamida, añadir tres gotas de solución de azul de timol a 1% (p/v) en dimetilformamida y titular por la solución de metóxido de sodio hasta el apareamiento de coloración azul. Cada 12,212 mg de ácido benzoico equivale a 1 ml de metóxido de sodio 0,1 *M*.

**Nitrato cérico amoniacal 0,01 M SV**

*Preparación* – A 100 ml de nitrato cérico amoniacal 0,1 *M SV* añadir, cuidadosamente, con enfriamiento, 30 ml de ácido sulfúrico y diluir para 1000 ml con agua.

**Nitrato cérico amoniacal 0,1 M SV**

*Preparación* – Agitar solución conteniendo 56 ml de ácido sulfúrico y 54,82 g de nitrato cérico amoniacal por 2 minutos y, cuidadosamente, añadir cinco porciones sucesivas de 100 ml de agua, agitando después de cada adición. Diluir

la solución límpida para 1000 ml con agua. Estandarizar 10 días después del preparado.

*Estandarización* – Añadir a 25 ml de la solución 2 g de yoduro de potasio y 150 ml de agua. Titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,1 *M SV*, utilizando almidón *SI* como indicador. Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 *M SV* equivale a 54,822 mg de  $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ .

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

**Nitrato de bario 0,01 M SV**

*Especificación* – Contiene 2,614 g de nitrato de bario en 1000 ml de agua.

*Estandarización* – Añadir 10 ml de solución de ácido sulfúrico 0,01 *M* en un frasco y diluir con agua. Añadir dos gotas de torina a 0,2% (p/v) y dos gotas de cloruro de metiltioninio 0,02% (p/v) y titular lentamente con solución de nitrato de bario hasta cambio de color de amarillo para rosa.

**Nitrato de plomo 0,1 M SV**

*Preparación* – Transferir, exactamente, cerca de 8,28 g de nitrato de plomo para balón volumétrico de 250 ml, diluir en agua y completar el volumen con el mismo solvente. Homogeneizar.

*Estandarización* – Transferir, exactamente, 5 ml de nitrato de plomo 0,1 *M*, para matraz de 125 ml, añadir 50 ml de agua y, bajo agitación magnética, añadir 5 gotas de anaranjado de xileno a 0,1% (p/v) en agua y 5 g de metenamina, hasta coloración violeta. Titular con edetato disódico 0,05 *M SV* hasta coloración amarilla. Cada ml de edetato disódico 0,05 *M SV* equivale a 16,560 mg de  $Pb(NO_3)_2$ .

**Nitrato de mercurio (II) 0,1 M SV**

*Sinonimia* – Nitrato mercúrico 0,1 *M SV*.

*Preparación* – Disolver cerca de 35 g de nitrato de mercurio (II) en 5 ml de ácido nítrico y 500 ml de agua. Completar con agua a 1000 ml.

*Estandarización* – A 20 ml de esta solución, añadir 2 ml de ácido nítrico *SR* y 2 ml de sulfato férrico amoniacal *SR*. Enfriar a temperatura inferior a 20 °C y titular con tiocianato de amonio 0,1 *M* hasta apareamiento permanente de la coloración marrón. Calcular la molaridad.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

**Nitrato de plata 0,1 M SV**

*Preparación* – Disolver cerca de 17,5 g de nitrato de plata en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 100 mg de cloruro de sodio, desecado; transferir para vaso de precipitados de 150 ml y disolver en 5 ml de agua. Juntar 5 ml de ácido acético *SR*, 50 ml de metanol y tres gotas de eosina *Y SI*. Agitar, de preferencia con agitador magnético, y titular con la solución de nitrato de plata. Calcular la molaridad. Cada ml de nitrato de plata 0,1 *M SV* corresponde a 5,844 mg de cloruro de sodio.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

A



*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

### Nitrato de torio 0,005 M SV

*Especificación* – Contiene 2,401 g de nitrato de torio anhídrido en 1000 ml de agua.

*Estandarización* – Transferir, exactamente, cerca de 0,05 g de fluoruro de sodio, previamente desecado, para balón volumétrico de 250 ml y completar con agua. En 20 ml de esa solución, añadir 0,6 ml de alizarina SI y entonces, titular con hidróxido de sodio 0,1 M SV hasta el cambio de color de rosa para amarillo. Añadir 5 ml de tampón acetato pH 3,0 y titular con solución de nitrato de torio 0,005 M hasta el cambio de color de amarillo para rosa amarillento. Cada 0,8398 mg de fluoruro de sodio es equivalente a 1 ml de nitrato de torio 0,005 M SV.

### Nitrito de sodio 0,1 M SV

*Especificación* – Contiene 6,9 g de nitrito de sodio en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Disolver 7,5 g de nitrito de sodio en agua y completar el volumen a 1000 ml. Pesar exactamente cerca de 500 mg de sulfanilamida previamente desecada por 3 horas a 105 °C. Transferir para vaso de precipitados. Añadir 20 ml de ácido clorhídrico y 50 ml de agua. Agitar hasta disolución y enfriar a 15 °C. Manteniendo la temperatura en torno de 15 °C, titular lentamente con solución de nitrito de sodio usando como indicador externo almidón yodado SI, hasta cambio: Cada 17,220 mg de sulfanilamida equivalen a 1 ml de nitrito de sodio 0,1 M.

### Permanganato de potasio 0,02 M SV

*Especificación* – Contiene 3,161 g de permanganato de potasio en agua a 1000 ml.

*Preparación* – Disolver cerca de 3,2 g de permanganato de potasio en 1000 ml de agua, calentar a ebullición por 15 minutos. Dejar en reposo en frasco ámbar con tapa de vidrio, al abrigo de la luz, por dos días, y filtrar a través de embudo de vidrio sinterizado.

*Estandarización* – Disolver, exactamente, cerca de 0,2 g de oxalato de sodio, previamente desecado a 110 °C hasta peso constante, en 250 ml de agua. Añadir 7 ml de ácido sulfúrico, calentar a cerca de 70 °C, y titular lentamente con la solución de permanganato de potasio, con agitación constante, hasta coloración rosa pálida, que persista por 15 segundos. La temperatura al final de la titulación no debe ser inferior a 60 °C. Cada ml de permanganato de potasio 0,02 M SV equivale a 6,700 mg de oxalato de sodio.

*Conservación* – Recipientes de vidrio ámbar bien cerrados, con tapa de vidrio.

*Almacenamiento* – Proteger de la luz.

*Información adicional* – Verificar el título con frecuencia.

### Sulfato cérico 0,05 M SV

*Especificación* – Contiene 33,22 g de sulfato cérico en 1000 ml de agua.

*Estandarización* – Pesar, exactamente, cerca de 0,2 g de oxalato de sodio, desecado previamente, y disolver en 75

ml de agua. Añadir, con agitación, 2 ml de ácido sulfúrico previamente mezclado con 5 ml de agua, homogeneizar. Añadir 10 ml de ácido clorhídrico, y calentar hasta cerca de 75 °C. Titular con sulfato cérico 0,05 M hasta color amarillo claro permanente. Cada 6,700 mg de oxalato de sodio es equivalente a 1 ml de sulfato cérico 0,05 M SV.

### Sulfato cérico amoniacal 0,1 M SV

*Preparación* – Disolver 65 g de sulfato cérico amoniacal en mezcla de 30 ml de ácido sulfúrico y 500 ml de agua. Enfriar y completar el volumen con agua para 1000 ml. *Estandarización* – Disolver 80 mg de trióxido de arsénico en 15 ml de hidróxido de sodio 0,2 M, calentando si necesario. Añadir 50 ml de ácido sulfúrico M, 0,15 ml de tetróxido de osmio a 0,25% (p/v) y 0,1 ml de ferroína SI. Titular con sulfato cérico amoniacal 0,1 M hasta cambio de coloración. Cada ml de sulfato cérico amoniacal 0,1 M es equivalente a 4,496 mg de trióxido de arsénico.

### Sulfato de zinc 0,1 M SV

*Especificación* – Contiene 16,144 g de sulfato de zinc heptahidratado en agua a 1000 ml. *Preparación* – Disolver 28,8 g de sulfato de zinc en agua y completar el volumen a 1000 ml. Pipetear 20 ml de la solución de edetato disódico 0,05 M para un matraz de 250 ml y añadir, en este orden, 20 ml de solución tampón ácido acético-acetato de amonio, 100 ml de etanol y 2 ml de ditizona SR. Titular por la solución de sulfato de zinc hasta la coloración rosa clara. Calcular la molaridad.

### Tetrafenilborato de sodio 0,02 M SV

*Preparación* – Disolver 6,845 g de tetrafenilborato de sodio en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Pipetear dos porciones de 75 ml en dos vasos de precipitados. A cada uno de ellos, añadir 1 ml de ácido acético SR, 25 ml de agua y, lentamente, bajo agitación, 25 ml de biftalato de potasio a 5% (p/v). Dejar en reposo por dos horas. Filtrar una de las mezclas en crisol filtrante, de vidrio sinterizado (porosidad 100-160 micrómetros) y lavar el precipitado con agua fría. Transferir el precipitado con 50 ml de agua y agitar intermitentemente por 30 minutos. Filtrar y usar el filtrado como solución saturada de tetrafenilborato de potasio en el siguiente procedimiento de estandarización. Filtrar la segunda mezcla en crisol filtrante, de vidrio sinterizado, tarado, y lavar con tres porciones de 5 ml de la solución saturada de tetrafenilborato de potasio. Secar el precipitado a 105 °C durante una hora. Cada g de tetrafenilborato de potasio equivale a 955,1 mg de tetrafenilborato de sodio. A partir del peso del tetrafenilborato de sodio obtenido, calcular la molaridad de la solución.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados. *Estabilidad* – Usar soluciones recientes.

### Tiocianato de amonio 0,1 M SV

*Preparación* – Disolver cerca de 8 g de tiocianato de amonio en agua a 1000 ml.

*Estandarización* – Mezclar exactamente 30 ml de nitrato de plata 0,1 M con 50 ml de agua, 2 ml de ácido nítrico SR

y 2 ml de sulfato férrico amoniacal SR. Titular con la solución de tiocianato de amonio hasta apareamiento del color castaño rojiza. Cada ml de nitrato de plata 0,1 M equivalente a 7,612 mg de tiocianato de amonio.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados.

#### Tiosulfato de sodio 0,1 M SV

*Preparación* – Disolver cerca de 25 g de tiosulfato de sodio pentahidratado y 200 mg de carbonato de sodio en agua, recientemente hervida y enfriada, a 1000 ml. *Estandarización* – Pesar exactamente cerca de 210 mg de dicromato de potasio, pulverizado y desecado, y disolver en 100 ml de agua. Transferir para balón de 500 ml y añadir 3 g de yoduro de potasio, 2 g de bicarbonato de sodio y 5 ml de ácido clorhídrico SR. Agitar y dejar en reposo por 10 minutos en oscuro. Titular el yodo liberado con la solución de tiosulfato de sodio hasta color verde amarillento. Añadir 3 ml de almidón SI y continuar la titulación hasta desaparición de la color azul. Calcular la molaridad. Cada ml de tiosulfato de sodio 0,1 M SV corresponde a 4,903 mg de dicromato de potasio.

*Conservación* – Recipientes bien cerrados. *Información adicional* – Verificar el título con frecuencia.

## 14.4 TAMPONES

Ciertos ensayos farmacopeicos exigen el ajuste o el mantenimiento de pH. Para ello, se emplean soluciones denominadas tampones, capaces de soportar variaciones en la actividad de iones hidrógeno. Los componentes requeridos están descritos en el ítem Reactivos. Los de naturaleza cristalina deben ser previamente desecados a 110 – 120 °C por una hora; utilizar agua exenta de dióxido de carbono. El almacenamiento debe ser hecho en recipientes herméticos y apropiados. Considerar la estabilidad en el preparado de las cantidades para consumo. A continuación, se relacionan las soluciones en orden creciente de valores de pH. Otros tampones con características particulares son descritos en los textos de los respectivos ensayos.

#### Tampón ácido clorhídrico pH 2,0

*Preparación* – Mezclar 50 ml de solución acuosa de cloruro de potasio 0,2 M con 13 ml de solución acuosa de ácido clorhídrico 0,2 M. Completar el volumen para 200 ml con agua y ajustar el pH si necesario.

#### Tampón fosfato pH 2,2

*Preparación* – Disolver 1,38 g de fosfato de sodio monobásico en 800 ml de agua. Ajustar el pH con ácido fosfórico y diluir para 1000 ml con agua.

#### Tampón acetato pH 3,0

*Preparación* – Disolver 12 g de acetato de sodio en agua, añadir 6 ml de ácido acético glacial y diluir con agua para completar 100 ml. Ajustar el pH si necesario.

#### Tampón acetato pH 3,5

*Preparación* – Disolver 25 g de acetato de amonio en 35 ml de agua, añadir 38 ml de ácido clorhídrico 7 M, ajustar

el pH para 3,5 con ácido clorhídrico SR o hidróxido de amonio 6 M y completar el volumen para 100 ml con agua.

#### Tampón acetato pH 4,0

*Preparación* – Transferir 900 ml de agua para balón volumétrico de 1000 ml, añadir 2,86 ml de ácido acético glacial y 1 ml de hidróxido de sodio a 50% (p/v), completar el volumen con agua y homogeneizar. Si es necesario, ajustar el pH en 4,0 con ácido acético glacial o hidróxido de sodio a 50% (p/v).

#### Tampón acetato pH 4,4

*Preparación* – Disolver 136 g de acetato de sodio y 77 g de acetato de amonio en agua y diluir a 1000 ml. Añadir 250 ml de ácido acético glacial y homogeneizar.

#### Tampón biftalato pH 4,4

*Preparación* – Disolver 2,042 g de biftalato de potasio en 50 ml de agua, añadir 7,5 ml de hidróxido de hidrógeno 0,2 M y diluir para 200 ml en agua. Ajustar el pH si necesario.

#### Tampón acetato 0,05 M pH 4,5

*Preparación* – Transferir 2,99 g de acetato de sodio trihidratado y 1,66 ml de ácido acético glacial para balón volumétrico de 1000 ml. Disolver en agua y completar el volumen con el mismo solvente. Ajustar el pH si necesario.

#### Tampón acetato de sodio pH 4,5

*Preparación* – Diluir 2,8 ml de ácido acético glacial con agua para 1000 ml. Ajustar el pH en  $4,5 \pm 0,05$  con hidróxido de sodio a 50% (p/v).

