

# FARMACOPÉIA BRASILEIRA

QUARTA EDIÇÃO

Parte I



**ATHENEU EDITORA SÃO PAULO LTDA**  
Rua Marconi, 131 — 2º andar  
01047 — São Paulo — SP  
1988

DECRETO Nº 96.607 DE 30 DE AGOSTO DE 1988

Aprova a Parte I da Quarta Edição da Farmacopéia Brasileira — Generalidades e Métodos de Análise — e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, usando das atribuições que lhe confere o art. 81, item III, da Constituição,

DECRETA:

Art. 1º Fica aprovada a Parte I da Quarta Edição da Farmacopéia Brasileira — Generalidades e Métodos de Análise — que a este acompanha, elaborada pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia, do Conselho Nacional de Saúde.

Parágrafo único. É delegada ao Ministro de Estado da Saúde competência para aprovar a Parte II da Farmacopéia Brasileira — monografias — sob a forma de fascículos.

Art. 2º Na elaboração de medicamentos e insumos farmacêuticos serão observadas as normas e condições estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira e seus fascículos.

Parágrafo único. O fármaco ou adjuvante de fabricação não incluído na Quarta Edição da Farmacopéia Brasileira será analisado na forma prevista em outros códigos oficiais.

Art. 3º Incumbe ao Ministério da Saúde, por meio da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, manter constante atualização das monografias, bem assim promover novas edições ou propor alterações à edição vigente da Farmacopéia Brasileira.

Art. 4º As drogarias e farmácias, os estabelecimentos de ensino de medicina, farmácia, odontologia e veterinária, os órgãos de fiscalização e controle de qualidade de medicamentos, os laboratórios industriais e os estabelecimentos congêneres, são obrigados a manter exemplar atualizados da Farmacopéia Brasileira.

Art. 5º É vedada a impressão, distribuição, reprodução ou venda da Farmacopéia Brasileira, sem a prévia e expressa autorização do Ministério da Saúde.

Art. 6º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 7º Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, 30 de agosto de 1988; 167º da Independência e 100º da República.

JOSÉ SARNEY  
*Lutz Carlos Borges da Silveira*

A Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira formaliza agradecimentos à Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, particularmente aos Drs. Marcelo Jorge Vernengo e Goy Enrique Navas, e à Comissão da Farmacopéia Européia, na pessoa do Dr. Peter-Josef Schorn, pelo apoio recebido no decorrer da elaboração desta obra.

## **PARTE I**

Em decorrência da nova sistemática de apresentação da Farmacopéia Brasileira adotada nesta edição, os textos da Parte I constituem-se em recomendações oficiais para todas as monografias publicadas a partir de janeiro de 1989.

# CONTEÚDO

I. PREFÁCIO

II. HISTÓRICO

III. COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA E COLABORADORES

IV. GENERALIDADES

V. MÉTODOS DE ANÁLISE

V.1. PROCEDIMENTOS TÉCNICOS APLICADOS A MEDICAMENTOS

V.1.1. Determinação de peso em formas farmacêuticas

V.1.2. Determinação de volume em formas farmacêuticas

V.1.3. Determinação de resistência mecânica em comprimidos

V.1.3.1. Dureza

V.1.3.2. Friabilidade

V.1.4. Testes de desintegração

V.1.4.1. Determinação do tempo de desintegração para comprimidos e cápsulas

V.1.4.2. Determinação do tempo de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais

V.1.5. Determinação do tempo de dissolução para comprimidos e cápsulas

V.2. MÉTODOS FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS

V.2.1. Determinação da massa

V.2.2. Determinação da temperatura e faixa de fusão

V.2.3. Determinação da temperatura de ebulição e faixa de destilação

V.2.4. Determinação da temperatura de congelamento

V.2.5. Determinação da densidade de massa e densidade relativa

V.2.6. Determinação do índice de refração

V.2.7. Determinação da viscosidade

V.2.8. Determinação do poder rotatório e do poder rotatório específico

V.2.9. Determinação da perda por dessecação

V.2.10. Determinação de cinzas sulfatadas (resíduo por incineração)

V.2.11. Determinação da granulometria dos pós

V.2.12. Cor de líquidos

V.2.13. Espectrofotometria de absorção atômica

V.2.14. Espectrofotometria de absorção no ultravioleta, visível e infravermelho

V.2.15. Espectrofotometria de fluorescência

V.2.16. Turbidimetria e nefelometria

V.2.17. Cromatografia

## CONTEÚDO

- V.2.17.1. Cromatografia em camada delgada
- V.2.17.2. Cromatografia em papel
- V.2.17.3. Cromatografia em coluna
- V.2.17.4. Cromatografia líquida de alta pressão
- V.2.17.5. Cromatografia a gás
- V.2.17.6. Material para cromatografia
- V.2.18. Polarografia
- V.2.19. Determinação do pH
- V.2.20. Determinação de água
  - V.2.20.1. Método volumétrico
  - V.2.20.2. Método da destilação azeotrópica
  - V.2.20.3. Método gravimétrico
- V.2.21. Análise de solubilidade por fases
- V.2.22. Eletroforese
- V.3. MÉTODOS QUÍMICOS
  - V.3.1. Reações de identificação
    - V.3.1.1. Iões, grupos e funções
      - Acetato
      - Acetila
      - Alcalóide
      - Alumínio, íon
      - Amina aromática primária
      - Amônia e amina alifática volátil
      - Amônio, íon
      - Antimônio(III), íon
      - Arsênio
      - Barbitúrico sem substituinte no nitrogênio
      - Bário, íon
      - Benzoato
      - Bicarbonato
      - Bismuto, íon
      - Bissulfito
      - Borato
      - Brometo
      - Cálcio, íon
      - Carbonato
      - Chumbo, íon
      - Cianeto
      - Citrato
      - Clorato
      - Cloreto
      - Cobre(II), íon
      - Éster
      - Ferro
      - Férrio, íon
      - Ferroso, íon
      - Fosfato (ou ortofosfato)
      - Hipofosfito
      - Iodeto
      - Lactato
      - Lítio, íon
      - Magnésio, íon
      - Mercúrio
      - Mercúrio(II), íon
      - Mercúrio(I), íon
      - Nitrato

## CONTEÚDO

- Nitrito
- Oxalato
- Permanganato
- Peróxido
- Potássio, ion
- Prata, ion
- Salicilato
- Sódio, ion
- Succinato
- Sulfato
- Sulfito
- Tartarato
- Tiocianato
- Tiosulfato
- Xantina
- Zinco, ion
- V.3.1.2. Identificação de esteróides por cromatografia em camada delgada
- V.3.1.3. Pesquisa de esteróides estranhos por cromatografia em camada delgada
- V.3.1.4. Pesquisa de substâncias relacionadas a sulfonamidas por cromatografia em camada delgada
- V.3.1.5. Identificação de fenotiazinas por cromatografia em camada delgada
- V.3.1.6. Pesquisa de impurezas relacionadas a fenotiazinas por cromatografia em camada delgada
- V.3.2. Ensaio-limite para impurezas inorgânicas
  - V.3.2.1. Ensaio-limite para cloretos
  - V.3.2.2. Ensaio-limite para sulfatos
  - V.3.2.3. Ensaio-limite para metais pesados
  - V.3.2.4. Ensaio-limite para ferro
  - V.3.2.5. Ensaio-limite para arsênio
  - V.3.2.6. Ensaio-limite para amônia
- V.3.3. Determinações em gorduras e óleos
  - V.3.3.1. Determinação da densidade relativa
  - V.3.3.2. Determinação da temperatura de fusão
  - V.3.3.3. Determinação da temperatura de solidificação
  - V.3.3.4. Determinação do índice de refração
  - V.3.3.5. Determinação do poder rotatório
  - V.3.3.6. Determinação de água e sedimentos
  - V.3.3.7. Determinação do índice de acidez
  - V.3.3.8. Determinação do índice de saponificação
  - V.3.3.9. Determinação do índice de ésteres
  - V.3.3.10. Determinação do índice de iodo
  - V.3.3.11. Determinação do índice de peróxidos
  - V.3.3.12. Determinação do índice de hidroxila
  - V.3.3.13. Determinação do índice de acetila
  - V.3.3.14. Determinação de matéria insaponificável
- V.3.4. Ensaio
  - V.3.4.1. Titulações por diazotação
  - V.3.4.2. Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl
    - V.3.4.2.1. Macrodeterminação (Método I)
    - V.3.4.2.2. Semi-microdeterminação (Método II)
  - V.3.4.3. Método de combustão em frasco de oxigênio
  - V.3.4.4. Titulações complexométricas
    - Alumínio
    - Bismuto
    - Cálcio
    - Chumbo
    - Magnésio