#### Tampón acetato de sodio 0,1 M pH 5,0

*Preparación* – Transferir 13,61 g de acetato de sodio trihidratado para balón volumétrico de 1000 ml, disolver en cantidad suficiente de agua y completar el volumen con el mismo solvente. Homogeneizar. Ajustar el pH en 5,0 con ácido acético 0,1 M.

#### Tampón citrato-fosfato pH 5,0

*Solución A* – Disolver 0,8 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado en 500 ml de agua.

*Solución B* – Disolver 3,5 g de ácido cítrico monohidratado en 500 ml de agua.

*Preparación* – Mezclar, con agitación, las *Soluciones A* y *B* hasta ajustar el pH para 5,0. Distribuir en recipientes con 50 ml cada. Autoclavar a 121 °C, presión de 1 atm, por 20 minutos. Almacenar a 4 °C.

#### Tampón fosfato pH 5,5

*Solución A* – Disolver 13,61 g de fosfato de potasio monobásico en agua y completar para 1000 ml con el mismo solvente.

*Solución B* – Disolver 35,81 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado en agua y completar para 1000 ml con el mismo solvente.

A



*Preparación* – Mezclar 96,4 ml de la *Solución A* y 3,6 ml de la *Solución B*. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 5,8**

*Preparación* – En balón volumétrico de 200 ml, añadir 3,6 ml de hidróxido de sodio 0,2 M a 50 ml de fosfato de potasio monobásico 0,2 M y completar el volumen con agua. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 6,0**

*Preparación* – Mezclar 50 ml de fosfato de potasio monobásico 0,2 M y 5,7 ml de hidróxido de sodio 0,2 M. Completar el volumen a 200 ml con agua. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón acetato pH 6,0**

*Preparación* – Disolver 100 g de acetato de amoníaco en 300 ml de agua, añadir 4,1 ml de ácido acético glacial, si necesario ajustar el pH, utilizando hidróxido de amonio 10 M o ácido acético glacial 5 M y completar a 500 ml con agua.

#### **Tampón citrofosfato pH 6,0**

*Nombre alternativo* – Tampón fosfato de sodio pH 6,0 *Preparación* – Mezclar 36,8 ml de ácido cítrico a 2,1% (p/v) con 63,2 ml de fosfato de sodio dibásico a 7,15% (p/v). Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 6,5**

*Preparación* – Disolver 2,75 g de fosfato de sodio dibásico di-hidratado y 4,5 g de cloruro de sodio en 500 ml de agua. Ajustar el pH en 6,5 con tampón fosfato pH 8,5.

#### **Tampón fosfato pH 6,8**

*Preparación* – Disolver 28,8 g de fosfato de sodio dibásico y 11,45 g de fosfato de potasio tribásico en agua y completar el volumen a 1000 ml.

#### **Tampón fosfato-laurilsulfato de sodio pH 6,8**

*Preparación* – Mezclar 19 partes de ácido clorhídrico 0,1 M con 17 partes de tampón fosfato-laurilsulfato de sodio pH 11,0. Si necesario, ajustar el pH para 6,8 con ácido fosfórico a 20% (v/v) o hidróxido de sodio a 40% (p/v).

#### **Tampón de tris-clorhidrato M de pH 6,8**

*Preparación* – Disolver 60,6 g de trometamina en 400 ml agua. Ajustar el pH para 6,8 con ácido clorhídrico y completar para 500 ml con agua. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato 0,025 M pH 6,86**

*Preparación* – Disolver 3,53 g de fosfato de sodio dibásico y 3,39 g de fosfato de potasio monobásico en agua para completar el volumen a 1000 ml. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón acetato pH 7,0**

*Preparación* – Disolver 2,73 g de acetato de sodio en aproximadamente 70 ml de agua. Ajustar el pH a 7,0 con ácido

acético 0,5 M. Completar con agua a 100 ml. Ajustar el pH si necesario.

*Conservación* – En recipientes bien cerrados.

#### **Tampón citrofosfato pH 7,0**

*Nombre alternativo* – Tampón fosfato de sodio pH 7,0 *Preparación* – Mezclar 82,4 ml de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado a 7,15% (p/v) con 17,6 ml de ácido cítrico a 2,1% (p/v). Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 7,0**

*Solución A* – Hidróxido de sodio M

*Solución B* – Disolver 13,6 g de fosfato de potasio monobásico en agua y completar el volumen para 100 ml con el mismo solvente.

*Preparación* – Mezclar 29,5 ml de la *Solución A* y 50 ml de la *Solución B*. Ajustar el pH en  $7,0 \pm 0,1$  utilizando las *Soluciones A* y *B* y completar el volumen para 100 ml con agua.

#### **Tampón fosfato M/15 pH 7,0**

*Preparación* – Disolver 0,908 g de fosfato de potasio monobásico en agua y diluir a 100 ml. Separadamente, disolver 2,38 g de fosfato de sodio dibásico en agua y diluir a 100 ml. Mezclar 38,9 ml de la solución de fosfato de potasio monobásico con 61,1 ml de solución de fosfato de sodio dibásico. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 7,1**

*Preparación* – Transferir 1 g de fosfato de potasio monobásico y 1,8 g de fosfato de sodio dibásico anhidro para balón volumétrico de 1000 ml, añadir 900 ml en agua y ajustar el pH para  $7,1 \pm 0,1$  con ácido fosfórico o hidróxido de sodio 10 M. Completar el volumen con el mismo solvente.

#### **Tampón fosfato pH 7,2**

*Preparación* – Juntar 250 ml de fosfato de potasio monobásico 0,2 M y 175 ml de hidróxido de sodio 0,2 M. Completar el volumen a 1000 ml. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón albúmina-fosfato pH 7,2**

*Preparación* – Disolver 4,26 g de fosfato de sodio dibásico anhidro, 7,6 g de cloruro de sodio y 10 g de albúmina bovina en agua. Completar el volumen a 1000 ml y antes de usar ajustar el pH con hidróxido de sodio 2 M o con ácido fosfórico.

#### **Tampón fosfato pH 7,3**

*Preparación* – Disolver 20,8 g de fosfato de sodio dibásico heptahidratado y 3,08 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado en 900 ml de agua, ajustar el pH en  $7,3 \pm 0,1$  con ácido fosfórico SR o hidróxido de sodio SR y diluir para 1000 ml con el mismo solvente.

#### **Tampón barbital de pH 7,4**

*Preparación* – Mezclar 50 ml de una solución conteniendo 1,94% (p/v) de acetato de sodio y 2,95% (p/v) de barbital

sódico en agua con 50,5 ml de ácido clorhídrico 0,1 M. Juntar 20 ml de solución a 8,5% (p/v) de cloruro de sodio y completar a 250 ml con agua.

#### **Tampón fosfato de potasio pH 7,4 con polisorbato 80 a 2% (v/v)**

*Preparación* – Disolver 27,22 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 ml de agua. Transferir 250 ml de la solución anterior para balón volumétrico de 1000 ml, añadir 195,5 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y 450 ml de agua. Ajustar el pH para 7,4 con ácido fosfórico o hidróxido de sodio y completar el volumen con agua. El polisorbato 80 debe ser adicionado después, debido a la difícil

Solubilidad del mismo.

#### **Tampón imidazol pH 7,4**

*Preparación* – Disolver 3,4 g de imidazol y 5,84 g de cloruro de sodio en agua. Añadir 18,6 ml de ácido clorhídrico M y completar con agua a 1000 ml. si necesario, ajustar el pH para  $7,4 \pm 0,1$ .

#### **Tampón de trometamina-cloruro de sodio de pH 7,4.**

*Preparación* – Disolver 6,08 g de trometamina y 8,77 g de cloruro de sodio en 500 ml de agua destilada. Junte 10 g de albúmina bovina. Ajustar el pH con ácido clorhídrico y complete 1000 ml con agua destilada.

#### **Tampón tris-cloruro de sodio pH 7,5**

*Preparación* – Disolver 7,27 g de trometamina y 5,27 g de cloruro de sodio en 950 ml de agua. Ajustar el pH en 7,5 con ácido clorhídrico 2 M y completar con agua a 1000 ml.

#### **Tampón borato pH 8,0**

*Preparación* – Mezclar 0,619 g de ácido bórico y 0,746 g cloruro de potasio en 50 ml de agua. Añadir 3,97 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y diluir para 200 ml de agua. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón de barbital de pH 8,4**

*Preparación* – Disolver 8,25 g de barbital sódico en agua y completar a 1000 ml con el mismo solvente. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón de trometamina-EDTA de pH 8,4.**

*Preparación* – Disolver 5,12 g de cloruro de sodio, 3,03 g de trometamina y 1,40 g de yoduro de sodio en 250 ml agua destilada. Ajuste el pH con ácido clorhídrico y complete 500 ml con agua destilada.

#### **Tampón de tris-EDTA ASB de pH 8,4**

*Preparación* – Disolver 6,1 g de trometamina, 2,8 g de yoduro de sodio, 10,2 g de cloruro de sodio y 10 g de albúmina bovina en agua, ajustar el pH con ácido clorhídrico M y completar para 1000 ml con agua.

#### **Tampón acetato de amonio pH 8,5**

*Preparación* – Disolver 50 g de acetato de amonio en 1000 ml de etanol a 20% (v/v). Ajustar el pH en 8,5 con hidróxido de amonio 6 M.

#### **Tampón fosfato pH 8,5**

*Preparación* – Disolver 3,5 g de fosfato de potasio dibásico anhidro y 4,5 g de cloruro de sodio en 500 ml de agua. Ajustar el pH en 8,5 con una mezcla de agua y ácido fosfórico (1:1).

#### **Tampón barbital pH 8,6**

*Preparación* – Mezclar 129 ml de ácido clorhídrico 0,1 M añadir volumen suficiente de barbital sódico 0,1 M para completar 1000 ml. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón fosfato pH 8,6**

*Preparación* – Mezclar 2,3 volúmenes de hidróxido de sodio 0,2 M, con 2,5 volúmenes de fosfato de potasio monobásico 0,2 M y 2 volúmenes de metanol. Enfriar y mezclar con agua para obtener 10 volúmenes de solución. Ajustar, si necesario, el pH para  $8,60 \pm 0,05$  con hidróxido de sodio.

#### **Tampón de tris-clorhidrato 1,5 M pH 8,8**

*Preparación* – Disolver 90,8 g de trometamina en 400 ml de agua. Ajustar el pH para 8,8 con ácido clorhídrico y diluir para 500 ml con agua.

#### **Tampón borato pH 9,0**

*Preparación* – Disolver 12,37 g de ácido bórico y 14,91 g de cloruro de potasio en agua y completar el volumen para 1000 ml con el mismo solvente. Transferir 50 ml de la solución obtenida para balón volumétrico de 200 ml, añadir 20 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y 120 ml de agua. Ajustar el pH en 9,0 con hidróxido de sodio SR o ácido clorhídrico SR y completar el volumen con agua.

#### **Tampón tris 0,05 M pH 9,0**

*Preparación* – Transferir 6,05 g de trometamina para balón volumétrico de 1000 ml. Disolver en agua y completar el volumen con el mismo solvente. Ajustar el pH en  $9,0 \pm 0,05$  utilizando ácido fosfórico. Disolver 10 g de laurilsulfato de sodio en cerca de 600 ml del tampón. Mezclar la solución obtenida con lo restante del tampón.

#### **Tampón borato pH 9,6**

*Preparación* – Transferir 3,093 g de ácido bórico y 3,728 g de cloruro de potasio para balón volumétrico de 1000 ml, añadir 250 ml de agua y agitar hasta disolución. Añadir 182 ml de hidróxido de sodio 0,2 M y completar el volumen con agua. Ajustar el pH si necesario.

#### **Tampón carbonato-bicarbonato de sodio pH 9,6**

*Preparación* – Disolver 0,75 g de carbonato de sodio y 1,5 g de bicarbonato de sodio en 500 ml de agua. Distribuir en recipientes con 50 ml cada uno. Autoclavar a 121 °C, presión de 1 atm, por 20 minutos. Almacenar a 4 °C.

A

**Tampón cloruro de amonio pH 10,0**

*Preparación* – Disolver 5,4 g de cloruro de amonio en 70 ml de hidróxido de amonio 5 M y diluir con agua a 100 ml.

**Tampón cloruro de amonio pH 10,7**

*Preparación* – Disolver 67,5 g de cloruro de amonio en agua, añadir 570 ml de solución concentrada de amoníaco y diluir para 1000 ml con agua. Ajustar el pH si necesario.

**Tampón fosfato-laurilsulfato de sodio pH 11,0**

*Preparación* – Disolver en agua 16,35 g de fosfato de sodio monobásico, 7,05 g de hidróxido de sodio y 3 g de laurilsulfato de sodio y diluir con agua para 1000 ml. Ajustar el pH si necesario.

**Tampón ácido acético-acetato de amonio**

*Preparación* – Disolver 77,1 g de acetato de amonio en agua, añadir 57,0 ml de ácido acético glacial y completar con agua a 1000 ml. Ajustar el pH si necesario.

**Tampón de electroforesis DSS-EGPA**

*Preparación* – Disolver 151,4 g de trometamina, 721 g de glicina y 50 g laurilsulfato de sodio en agua y completar 5000 ml con el mismo solvente. Diluir a 1:10 con agua, inmediatamente antes del uso. El pH de la solución diluida debe estar comprendido entre 8,1 y 8,8.

**Tampón concentrado para muestras DSS-EGPA.**

*Preparación* – Disolver 1,89 g de trometamina, 5 g de laurilsulfato de sodio y 50 mg de azul de bromofenol en agua; juntar 25 ml de glicerina y completar para 100 ml con agua. Ajustar el pH para 6,8 con ácido clorhídrico y completar para 125 ml con agua.

**Tampón concentrado para muestras DSS-EGPA en condiciones reductoras**

*Preparación* – Disolver 3,78 g de trometamina, 10 g de laurilsulfato de sodio, 100 mg de azul de bromofenol y 50 ml de glicerina en 200 ml de agua. Juntar 25 ml de 2-mercaptoetanol. Ajustar el pH para 6,8 con ácido clorhídrico y completar para 250 ml con agua. En vez del 2-mercaptoetanol, puede ser usado el ditioneitol como agente reductor. En ese caso, proceda como indicado: disuelva 3,78 g de trometamina, 10 g de laurilsulfato de sodio, 100 mg de azul de bromofenol y 50 ml de glicerina en 200 ml de agua. Ajustar el pH para 6,8 con ácido clorhídrico y completar para 250 ml con agua. Inmediatamente antes del empleo, añadir el ditioneitol, para obtener una concentración final de 0,1 M.