## CONTEÚDO

- Zinco
- V.3.4.5. Titulações em meio não-aquoso
  - Titulação de substâncias de caráter básico
  - Titulação de sais de ácidos halogenados
  - Titulação de substâncias de caráter ácido
- V.3.4.6. Determinação da metoxila
- V.3.4.7. Determinação do dióxido de enxofre
- V.3.4.8. Determinação do álcool
  - V.3.4.8.1. Método por destilação
  - V.3.4.8.2. Método por cromatografia a gás
- V.3.4.9. Análise de aminoácidos
- V.4. MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA
  - V.4.1. Preparo de material vegetal para observação e estudos histológicos
  - V.4.2. Métodos de análise de drogas vegetais
    - V.4.2.1. Amostragem
    - V.4.2.2. Determinação de material estranho
    - V.4.2.3. Determinação de água
    - V.4.2.4. Determinação de cinzas totais
    - V.4.2.5. Determinação de cinzas insolúveis em ácido
    - V.4.2.6. Determinação de óleos essenciais
    - V.4.2.7. Determinação de óleos fixos
    - V.4.2.8. Determinação do cineol
    - V.4.2.9. Determinação do índice de espuma
    - V.4.2.10. Determinação de substâncias extraíveis por álcool
- V.5. MÉTODOS BIOLÓGICOS
  - V.5.1. Testes de segurança biológica
    - V.5.1.1. Esterilidade
    - V.5.1.2. Pirogênicos
    - V.5.1.3. Toxicidade
    - V.5.1.4. Substâncias vasodepressoras
    - V.5.1.5. Histamina
    - V.5.1.6. Contagem de microrganismos viáveis em produtos que não necessitam cumprir com o teste de esterilidade
    - V.5.1.7. Método geral para pesquisa e identificação de patógenos
      - V.5.1.7.1. Enriquecimento não-seletivo
        - Substâncias solúveis em água
        - Substâncias oleosas miscíveis em água
        - Substâncias solúveis em miristato de isopropila
        - Pomadas e cremes insolúveis em miristato de isopropila
        - Gelatina
        - Substâncias insolúveis ou parcialmente solúveis em água
      - V.5.1.7.2. Fase seletiva e testes de confirmação
        - *Pseudomonas aeruginosa*
        - *Staphylococcus aureus*
        - *Salmonella sp.*
        - *Escherichia coli*
      - V.5.1.7.3. Descrição dos meios de cultura e reagentes
      - V.5.1.7.4. Esterilização e acondicionamento dos meios de cultura
      - V.5.1.7.5. Capacidade seletiva e nutritiva dos meios de cultura e validação do teste para pesquisa e identificação de patógenos
    - V.5.1.8. Substâncias pressoras
  - V.5.2. Ensaio
    - V.5.2.1. Ensaio biológico de oxitocina
      - Método A: hipotensão arterial em frango
      - Método B: contração do útero de rata *in vitro*
    - V.5.2.2. Ensaio biológico de corticotrofina



## CONTEÚDO

- Método A: subcutâneo
  - Método B: intravenoso
  - V.5.2.3. Ensaio biológico de insulina
    - Método A: convulsão em camundongos
    - Método B: glicose sanguínea em coelhos
    - Método C: glicose sanguínea em camundongos
  - V.5.2.4. Duração do efeito da insulina
  - V.5.2.5. Ensaio biológico de glucagon
  - V.5.2.6. Ensaio biológico da heparina
  - V.5.2.7. Ensaio biológico de sulfato de protamina
  - V.5.2.8. Ensaio biológico de gonadotrofina sérica
  - V.5.2.9. Ensaio biológico de gonadotrofina coriônica
  - V.5.2.10. Ensaio biológico de gonadorelina
  - V.5.2.11. Ensaio biológico de menotrofina
  - V.5.2.12. Ensaio biológico de digital
  - V.5.2.13. Ensaio biológico de vasopressina
  - V.5.2.14. Ensaio biológico de lipressina
  - V.5.2.15. Ensaio biológico de felipressina
  - V.5.2.16. Ensaio biológico de somatotrofina
    - Método A: aumento de peso corporal
    - Método B: método da tibia
  - V.5.2.17. Ensaio microbiológico de antibióticos
    - V.5.2.17.1. Ensaio microbiológico por difusão em ágar
    - V.5.2.17.2. Ensaio microbiológico por turbidimetria
- VI. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS APLICÁVEIS AOS ENSAIOS BIOLÓGICOS
- VI.1. GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS
  - VI.2. FUNDAMENTOS
  - VI.3. VALORES ABERRANTES
  - VI.4. ENSAIOS DIRETOS
  - VI.5. ENSAIOS INDIRETOS QUANTITATIVOS
    - VI.5.1. Tipos de delineamento
    - VI.5.2. Análise de variância
    - VI.5.3. Testes de validade
    - VI.5.4. Estimativa da potência e limites de confiança
  - VI.6. MÉDIAS MÓVEIS
  - VI.7. ENSAIOS INDIRETOS "TUDO OU NADA"
  - VI.8. COMBINAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE POTÊNCIA
    - VI.8.1. Potência média ponderada e limites de confiança
  - VI.9. TABELAS ESTATÍSTICAS
  - VI.10. EXEMPLOS DE ENSAIOS ESTATÍSTICOS
    - VI.10.1. Exemplo de ensaio direto
    - VI.10.2. Exemplos de ensaios indiretos quantitativos
    - VI.10.3. Exemplo de ensaio indireto "tudo ou nada"
    - VI.10.4. Exemplo de combinação de estimativas de potência
- VII. RADIOFÁRMACOS
- VIII. PRODUÇÃO DE DISCOS E METODOLOGIA PARA TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTI-BACTERIANOS
- VIII.1. PRODUÇÃO DE DISCOS
  - VIII.2. CONTROLE DOS DISCOS
- IX. RECIPIENTES E MATERIAIS EMPREGADOS NA SUA FABRICAÇÃO
- IX.1. MATERIAIS EMPREGADOS NA FABRICAÇÃO DE RECIPIENTES
    - IX.1.1. Material plástico
      - Métodos gerais de análise de materiais plásticos
      - Limpeza e grau de opalescência de soluções
      - Ensaio por combustão em atmosfera de oxigênio

## CONTEÚDO

IX.1.1.1. Materiais plásticos à base de cloreto de polivinila (PVC)

IX.1.1.2. Poliolefinas

IX.1.1.2.1. Polietileno de baixa densidade

IX.1.1.2.2. Polietileno de alta densidade

IX.1.1.2.3. Polipropileno

IX.1.1.2.4. Poliestireno

IX.1.1.2.5. Poliestireno opaco

IX.2. RECIPIENTES

IX.2.1. Recipientes de vidro

IX.2.2. Recipientes de material plástico

IX.2.2.1. Recipientes de material plástico para soluções injetáveis aquosas

IX.2.2.1.1. Recipientes à base de cloreto de polivinila

IX.2.2.2. Recipientes de material plástico para sangue e produtos do sangue

IX.2.2.2.1. Recipiente à base de cloreto de polivinila para sangue e produtos do sangue, contendo ou não solução anticoagulante

X. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO

X.1. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

X.1.1. Métodos físicos

X.1.1.1. Esterilização pelo calor

X.1.1.2. Esterilização por radiação

X.1.1.3. Esterilização por filtração

X.1.2. Método químico

X.1.2.1. Esterilização pelo óxido de etileno

X.2. INDICADORES BIOLÓGICOS

XI. SUBSTÂNCIAS CORANTES

XII. REAGENTES

XII.1. INDICADORES

XII.2. REAGENTES E SOLUÇÕES REAGENTES

XII.3. SOLUÇÕES VOLUMÉTRICAS

XII.4. TAMPÕES

XIII. ANEXOS

XIII.1. METODOLOGIA PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS (ANTIBIOGRAMA)

XIII.2. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

XIII.2.1. Condições sanitárias

XIII.2.2. Ambiente

XIII.2.3. Nutrição

XIII.2.4. Genética

XIII.2.5. Ética

XIII.3. NOMES, SÍMBOLOS E MASSAS ATÔMICAS

XIII.4. UNIDADES DO SISTEMA INTERNACIONAL (SI) USADAS NA FARMACOPÉIA E EQUIVALÊNCIA COM OUTRAS UNIDADES

XIII.5. MICRORGANISMOS EMPREGADOS EM TESTES E ENSAIOS

## I. PREFÁCIO

Dando cumprimento às disposições do Decreto Federal nº 78.840, de 25/11/1976, a nova edição da Farmacopéia Brasileira vem ao encontro dos desejos da comunidade técnico-científica brasileira, manifestamente interessada na revisão da edição anterior.

A Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, constituída pela Portaria nº 151/82 do Exmo. Ministro da Saúde, só pôde realizar seu trabalho graças ao apoio decisivo da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária – SNVS – do Ministério da Saúde. Acordos e convênios celebrados entre a SNVS, a Central de Medicamentos – CEME – do Ministério da Previdência e Assistência Social – MPAS – e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq –, asseguraram à Comissão recursos financeiros indispensáveis, incluindo bolsas de estudos para execução dos trabalhos.

A elaboração das monografias foi confiada a profissionais com efetiva experiência no assunto; estas monografias foram revisadas por outros profissionais do mesmo campo de atividade. Apesar disto, eventuais imperfeições, erros ou omissões são de responsabilidade exclusiva da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira, a quem coube a aprovação do texto final.