**Tampón fosfato-salino (PBS)**

*Preparación* – Disolver, con agitación, 24 g de cloruro de sodio, 0,6 g de cloruro de potasio, 4,3 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado y 0,6 g de fosfato de potasio monobásico en 4 L de agua. Autoclavar a 121 °C, presión de 1 atm, por 20 minutos. Almacenar a 4 °C.

**Tampón sulfato cúprico**

*Solución A* – Disolver 15,22 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en cantidad suficiente de agua. Añadir 9,75 g de ácido cítrico monohidratado y diluir para 1000 ml con agua. Ajustar el pH a 5,2 con ayuda de hidróxido de sodio o ácido cítrico.

*Solución B* – Disolver 0,313 g de sulfato cúprico pentahidratado en agua y diluir para 100 ml con el mismo solvente.

*Preparación* – En el momento del uso mezclar 15 ml de la Solución B con 985 ml de la Solución A.

A

# ANEXO A – TABLA PERIÓDICA DE LOS ELEMENTOS QUÍMICOS – NOMBRES, SÍMBOLOS Y MASAS ATÓMICAS

La **Tabla A.1** es recomendada por la International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC de 2007. Las masas atómicas se basan en la masa del  $^{12}\text{C} = 12$ .

**Tabla A.1 – Elementos químicos – nomes, símbolos e massas atômicas.**

1 <b>H</b> 1,0079	<b>Tabla Periódica de los Elementos Químicos</b>																2 <b>He</b> 4,0026
3 <b>Li</b> 6,941	4 <b>Be</b> 9,0122											5 <b>B</b> 10,811	6 <b>C</b> 12,011	7 <b>N</b> 14,007	8 <b>O</b> 15,999	9 <b>F</b> 18,998	10 <b>Ne</b> 20,180
11 <b>Na</b> 22,990	12 <b>Mg</b> 24,305											13 <b>Al</b> 26,982	14 <b>Si</b> 28,086	15 <b>P</b> 30,974	16 <b>S</b> 32,065	17 <b>Cl</b> 35,453	18 <b>Ar</b> 39,948
19 <b>K</b> 39,098	20 <b>Ca</b> 40,078	21 <b>Sc</b> 44,956	22 <b>Ti</b> 47,867	23 <b>V</b> 50,942	24 <b>Cr</b> 51,996	25 <b>Mn</b> 54,938	26 <b>Fe</b> 55,845	27 <b>Co</b> 58,933	28 <b>Ni</b> 58,693	29 <b>Cu</b> 63,546	30 <b>Zn</b> 65,38	31 <b>Ga</b> 69,723	32 <b>Ge</b> 72,64	33 <b>As</b> 74,922	34 <b>Se</b> 78,96	35 <b>Br</b> 79,904	36 <b>Kr</b> 83,798
37 <b>Rb</b> 85,468	38 <b>Sr</b> 87,62	39 <b>Y</b> 88,906	40 <b>Zr</b> 91,224	41 <b>Nb</b> 92,906	42 <b>Mo</b> 95,96	43 <b>Tc</b> -	44 <b>Ru</b> 101,07	45 <b>Rh</b> 102,91	46 <b>Pd</b> 106,42	47 <b>Ag</b> 107,87	48 <b>Cd</b> 112,41	49 <b>In</b> 114,82	50 <b>Sn</b> 118,71	51 <b>Sb</b> 121,76	52 <b>Te</b> 127,60	53 <b>I</b> 126,90	54 <b>Xe</b> 131,29
55 <b>Cs</b> 132,91	56 <b>Ba</b> 137,33	57-71	72 <b>Hf</b> 178,49	73 <b>Ta</b> 180,95	74 <b>W</b> 183,84	75 <b>Re</b> 186,21	76 <b>Os</b> 190,23	77 <b>Ir</b> 192,22	78 <b>Pt</b> 195,08	79 <b>Au</b> 196,97	80 <b>Hg</b> 200,59	81 <b>Tl</b> 204,38	82 <b>Pb</b> 207,2	83 <b>Bi</b> 208,98	84 <b>Po</b> -	85 <b>At</b> -	86 <b>Rn</b> -
87 <b>Fr</b> -	88 <b>Ra</b> -	89-103	104 <b>Rf</b> -	105 <b>Db</b> -	106 <b>Sg</b> -	107 <b>Bh</b> -	108 <b>Hs</b> -	109 <b>Mt</b> -	110 <b>Ds</b> -	111 <b>Rg</b> -							

57 <b>La</b> 138,91	58 <b>Ce</b> 140,12	59 <b>Pr</b> 140,91	60 <b>Nd</b> 144,24	61 <b>Pm</b> -	62 <b>Sm</b> 150,36	63 <b>Eu</b> 151,96	64 <b>Gd</b> 157,25	65 <b>Tb</b> 158,93	66 <b>Dy</b> 162,50	67 <b>Ho</b> 164,93	68 <b>Er</b> 167,26	69 <b>Tm</b> 168,93	70 <b>Yb</b> 173,05	71 <b>Lu</b> 174,97
89 <b>Ac</b> -	90 <b>Th</b> 232,04	91 <b>Pa</b> 231,04	92 <b>U</b> 238,03	93 <b>Np</b> -	94 <b>Pu</b> -	95 <b>Am</b> -	96 <b>Cm</b> -	97 <b>Bk</b> -	98 <b>Cf</b> -	99 <b>Es</b> -	100 <b>Fm</b> -	101 <b>Md</b> -	102 <b>No</b> -	103 <b>Lr</b> -

Tabla A.2 – Elementos químicos ordenados por el número atómico.

Número atómico (Z)	Nombre	Símbolo	Masa atómica (A)	Densidad a 20°C	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Año de la descubrimiento	Descubridor(es)
1	Hidrógeno	H	1,00794 g/mol	0,084 g/l	-259,1 °C	-252,9 °C	1766	Cavendish
2	Helio	He	4,002602 g/mol	0,17 g/l	-272,2 °C	-268,9 °C	1895	Ramsay y Cleve
3	Litio	Li	6,941 g/mol	0,53 g/cm <sup>3</sup>	180,5 °C	1317 °C	1817	Arfvedson
4	Berilio	Be	9,012182 g/mol	1,85 g/cm <sup>3</sup>	1278 °C	2970 °C	1797	Vauquelin
5	Boro	B	10,811 g/mol	2,46 g/cm <sup>3</sup>	2300 °C	2550 °C	1808	Davy y Gay-Lussac
6	Carbono	C	12,011 g/mol	3,51 g/cm <sup>3</sup>	3550 °C	4827 °C	Pre-historia	Desconocido
7	Nitrógeno / (Azoto)	N	14,00674 g/mol	1,17 g/l	-209,9 °C	-195,8 °C	1772	Rutherford
8	Oxígeno	O	15,9994 g/mol	1,33 g/l	-218,4 °C	-182,9 °C	1774	Priestley y Scheele
9	Flúor	F	18,9984032 g/mol	1,58 g/l	-219,6 °C	-188,1 °C	1886	Moissan
10	Neón	Ne	20,1797 g/mol	0,84 g/l	-248,7 °C	-246,1 °C	1898	Ramsay y Travers
11	Sodio	En la	22,989768 g/mol	0,97 g/cm <sup>3</sup>	97,8 °C	892 °C	1807	Davy
12	Magnesio	Mg	24,305 g/mol	1,74 g/cm <sup>3</sup>	648,8 °C	1107 °C	1755	Black
13	Aluminio	Al	26,981539 g/mol	2,70 g/cm <sup>3</sup>	660,5 °C	2467 °C	1825	Oersted
14	Silicio	Si	28,0855 g/mol	2,33 g/cm <sup>3</sup>	1410 °C	2355 °C	1824	Berzelius
15	Fósforo	P	30,973762 g/mol	1,82 g/cm <sup>3</sup>	44 (P4) °C	280 (P4) °C	1669	Brandt
16	Azufre	S	32,066 g/mol	2,06 g/cm <sup>3</sup>	113 °C	444,7 °C	Pre-historia	Desconocido
17	Cloro	Cl	35,4527 g/mol	2,95 g/l	-34,6 °C	-101 °C	1774	Scheele
18	Argón	Aire	39,948 g/mol	1,66 g/l	-189,4 °C	-185,9 °C	1894	Ramsay y Rayleigh
19	Potasio	K	39,0983 g/mol	0,86 g/cm <sup>3</sup>	63,7 °C	774 °C	1807	Davy
20	Calcio	Ca	40,078 g/mol	1,54 g/cm <sup>3</sup>	839 °C	1487 °C	1808	Davy
21	Escandio	Sc	44,95591 g/mol	2,99 g/cm <sup>3</sup>	1539 °C	2832 °C	1879	Nilson
22	Titanio	Ti	47,88 g/mol	4,51 g/cm <sup>3</sup>	1660 °C	3260 °C	1791	Gregor y Klaproth
23	Vanadio	V	50,9415 g/mol	6,09 g/cm <sup>3</sup>	1890 °C	3380 °C	1801	Del Río
24	Cromio / Cromo	Cr	51,9961 g/mol	7,14 g/cm <sup>3</sup>	1857 °C	2482 °C	1797	Vauquelin
25	Manganeso	Mn	54,93805 g/mol	7,44 g/cm <sup>3</sup>	1244 °C	2097 °C	1774	Galín
26	Hierro	Fe	55,847 g/mol	7,87 g/cm <sup>3</sup>	1535 °C	2750 °C	Pre-historia	Desconocido
27	Cobalto	Co	58,9332 g/mol	8,89 g/cm <sup>3</sup>	1495 °C	2870 °C	1735	Brandt
28	Níquel	Ni	58,69 g/mol	8,91 g/cm <sup>3</sup>	1453 °C	2732 °C	1751	Cronstedt
29	Cobre	Cu	63,546 g/mol	8,92 g/cm <sup>3</sup>	1083,5 °C	2595 °C	Pre-historia	Desconocido
30	Zinc	Zn	65,39 g/mol	7,14 g/cm <sup>3</sup>	419,6 °C	907 °C	Pre-historia	Desconocido
31	Galio	Ga	69,723 g/mol	5,91 g/cm <sup>3</sup>	29,8 °C	2403 °C	1875	Lecoq de Boisbaudran
32	Germanio	Ge	72,61 g/mol	5,32 g/cm <sup>3</sup>	937,4 °C	2830 °C	1886	Winkler
33	Arsénico	Las	74,92159 g/mol	5,72 g/cm <sup>3</sup>	613 °C	613 (sublimiert) °C	ca. 1250	Albertus Magnus
34	Selenio	Se	78,96 g/mol	4,82 g/cm <sup>3</sup>	217 °C	685 °C	1817	Berzelius



Número atómico (Z)	Nombre	Símbolo	Masa atómica (A)	Densidad a 20°C	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Año de la descubrimiento	Descubridor(es)
35	Bromo	Br	79,904 g/mol	3,14 g/cm <sup>3</sup>	-7,3 °C	58,8 °C	1826	Balard
36	Criptón	Kr	83,8 g/mol	3,48 g/l	-156,6 °C	-152,3 °C	1898	Ramsay y Travers
37	Rubidio	Rb	85,4678 g/mol	1,53 g/cm <sup>3</sup>	39 °C	688 °C	1861	Bunsen y Kirchhoff
38	Estroncio	Sr	87,62 g/mol	2,63 g/cm <sup>3</sup>	769 °C	1384 °C	1790	Crawford
39	itrio	Y	88,90585 g/mol	4,47 g/cm <sup>3</sup>	1523 °C	3337 °C	1794	Gadolin
40	Zirconio	Zr	91,224 g/mol	6,51 g/cm <sup>3</sup>	1852 °C	4377 °C	1789	Klaproth
41	Niobio	Nb	92,90638 g/mol	8,58 g/cm <sup>3</sup>	2468 °C	4927 °C	1801	Hatchet
42	Molibdeno	Mo	95,94 g/mol	10,28 g/cm <sup>3</sup>	2617 °C	5560 °C	1778	Scheele
43	Tecnecio	Tc	98,9063 g/mol	11,49 g/cm <sup>3</sup>	2172 °C	5030 °C	1937	Perrier y Segrè
44	Rutenio	Ru	101,07 g/mol	12,45 g/cm <sup>3</sup>	2310 °C	3900 °C	1844	Claus
45	Rodio	Rh	102,9055 g/mol	12,41 g/cm <sup>3</sup>	1966 °C	3727 °C	1803	Wollaston
46	Paladio	Pd	106,42 g/mol	12,02 g/cm <sup>3</sup>	1552 °C	3140 °C	1803	Wollaston
47	Plata	Ag	107,8682 g/mol	10,49 g/cm <sup>3</sup>	961,9 °C	2212 °C	Pre-historia	Desconocido
48	Cadmio	Cd	112,411 g/mol	8,64 g/cm <sup>3</sup>	321 °C	765 °C	1817	Stromeyer y Hermann
49	indio	In	114,82 g/mol	7,31 g/cm <sup>3</sup>	156,2 °C	2080 °C	1863	Reich y Richter
50	Estaño	Sn	118,71 g/mol	7,29 g/cm <sup>3</sup>	232 °C	2270 °C	Pre-historia	Desconocido
51	Antimonio	Sb	121,75 g/mol	6,69 g/cm <sup>3</sup>	630,7 °C	1750 °C	Pre-historia	Desconocido
52	Telurio	Te	127,6 g/mol	6,25 g/cm <sup>3</sup>	449,6 °C	990 °C	1782	Von Reichenstein
53	Yodo	I	128,90447 g/mol	4,94 g/cm <sup>3</sup>	113,5 °C	184,4 °C	1811	Courtois
54	Xenón	Xe	131,29 g/mol	4,49 g/l	-111,9 °C	-107 °C	1898	Ramsay y Travers
55	Cesio	Cs	132,90543 g/mol	1,90 g/cm <sup>3</sup>	28,4 °C	690 °C	1860	Kirchhoff y Bunsen
56	Bario	Ba	137,327 g/mol	3,65 g/cm <sup>3</sup>	725 °C	1640 °C	1808	Davy
57	Lantano	La	138,9055 g/mol	6,16 g/cm <sup>3</sup>	920 °C	3454 °C	1839	Mosander
58	Cerio	Ce	140,115 g/mol	6,77 g/cm <sup>3</sup>	798 °C	3257 °C	1803	Von Hisinger y Berzelius
59	Praseodimio	Pr	140,90765 g/mol	6,48 g/cm <sup>3</sup>	931 °C	3212 °C	1895	Von Welsbach
60	Neodimio	Nd	144,24 g/mol	7,00 g/cm <sup>3</sup>	1010 °C	3127 °C	1895	Von Welsbach
61	Promecio	Pm	146,9151 g/mol	7,22 g/cm <sup>3</sup>	1080 °C	2730 °C	1945	Marinsky y Glendenin
62	Samario	Sm	150,36 g/mol	7,54 g/cm <sup>3</sup>	1072 °C	1778 °C	1879	Lecoq de Boisbaudran
63	Europio	Eu	151,965 g/mol	5,25 g/cm <sup>3</sup>	822 °C	1597 °C	1901	Demaçay
64	Gadolinio	Gd	157,25 g/mol	7,89 g/cm <sup>3</sup>	1311 °C	3233 °C	1880	De Marignac
65	Terbio	Tb	158,92534 g/mol	8,25 g/cm <sup>3</sup>	1360 °C	3041 °C	1843	Mosander
66	Disproscio	Dy	162,5 g/mol	8,56 g/cm <sup>3</sup>	1409 °C	2335 °C	1886	Lecoq de Boisbaudran
67	Holmio	Ho	164,93032 g/mol	8,78 g/cm <sup>3</sup>	1470 °C	2720 °C	1878	Soret

## A

Número atómico (Z)	Nombre	Símbolo	Masa atómica (A)	Densidad a 20°C	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Año de la descubrimiento	Descubridor(es)
68	Erbio	Er	167,26 g/mol	9,05 g/cm <sup>3</sup>	1522 °C	2510 °C	1842	Mosander
69	Tulio	Tm	168,93421 g/mol	9,32 g/cm <sup>3</sup>	1545 °C	1727 °C	1879	Cleve
70	Iterbio	Yb	173,04 g/mol	6,97 g/cm <sup>3</sup>	824 °C	1193 °C	1878	De Marignac
71	Lutecio	Lu	174,967 g/mol	9,84 g/cm <sup>3</sup>	1656 °C	3315 °C	1907	Urbain
72	Hafnio	Hf	178,49 g/mol	13,31 g/cm <sup>3</sup>	2150 °C	5400 °C	1923	Coster y vón Hevesy
73	Tántalo	Ta	180,9479 g/mol	16,68 g/cm <sup>3</sup>	2996 °C	5425 °C	1802	Ekeberg
74	Tungsteno	W	183,85 g/mol	19,26 g/cm <sup>3</sup>	3407 °C	5927 °C	1783	Gebrüder de Elhuyar
75	Renio	Re	186,207 g/mol	21,03 g/cm <sup>3</sup>	3180 °C	5627 °C	1925	Noddack, Tacke y Berg
76	Osino	Os	190,2 g/mol	22,61 g/cm <sup>3</sup>	3045 °C	5027 °C	1803	Tenant
77	Iridio	Ir	192,22 g/mol	22,65 g/cm <sup>3</sup>	2410 °C	4130 °C	1803	Tenant y andere
78	Platino	Pt	195,08 g/mol	21,45 g/cm <sup>3</sup>	1772 °C	3827 °C	1557	Scaliger
79	Oro	Au	196,96654 g/mol	19,32 g/cm <sup>3</sup>	1064,4 °C	2940 °C	Pre-historia	Desconocido
80	Mercurio	Hg	200,59 g/mol	13,55 g/cm <sup>3</sup>	-38,9 °C	356,6 °C	Pre-historia	Desconocido
81	Talio	Tl	204,3833 g/mol	11,85 g/cm <sup>3</sup>	303,6 °C	1457 °C	1861	Crookes
82	Plomo	Pb	207,2 g/mol	11,34 g/cm <sup>3</sup>	327,5 °C	1740 °C	Pre-historia	Desconocido
83	Bismuto	Bi	208,98037 g/mol	9,80 g/cm <sup>3</sup>	271,4 °C	1560 °C	1540	Agricola
84	Polonio	Po	208,9824 g/mol	9,20 g/cm <sup>3</sup>	254 °C	962 °C	1898	Marie y Pierre Curie
85	Astato	At	209,9871 g/mol	302 °C	302 °C	337 °C	1940	Corson y MacKenzie
86	Radón	Rn	222,0176 g/mol	9,23 g/l	-71 °C	-61,8 °C	1900	Dom
87	Francio	Fr	223,0197 g/mol	27 °C	27 °C	677 °C	1939	Perey
88	Radio	Ra	226,0254 g/mol	5,50 g/cm <sup>3</sup>	700 °C	1140 °C	1898	Marie y Pierre Curie
89	Actinio	Ac	227,0278 g/mol	10,07 g/cm <sup>3</sup>	1047 °C	3197 °C	1899	Debiere
90	Torio	Th	232,0381 g/mol	11,72 g/cm <sup>3</sup>	1750 °C	4787 °C	1829	Berzelius
91	Protactinio	Pa	231,0359 g/mol	15,37 g/cm <sup>3</sup>	1554 °C	4030 °C	1917	Soddy, Cranston y Halin
92	Uranio	U	238,0289 g/mol	18,97 g/cm <sup>3</sup>	1132,4 °C	3818 °C	1789	Klaproth
93	Neptunio	Np	237,0482 g/mol	20,48 g/cm <sup>3</sup>	640 °C	3902 °C	1940	McMillan y Abelson
94	Plutonio	Pu	244,0642 g/mol	19,74 g/cm <sup>3</sup>	641 °C	3327 °C	1940	Seaborg
95	Americio	Am	243,0614 g/mol	13,67 g/cm <sup>3</sup>	994 °C	2607 °C	1944	Seaborg
96	Curio	Cm	247,0703 g/mol	13,51 g/cm <sup>3</sup>	1340 °C	3110 °C	1944	Seaborg
97	Berquelio	Bk	247,0703 g/mol	13,25 g/cm <sup>3</sup>	986 °C		1949	Seaborg
98	Californio	Cf	251,0796 g/mol	15,1 g/cm <sup>3</sup>	900 °C		1950	Seaborg
99	Einstenio	Es	252,0829 g/mol	860 °C			1952	Seaborg
100	Fermio	Fm	257,0951 g/mol	1527 °C			1952	Seaborg
101	Mendelevio	Md	258,0986 g/mol				1955	Seaborg
102	Nobelio	En el	259,1009 g/mol				1958	Seaborg

Número atómico (Z)	Nombre	Símbolo	Masa atómica (A)	Densidad a 20°C	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Año de la descubrimiento	Descubridor(es)
103	Laurencio	Lr	260.1053 g/mol				1961	Ghiorso
104	Rutherfordio	Rf	261.1087 g/mol				1964/69	Flerow oder Ghiorso
105	Dubnio	Db	262.1138 g/mol				1967/70	Flerow oder Ghiorso
106	Seaborgio	Sg	263.1182 g/mol				1974	Oganesian
107	Bohrio	Bh	262.1229 g/mol				1976	Oganesian
108	Hassio	Hs	265 g/mol				1984	Sociedad para Descubrimiento de iones Pesados
109	Meitnerio	Mt	266 g/mol				1982	Sociedad para Descubrimiento de iones Pesados
110	Darmstadio	Ds	269 g/mol				1994	Sociedad para Descubrimiento de iones Pesados
111	Roentgenio	Rg	272 g/mol				1994	Sociedad para Descubrimiento de iones Pesados
112	Ununbio	Uub	277 g/mol				1996	Sociedad para Descubrimiento de iones Pesados
113	Ununtrio	Uut						
114	Ununquadio	Uuq						
115	Ununpentio	Uup						
116	Ununhexio	Uuh						
117	Ununseptio	Uus						
118	Ununoctio	Uuo						



# ANEXO B – UNIDADES DEL SISTEMA INTERNACIONAL (SI) USADAS EN LA FARMACOPEA Y LAS EQUIVALENCIAS CON OTRAS UNIDADES

El sistema internacional posee siete unidades de base, utilizadas como referencia en todas las mediciones y relacionadas en la **Tabla B.1**

**Tabla B.1 – Las siete unidades de base del SI**

<i>Magnitud</i>	<i>Unidad</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Definición de la unidad</i>
Largo l, h, r, x	Metro	m	El metro es el largo del trayecto recorrido por la luz en el vacío durante un intervalo de tiempo de 1/299792458 del segundo. Así, la velocidad de la luz en el vacío, $c_0$ , es exactamente igual a 299792458 m/s.
Masa M	kilogramo	kg	Es igual a la masa del prototipo internacional del kilogramo, m(K), que es exactamente igual a 1 kg
Tiempo T	segundo	s	El segundo es la duración de 9.192.631.770 periodos de la radiación, correspondiente a la transición entre los dos niveles hiperfinos del estado fundamental del átomo de cesio-133 y se refiere al átomo de cesio en reposo, a una temperatura de 0K.
Corriente eléctrica I, i	ampere	A	El ampere es la intensidad de una corriente eléctrica constante que, mantenida en dos conductores paralelos, rectilíneos, de largo infinito, de sección circular insignificante, y situados a la distancia de 1 metro entre sí, en el vacío, produciría entre estos conductores una fuerza igual a $2 \times 10^{-7}$ newton por metro de largo
Temperatura termodinámica T	kelvin	k	El kelvin, unidad de temperatura termodinámica, es la fracción 1/273,16 de la temperatura termodinámica en el punto tríplice del agua. Así, la temperatura del punto tríplice del agua, $T_{pta}$ , es exactamente igual a 273,16 K.
Cantidad de sustancia N	mol	mol	1.El mol es la cantidad de materia de un sistema conteniendo tantas entidades elementales como átomos existen en 0,012 quilogramos de carbono 12. 2.Cuando se utiliza el mol, las entidades elementales deben ser especificadas, pudiendo ser átomos, moléculas, iones, electrones, así como otras partículas, o agrupamientos especificados de esas partículas. 3.Así, la masa molar del carbono 12, M(12C), es exactamente igual a 12 g/mol. Se refiere a los átomos de carbono 12 libres, en reposo y en su estado fundamental.
Intensidad luminosa $I_v$	candela	cd	La candela es la intensidad luminosa, en una dada dirección de una fuente que emite una radiación monocromática de frecuencia $540 \times 10^{12}$ hertz y cuya intensidad energética en esa dirección es 1/683 watt por estereorradián. Así, la eficacia luminosa espectral, K, de la radiación monocromática de frecuencia $540 \times 10^{12}$ Hz es exactamente igual a 683 lm/W

B



Todas las otras magnitudes son descritas como magnitudes derivadas y medidas como unidades derivadas. En la **Tabla B.2** están listadas algunas magnitudes derivadas.

**Tabla B.2 – Algunas magnitudes derivadas.**

<i>Magnitud derivada</i>	<i>Representación</i>	<i>Unidad derivada</i>	<i>Símbolo</i>
área	A	metro cuadrado	m <sup>2</sup>
volumen	v	metro cúbico	m <sup>3</sup>
velocidad	v	metro por segundo	m/s
aceleración	a	metro por segundo al cuadrado	m/s <sup>2</sup>
número de ondas	σ, ν	inverso del metro	m <sup>-1</sup>
masa específica	p	kilogramo por metro cúbico	kg/m <sup>3</sup>
densidad superficial	ρA	kilogramo por metro cuadrado	kg/m <sup>2</sup>
volumen específico	v	metro cúbico por kilogramo	m <sup>3</sup> /kg
densidad de corriente	j	ampere por metro cuadrado	A/m <sup>2</sup>
campo magnético	H	ampere por metro	A/m
concentración	c	mol por metro cúbico	mol/m <sup>3</sup>
densidad de masa	ρ, γ	kilogramo por metro cúbico	kg/m <sup>3</sup>
luminancia	Lv	candela por metro cuadrado	cd/m <sup>2</sup>
índice de refracción	n	un	1
permeabilidad relativa	μ <sub>r</sub>	un	1

Note que el índice de refracción y la permeabilidad relativa son ejemplos de magnitudes adimensionales, para las cuales la unidad del SI es el número uno (1), a pesar de que esta unidad no sea escrita.

Algunas unidades derivadas reciben nombre especial, siendo ese simplemente una forma compacta de expresión de combinaciones de unidades de base que son usadas frecuentemente. Entonces, por ejemplo, el joule, símbolo J, es por definición, igual a m<sup>2</sup> kg s<sup>-2</sup>. Existen actualmente 22 nombres especiales para unidades aprobados para uso en el SI, que están listados en la **Tabla B.3**.

**Tabla B.3 – Unidades derivadas con nombres especiales en el SI.**

<b>Magnitud derivada</b>	<b>Nombre de la unidad derivada</b>	<b>Símbolo de la unidad</b>	<b>Expresión en términos de otras unidades</b>
ángulo plano	Radián	rad	m/m = 1
ángulo sólido	estereorradián	sr	m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> = 1
Frecuencia	Hertz	Hz	s <sup>-1</sup>
Fuerza	newton	N	m kg s <sup>-2</sup>
presión, tensión	pascal	Pa	N/m <sup>2</sup> = m <sup>-1</sup> kg s <sup>-2</sup>
energía, trabajo, cantidad de calor	Joule	J	N m = m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup>
potencia, flujo de energía	Watt	W	J/s = m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup>
carga eléctrica, cantidad de electricidad	coulomb	C	s A
diferencia de potencial eléctrico	Volt	V	W/A = m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup> A <sup>-1</sup>
Capacitancia	Farad	F	C/V = m <sup>-2</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>4</sup> A <sup>2</sup>
resistencia eléctrica	Ohm	Ω	V/A = m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup> A <sup>-2</sup>
conductancia eléctrica	siemens	S	A/V = m <sup>-2</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>3</sup> A <sup>2</sup>
flujo de inducción magnética	weber	Wb	V s = m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> A <sup>-1</sup>
inducción magnética	Tesla	T	Wb/m <sup>2</sup> = kg s <sup>-2</sup> A <sup>-1</sup>
Inductancia	Henry	H	Wb/A = m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> A <sup>-2</sup>
temperatura Celsius	grado Celsius	°C	K
flujo luminoso	lumen	lm	cd sr = cd
Iluminancia	Lux	lx	lm/m <sup>2</sup> = m <sup>-2</sup> cd
actividad de un radionúclido	becquerel	Bq	s <sup>-1</sup>
dosis absorbida, energía específica (comunicada), kerma	Gray	Gy	J/kg = m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
equivalente de dosis, equivalente de dosis ambiente	sievert	Sv	J/kg = m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
actividad catalítica	Katal	kat	s <sup>-1</sup> mol

A pesar de que el Hertz y el becquerel sean iguales al inverso del segundo, el Hertz es usado solamente para fenómenos cíclicos, y el becquerel, para procesos estocásticos en el decaimiento radioactivo.