A 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira marca o início de nova era. Trata-se de edição na qual se adota novo sistema de apresentação. O rápido avanço da tecnologia e a crescente complexidade das substâncias medicinais determinam a necessidade de freqüentes revisões da farmacopéia. Para facilitar estas revisões e possibilitar introdução de novas monografias e métodos de análise necessários, a Comissão adotou esta nova forma de apresentação.

O presente volume constitui a Parte I da Farmacopéia e compreende as generalidades e os métodos gerais de análise. A Parte II será constituída de monografias de matérias-primas e especialidades farmacêuticas, publicadas em fascículos. Um índice indicará o título das monografias, seus números de referência e a data para sua entrada em vigor.

A Farmacopéia Brasileira em sua 4ª edição tem vigência em todo o Território Nacional. A nomenclatura, os métodos de identificação e análise e todos os demais dados nela contidos prevalecem sobre quaisquer outros assinalados em códigos farmacêuticos diversos. Nos casos omissos, podem ser utilizadas a Farmacopéia Internacional, a Farmacopéia Européia e outros códigos farmacêuticos em suas últimas edições.\*

As monografias da Farmacopéia Brasileira 4ª edição estabelecem parâmetros que o produto deverá satisfazer a qualquer tempo durante seu período de uso e não para serem interpretados somente como especificações para liberação por parte do fabricante.

A não inclusão de um fármaco ou adjuvante de fabricação na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira não dispensa estas substâncias de análise segundo outros códigos oficiais; assim como a presença de impureza não descrita especificamente na Farmacopéia não significa que a substância pode ser usada pelo simples fato de a Farmacopéia não a especificar. Nestes casos, a decisão deve ser tomada com base no bom senso técnico e nas boas práticas de fabricação.

A Farmacopéia é obra para profissionais devidamente qualificados e treinados. Por este motivo, não fornece explicações didáticas, apresentando as monografias com redação clara, sucinta e desprovidas de minúcias julgadas desnecessárias pela Comissão.

A Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira torna públicos seus agradecimentos a todos aqueles que colaboraram no preparo desta edição e, em especial, ao Conselho Federal de Farmácia pelo apoio que possibilitou a publicação oficial da F. Bras. IV.

\* Normas Nacionais extrafarmacopéicas deverão obter previamente aprovação da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira do Conselho Nacional de Saúde.

## II. HISTÓRICO

"São de natureza efêmera os livros desta ordem, destinados a espelharem um dos lados da farmacologia, ciência que vai percorrer atualmente a fase mais acelerada da sua evolução". SOUZA MARTINS, in *Relatório de Introdução da 3ª edição da Farmacopéia Portuguesa*, 1876.

O vocábulo *farmacopéia* provém da aglutinação de dois termos gregos, a saber, *φάρμακον* = medicamento ou veneno, e *ποιος* = fabricante e fabricação. As farmacopéias constituem códigos farmacêuticos oficiais ou oficialmente adotados, nos quais se estabelecem a identificação, os padrões de qualidade e os métodos de análise dos fármacos em uso. Existentes desde o século III, os primeiros compêndios eram de caráter regional, pois os fármacos de então eram provenientes de órgãos de animais, de minerais e, sobretudo, da flora local e nativa. Alguns chegaram a ser oficializados, embora em caráter regional, como, por exemplo, o formulário da Escola de Salerno — *Regimen Sanitatis*, de 1066, adotado em 1240 por Frederico II, Rei das Duas Sicílias. As tentativas empreendidas individualmente por diversos autores no sentido de unificar a descrição e identificação dos fármacos mais importantes datam do final do século XVII, e do século XVIII. Entre outras obras, merecem citação a *Pharmacopoeia Internationalis* de Lémery (1690), as farmacopéias de James (1747), de De Quincy (1758), de Triller (1764) e, especialmente, a *Pharmacopoeia Universalis*, de Jourdan (1828), que compilava dados de quase 50 farmacopéias e compêndios diferentes. Nenhum destes trabalhos, entretanto, possuía caráter oficial.

As farmacopéias nacionais, de caráter oficial e adoção obrigatória, começam a surgir no final do século XVIII e início do século XIX. Assim, foram publicadas as primeiras edições das farmacopéias, portuguesa (1794), holandesa (1805), francesa (1818) e americana (1820).

O Brasil Colônia adotava a *Pharmacopoeia Geral para o Reino e Domínios de Portugal*, de 1794, cuja autoria é atribuída a Francisco Tavares, professor da Universidade de Coimbra.

Com a Independência, volta-se o Brasil à orientação cultural francesa e, no campo da Farmácia, o *Codex Medicamentarius* francês adquire força legal. O Regulamento da Junta de Higiene Pública, mandado executar pelo Decreto nº 828 de 29/09/1851, sem especificar qual a farmacopéia a ser cumprida, estabelece lista de livros que as farmácias deveriam possuir, cons-

tando dela, entre outros, a *Farmacopéia Portuguesa* de 1794, o *Codex Francês* e o *Código Farmacêutico Lusitano*, da autoria de Agostinho Albano da Silveira Pinto, cuja primeira edição foi publicada em 1835 e hoje considerada como a 2ª edição da Farmacopéia Portuguesa.

Já o Decreto nº 8.387 de 19/01/1882 estabelece textualmente: "para a preparação dos remédios oficiais seguir-se-á a farmacopéia francesa, até que esteja composta uma farmacopéia brasileira . . .", situação esta que iria perdurar até 1926, quando o Decreto nº 17.509 de 04/11/1926 aprovou a primeira Farmacopéia Brasileira, de autoria de Rodolpho Albino Dias da Silva, tornada obrigatória a partir de 15 de agosto de 1929.

A primeira edição da Farmacopéia Brasileira ombreava com as farmacopéias da época, dos países mais desenvolvidos, revelando-se notável pela precisão das monografias e, sobretudo, pelo grande número de inclusões de fármacos obtidos da flora brasileira, não existentes em nenhuma outra farmacopéia.

A constante evolução da farmacologia, a introdução de novos fármacos na terapêutica, o surgimento de novos métodos de análise, mais modernos e precisos, e a necessidade de especificações atualizadas para o controle de matéria-prima e produtos farmacêuticos são fatores fundamentais determinantes da obsolescência dos códigos farmacêuticos e da necessidade de revisá-los e atualizá-los periodicamente. O Decreto que aprovou a primeira edição da Farmacopéia Brasileira foi omisso quanto às revisões; assim, a segunda edição veio à luz quase 30 anos após a primeira e representou cinco anos de trabalho de dez subcomissões especializadas. A 2ª edição incorporou as aquisições decorrentes da própria atualização da farmacologia. Não conseguiu, contudo, ser mais rica e precisa do que a primeira edição, fruto de um só autor. O Decreto Federal nº 45.502 de 27/02/1959, ao aprovar a 2ª edição da Farmacopéia Brasileira, fixou sua revisão a cada dez anos. Infelizmente, empecilhos diversos não permitiram o cumprimento desse Decreto. Mais de 15 anos decorreram, até que se cogitasse de uma nova edição.

Assim é que, em 25 de novembro de 1976, foi

oficializada, pelo Decreto nº 78.840, a terceira edição da Farmacopéia Brasileira. O mesmo Decreto fixou em cinco anos o prazo para sua revisão. Realizada em tempo determinado e muito curto, tarefa possível de levar a termo somente graças ao apoio do Conselho Federal de Farmácia, a obra despertou sensíveis manifestações da comunidade técnico-científica, a recomendarem rápida revisão do seu texto, independente do dispositivo legal.

Assim, a 4ª edição surge com algum atraso. Procurou-se, nesta edição, sanar as deficiências da anterior. Procurou-se, também, adotar métodos modernos de análise, compatíveis, porém, com a realidade nacional. A publicação desta parte e a adoção de uma nova sistemática de apresentação que possibilita sua contínua atualização através de revisões permanentes são as metas prioritárias que a Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira se propõe alcançar.

### III. COMISSÃO PERMANENTE DE REVISÃO DA FARMACOPÉIA BRASILEIRA

PORTARIA MINISTERIAL Nº 333 DE 31.05.88, PUBLICADA NO DIÁRIO  
OFICIAL DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL DE 01.06.1988, E  
PORTARIA MINISTERIAL Nº 353 DE 09.06.1988.

#### PRESIDENTE

JOÃO GILVAN ROCHA  
Prof. Dr., Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Federal de Sergipe  
Conselho Nacional de Saúde  
Ministério da Saúde  
Brasília, D.F.