La unidad de temperatura Celsius es el grado Celsius, °C, que es igual en magnitud al kelvin, K, la unidad de temperatura termodinámica. La magnitud temperatura Celsius  $t$  está relacionada con la temperatura termodinámica  $T$  por la ecuación  $t/°C = T/K - 273,15$ .

El sievert, también, es usado para las magnitudes: equivalentes de dosis direccional y equivalente de dosis individual.

Los cuatro últimos nombres especiales de las unidades de la **Tabla B.3** fueron adoptados específicamente para resguardar mediciones relacionadas a la salud humana.

Para cada magnitud, existe solamente una unidad SI (a pesar de que pueda estar expresada frecuentemente de diferentes modos, por el uso de nombres especiales). Sin embargo, la misma unidad SI puede ser usada para expresar los valores de diversas magnitudes diferentes (por ejemplo, la unidad SI para la relación J/K puede ser usada para expresar tanto el valor de la capacidad calorífica como de la entropía). Por tanto, es importante no usar la unidad sola

para especificar la magnitud. Esto se aplica tanto a los textos científicos como a los instrumentos de medición (esto es, la lectura de salida de un instrumento debe indicar la magnitud medida y la unidad).

Las magnitudes adimensionales, también llamadas de magnitudes de dimensión uno, son usualmente definidas como la razón entre dos magnitudes de la misma naturaleza (por ejemplo, el índice de refracción es la razón entre dos velocidades, y la permeabilidad relativa es la razón entre la permeabilidad de un medio dieléctrico y la del vacío). Entonces la unidad de una magnitud adimensional es la razón entre dos unidades idénticas del SI, por tanto es siempre igual a uno (1). Sin embargo, al expresarse los valores de magnitudes adimensionales, la unidad uno (1) no es escrita.

#### MÚLTIPLOS Y SUBMÚLTIPLOS DE LAS UNIDADES DEL SI

Un conjunto de prefijos fue adoptado para uso con las unidades del SI, a fin de expresar los valores de magnitudes que son mucho mayores o mucho menores que la unidad SI usada sin un prefijo. Los prefijos SI están listados en la **Tabla B.4**. Ellos pueden ser usados con cualquier unidad de base y con las unidades derivadas con nombres especiales.

**Tabla B.4** – Múltiplos y submúltiplos del SI – Prefijos y símbolos.

<i>Factor</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>		<i>Factor</i>	<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>
10 <sup>1</sup>	Deca	Da		10 <sup>-1</sup>	deci	d
10 <sup>2</sup>	hecto	H		10 <sup>-2</sup>	centi	c
10 <sup>3</sup>	Kilo	K		10 <sup>-3</sup>	mili	m
10 <sup>6</sup>	mega	M		10 <sup>-6</sup>	micro	μ
10 <sup>9</sup>	Giga	G		10 <sup>-9</sup>	nano	n
10 <sup>12</sup>	Tera	T		10 <sup>-12</sup>	pico	p
10 <sup>15</sup>	Peta	P		10 <sup>-15</sup>	femto	f
10 <sup>18</sup>	Exa	E		10 <sup>-18</sup>	atto	a
10 <sup>21</sup>	Zetta	Z		10 <sup>-21</sup>	zepto	z
10 <sup>24</sup>	Yotta	Y		10 <sup>-24</sup>	yocto	y

Cuando los prefijos son usados, el nombre del prefijo y el de la unidad son combinados para formar una palabra única y, similarmente, el símbolo del prefijo y el símbolo de la unidad son escritos sin espacios, para formar un símbolo único que puede ser elevado a cualquier potencia. Por ejemplo, se puede escribir: quilómetro, km; microvolt, μV; femtosegundo, fs; 50 V/cm = 50 V(10<sup>-2</sup> m)<sup>-1</sup> = 5000 V/m.

Cuando las unidades de base y las unidades derivadas son usadas sin cualquier prefijo, el conjunto de unidades resultante es considerado coherente. El uso de un conjunto de unidades coherentes tiene ventajas técnicas. Sin embargo, el uso de los prefijos es conveniente porque él evita la necesidad de emplear factores de 10<sup>n</sup>, para expresar los valores de magnitudes muy grandes o muy pequeñas. Por ejemplo, el largo de una conexión química es más convenientemente expresado en nanómetros, nm, que en metros, m, y la distancia entre Londres y París es más convenientemente expresada en kilómetros, km, que en metros, m.

El kilogramo, kg, es una excepción, porque a pesar de que él sea una unidad de base el nombre ya incluye un prefijo, por razones históricas. Los múltiplos y los submúltiplos del kilogramo son escritos combinándose los prefijos con el gramo: luego, se escribe miligramo, mg, y no microkilogramo, μkg.

#### UNIDADES FUERA DEL SI

El SI es el único sistema de unidades que es reconocido universalmente, de modo que él tiene una ventaja distinta cuando se establece un diálogo internacional. Otras unidades, es decir, unidades no SI, son generalmente definidas en términos de unidades SI. El uso del SI, también, simplifica la enseñanza de la ciencia. Por todas esas razones el empleo de las unidades SI es recomendado en todos los campos de la ciencia y de la tecnología.

A pesar de que algunas unidades no SI sean todavía ampliamente usadas, otras, a ejemplo del minuto, de la hora y del día, como unidades de tiempo, serán siempre usadas porque ellas están arraigadas profundamente en la nuestra cultura. Otras son usadas, por razones históricas, para atender a las necesidades de grupos con intereses especiales, o porque no existe alternativa SI conveniente.

Los científicos deben tener la libertad para utilizar unidades no SI si ellos las consideran más adecuadas a su propósito. Sin embargo, cuando unidades no SI son utilizadas, el factor de conversión para el SI debe ser siempre incluido. Algunas unidades no SI están listadas en la **Tabla B.5**, con su factor de conversión para el SI.

**Tabla B.5 – Algunas unidades no SI.**

<i>Magnitud</i>	<i>Unidad</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Relación con el SI</i>
Tiempo	Minuto	min	1 min = 60 s
	Hora	h	1 h = 3600 s
	Día	d	1 d = 86400 s
Volumen	Litro	L	1 L = 1 dm <sup>3</sup>
Masa	Tonelada	t	1 t = 1000 kg
Energía	Electronvolt	eV	1 eV ~ 1,602 x 10 <sup>-19</sup> J
Presión	Bar	bar	1 bar = 100 kPa = 750,064 mm Hg = 0,987 atm
	milímetro de mercurio	mm Hg	1 mm Hg = 133,322 Pa = 10 <sup>-3</sup> bar = 10 <sup>-3</sup> atm 760 mm Hg = 1 atm = 1,013 bar = 101,324 kPa
Largo	Angstrom <sup>1</sup>	Å	1 Å = 10 <sup>-2</sup> m
	milla náutica	M	1 M = 1852 m
Fuerza	Dina	dyn	1 dyn = 10 <sup>-5</sup> N
Energía	Erg	erg	1 erg = 10 <sup>-7</sup> J

1El *Diccionario Houaiss de la Lengua Portuguesa* admite esa palabra escrita sin el símbolo sobre la "a".

Los símbolos de las unidades comienzan con letra mayúscula cuando se trata de nombre propio (por ejemplo, amper, A; kelvin, K; hertz, Hz; coulomb, C). En los otros casos ellos siempre comienzan con letra minúscula (por ejemplo, metro, m; segundo, s; mol, mol). El símbolo del litro es una excepción: la letra mayúscula es usada para evitar confusión entre a letra minúscula l y el número uno (1). El símbolo de la milla náutica es presentado aquí como M; sin

embargo no hay un acuerdo general sobre ningún símbolo para la milla náutica.

En la Tabla B.6 están listados otros ejemplos de unidades fuera del SI y de uso, además corriente, pero, que deben ser evitadas. Cuando mencionadas en un documento conviene indicar su equivalencia con la unidad SI.

**Tabla B.6 – Otros ejemplos de unidades fuera del SI.**

<i>Nombre</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Valor en unidad SI</i>	<i>Descripción</i>
Curie	Ci	1 Ci = 3,7 x 10 <sup>10</sup> Bq	Expresa la actividad de radionucléidos
Roentgen	R	1 R = 2,58 x 10 <sup>-4</sup> C/Kg	Expresa la exposición a las radiaciones X o y
Rad	Rad o rd	1 rad = 1 cGy = 10 <sup>-2</sup> Gy	Expresa la dosis absorbida de las radiaciones ionizantes
Rem	Rem	1 rem = 1 cSv = 10 <sup>-2</sup> Sv	Expresa equivalente de dosis en radioprotección
Torr	Torr	1 Torr = (101 325/760) Pa	Expresa presión, actualmente está en desuso
Atmosfera normal	Atm	1 Atm = 760 mm Hg = 1,013 bar = 101,324 kPa	Expresa la presión atmosférica estándar, actualmente está en desuso
cal	Cal	1 Cal = 4,18 J	Expresa la cantidad de calor (energía) necesaria para elevar de 14,5°C a 15,5°C la temperatura de 1 gramo de agua. actualmente por convención 1 Cal = 1000 cal = 1 Kcal

Los símbolos de las unidades son impresos en tipo romano (vertical), independientemente del tipo usado en lo restante del texto. Ellos son entidades matemáticas y no abreviaturas. Ellos nunca son seguidos por un punto (excepto en el final de una oración) ni por una s para formar el plural. Es obligatorio el uso de la forma correcta para los símbolos de las unidades, conforme ilustrado por los ejemplos presentados en la publicación completa del SI. Algunas veces los símbolos de las unidades pueden tener más de una letra. Ellos son escritos en letras minúsculas, excepto que la primera letra es mayúscula cuando el nombre es de una persona. Sin embargo, cuando el nombre de una unidad es escrito por extenso, debe comenzar con letra minúscula (excepto en el inicio de una oración), para distinguir el nombre de la unidad del nombre de la persona.

Al escribirse el valor de una magnitud, como el producto de un valor numérico y una unidad, ambos, el número y la unidad deben ser tratados por las reglas ordinarias del álgebra. Por ejemplo, la ecuación  $T = 293 \text{ K}$  puede ser escrita igualmente  $T/\text{K} = 293$ . Ese procedimiento es descrito como el uso del cálculo de magnitudes, o el álgebra de magnitudes. A veces esa notación es útil para identificar el encabezamiento de columnas de tablas, o la denominación de los ejes de gráficos, de modo que las entradas en la tabla o la identificación de los puntos sobre los ejes son simples números.

En la formación de productos o cocientes de unidades, se aplican las reglas normales del álgebra. En la formación de productos de unidades, se debe dejar un espacio entre las unidades (alternativamente se puede colocar un punto en el medio de la altura de la línea, como símbolo de multiplicación).

En la formación de números el marcador decimal puede ser o un punto o una coma, de acuerdo con las circunstancias apropiadas. Para documentos en la lengua inglesa es usual el punto, pero en Brasil y para muchas lenguas de Europa continental y en otros países, la coma es de uso más común.

Cuando un número tiene muchos dígitos es usual agrupar las cifras en bloques de tres, antes y después de la coma, para facilitar la lectura. Eso no es esencial, pero se hace frecuentemente, y generalmente es muy útil. Cuando esto se hace, los grupos de tres dígitos deben ser separados por apenas un espacio pequeño; no se debe usar ni un punto y ni una coma entre ellos. La inseguridad del valor numérico de una magnitud puede ser convenientemente expresada, explicitándose la inseguridad de los últimos dígitos significativos, entre paréntesis, después del número. Ejemplo: 123 456,789 0

Para informaciones adicionales, ver la página web del BIPM <http://www.bipm.org> o la Publicación completa del SI, 8ª edición, que está disponible en la página <http://www.bipm.org/en/si>.