#### PRESIDENTE SUBSTITUTO

CELSO FIGUEIREDO BITTENCOURT  
Prof. Dr., Curso de Farmácia e Bioquímica  
da Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS

ANDREJUS KOROLKOVAS  
Prof. Dr., Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP

ANGELO JOSÉ COLOMBO  
Prof. Dr., Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP

CIPRIANO CARDOSO FILHO  
Farmacêutico, Produtos Roche Químicos  
e Farmacêuticos S.A.  
Rio de Janeiro, RJ

EDUARDO AUGUSTO MOREIRA  
Prof. Dr., Curso de Farmácia  
da Universidade Federal do Paraná  
Curitiba, PR

ELFRIDES EVA S. SCHAPOVAL  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>, Faculdade de Farmácia  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS

ELZA ANDERS SAAD  
Farmacêutica, Degussa S.A.  
São Paulo, SP

GERALDO FENERICH  
Farmacêutico, Central de Medicamentos  
Ministério da Saúde  
Brasília, DF

JOSÉ ALEIXO PRATES E SILVA  
Prof. Dr., Curso de Farmácia  
da Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Natal, RN

NIKOLAI SHARAPIN  
Prof., Dr., Instituto de Química  
da Universidade Federal Fluminense  
Niterói, RJ

SEBASTIÃO BAETA HENRIQUE  
Prof. Dr., Instituto Butantan  
São Paulo, SP

SUZANA MACHADO DE A'VILA  
Farmacêutica, Secretária Nacional  
de Ações Básicas da Saúde  
Ministério da Saúde  
Brasília, DF

THEREZINHA C. BARBOSA TOMASSINI  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>, Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Rio de Janeiro, RJ

## COLABORADORES

### ACYR RODRIGUES DO PRADO

Médico, Central de Medicamentos  
Ministério da Saúde  
Brasília, DF.

### ADELA ROSENKRANZ

Professora da Escola Paulista de Medicina, Consultora da  
Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS  
São Paulo, SP.

### ADILSON CADONHA

Farmacêutico, Upjohn Produtos  
Farmacêuticos Ltda.  
São Paulo, SP.

### ALEXANDRE PINTO CORRADO

Professor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo  
Ribeirão Preto, SP.

### ALFREDO KARL MASLOWSKY

Químico, Biogalênica Química  
e Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

### ÁLVARO NORONHA DA COSTA

Farmacêutico, Indústria Química e  
Farmacêutica Schering S.A.  
Rio de Janeiro, RJ.

### AMAURY CARON DOS ANJOS

Professor do Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Paraná  
Curitiba, PR.

### ANA BEATRIZ DA SILVA

Engenheira-Química, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

### ANA MARIA BERGOLD

Professora da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Porto Alegre, RS.

### ANA MARIA DA PENHA BRAGUIM PELLIN

Farmacêutica, Boehringer & Cia. Ltda.  
São Paulo, SP.

### ANDRÉ ROSEIRA DE MATOS

Farmacêutico, Cirumédica S.A.,  
Produtos Médicos-Cirúrgicos  
São Paulo, SP.

### ANDREJUS KOROLKOVAS

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

### ANGELO JOSÉ COLOMBO

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

### ANTONIO CARLOS ZANINI

Professor da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

### ANTONIO EUGÊNIO CASTRO CARDOSO DE ALMEIDA

Farmacêutico, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

### ANTONIO PAIVA

Professor da Escola Paulista de Medicina  
São Paulo, SP.

### ANTONIO ROBERTO TEIXEIRA

Médico, Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

### ARNOLD H. BECKETT

Professor, Chelsea College, Universidade de Londres.  
Consultor da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS  
Londres, Inglaterra.

### ARON JURKIEWICZ

Professor da Escola Paulista de Medicina  
São Paulo, SP.

### AUGUSTO VILSON BORTOLUZZI

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

### BARTYRA DE CASTRO AREZZO

Comissão Nacional de Energia Nuclear  
Rio de Janeiro, RJ.

### BEATRIZ RIGON

Núcleo de Processamento de Dados  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

### BRUNO CARLOS DE ALMEIDA CUNHA

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

### CECÍLIA ELENA FIGUEIREDO OGNIBENE

Farmacêutica, Sanrisil S.A.  
São Paulo, SP.

**CÉLIA COLI**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**CELINA XAVIER DE MENDONÇA**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
São Paulo, SP.

**CELSO FIGUEIREDO BITTENCOURT**

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**CLARISSE CAVICCHIA**

Farmacêutica, Upjohn Produtos Farmacêuticos Ltda.  
São Paulo, SP.

**CLÁUDIA GONÇALVES TORRES DE OLIVEIRA**

Professora do Instituto de Química da  
Universidade Federal Fluminense  
Niterói, RJ.

**CLEODORO WALTER**

Núcleo de Processamento de Dados  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS

**DECIO MELHEM**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**DERBLAY GALVÃO**

Professor, Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Brasília, DF.

**DOMINGOS CORRÊA**

Químico, Biogalênica Química e  
Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

**EDUARDO AUGUSTO MOREIRA**

Professor do Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Paraná  
Curitiba, PR.

**EDUARDO JOSÉ CENTENO DE CASTRO**

Professor da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**ELFRIDES EVA S. SCHAPOVAL**

Professora da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**ELFRIEDE MARIANNE BACCHI**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**ELIANE DE VARES CAÇÃO**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Niterói, RJ.

**ELIZABETH IGNE FERREIRA**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**ELOIR PAULO SCHENKEL**

Professor da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**ELZA ANDERS SAAD**

Farmacêutica, Degussa S.A.  
São Paulo, SP.

**FERNANDO DE OLIVEIRA**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**FRANCO MARIA LAJOLO**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**GALBA MORANELLI DE ALMEIDA**

Professor da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, MG.

**GEORGE GONZALES ORTEGA**

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**GERALDO FENERICH**

Farmacêutico, Central de  
Medicamentos – Ministério da Saúde  
Brasília, DF.

**GERCY SEVERO ALVES**

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**GERMÍNIO NAZZARIO**

Químico, Instituto Adolfo Lutz  
São Paulo, SP.

**GILBERTO ANTONIO ASSIS BRASIL E SILVA**

Professor da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**GILSON DE FREITAS VIEIRA**

Farmacêutico, Glaxo do Brasil S.A.  
Rio de Janeiro, RJ.



**GOY ENRIQUE NAVAS**

Farmacêutico, Consultor da  
Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS  
Rio de Janeiro, RJ.

**GRANVILLE GARCIA DE OLIVEIRA**

Médico, Central de Medicamentos – Ministério da Saúde  
Brasília, DF.

**GÜNTER HÖXTER**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**HANNA A. ROTHSCHILD**

Professor da Escola Paulista de Medicina  
São Paulo, SP.

**HECTOR ARALDI**

Farmacêutico, Consultor da  
Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS  
Buenos Aires, Argentina.

**HÉLIO JOSÉ BERTUZZI**

Professor da Divisão de Farmácia do Hospital  
Universitário da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**HÉLIO MORRONE COSENTINO**

Físico, Sanrisil S.A.  
São Paulo, SP.

**IDA CARAMICO SOARES**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**ITACY PEREIRA TORQUILHO**

Farmacêutico, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

**IVONE BAREICHA**

Professora do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, MG.

**IVONE CARVALHO**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
Ribeirão Preto, SP

**IVONE SARTOR**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**IVONETE BATISTA DE ARAÚJO**

Professora do Curso de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico – CNPq  
Natal, RN.

**JAMIL ZAMUR**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**JOÃO BATISTA DOMINGUES**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**JOÃO HAIKAL HELOU**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**JOSÉ ABRAHÃO NETO**

Farmacêutico, Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
São Paulo, SP.

**JOSÉ ALEIXO PRATES E SILVA**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Norte  
Natal, RN.

**JOSÉ APARIÇIO BRITTES FUNCK**

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**JOSÉ PEDRO SALGADO EGREJA**

Farmacêutico, Byk-Procienc Indústrias  
Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

**JOSÉ XIMENES**

Farmacêutico, Cefar Farmacodiagnóstica Ltda.  
São Paulo, SP.

**JOSINO COSTA MOREIRA**

Farmacêutico, Instituto Nacional de Controle de  
Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

**LAERTE KAWANCHI**

Farmacêutico, Byk-Procienc Indústrias  
Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

**LAURA MARIA ESPINOSA RAMOS**

Farmacêutica, Boehringer & Cia Ltda.  
São Paulo, SP.

**LAUREN ROSA CROSSETI VAUCHER**

Professora do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**LAURO DOMINGOS MORETTO**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
Farmacêutico, Boehringer & Cia. Ltda.  
São Paulo, SP.

**LÉA GUSMÃO CHIAPINI**

Professora da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico – CNPq  
Porto Alegre, RS.

**LEILA MACEDO ODA**

Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

**LEOBERTO COSTA TAVARES**

Farmacêutico  
São Paulo, SP.

**LIANE LEIPNITZ ENE**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Porto Alegre, RS.

**LIGIA MARIA MOREIRA DE CAMPOS**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, MG.

**LILIAN BASSANI**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Santa Maria, RS.

**LORE LAMB**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Curitiba, PR.

**LÚCIA DE ARAÚJO COSTA**

Professora do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Natal, RN.

**LÚCIA EIKO ABE**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
São Paulo, SP.

**LÚCIA EMY TEIXEIRA DOS SANTOS**

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, MG.

**LUCY BRENNER RAMOS**

Professora do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**LUIZ ALBERTO MASCHIETTO**

Farmacêutico, Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

**LUIZ ANTONIO GIOIELLI**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP

**LUIZ BAUER †**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**LUIZ EDUARDO CHAVES CAIADO**

Farmacêutico, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Rio de Janeiro, RJ.

**LUIZ FELIPE MOREIRA LIMA**

Médico, Fundação Oswaldo Cruz  
Rio de Janeiro, RJ.

**LUIZ FLÁVIO DE FREITAS LEITE**

Farmacêutico, Biobrás Bioquímica do Brasil S.A.  
Montes Claros, MG.

**LUIZ MANOEL SCAVAZZA**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná  
Curitiba, PR.

**LUIZ RODRIGUES AGUAXO**

Médico Veterinário, Consultor da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS  
Rio de Janeiro, RJ.

**MARA LANE CARDOSO**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Santa Maria, RS.

**MARCELO JORGE VERNENGO**

Químico, Consultor da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS  
Rio de Janeiro, RJ.

**MARCO ANTONIO ALMEIDA**

Farmacêutico, Biobrás Bioquímica do Brasil S.A.  
Montes Claros, MG.

**MARCO ANTONIO DEXHEIMER**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, RS.

**MARCO AURÉLIO XAVIER**

Farmacêutico, Biobrás Bioquímica do Brasil S.A.  
Montes Claros, MG.

**MARGARETE REGINATTO GIACOMINI**

Farmacêutica, Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

**MARGARETE TRINDADE HAHN**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq  
Santa Maria, RS.

**MARGARETH LINDE ATHAYDE**

Farmacêutica, Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde  
Brasília, DF.

MARIA AMÉLIA BARATA DA SILVEIRA  
Professora da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

MARIA DE FÁTIMA DANTAS  
Farmacêutica, Universidade Federal do  
Rio Grande do Norte  
Natal, RN.

MARIA ELIZABETH DE ÁVILA DALMORA  
Professora do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

MARIA GISELA PIROS  
Farmacêutica, Majer Meyer S.A.  
Indústrias Farmacêuticas  
São Paulo, SP.

MARIA INÊS ROCHA MIRITELLO SANTORO  
Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

MARIA LÚCIA NOSSAR SIMÕES DE DALGO  
Professora do Instituto de Química da  
Universidade Federal Fluminense  
Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Niterói, RJ.

MARIA LUIZA CRUZ  
Farmacêutica  
São Paulo, SP.

MARIA TEREZA ALVES RODRIGUES  
Farmacêutica, Instituto Butantan  
São Paulo, SP

MARIA TEREZA FÁRIA PIRES DE MELO  
Química Industrial, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

MARILENE PEREIRA BASTOS CENEVIVA †  
Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

MARÍLIA APPEL DE MATTOS BORTOLUZZI  
Professora do Curso de Farmácia e Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Maria  
Santa Maria, RS.

MARÍLIA MARTINS NISHIKAWA  
Biomédica, Instituto Nacional de  
Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ  
Rio de Janeiro, RJ.

MÁRIO GERALDO KRISTELLER  
Químico, Biogalênica Química e  
Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

MÁRIO MUNIZ LANNES  
Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade  
Federal Fluminense  
Niterói, RJ.

MARTHA DE LUCA  
Professora da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal Fluminense  
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico – CNPq  
Niterói, RJ.

MAURÍCIO MARTINS DO CARMO  
Farmacêutico, Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
São Paulo, SP.

MICHAEL SIMON NOTHENBERG  
Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

MILTON LEONCIO BRAZZACH  
Professor da Divisão de Farmácia do  
Hospital Universitário da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

MIRIAN TERESINHA KNORST  
Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Santa Maria, RS.

NARA RITA DEITOS  
Educatória Especial  
Santa Maria, RS.

NELCI FENALTTI HOEHR  
Professora do Curso de Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Ciências Médicas da  
Pontifícia Universidade Católica  
Campinas, SP.

NILTON BEZERRA DO VALE  
Professor do Curso de Biologia da  
Universidade Federal do  
Rio Grande do Norte  
Natal, RN.

NIKOLAI SHARAPIN  
Professor do Instituto de Química da  
Universidade Federal Fluminense  
Niterói, RJ.

OLINDA SUZUKI  
Farmacêutica, Byk Prociex Indústria  
Farmacêutica Ltda.  
São Paulo, SP.

OSCAR VILLAÇA DE MELO †  
Professor da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Pernambuco  
Recife, PE.

**PAOLO BARTOLINI**

Químico, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo São Paulo, SP.

**PAULO ANTONIO RODRIGUES**

Farmacêutico, Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda. São Paulo, SP.

**PAULO CEZAR SANDER**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná Curitiba, PR.

**PEDRO ROS PETROVICK**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS.

**PETER J. SCHORN**

Farmacêutico, Consultor da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS Strasbourg, França

**REINALDO SPITZNER**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná Curitiba, PR.

**RENATO BARUFFALDI**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo São Paulo, SP.

**RENI KRANBECK**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná Curitiba, PR.

**RICARDO SCHUCH**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo São Paulo, SP.

**ROBERTO EDUARDO MORTEO**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense Niterói, RJ.

**ROBERTO PELLEGRINI**

Farmacêutico, Upjohn Produtos Farmacêuticos Ltda. São Paulo, SP.

**ROBERTO RITTNER NETO**

Professor do Instituto de Química da Universidade de Campinas Campinas, SP.

**RONALDO ALVES SILVEIRA**

Farmacêutico, Bayer do Brasil S.A. São Paulo, SP.

**RONALDO NOGUEIRA DE MORAES PITOMBO**

Professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo São Paulo, SP.

**RUBENS LEONART**

Biólogo, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq Curitiba, PR.

**RUTH WIEDMANN VELLOSO**

Professora do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS.

**RUY MASSAKAZO YOSHINAGA**

Farmacêutico, Fontoura-Wyeth S.A. São Bernardo do Campo, SP.

**SALVADOR ALVES PEREIRA**

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense Niterói, RJ.

**SÉRJIO LUIZ DALMORA**

Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da Universidade de Santa Maria Santa Maria, RS.

**SIGURD WALTER BACH**

Professor do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná Curitiba, PR.

**SILVANA FERREIRA VACCARI**

Médica Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS

**SILVIA STORPIRTIS**

Farmacêutica, Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq São Paulo, SP.

**SIMONE GONÇALVES CARDOSO**

Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, RS

**SONIA MARIA FERREIRA SIMAS SANTOS**

Bióloga, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/FIOCRUZ Rio de Janeiro, RJ.

**TAKAKO SAITO**

Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo São Paulo, SP.

**TARCISIO JOSÉ PALHANO**  
Professor do Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Bolsista do Conselho Nacional de  
Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq  
Natal, RN

**THERESA CHRISTINA VESSONI PENNA**  
Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**TOSHIO HARAGUCHI**  
Professor do Curso de Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Ciências Médicas da  
Pontifícia Universidade Católica  
Campinas, SP.

**TOMÁS D. ARIAS**  
Farmacêutico, Consultor da Organização  
Pan-Americana da Saúde – OPAS  
Cidade do Panamá, Panamá.

**TOMOE NAKASHIMA**  
Professora do Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Paraná  
Curitiba, PR.

**VENI MARIA FELLI NAKASONE**  
Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo  
São Paulo, SP.

**VIKTORIA TUTUNDJIAN**  
Engenheira-química, Boehringer & Cia. Ltda.  
São Paulo, SP.

**ZELI ISABEL ROESSLER**  
Especialista em assuntos educacionais,  
Ministério da Ciência e Tecnologia  
Brasília, DF.

## **IV. GENERALIDADES**

## IV. GENERALIDADES

### TÍTULO

O título completo desta obra é "Farmacopéia da República Federativa do Brasil, quarta edição".

Sua denominação pode ser abreviada para "Farmacopéia Brasileira, 4ª edição", ou "F. Bras. IV".

### DEFINIÇÕES

#### *Farmacopéico*

A expressão *farmacopéico* substitui as expressões oficial e oficial, utilizadas em edições anteriores, equivalendo-se as três expressões para todos os efeitos.

#### *Fármaco*

Substância ativa, droga, insumo farmacêutico ou matéria-prima empregada para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos em benefício da pessoa à qual se administra.

#### *Medicamento*

Produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, que contém um ou mais fármacos juntamente com outras substâncias, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico.

#### *Medicamento farmacopéico*

Medicamento inscrito na 4ª edição da Farmacopéia Brasileira.

#### *Medicamento magistral*

Medicamento, preparado na farmácia, cuja prescrição estabelece a composição, a forma farmacêutica e a posologia.

### NOMENCLATURA

Os títulos das monografias obedecem à Denominação Comum Brasileira para Fármacos, estabelecida com base nas recomendações da Organização Mundial da Saúde. Os subtítulos são em latim.

Em casos excepcionais, nomes muito difundidos, porém diferentes dos adotados pela Denominação Comum Brasileira para Fármacos, podem ser citados como "outra denominação".

### NOME QUÍMICO

O nome químico de substância farmacopéica está de acordo com a nomenclatura preconizada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada.

### FÓRMULA QUÍMICA

Quando a substância farmacopéica possui composição química definida, a sua fórmula bruta e massa molecular constam da monografia. No caso de substâncias orgânicas de composição química definida, estes dados são acrescidos da respectiva fórmula estrutural.

### MASSA ATÔMICA RELATIVA

As massas atômicas relativas usadas para o cálculo de pesos moleculares são as constantes da Tabela de Massas Atômicas Relativas publicada em 1979 pela União Internacional de Química Pura e Aplicada e baseada na massa do carbono-12.