B





# ANEXO C- PARA SOLVENTES CROMATOGRAFIA

**Tabla C. 1** – Solventes para cromatografía y sus propiedades.

Solvente	índice de Polaridad	Fórmula	Masa Molecular (g/mol)	índice de refracción $n_{20}^{20}$	Punto ebullición CO	Presión de vapor (mbar 20°C)	Constante Dieléctrica	Momento Dipolo
n-Heptano	-	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	100,21	1,388	98,4	48		
w-Hexano	0,0	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,18	1,375	68,9	160	1,9	0
Ciclohexano	0,0	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84,16	1,427	80,7	104	2,0	0
Isooctano	0,4	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	114,23	1,392	99,2		1,9	
Tetracloruro de carbono	1,7	CCl <sub>4</sub>	153,82	1,460	76,5	120	2,2	0
Tolueno	2,3	c <sub>6</sub> h <sub>5</sub> ch <sub>3</sub>	92,14	1,496	110,6	29	2,4	0,36
Cloroformo	4,4	CHCl <sub>3</sub>	119,38	1,446	61,7	210	4,8	1,01
Dicloruro de etileno	3,7	cich <sub>2</sub> ch <sub>2</sub> ci	98,96	1,445	83,5	87	10,6	
Cloruro de metileno	3,4	ch <sub>2</sub> ci <sub>2</sub>	84,93	1,424	40,0	453	9,1	1,60
1-Butanol	3,9	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> OH	74,12	1,399	117,2		17,8	1,66
Acetonitrilo	6,2	CH <sub>3</sub> CN	41,05	1,344	81,6		37,5	3,92
Alcohol isopropílico	4,3	CH <sub>3</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>	60,11	1,378	82,4	43	18,3	1,66
Acetato de etilo	4,3	ch <sub>3</sub> cooc <sub>2</sub> h <sub>5</sub>	88,12	1,372	77,1	97	6,0	1,78
Acetona	5,4	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	58,08	1,359	56,2	233	20,7	2,88
Etanol	5,2	c <sub>2</sub> h <sub>5</sub> oh	46,07	1,361	78,5	59	24,3	1,70
Dioxano	4,8	c <sub>4</sub> h <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	1,422	101,0	41	2,2	
Tetrahidrofurano	4,2	c <sub>4</sub> h <sub>8</sub> O	72,11	1,405	67,0	200	7,4	1,63
Metanol	6,6	CH <sub>3</sub> OH	32,04	1,329	65,0	128	32,6	1,70
Agua	9,0	h <sub>2</sub> O	18,01	1,333	100,0	23	80,2	1,85



# ANEXO D – ALCOHOLIMETRÍA

Tabla D.1 – Tabla Alcoholimetría (20 °C)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
0,0	0,0	998,20	0,999997
0,1	0,08	998,05	0,999846
0,2	0,16	997,90	0,999696
0,3	0,24	997,75	0,999546
0,4	0,32	997,59	0,999386
0,5	0,40	997,44	0,999235
0,6	0,47	997,29	0,999085
0,7	0,55	997,14	0,998935
0,8	0,63	996,99	0,998785
0,9	0,71	996,85	0,998644
1,0	0,79	996,70	0,998494
1,1	0,87	996,55	0,998344
1,2	0,95	996,40	0,998194
1,3	1,03	996,25	0,998043
1,4	1,11	996,11	0,997903
1,5	1,19	995,96	0,997753
1,6	1,27	995,81	0,997602
1,7	1,35	995,67	0,997462
1,8	1,43	995,52	0,997312
1,9	1,51	995,38	0,997172
2,0	1,59	995,23	0,997021
2,1	1,67	995,09	0,996881
2,2	1,75	994,94	0,996731
2,3	1,82	994,80	0,996591
2,4	1,90	994,66	0,996450
2,5	1,98	994,51	0,996300
2,6	2,06	994,37	0,996160
2,7	2,14	994,23	0,996020
2,8	2,22	994,09	0,995879
2,9	2,30	993,95	0,995739
3,0	2,38	993,81	0,995599
3,1	2,46	993,66	0,995449
3,2	2,54	993,52	0,995308
3,3	2,62	993,38	0,995168
3,4	2,70	993,24	0,995028
3,5	2,78	993,11	0,994898
3,6	2,86	992,97	0,994757
3,7	2,94	992,83	0,994617
3,8	3,02	992,69	0,994477
3,9	3,10	992,55	0,994337

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
4,0	3,18	992,41	0,994196
4,1	3,26	992,28	0,994066
4,2	3,34	992,14	0,993926
4,3	3,42	992,00	0,993786
4,4	3,50	991,87	0,993655
4,5	3,58	991,73	0,993515
4,6	3,66	991,59	0,993375
4,7	3,74	991,46	0,993245
4,8	3,82	991,32	0,993104
4,9	3,90	991,19	0,992974
5,0	3,98	991,06	0,992844
5,1	4,06	990,92	0,992704
5,2	4,14	990,79	0,992573
5,3	4,22	990,65	0,992433
5,4	4,30	990,52	0,992303
5,5	4,38	990,39	0,992173
5,6	4,46	990,26	0,992042
5,7	4,54	990,12	0,991902
5,8	4,62	989,99	0,991772
5,9	4,70	989,86	0,991642
6,0	4,78	989,73	0,991512
6,1	4,87	989,60	0,991381
6,2	4,95	989,47	0,991251
6,3	5,03	989,34	0,991121
6,4	5,11	989,21	0,990991
6,5	5,19	989,08	0,990860
6,6	5,27	988,95	0,990730
6,7	5,35	988,82	0,990600
6,8	5,43	988,69	0,990470
6,9	5,51	988,56	0,990339
7,0	5,59	988,43	0,990209
7,1	5,67	988,30	0,990079
7,2	5,75	988,18	0,989959
7,3	5,83	988,05	0,989828
7,4	5,91	987,92	0,989698
7,5	5,99	987,79	0,989568
7,6	6,07	987,67	0,989448
7,7	6,15	987,54	0,989318
7,8	6,23	987,42	0,989197
7,9	6,32	987,29	0,989067
8,0	6,40	987,16	0,988937
8,1	6,48	987,04	0,988817
8,2	6,56	986,91	0,988686
8,3	6,64	986,79	0,988566
8,4	6,72	986,66	0,988436
8,5	6,80	986,54	0,988316
8,6	6,88	986,42	0,988196
8,7	6,96	986,29	0,988065
8,8	7,04	986,17	0,987945
8,9	7,12	986,05	0,987825

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
9,0	7,20	985,92	0,987695
9,1	7,29	985,80	0,987574
9,2	7,37	985,68	0,987454
9,3	7,45	985,56	0,987334
9,4	7,53	985,44	0,987214
9,5	7,61	985,31	0,987084
9,6	7,69	985,19	0,986963
9,7	7,77	985,07	0,986843
9,8	7,85	984,95	0,986723
9,9	7,93	984,83	0,986603
10,0	8,01	984,71	0,986482
10,1	8,10	984,59	0,986362
10,2	8,18	984,47	0,986242
10,3	8,26	984,35	0,986122
10,4	8,34	984,23	0,986002
10,5	8,42	984,11	0,985881
10,6	8,50	983,99	0,985761
10,7	8,58	983,88	0,985651
10,8	8,66	983,76	0,985531
10,9	8,75	983,64	0,985411
11,0	8,83	983,52	0,985290
11,1	8,91	983,40	0,985170
11,2	8,99	983,29	0,985060
11,3	9,07	983,17	0,984940
11,4	9,15	983,05	0,984819
11,5	9,23	982,94	0,984709
11,6	9,32	982,82	0,984589
11,7	9,40	982,70	0,984469
11,8	9,48	982,59	0,984359
11,9	9,56	982,47	0,984238
12,0	9,64	982,35	0,984118
12,1	9,72	982,24	0,984008
12,2	9,80	982,12	0,983888
12,3	9,89	982,01	0,983778
12,4	9,97	981,89	0,983657
12,5	10,05	981,78	0,983547
12,6	10,13	981,67	0,983437
12,7	10,21	981,55	0,983317
12,8	10,29	981,44	0,983207
12,9	10,37	981,32	0,983086
13,0	10,46	981,21	0,982976
13,1	10,54	981,10	0,982866
13,2	10,62	980,98	0,982746
13,3	10,70	980,87	0,982636
13,4	10,78	980,76	0,982525
13,5	10,87	980,64	0,982405
13,6	10,95	980,53	0,982295
13,7	11,03	980,42	0,982185
13,8	11,11	980,31	0,982075
13,9	11,19	980,19	0,981954

D



Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
14,0	11,27	980,08	0,981844
14,1	11,36	979,97	0,981734
14,2	11,44	979,86	0,981624
14,3	11,52	979,75	0,981514
14,4	11,60	979,64	0,981403
14,5	11,68	979,52	0,981283
14,6	11,77	979,41	0,981173
14,7	11,85	979,30	0,981063
14,8	11,93	979,19	0,980953
14,9	12,01	979,08	0,980842
15,0	12,09	978,97	0,980732
15,1	12,17	978,86	0,980622
15,2	12,26	978,75	0,980512
15,3	12,34	978,64	0,980402
15,4	12,42	978,53	0,980291
15,5	12,50	978,42	0,980181
15,6	12,59	978,31	0,980071
15,7	12,67	978,20	0,979961
15,8	12,75	978,09	0,979851
15,9	12,83	977,98	0,979740
16,0	12,91	977,87	0,979630
16,1	13,00	977,76	0,979520
16,2	13,08	977,65	0,979410
16,3	13,16	977,55	0,979310
16,4	13,24	977,44	0,979199
16,5	13,32	977,33	0,979089
16,6	13,41	977,22	0,978979
16,7	13,49	977,11	0,978869
16,8	13,57	977,00	0,978759
16,9	13,65	976,89	0,978648
17,0	13,74	976,79	0,978548
17,1	13,82	976,68	0,978438
17,2	13,90	976,57	0,978328
17,3	13,98	976,46	0,978218
17,4	14,07	976,35	0,978107
17,5	14,15	976,25	0,978007
17,6	14,23	976,14	0,977897
17,7	14,31	976,03	0,977787
17,8	14,40	975,92	0,977677
17,9	14,48	975,81	0,977566
18,0	14,56	975,71	0,977466
18,1	14,64	975,60	0,977356
18,2	14,73	975,49	0,977246
18,3	14,81	975,38	0,977136
18,4	14,89	975,28	0,977036
18,5	14,97	975,17	0,976925
18,6	15,06	975,06	0,976815
18,7	15,14	974,95	0,976705
18,8	15,22	974,85	0,976605
18,9	15,30	974,74	0,976495

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
19,0	15,39	974,63	0,976384
19,1	15,47	974,52	0,976274
19,2	15,55	974,42	0,976174
19,3	15,63	974,31	0,976064
19,4	15,72	974,20	0,975954
19,5	15,80	974,09	0,975843
19,6	15,88	973,99	0,975743
19,7	15,97	973,88	0,975633
19,8	16,05	973,77	0,975523
19,9	16,13	973,66	0,975413
20,0	16,21	973,56	0,975312
20,1	16,30	973,45	0,975202
20,2	16,38	973,34	0,975092
20,3	16,46	973,24	0,974992
20,4	16,55	973,13	0,974882
20,5	16,63	973,02	0,974771
20,6	16,71	972,91	0,974661
20,7	16,79	972,80	0,974551
20,8	16,88	972,70	0,974451
20,9	16,96	972,59	0,974341
21,0	17,04	972,48	0,974230
21,1	17,13	972,37	0,974120
21,2	17,21	972,26	0,974010
21,3	17,29	972,16	0,973910
21,4	17,38	972,05	0,973800
21,5	17,46	971,94	0,973689
21,6	17,54	971,83	0,973579
21,7	17,63	971,73	0,973479
21,8	17,71	971,62	0,973369
21,9	17,79	971,51	0,973259
22,0	17,87	971,40	0,973149
22,1	17,96	971,29	0,973038
22,2	18,04	971,18	0,972928
22,3	18,12	971,08	0,972828
22,4	18,21	970,97	0,972718
22,5	18,29	970,86	0,972608
22,6	18,37	970,75	0,972497
22,7	18,46	970,64	0,972387
22,8	18,54	970,53	0,972277
22,9	18,62	970,42	0,972167
23,0	18,71	970,31	0,972057
23,1	18,79	970,20	0,971946
23,2	18,87	970,09	0,971836
23,3	18,96	969,98	0,971726
23,4	19,04	969,87	0,971616
23,5	19,13	969,76	0,971506
23,6	19,21	969,65	0,971395
23,7	19,29	969,54	0,971285
23,8	19,38	969,43	0,971175
23,9	19,46	969,32	0,971065

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
24,0	19,54	969,21	0,970955
24,1	19,63	969,10	0,970844
24,2	19,71	968,99	0,970734
24,3	19,79	968,88	0,970624
24,4	19,88	968,77	0,970514
24,5	19,96	968,66	0,970404
24,6	20,05	968,55	0,970293
24,7	20,13	968,43	0,970173
24,8	20,21	968,32	0,970063
24,9	20,30	968,21	0,969953
25,0	20,38	968,10	0,969843
25,1	20,47	967,99	0,969732
25,2	20,55	967,87	0,969612
25,3	20,63	967,76	0,969502
25,4	20,72	967,65	0,969392
25,5	20,80	967,53	0,969272
25,6	20,89	967,42	0,969161
25,7	20,97	967,31	0,969051
25,8	21,05	967,19	0,968931
25,9	21,14	967,08	0,968821
26,0	21,22	966,97	0,968711
26,1	21,31	966,85	0,968590
26,2	21,39	966,74	0,968480
26,3	21,47	966,62	0,968360
26,4	21,56	966,51	0,968250
26,5	21,64	966,39	0,968130
26,6	21,73	966,28	0,968019
26,7	21,81	966,16	0,967899
26,8	21,90	966,05	0,967789
26,9	21,98	965,93	0,967669
27,0	22,06	965,81	0,967548
27,1	22,15	965,70	0,967438
27,2	22,23	965,58	0,967318
27,3	22,32	965,46	0,967198
27,4	22,40	965,35	0,967088
27,5	22,49	965,23	0,966967
27,6	22,57	965,11	0,966847
27,7	22,65	964,99	0,966727
27,8	22,74	964,88	0,966617
27,9	22,82	964,76	0,966497
28,0	22,91	964,64	0,966376
28,1	22,99	964,52	0,966256
28,2	23,08	964,40	0,966136
28,3	23,16	964,28	0,966016
28,4	23,25	964,16	0,965895
28,5	23,33	964,04	0,965775
28,6	23,42	963,92	0,965655
28,7	23,50	963,80	0,965535
28,8	23,59	963,68	0,965415
28,9	23,67	963,56	0,965294

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
29,0	23,76	963,44	0,965174
29,1	23,84	963,32	0,965054
29,2	23,93	963,20	0,964934
29,3	24,01	963,07	0,964804
29,4	24,10	962,95	0,964683
29,5	24,18	962,83	0,964563
29,6	24,27	962,71	0,964443
29,7	24,35	962,58	0,964313
29,8	24,44	962,46	0,964192
29,9	24,52	962,33	0,964062
30,0	24,61	962,21	0,963942
30,1	24,69	962,09	0,963822
30,2	24,78	961,96	0,963692
30,3	24,86	961,84	0,963571
30,4	24,95	961,71	0,963441
30,5	25,03	961,59	0,963321
30,6	25,12	961,46	0,963191
30,7	25,20	961,33	0,963060
30,8	25,29	961,21	0,962940
30,9	25,38	961,08	0,962810
31,0	25,46	960,95	0,962680
31,1	25,55	960,82	0,962549
31,2	25,63	960,70	0,962429
31,3	25,72	960,57	0,962299
31,4	25,80	960,44	0,962169
31,5	25,89	960,31	0,962039
31,6	25,97	960,18	0,961908
31,7	26,06	960,05	0,961778
31,8	26,15	959,92	0,961648
31,9	26,23	959,79	0,961518
32,0	26,32	959,66	0,961387
32,1	26,40	959,53	0,961257
32,2	26,49	959,40	0,961127
32,3	26,57	959,27	0,960997
32,4	26,66	959,14	0,960866
32,5	26,75	959,01	0,960736
32,6	26,83	958,87	0,960596
32,7	26,92	958,74	0,960466
32,8	27,00	958,61	0,960335
32,9	27,09	958,47	0,960195
33,0	27,18	958,34	0,960065
33,1	27,26	958,20	0,959925
33,2	27,35	958,07	0,959795
33,3	27,44	957,94	0,959664
33,4	27,52	957,80	0,959524
33,5	27,61	957,66	0,959384
33,6	27,69	957,53	0,959254
33,7	27,78	957,39	0,959113
33,8	27,87	957,26	0,958983
33,9	27,95	957,12	0,958843