### UNIDADES DE MEDIDA

São adotadas nesta Farmacopéia as unidades constantes do Sistema Internacional de Unidades (SI), em conformidade com o Decreto Federal nº 81.621, de 03 de maio de 1978. Excepcionalmente são utilizadas outras unidades de uso somente na prática farmacêutica.

As unidades e frações do sistema métrico decimal, baseadas no Sistema Internacional de Unidades (SI), utilizadas na F. Bras. IV, são representadas pelas seguintes abreviações:

#### DE COMPRIMENTO

metro	- m
decímetro	- dm = 10 <sup>-1</sup> m
centímetro	- cm = 10 <sup>-2</sup> m
milímetro	- mm = 10 <sup>-3</sup> m
micrometro*	- μm = 10 <sup>-6</sup> m
nanômetro**	- nm = 10 <sup>-9</sup> m

\* ou micron

\*\* ou milímicron

## DE VOLUME

litro	- l
decilitro	- dl = $10^{-1}$ l
mililitro	- ml = $10^{-3}$ l
microlitro	- $\mu$ l = $10^{-6}$ l

## DA MASSA \*

quilograma	- kg
grama	- g = $10^{-3}$ kg
decigrama	- dg = $10^{-1}$ g
centigrama	- cg = $10^{-2}$ g
miligrama	- mg = $10^{-3}$ g
micrograma**	- $\mu$ g = $10^{-6}$ g
nanograma	- ng = $10^{-9}$ g
picograma	- pg = $10^{-12}$ g
fentograma	- fg = $10^{-15}$ g
atograma	- ag = $10^{-18}$ g

\* As expressões massa e peso são adotadas indistintamente nesta Farmacopéia.

\*\* Nas prescrições e referências relativas a doses terapêuticas,  $\mu$ g equivale a "mcg" ou  $\gamma$  (gama).

## DE RADIATIVIDADE

becquerel	- Bq = 1 desintegração nuclear por segundo
curie	- Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
milicurie	- mCi = $3,7 \times 10^7$ Bq
microcurie	- $\mu$ Ci = $3,7 \times 10^4$ Bq
gigabecquerel	- GBq = 27,027 mCi
megabecquerel	- MBq = 27,027 $\mu$ Ci
quilobecquerel	- kBq = 27,027 nCi

## PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

A Farmacopéia não fornece detalhes dos processos de fabricação de substâncias químicas. A indicação de que uma substância pode ser produzida por um método determinado não exclui

a possibilidade de produzi-la por outros métodos. Qualquer que seja o método utilizado, o produto final deve corresponder às especificações da Farmacopéia.

Na fabricação de produtos injetáveis, comprimidos, cápsulas e outras preparações farmacopéicas, é permitido o uso de substâncias adjuvantes, descritas nas monografias e adicionadas com finalidade específica. Estas substâncias adjuvantes devem ser inócuas e não devem ter influência adversa sobre a eficácia terapêutica da substância ativa contida na preparação nem interferir com ensaios e determinações.

## DESCRICÃO DE SUBSTÂNCIA

As informações referentes à descrição de uma substância são genéricas e destinam-se à avaliação preliminar da integridade da mesma. A descrição, por si, não é indicativa da pureza, devendo ser associada a outros testes farmacopéicos para assegurar que a substância esteja de acordo com a monografia.

## SOLUBILIDADE

A solubilidade indicada não deve ser tomada no sentido estrito de constante física, mas como simples informação.

As indicações sobre a solubilidade referem-se às determinações feitas à temperatura de 25 °C.

A não ser que a monografia especifique diferentemente, a expressão *solvente* refere-se à água.

A expressão *partes* refere-se à dissolução de 1 g de um sólido ou 1 ml de um líquido no número de mililitros do solvente estabelecido no número de *partes*.

As solubilidades aproximadas constantes nas monografias são designadas por termo descritivo, cujo significado figura na tabela abaixo.

TERMO DESCRITIVO	SOLVENTE
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1 000 partes
Muito pouco solúvel	De 1 000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

## REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO

São reações usadas no auxílio da caracterização de uma substância. Embora específicos, só serão suficientes para estabelecer ou confirmar a identidade da substância quando considerados em conjunto com outros testes e especificações constantes da monografia.

## DENSIDADE DE MASSA E DENSIDADE RELATIVA

A densidade de massa ( $\rho$ ) é a massa de uma unidade de volume de uma substância. É expressa em unidades de massa por volume.

A densidade relativa usualmente adotada ( $d_{20}^{20}$ )



é definida como a relação entre a massa de uma substância ao ar a 20 °C e a massa de igual volume de água na mesma temperatura.

#### DETERMINAÇÃO DE ÁGUA E PERDA POR DESSECAÇÃO

Usa-se geralmente a expressão *determinação de água* ou determinação de umidade quando se determina, em condições especificadas, a água de hidratação ou a água de adsorção de uma substância.

A expressão *perda por dessecação* refere-se geralmente à perda em massa, por secagem, em condições especificadas, de água e outros componentes residuais voláteis.

#### IMPUREZAS

Os testes descritos nas monografias limitam as impurezas a quantidades tais que assegurem qualidade ao fármaco. O fato de os ensaios não incluírem uma impureza pouco freqüente não significa que esta possa ser tolerada.

#### REAÇÕES QUÍMICAS E LIMPEZA DE SOLUÇÕES

A não ser que a monografia especifique diferentemente, as reações químicas são feitas em tubos de ensaio de aproximadamente 15 mm de diâmetro interno. Utilizam-se 5 ml do líquido ou solução a examinar, adicionando-se três gotas de reagente ou de cada reagente. O exame do conteúdo do tubo de ensaio deve ser feito sobre toda a camada líquida, observando de cima para baixo, após cinco minutos de repouso.

**Solução límpida** — é aquela que apresenta turvação menor que a de uma suspensão de caulim a 0,0005% (p/V) em água e cujas partículas têm, em média, diâmetro inferior a 20  $\mu$ m. Não se considera sinal de turvação qualquer resíduo óbvio de material filtrante (fiapos).

**Opalescência** — turvação equivalente, no máximo, à produzida pela adição de 5 ml da diluição de 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M em 99 ml de água, a 0,5 ml de nitrato de prata 0,01 M. A observação deve ser feita sobre fundo preto, com luz incidente, cinco minutos após adição do nitrato de prata.

**Leve turvação** — é aquela equivalente, no máximo, à que se produz quando se adicionam 5 ml da diluição de 2 ml de ácido clorídrico 0,01 M em 98 ml de água a 0,5 ml de nitrato de prata 0,1 M.

A observação deve ser feita como no caso precedente.

**Turvação** — é a equivalente, no máximo, à que se produz quando se adicionam 5 ml da diluição de 4 ml de ácido clorídrico 0,01 M em 96 ml de água a 0,5 ml de nitrato de prata 0,1 M.

A observação deve ser feita como nos casos precedentes.

**Precipitado** — é a formação de depósito quando partículas em suspensão são deixadas em repouso por 15 minutos.

**Líquido incolor** — é aquele cuja tonalidade não ultrapassa a das soluções padrão para a determinação de limite de impurezas. O ensaio deve ser comparativo e realizado em colunas líquidas de 10 cm de altura, contidas em tubos de vidro de fundo chato, incolores e transparentes, sobre fundo branco.

#### ACIDEZ E ALCALINIDADE: ENSAIOS RÁPIDOS

Uma solução é considerada *neutra* quando não modifica a cor dos papéis azul e vermelho de tornassol, ou quando o papel indicador universal adquire as cores da escala neutra, ou quando 1 ml da mesma solução se cora de verde com uma gota de azul de bromotimol SI (pH 7,0).

É considerada *ácida* quando cora em vermelho o papel azul de tornassol ou 1 ml se cora de amarelo por uma gota de vermelho de fenol SI (pH 1,0 a 6,6).

É considerada *fracamente ácida* quando cora levemente de vermelho o papel azul de tornassol ou 1 ml se cora de alaranjado por uma gota de vermelho de metila SI (pH 4,0 a 6,6).

É considerada *fortemente ácida* quando cora de azul o papel de vermelho de congo ou 1 ml se cora de vermelho pela adição de uma gota de alaranjado de metila SI (pH 1,0 a 4,0).

É considerada *alcalina* quando cora de azul o papel vermelho de tornassol ou 1 ml se cora de azul por uma gota de azul de bromotimol SI (pH 7,6 a 13,0).

É considerada *fracamente alcalina* quando cora de azul o papel vermelho de tornassol ou 1 ml se cora de rosa por uma gota de vermelho de cresol SI (pH 7,6 a 8,8).

É considerada *fortemente alcalina* quando se cora de azul por uma gota de timolfaleína SI (pH 9,3 a 10,5) ou de vermelho por uma gota de fenolfaleína SI (pH 10,0 a 13,0).

#### REAGENTES, INDICADORES, SOLUÇÕES REAGENTES, SOLUÇÕES INDICADORAS, SOLUÇÕES COLORIMÉTRICAS E SOLUÇÕES VOLUMÉTRICAS

**Reagentes** — são substâncias utilizadas em testes, reações, ensaios e doseamentos farmacopéuticos quer como tais, quer em soluções.