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
34,0	28,04	956,98	0,958703
34,1	28,13	956,84	0,958562
34,2	28,21	956,70	0,958422
34,3	28,30	956,57	0,958292
34,4	28,39	956,43	0,958152
34,5	28,47	956,29	0,958011
34,6	28,56	956,15	0,957871
34,7	28,65	956,01	0,957731
34,8	28,73	955,87	0,957591
34,9	28,82	955,73	0,957450
35,0	28,91	955,59	0,957310
35,1	28,99	955,45	0,957170
35,2	29,08	955,30	0,957020
35,3	29,17	955,16	0,956879
35,4	29,26	955,02	0,956739
35,5	29,34	954,88	0,956599
35,6	29,43	954,73	0,956449
35,7	29,52	954,59	0,956308
35,8	29,60	954,44	0,956158
35,9	29,69	954,30	0,956018
36,0	29,78	954,15	0,955867
36,1	29,87	954,01	0,955727
36,2	29,95	953,86	0,955577
36,3	30,04	953,72	0,955437
36,4	30,13	953,57	0,955286
36,5	30,22	953,42	0,955136
36,6	30,30	953,28	0,954996
36,7	30,39	953,13	0,954846
36,8	30,48	952,98	0,954695
36,9	30,56	952,83	0,954545
37,0	30,65	952,69	0,954405
37,1	30,74	952,54	0,954255
37,2	30,83	952,39	0,954104
37,3	30,92	952,24	0,953954
37,4	31,00	952,09	0,953804
37,5	31,09	951,94	0,953653
37,6	31,18	951,79	0,953503
37,7	31,27	951,63	0,953343
37,8	31,35	951,48	0,953193
37,9	31,44	951,33	0,953042
38,0	31,53	951,18	0,952892
38,1	31,62	951,02	0,952732
38,2	31,71	950,87	0,952582
38,3	31,79	950,72	0,952431
38,4	31,88	950,56	0,952271
38,5	31,97	950,41	0,952121
38,6	32,06	950,25	0,951960
38,7	32,15	950,10	0,951810
38,8	32,24	949,94	0,951650
38,9	32,32	949,79	0,951500



Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
39,0	32,41	949,63	0,951339
39,1	32,50	949,47	0,951179
39,2	32,59	949,32	0,951029
39,3	32,68	949,16	0,950868
39,4	32,77	949,00	0,950708
39,5	32,86	948,84	0,950548
39,6	32,94	948,68	0,950388
39,7	33,03	948,52	0,950227
39,8	33,12	948,37	0,950077
39,9	33,21	948,21	0,949917
40,0	33,30	948,05	0,949756
40,1	33,39	947,88	0,949586
40,2	33,48	947,72	0,949426
40,3	33,57	947,56	0,949266
40,4	33,66	947,40	0,949105
40,5	33,74	947,24	0,948945
40,6	33,83	947,08	0,948785
40,7	33,92	946,91	0,948614
40,8	34,01	946,75	0,948454
40,9	34,10	946,58	0,948284
41,0	34,19	946,42	0,948124
41,1	34,28	946,26	0,947963
41,2	34,37	946,09	0,947793
41,3	34,46	945,93	0,947633
41,4	34,55	945,76	0,947462
41,5	34,64	945,59	0,947292
41,6	34,73	945,43	0,947132
41,7	34,82	945,26	0,946961
41,8	34,91	945,09	0,946791
41,9	35,00	944,93	0,946631
42,0	35,09	944,76	0,946461
42,1	35,18	944,59	0,946290
42,2	35,27	944,42	0,946120
42,3	35,36	944,25	0,945950
42,4	35,45	944,08	0,945779
42,5	35,54	943,91	0,945609
42,6	35,63	943,74	0,945439
42,7	35,72	943,57	0,945268
42,8	35,81	943,40	0,945098
42,9	35,90	943,23	0,944928
43,0	35,99	943,06	0,944758
43,1	36,08	942,88	0,944577
43,2	36,17	942,71	0,944407
43,3	36,26	942,54	0,944237
43,4	36,35	942,37	0,944066
43,5	36,44	942,19	0,943886
43,6	36,53	942,02	0,943716
43,7	36,62	941,84	0,943535
43,8	36,71	941,67	0,943365
43,9	36,80	941,49	0,943185

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
44,0	36,89	941,32	0,943014
44,1	36,98	941,14	0,942834
44,2	37,07	940,97	0,942664
44,3	37,16	940,79	0,942483
44,4	37,25	940,61	0,942303
44,5	37,35	940,43	0,942123
44,6	37,44	940,26	0,941952
44,7	37,53	940,08	0,941772
44,8	37,62	939,90	0,941592
44,9	37,71	939,72	0,941411
45,0	37,80	939,54	0,941231
45,1	37,89	939,36	0,941051
45,2	37,98	939,18	0,940871
45,3	38,08	939,00	0,940690
45,4	38,17	938,82	0,940510
45,5	38,26	938,64	0,940330
45,6	38,35	938,46	0,940149
45,7	38,44	938,28	0,939969
45,8	38,53	938,10	0,939789
45,9	38,62	937,91	0,939598
46,0	38,72	937,73	0,939418
46,1	38,81	937,55	0,939238
46,2	38,90	937,36	0,939047
46,3	38,99	937,18	0,938867
46,4	39,08	937,00	0,938687
46,5	39,18	936,81	0,938496
46,6	39,27	936,63	0,938316
46,7	39,36	936,44	0,938126
46,8	39,45	936,26	0,937945
46,9	39,54	936,07	0,937755
47,0	39,64	935,88	0,937565
47,1	39,73	935,70	0,937384
47,2	39,82	935,51	0,937194
47,3	39,91	935,32	0,937004
47,4	40,00	935,14	0,936823
47,5	40,10	934,95	0,936633
47,6	40,19	934,76	0,936443
47,7	40,28	934,57	0,936252
47,8	40,37	934,38	0,936062
47,9	40,47	934,19	0,935872
48,0	40,56	934,00	0,935681
48,1	40,65	933,81	0,935491
48,2	40,75	933,62	0,935301
48,3	40,84	933,43	0,935110
48,4	40,93	933,24	0,934920
48,5	41,02	933,05	0,934729
48,6	41,12	932,86	0,934539
48,7	41,21	932,67	0,934349
48,8	41,30	932,47	0,934148
48,9	41,40	932,28	0,933958

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
49,0	41,49	932,09	0,933768
49,1	41,58	931,90	0,933577
49,2	41,68	931,70	0,933377
49,3	41,77	931,51	0,933187
49,4	41,86	931,32	0,932996
49,5	41,96	931,13	0,932806
49,6	42,05	930,92	0,932596
49,7	42,14	930,73	0,932405
49,8	42,24	930,53	0,932205
49,9	42,33	930,34	0,932015
50,0	42,43	930,14	0,931814
50,1	42,52	929,95	0,931624
50,2	42,61	929,75	0,931424
50,3	42,71	929,55	0,931223
50,4	42,80	929,35	0,931023
50,5	42,90	929,16	0,930832
50,6	42,99	928,96	0,930632
50,7	43,08	928,76	0,930432
50,8	43,18	928,56	0,930231
50,9	43,27	928,36	0,930031
51,0	43,37	928,16	0,929831
51,1	43,46	927,96	0,929630
51,2	43,56	927,77	0,929440
51,3	43,65	927,57	0,929240
51,4	43,74	927,36	0,929029
51,5	43,84	927,16	0,928829
51,6	43,93	926,96	0,928629
51,7	44,03	926,76	0,928428
51,8	44,12	926,56	0,928228
51,9	44,22	926,36	0,928027
52,0	44,31	926,16	0,927827
52,1	44,41	925,95	0,927617
52,2	44,50	925,75	0,927416
52,3	44,60	925,55	0,927216
52,4	44,69	925,35	0,927016
52,5	44,79	925,14	0,926805
52,6	44,88	924,94	0,926605
52,7	44,98	924,73	0,926395
52,8	45,07	924,53	0,926194
52,9	45,17	924,32	0,925984
53,0	45,26	924,12	0,925783
53,1	45,36	923,91	0,925573
53,2	45,46	923,71	0,925373
53,3	45,55	923,50	0,925162
53,4	45,65	923,30	0,924962
53,5	45,74	923,09	0,924752
53,6	45,84	922,88	0,924541
53,7	45,93	922,68	0,924341
53,8	46,03	922,47	0,924130
53,9	46,13	922,26	0,923920

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
54,0	46,22	922,06	0,923720
54,1	46,32	921,85	0,923509
54,2	46,41	921,64	0,923299
54,3	46,51	921,43	0,923089
54,4	46,61	921,22	0,922878
54,5	46,70	921,01	0,922668
54,6	46,80	920,80	0,922457
54,7	46,90	920,59	0,922247
54,8	46,99	920,38	0,922037
54,9	47,09	920,17	0,921826
55,0	47,18	919,96	0,921616
55,1	47,28	919,75	0,921406
55,2	47,38	919,54	0,921195
55,3	47,47	919,33	0,920985
55,4	47,57	919,12	0,920774
55,5	47,67	918,91	0,920564
55,6	47,77	918,69	0,920344
55,7	47,86	918,48	0,920133
55,8	47,96	918,27	0,919923
55,9	48,06	918,06	0,919713
56,0	48,15	917,84	0,919492
56,1	48,25	917,63	0,919282
56,2	48,35	917,42	0,919071
56,3	48,45	917,22	0,918871
56,4	48,54	916,99	0,918641
56,5	48,64	916,77	0,918420
56,6	48,74	916,56	0,918210
56,7	48,84	916,35	0,917999
56,8	48,94	916,13	0,917779
56,9	49,03	915,91	0,917559
57,0	49,13	915,70	0,917348
57,1	49,23	915,48	0,917128
57,2	49,32	915,27	0,916917
57,3	49,42	915,05	0,916697
57,4	49,52	914,83	0,916477
57,5	49,62	914,62	0,916266
57,6	49,72	914,40	0,916046
57,7	49,81	914,18	0,915826
57,8	49,91	913,97	0,915615
57,9	50,01	913,75	0,915395
58,0	50,11	913,53	0,915174
58,1	50,21	913,31	0,914954
58,2	50,31	913,09	0,914734
58,3	50,40	912,87	0,914513
58,4	50,50	912,65	0,914293
58,5	50,60	912,43	0,914072
58,6	50,70	912,22	0,913862
58,7	50,80	912,00	0,913642
58,8	50,90	911,78	0,913421
58,9	51,00	911,55	0,913191

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
59,0	51,10	911,33	0,912970
59,1	51,19	911,11	0,912750
59,2	51,29	910,89	0,912530
59,3	51,39	910,67	0,912309
59,4	51,49	910,45	0,912089
59,5	51,59	910,23	0,911868
59,6	51,69	910,01	0,911648
59,7	51,79	909,78	0,911418
59,8	51,89	909,56	0,911197
59,9	51,99	909,34	0,910977
60,0	52,09	909,11	0,910746
60,1	52,19	908,89	0,910526
60,2	52,29	908,67	0,910306
60,3	52,39	908,44	0,910075
60,4	52,49	908,22	0,909855
60,5	52,59	908,00	0,909634
60,6	52,69	907,77	0,909404
60,7	52,79	907,55	0,909184
60,8	52,89	907,32	0,908953
60,9	52,99	907,10	0,908733
61,0	53,09	906,87	0,908502
61,1	53,19	906,64	0,908272
61,2	53,29	906,42	0,908052
61,3	53,39	906,19	0,907821
61,4	53,49	905,97	0,907601
61,5	53,59	905,74	0,907370
61,6	53,69	905,51	0,907140
61,7	53,79	905,29	0,906920
61,8	53,89	905,06	0,906689
61,9	53,99	904,83	0,906459
62,0	54,09	904,60	0,906228
62,1	54,19	904,37	0,905998
62,2	54,30	904,15	0,905777
62,3	54,40	903,92	0,905547
62,4	54,50	903,69	0,905317
62,5	54,60	903,46	0,905086
62,6	54,70	903,23	0,904856
62,7	54,80	903,00	0,904625
62,8	54,90	902,77	0,904395
62,9	55,00	902,54	0,904165
63,0	55,11	902,31	0,903934
63,1	55,21	902,08	0,903704
63,2	55,31	901,85	0,903473
63,3	55,41	901,62	0,903243
63,4	55,51	901,39	0,903013
63,5	55,61	901,15	0,902772
63,6	55,72	900,92	0,902542
63,7	55,82	900,69	0,902311
63,8	55,92	900,46	0,902081
63,9	56,02	900,23	0,901850

D



Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
64,0	56,12	899,99	0,901610
64,1	56,23	899,76	0,901380
64,2	56,33	899,53	0,901149
64,3	56,43	899,29	0,900909
64,4	56,53	899,06	0,900678
64,5	56,64	898,83	0,900448
64,6	56,74	898,59	0,900207
64,7	56,84	898,36	0,899977
64,8	56,94	898,12	0,899737
64,9	57,05	897,89	0,899506
65,0	57,15	897,65	0,899266
65,1	57,25	897,42	0,899035
65,2	57,36	897,18	0,898795
65,3	57,46	896,94	0,898554
65,4	57,56	896,71	0,898324
65,5	57,67	896,47	0,898084
65,6	57,77	896,23	0,897843
65,7	57,87	896,00	0,897613
65,8	57,98	895,76	0,897372
65,9	58,08	895,52	0,897132
66,0	58,18	895,28	0,896892
66,1	58,29	895,05	0,896661
66,2	58,39	894,81	0,896421
66,3	58,49	894,57	0,896180
66,4	58,60	894,33	0,895940
66,5	58,70	894,09	0,895699
66,6	58,81	893,85	0,895459
66,7	58,91	893,61	0,895218
66,8	59,01	893,37	0,894978
66,9	59,12	893,13	0,894738
67,0	59,22	892,89	0,894497
67,1	59,33	892,65	0,894257
67,2	59,43	892,41	0,894016
67,3	59,54	892,17	0,893776
67,4	59,64	891,93	0,893535
67,5	59,74	891,69	0,893295
67,6	59,85	891,45	0,893055
67,7	59,95	891,20	0,892804
67,8	60,06	890,96	0,892564
67,9	60,16	890,72	0,892323
68,0	60,27	890,48	0,892083
68,1	60,37	890,23	0,891832
68,2	60,48	889,99	0,891592
68,3	60,58	889,75	0,891352
68,4	60,69	889,50	0,891101
68,5	60,80	889,26	0,890861
68,6	60,90	889,01	0,890610
68,7	61,01	888,77	0,890370
68,8	61,11	888,52	0,890119
68,9	61,22	888,28	0,889879