**Indicadores** — são substâncias utilizadas nos ensaios farmacopéuticos para determinar o ponto final de uma reação química, avaliar a concentração hidrogeniônica ou assinalar uma mudança de pH desejada.

**Soluções reagentes** — são soluções de reagentes em solventes específicos e concentrações definidas. São designadas por "SR".

**Soluções indicadoras** — são soluções de indicadores em solventes específicos e concentrações definidas. São designadas por "SI".

**Soluções colorimétricas** — são soluções utilizadas na preparação de padrões colorimétricos para fins de comparação. São indicadas por "SC".

**Soluções volumétricas** — são soluções de reagentes de concentração conhecida, destinadas ao uso em determinações quantitativas. Na F. Bras. IV as concentrações das soluções volumétricas são expressas em molaridade. São indicadas por "SV".

**Solução molar** — é a solução que contém uma molécula-grama da substância em 1 000 ml da solução. Os múltiplos e submúltiplos da solução molar também são designados por números inteiros ou frações decimais como: 2 M; 0,5 M; 0,1 M etc.

#### APARELHOS VOLUMÉTRICOS

Os aparelhos volumétricos são empregados nas medidas de volume nos testes, ensaios e doseamentos farmacopéicos e devem ser aferidos à temperatura padrão de 25 °C. Se o aparelho volumétrico não for aferido a 25 °C, as soluções devem ser aferidas à temperatura de aferição indicada no aparelho.

Nas medições de volume, o nível inferior do menisco do líquido contido nos aparelhos volumétricos deve aflorar o traço de aferição. Nos casos de líquidos fortemente corados usa-se como referência a borda superior do menisco.

Os aparelhos volumétricos para a transferência de líquidos (pipetas ou buretas), em virtude de terem sido aferidos com água só poderão fornecer exatamente o volume indicado quando os líquidos a medir tiverem aproximadamente a viscosidade, a tensão superficial e a densidade da água.

#### TEMPERATURA

A menos que a monografia especifique diferentemente, todas as temperaturas constantes da F. Bras. IV são expressas na escala Celsius e todas as medidas são feitas a 25 °C.

#### ÁGUA

A água mencionada nos testes, reações e ensaios é água purificada. Para preparações injetáveis deve ser utilizada *água para injeções*, descrita na monografia. Quando for prescrito o uso de *água isenta de dióxido de carbono*, utilizar água purificada, fervida vigorosamente pelo menos cinco minutos e protegida do ar atmosférico durante o resfriamento e armazenagem.

#### BANHO-MARIA E BANHO A VAPOR

A expressão *banho-maria* significa o uso de um banho de água fervente, a não ser que a monogra-

fia especifique outra temperatura. As expressões *água quente* e *água muito quente* indicam temperaturas aproximadas entre 60 e 70 °C e entre 85 e 95 °C, respectivamente.

Banho a vapor significa exposição ao vapor fluente ou outra forma de calor, correspondendo em temperatura à do vapor fluente.

#### PRESSÃO REDUZIDA

A não ser que a monografia especifique diferentemente, a expressão *pressão reduzida* significa pressão menor que 6,7 kPa (aproximadamente 50 mm de mercúrio). Quando a monografia especificar *dessecação à pressão reduzida* sobre agente dessecante, a operação deve ser feita à pressão reduzida em dessecador ou outro aparelho adequado.

#### DESSECADOR

Compreende-se por dessecador um recipiente perfeitamente fechado, de formato e dimensões adequadas para manter atmosfera de baixo teor de umidade por meio de agentes dessecantes nele introduzidos, tais como sílica-gel, cloreto de cálcio anidro, pentóxido de fósforo, ácido sulfúrico, dentre outros.

Dessecador à pressão reduzida é o que permite manter atmosfera de baixa umidade à pressão reduzida a não mais que 6,7 kPa (aproximadamente 50 mm de mercúrio), ou à pressão indicada na monografia.

#### MEDIDAS DE PRESSÃO

A expressão pascal (Pa) usada para medidas de pressão como a arterial, a atmosférica ou a interna de um aparelho, refere-se a uso de manômetros ou barômetros calibrados em relação à pressão exercida pela força de 1 newton uniformemente distribuída sobre uma superfície plana de 1 m<sup>2</sup> de área perpendicular à direção da força; 1 pascal equivale a 7,5 x 10<sup>-3</sup> mm de mercúrio.

#### PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

A menos que a monografia especifique diferentemente, todas as soluções em testes, reações e ensaios são preparadas com água purificada.

#### ODOR

As expressões *inodora*, *praticamente inodora*, *leve odor característico*, ou variação das mesmas, são usadas examinando-se a amostra após exposição ao ar por 15 minutos, quando se trata de embalagens de até 25 g recém-abertas. No caso de embalagens maiores, transferir amostras de cerca de 25 g para cápsula de 100 ml de capacidade.

A caracterização do odor é apenas descritiva e não pode ser considerada como padrão de pureza, exceto em casos em que um odor particular não seja permitido pela monografia.

**PROVA EM BRANCO**

As expressões *executar branco paralelo* ou *fazer prova em branco* ou *efetuar ensaio em branco* significam repetir a determinação em condições idênticas e com quantidades idênticas de reagentes, omitindo-se, apenas, a substância em exame.

**DESSECAÇÃO ATÉ PESO CONSTANTE**

Esta expressão significa que a secagem deve prosseguir até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após uma hora de secagem adicional nas condições especificadas.

**INCINERAÇÃO ATÉ PESO CONSTANTE**

Esta expressão significa que a incineração deve prosseguir a  $800^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$  (a menos que a monografia especifique diferentemente) até que duas pesagens consecutivas não difiram em mais de 0,5 mg por grama da substância em exame, sendo que a segunda pesagem deve ser efetuada após 15 minutos de incineração adicional.

**PORCENTAGENS**

As concentrações em porcentagem são expressas como segue:

*Por cento p/p (peso em peso)* ou  $\%$  (p/p) — expressa o número de g de componentes em 100 g de mistura.

*Por cento p/V (peso em volume)* ou  $\%$  (p/V) — expressa o número de g de um componente em 100 ml da solução.

*Por cento V/V (volume em volume)* ou  $\%$  (V/V) — expressa o número de ml de um componente em 100 ml de solução.

*Por cento V/p (volume em peso)* ou  $\%$  (V/p) — expressa o número de ml de um componente em 100 g da mistura.

A expressão *por cento* usada sem outra atribuição significa: para mistura de sólidos e semi-sólidos, por cento p/p; para soluções ou suspensões de sólidos em líquidos, por cento p/V; para soluções de líquidos, por cento V/V; para soluções de gases em líquidos, por cento p/V; para expressar teor de óleos essenciais em drogas vegetais, por cento V/p.

**INTERPRETAÇÃO DA PRECISÃO DOS DADOS NUMÉRICOS E LIMITES DE TOLERÂNCIA**

A precisão desejada nos testes, reações e ensaios farmacopéicos é indicada pelo número de decimais que se apresenta no texto. Por exemplo, 20 indica valor não menor que 19,5 e não maior que 20,5; 2,0 indica valor não menor que 1,95 e

não maior que 2,05; 0,20 indica valor não menor que 0,195 e não maior que 0,205.

Os limites de tolerância, expressos numericamente por um valor máximo e mínimo, indicam a pureza de uma substância farmacopéica. Estes valores podem ser expressos em porcentagem ou números absolutos. A faixa da variação deve ser estritamente observada, não sendo tolerados valores fora dos limites máximo e mínimo.

**CONSERVAÇÃO**

As substâncias farmacopéicas devem ser conservadas sob condições tais que evitem sua contaminação ou deterioração. As condições de conservação de substâncias farmacopéicas figuram nas respectivas monografias.

**Proteger da luz** significa que a substância deve ser conservada em recipiente opaco ou capaz de impedir a ação da luz.

**Proteger da poeira** significa que a substância deve ser mantida em frasco arrolhado e munido de capuz protetor.

Quando a monografia define as condições de temperatura na qual o fármaco deve ser conservado, são utilizados os seguintes termos:

**em congelador** — em temperatura entre  $0^{\circ}\text{C}$  e  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**em refrigerador** — em temperatura entre  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ ;

**local fresco** — ambiente cuja temperatura permanece entre  $8^{\circ}\text{C}$  e  $15^{\circ}\text{C}$ ;

**local frio** — é o ambiente cuja temperatura não excede  $8^{\circ}\text{C}$ .

A menos que a monografia especifique diferentemente, quando um fármaco necessita ser conservado em local fresco, o mesmo pode ser conservado em refrigerador.

**Temperatura ambiente** — é a temperatura normalmente existente em um local de trabalho; entre  $15^{\circ}\text{C}$  e  $30^{\circ}\text{C}$ .

**Local quente** — é o ambiente cuja temperatura permanece entre  $30^{\circ}\text{C}$  e  $40^{\circ}\text{C}$ .

**Calor excessivo** — indica temperaturas acima de  $40^{\circ}\text{C}$ .

Quando a monografia não especificar condições de conservação, estas incluem proteção contra a umidade, congelamento e calor excessivo.