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
69,0	61,32	888,03	0,889628
69,1	61,43	887,79	0,889388
69,2	61,54	887,54	0,889138
69,3	61,64	887,29	0,888887
69,4	61,75	887,05	0,888647
69,5	61,85	886,80	0,888396
69,6	61,96	886,55	0,888146
69,7	62,07	886,31	0,887905
69,8	62,17	886,06	0,887655
69,9	62,28	885,81	0,887404
70,0	62,39	885,56	0,887154
70,1	62,49	885,31	0,886904
70,2	62,60	885,06	0,886653
70,3	62,71	884,82	0,886413
70,4	62,81	884,57	0,886162
70,5	62,92	884,32	0,885912
70,6	63,03	884,07	0,885661
70,7	63,13	883,82	0,885411
70,8	63,24	883,57	0,885160
70,9	63,35	883,32	0,884910
71,0	63,46	883,06	0,884650
71,1	63,56	882,81	0,884399
71,2	63,67	882,56	0,884149
71,3	63,78	882,31	0,883898
71,4	63,89	882,06	0,883648
71,5	63,99	881,81	0,883397
71,6	64,10	881,55	0,883137
71,7	64,21	881,30	0,882886
71,8	64,32	881,05	0,882636
71,9	64,43	880,79	0,882375
72,0	64,53	880,54	0,882125
72,1	64,64	880,29	0,881875
72,2	64,75	880,03	0,881614
72,3	64,86	879,78	0,881364
72,4	64,97	879,52	0,881103
72,5	65,08	879,27	0,880853
72,6	65,19	879,01	0,880592
72,7	65,29	878,75	0,880332
72,8	65,40	878,50	0,880081
72,9	65,51	878,24	0,879821
73,0	65,62	877,99	0,879570
73,1	65,73	877,73	0,879310
73,2	65,84	877,47	0,879049
73,3	65,95	877,21	0,878789
73,4	66,06	876,96	0,878539
73,5	66,17	876,70	0,878278
73,6	66,28	876,44	0,878018
73,7	66,39	876,18	0,877757
73,8	66,50	875,92	0,877497
73,9	66,61	875,66	0,877236

D

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
74,0	66,72	875,40	0,876976
74,1	66,83	875,14	0,876715
74,2	66,94	874,88	0,876455
74,3	67,05	874,62	0,876194
74,4	67,16	874,36	0,875934
74,5	67,27	874,10	0,875673
74,6	67,38	873,84	0,875413
74,7	67,49	873,58	0,875152
74,8	67,60	873,32	0,874892
74,9	67,71	873,06	0,874632
75,0	67,82	872,79	0,874361
75,1	67,93	872,53	0,874101
75,2	68,04	872,27	0,873840
75,3	68,15	872,00	0,873570
75,4	68,26	871,74	0,873309
75,5	68,38	871,48	0,873049
75,6	68,49	871,21	0,872778
75,7	68,60	870,95	0,872518
75,8	68,71	870,68	0,872247
75,9	68,82	870,42	0,871987
76,0	68,93	870,15	0,871716
76,1	69,04	869,89	0,871456
76,2	69,16	869,62	0,871185
76,3	69,27	869,35	0,870915
76,4	69,38	869,09	0,870654
76,5	69,49	868,82	0,870384
76,6	69,61	868,55	0,870113
76,7	69,72	868,28	0,869843
76,8	69,83	868,02	0,869582
76,9	69,94	867,75	0,869312
77,0	70,06	867,48	0,869041
77,1	70,17	867,21	0,868771
77,2	70,28	866,94	0,868500
77,3	70,39	866,67	0,868230
77,4	70,51	866,40	0,867960
77,5	70,62	866,13	0,867689
77,6	70,73	865,86	0,867419
77,7	70,85	865,59	0,867148
77,8	70,96	865,32	0,866878
77,9	71,07	865,05	0,866607
78,0	71,19	864,78	0,866337
78,1	71,30	864,50	0,866056
78,2	71,41	864,23	0,865786
78,3	71,53	863,96	0,865515
78,4	71,64	863,69	0,865245
78,5	71,76	863,41	0,864964
78,6	71,87	863,14	0,864694
78,7	71,98	862,86	0,864413
78,8	72,10	862,59	0,864143
78,9	72,21	862,31	0,863862

Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
79,0	72,33	862,04	0,863592
79,1	72,44	861,76	0,863311
79,2	72,56	861,49	0,863041
79,3	72,67	861,21	0,862760
79,4	72,79	860,94	0,862490
79,5	72,90	860,66	0,862209
79,6	73,02	860,38	0,861929
79,7	73,13	860,10	0,861648
79,8	73,25	859,83	0,861378
79,9	73,36	859,55	0,861097
80,0	73,48	859,27	0,860817
80,1	73,60	858,99	0,860536
80,2	73,71	858,71	0,860256
80,3	73,83	858,43	0,859975
80,4	73,94	858,15	0,859695
80,5	74,06	857,87	0,859414
80,6	74,18	857,59	0,859134
80,7	74,29	857,31	0,858853
80,8	74,41	857,03	0,858573
80,9	74,53	856,75	0,858292
81,0	74,64	856,46	0,858002
81,1	74,76	856,18	0,857721
81,2	74,88	855,90	0,857441
81,3	74,99	855,62	0,857160
81,4	75,11	855,33	0,856870
81,5	75,23	855,05	0,856589
81,6	75,34	854,76	0,856299
81,7	75,46	854,48	0,856018
81,8	75,58	854,19	0,855728
81,9	75,70	853,91	0,855447
82,0	75,82	853,62	0,855157
82,1	75,93	853,34	0,854876
82,2	76,05	853,05	0,854585
82,3	76,17	852,76	0,854295
82,4	76,29	852,48	0,854014
82,5	76,41	852,19	0,853724
82,6	76,52	851,90	0,853433
82,7	76,64	851,61	0,853143
82,8	76,76	851,32	0,852852
82,9	76,88	851,03	0,852562
83,0	77,00	850,74	0,852271
83,1	77,12	850,45	0,851981
83,2	77,24	850,16	0,851690
83,3	77,36	849,87	0,851400
83,4	77,48	849,58	0,851109
83,5	77,60	849,29	0,850819
83,6	77,72	848,99	0,850518
83,7	77,84	848,70	0,850228
83,8	77,96	848,41	0,849937
83,9	78,08	848,11	0,849637

Tabla D.1 (continuación)

<i>% v/v</i>	<i>% m/m</i>	<i><math>\rho_{20}</math> (Kg/m<sup>3</sup>)</i>	<i>d (g/cm<sup>3</sup>)</i>
84,0	78,20	847,82	0,849346
84,1	78,32	847,53	0,849056
84,2	78,44	847,23	0,848755
84,3	78,56	846,93	0,848454
84,4	78,68	846,64	0,848164
84,5	78,80	846,34	0,847863
84,6	78,92	846,05	0,847573
84,7	79,04	845,75	0,847272
84,8	79,16	845,45	0,846972
84,9	79,28	845,15	0,846671
85,0	79,40	844,85	0,846371
85,1	79,53	844,55	0,846070
85,2	79,65	844,25	0,845770
85,3	79,77	843,95	0,845469
85,4	79,89	843,65	0,845169
85,5	80,01	843,35	0,844868
85,6	80,14	843,05	0,844567
85,7	80,26	842,75	0,844267
85,8	80,38	842,44	0,843956
85,9	80,50	842,14	0,843656
86,0	80,63	841,84	0,843355
86,1	80,75	841,53	0,843045
86,2	80,87	841,23	0,842744
86,3	81,00	840,92	0,842434
86,4	81,12	840,62	0,842133
86,5	81,24	840,31	0,841823
86,6	81,37	840,00	0,841512
86,7	81,49	839,70	0,841211
86,8	81,61	839,39	0,840901
86,9	81,74	839,08	0,840590
87,0	81,86	838,77	0,840280
87,1	81,99	838,46	0,839969
87,2	82,11	838,15	0,839659
87,3	82,24	837,84	0,839348
87,4	82,36	837,52	0,839028
87,5	82,49	837,21	0,838717
87,6	82,61	836,90	0,838406
87,7	82,74	836,59	0,838096
87,8	82,86	836,27	0,837775
87,9	82,99	835,96	0,837465
88,0	83,11	835,64	0,837144
88,1	83,24	835,32	0,836824
88,2	83,37	835,01	0,836513
88,3	83,49	834,69	0,836192
88,4	83,62	834,37	0,835872
88,5	83,74	834,05	0,835551
88,6	83,87	833,73	0,835231
88,7	84,00	833,41	0,834910
88,8	84,13	833,09	0,834590
88,9	84,25	832,77	0,834269



Tabla D.1 (continuación)

% v/v	% m/m	$\rho_{20}$ (Kg/m <sup>3</sup> )	$d$ (g/cm <sup>3</sup> )
89,0	84,38	832,45	0,833948
89,1	84,51	832,12	0,833618
89,2	84,64	831,80	0,833297
89,3	84,76	831,48	0,832977
89,4	84,89	831,15	0,832646
89,5	85,02	830,82	0,832315
89,6	85,15	830,50	0,831995
89,7	85,28	830,17	0,831664
89,8	85,41	829,84	0,831334
89,9	85,54	829,51	0,831003
90,0	85,66	829,18	0,830673
90,1	85,79	828,85	0,830342
90,2	85,92	828,52	0,830011
90,3	86,05	828,19	0,829681
90,4	86,18	827,85	0,829340
90,5	86,31	827,52	0,829010
90,6	86,44	827,18	0,828669
90,7	86,57	826,85	0,828338
90,8	86,71	826,51	0,827998
90,9	86,84	826,17	0,827657
91,0	86,97	825,83	0,827316
91,1	87,10	825,49	0,826976
91,2	87,23	825,15	0,826635
91,3	87,36	824,81	0,826295
91,4	87,49	824,47	0,825954
91,5	87,63	824,13	0,825613
91,6	87,76	823,78	0,825263
91,7	87,90	823,44	0,824922
91,8	88,02	823,09	0,824572
91,9	88,16	822,74	0,824221
92,0	88,29	822,39	0,823870
92,1	88,42	822,04	0,823520
92,2	88,56	821,69	0,823169
92,3	88,69	821,34	0,822818
92,4	88,83	820,99	0,822468
92,5	88,96	820,63	0,822107
92,6	89,10	820,28	0,821757
92,7	89,23	819,92	0,821396
92,8	89,37	819,57	0,821045
92,9	89,50	819,21	0,820685
93,0	89,64	818,85	0,820324
93,1	89,77	818,49	0,819963
93,2	89,91	818,12	0,819593
93,3	90,05	817,76	0,819232
93,4	90,18	817,40	0,818871
93,5	90,32	817,03	0,818501
93,6	90,46	816,66	0,818130
93,7	90,59	816,30	0,817769
93,8	90,73	815,93	0,817399
93,9	90,87	815,55	0,817018

D

Tabla D.1 (continuación)

<i>% v/v</i>	<i>% m/m</i>	<i>ρ<sub>20</sub> (Kg/m<sup>3</sup>)</i>	<i>d (g/cm<sup>3</sup>)</i>
94,0	91,01	815,18	0,816647
94,1	91,15	814,81	0,816277
94,2	91,29	814,43	0,815896
94,3	91,43	814,06	0,815525
94,4	91,56	813,68	0,815145
94,5	91,70	813,30	0,814764
94,6	91,84	812,92	0,814383
94,7	91,98	812,54	0,814003
94,8	92,13	812,15	0,813612
94,9	92,27	811,77	0,813231
95,0	92,41	811,38	0,812840
95,1	92,55	810,99	0,812450
95,2	92,69	810,60	0,812059
95,3	92,83	810,21	0,811668
95,4	92,98	809,82	0,811278
95,5	93,12	809,42	0,810877
95,6	93,26	809,02	0,810476
95,7	93,41	808,63	0,810086
95,8	93,55	808,23	0,809685
95,9	93,69	807,82	0,809274
96,0	93,84	807,42	0,808873
96,1	93,98	807,01	0,808463
96,2	94,13	806,61	0,808062
96,3	94,27	806,20	0,807651
96,4	94,42	805,78	0,807230
96,5	94,57	805,37	0,806820
96,6	94,71	804,96	0,806409
96,7	94,86	804,54	0,805988
96,8	95,01	804,12	0,805567
96,9	95,16	803,70	0,805147
97,0	95,31	803,27	0,804716
97,1	95,45	802,85	0,804295
97,2	95,60	802,42	0,803864
97,3	95,75	801,99	0,803434
97,4	95,90	801,55	0,802993
97,5	96,05	801,12	0,802562
97,6	96,21	800,68	0,802121
97,7	96,36	800,24	0,801680
97,8	96,51	799,80	0,801240
97,9	96,66	799,35	0,800789
98,0	96,81	798,90	0,800338
98,1	96,97	798,45	0,799887
98,2	97,12	798,00	0,799436
98,3	97,28	797,54	0,798976
98,4	97,43	797,08	0,798515
98,5	97,59	796,62	0,798054
98,6	97,74	796,15	0,797583
98,7	97,90	795,68	0,797112
98,8	98,06	795,21	0,796641
98,9	98,22	794,73	0,796161

Tabla D.1 (continuación)

<i>% v/v</i>	<i>% m/m</i>	<i><math>\rho_{20}</math> (Kg/m<sup>3</sup>)</i>	<i>d (g/cm<sup>3</sup>)</i>
99,0	98,38	794,25	0,795680
99,1	98,53	793,77	0,795199
99,2	98,69	793,28	0,794708
99,3	98,86	792,79	0,794217
99,4	99,02	792,30	0,793726
99,5	99,18	791,80	0,793225
99,6	99,34	791,29	0,792714
99,7	99,50	790,79	0,792213
99,8	99,67	790,28	0,791703
99,9	99,83	789,76	0,791182
100,0	100,00	789,24	0,790661

D