**MATERIAL DE ACONDICIONAMENTO E EMBALAGEM**

Compreende-se por material de acondicionamento e embalagem o recipiente, envoltório, invólucro ou qualquer outra forma de proteção, removível ou não, destinado a envasar, proteger, manter, cobrir ou empacotar, especificamente ou não, matérias-primas, reagentes e medicamentos.

Material de acondicionamento propriamente dito é o que está em contato direto com seu conteúdo durante todo o tempo. Considera-se material de acondicionamento ampola, bisnaga, envelope, estojo, flaconete, frasco de vidro ou de plástico, frasco-ampola, cartucho, lata, pote, saco de papel e outros.

Embalagem é a que se destina à total proteção do material de acondicionamento nas condições usuais de transporte, armazenagem e distribuição. Considera-se embalagem: caixas de papelão, cartolina, madeira ou material plástico ou estojo de cartolina e outros.

Não deve haver qualquer interação, entre o material de acondicionamento e o seu conteúdo, capaz de alterar a concentração, a qualidade ou a pureza do material acondicionado.

As condições de acondicionamento são descritas nas monografias, utilizando-se os termos abaixo:

**Recipiente bem fechado** — é aquele que protege o seu conteúdo de perdas e contaminação por sólidos estranhos, nas condições usuais de manipulação, transporte, armazenagem e distribuição.

**Recipiente perfeitamente fechado** — é aquele que protege seu conteúdo de perdas e de contaminação por sólidos, líquidos e vapores estranhos, eflorescência, deliquescência ou evaporação nas condições usuais de manipulação, distribuição, armazenagem e transporte.

**Recipiente hermético** — é aquele impermeável ao ar ou qualquer outro gás, nas condições usuais de manipulação, transporte, armazenagem e distribuição.

**Cilindro de gás** — é recipiente metálico perfeitamente fechado, de paredes resistentes, destinado a conter gás sob pressão, obturado por válvula regulável, capaz de manter a saída do gás em vazão determinada.

**Recipiente para dose única** — é o recipiente hermético e que contém determinada quantidade do medicamento destinada a ser administrada de uma só vez, o qual, uma vez aberto, não poderá ser fechado com garantia de esterilidade.

**Recipiente para doses múltiplas** — é o recipiente hermético que permite a retirada de porções sucessivas de seu conteúdo, sem modificar a concentração, a pureza e a esterilidade da porção remanescente.

#### ROTULAGEM

Rótulo é a identificação impressa ou litografada, bem como dizeres pintados ou gravados a fogo, pressão ou decalque aplicados diretamente sobre recipientes, vasilhames, invólucros, envoltórios ou qualquer outro material de acondicionamento. Os rótulos terão dimensões necessárias à fácil leitura e serão redigidos de modo a facilitar o entendimento ao consumidor.

A confecção dos rótulos deverá obedecer às

normas vigentes do órgão federal de Vigilância Sanitária.

#### PRAZO DE VALIDADE

O prazo de validade limita o tempo durante o qual o produto poderá ser usado. Os produtos deverão indicar nos rótulos, quando tecnicamente possível, e embalagens a data do término do prazo de validade. Esta data identifica o tempo durante o qual o fármaco estará de acordo com as exigências da monografia farmacopéica, quando mantido sob as condições de conservação indicadas.

Quando o prazo de validade for indicado apenas pelo mês e ano, entende-se como vencimento do prazo o último dia desse mês.

#### SUBSTÂNCIAS ADJUVANTES

Substâncias adjuvantes, tais como, conservantes, estabilizantes, diluentes, desagregantes, aglutinantes, deslizantes, anti-aderentes, entre outras, são aquelas empregadas para preparar a forma farmacéutica. Essas substâncias devem ser inócuas nas quantidades adicionadas e não devem prejudicar a eficácia terapêutica do medicamento.

A presença de tais substâncias e a proporção adicionada devem ser claramente indicadas nos rótulos dos recipientes em que o produto é entregue para consumo.

A não ser que haja contra-indicação expressa, o ar dos recipientes pode ser substituído por dióxido de carbono ou nitrogênio.

#### CORANTES

Nas preparações farmacêuticas é tolerada a presença de substâncias corantes enumeradas em XI.

#### AÇÃO, USO E DOSES

São as constantes do relatório para registro do produto no órgão sanitário, atualizadas mediante revisão bibliográfica internacional, quando for o caso.

Quando indicadas nas monografias, as doses representam a quantidade do medicamento usualmente prescrita para pacientes adultos. O médico, a seu critério e sob sua exclusiva responsabilidade, poderá variar as quantidades e a frequência de administração de qualquer medicamento. Entretanto, a prescrição de doses muito superiores às usuais obriga o farmacêutico a confirmar, com o médico emissor da receita, as doses estabelecidas.

#### DOSES E MEDIDAS APROXIMADAS

Na falta de dispositivos de medidas apropriadas (dosadores, colheres-medida etc.), para a dispensação de medicamentos podem ser utilizadas medidas aproximadas. São, geralmente, unidades para uso doméstico, com frequência adotadas para informar ao paciente a medida da dose.

Tais medidas têm a seguinte indicação de capacidade:

Colher das de chá . . . . .	5 ml
Colher das de sobremesa . . . . .	10 ml
Colher das de sopa . . . . .	15 ml

As doses menores que 5 ml costumam ser administradas em frações da colher de chá ou em gotas.

#### PADRÕES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

Serão adotados padrões e substâncias de referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, pela Farmacopéia Internacional, pela Farmacopéia Européia e outras Farmacopéias de maior expressão técnica, até que padrões desenvolvidos por entidades nacionais, após estudos colaborativos, venham a receber aprovação e oficialização pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira.

Os padrões primários para Espectrofotometria de Absorção Atômica foram listados através da denominação do metal, seguido da sigla SRA (Solução Reagente para Absorção Atômica).

#### PRECISÃO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os resultados dos ensaios biológicos são expressos como potência média estimada e os limites de confiança para uma probabilidade de erro determinada. As especificações para as estimativas de potência e para os limites de confiança aceitáveis são indicadas em cada monografia. A probabilidade de erro utilizada é  $p = 0,05$ , a menos que outra probabilidade seja referida na monografia.

#### EXTRATOS

São preparações líquidas, sólidas ou semi-sólidas obtidas pela extração de drogas vegetais ou animais, frescas ou secas, por meio de líquido extrator adequado, seguida de sua evaporação total ou parcial e ajuste do concentrado a padrão previamente estabelecido.

#### EXTRATOS FLUIDOS

São preparações líquidas extrativas obtidas de drogas vegetais ou animais por extração com líquido apropriado ou por dissolução do extrato seco correspondente. Devem apresentar teor de princípios ativos e resíduo seco prescritos na monografia.

#### EXTRATOS MOLES

São preparações semi-sólidas obtidas por evaporação parcial de extratos de drogas vegetais ou animais, adicionadas ou não de adjuvantes e

apresentando teor de princípios ativos e resíduo seco prescritos na monografia.

#### EXTRATOS SECOS

São preparações sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por evaporação de extratos de drogas medicamentosas, adicionadas ou não de adjuvantes, apresentando teor de princípios ativos indicados na respectiva monografia.

#### ELIXIRES

São preparações líquidas, límpidas, hidroalcoólicas, apresentando teor alcoólico na faixa de 20 a 50%.

Os elixires são preparados por dissolução simples e devem ser envasados em frascos de cor âmbar e mantidos em lugar fresco e ao abrigo da luz.

#### XAROPES

São soluções aquosas concentradas de sacarose ou outros açúcares.

Quando não se destinam ao consumo imediato, devem ser adicionados de conservadores antimicrobianos autorizados.

#### TINTURAS

São preparações alcoólicas ou hidroalcoólicas resultantes da extração de drogas vegetais ou animais ou da diluição dos respectivos extratos. São classificadas em simples e compostas, conforme preparadas com uma ou mais matérias-primas.

Exceto quando prescrito diferentemente, 10 ml de tintura simples correspondem a 1 g de droga seca.

#### LOÇÕES

São preparações líquidas aquosas ou hidroalcoólicas destinadas ao uso externo através de aplicações sobre a pele.

#### ESPIRITOS

São preparações líquidas alcoólicas ou hidroalcoólicas, contendo princípios aromáticos ou medicamentosos e classificados em simples e compostos.

Os espíritos são obtidos pela dissolução de substâncias aromáticas no álcool, geralmente na proporção de 5% (p/V).

#### ÁGUAS AROMÁTICAS

São soluções saturadas de óleos essenciais ou outras substâncias aromáticas em água. Possuem odor característico das drogas com as quais são preparadas, recebendo também o nome das mesmas.

**EMULSÕES**

São preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas imiscíveis ou praticamente imiscíveis. De acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante classificam-se os sistemas em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O).

Quando são para uso injetável, devem atender às exigências de esterilidade (V.5.1.1) e pirogênios (V.5.1.2).

**SUSPENSÕES**

São preparações farmacêuticas obtidas pela dispersão de uma fase sólida insolúvel ou praticamente insolúvel em uma fase líquida.

Quando se destinam a uso injetável, as suspensões devem satisfazer às exigências de esterilidade (V.5.1.1) e não apresentar partículas maiores que 100  $\mu$ .

**CÁPSULAS**

São formas farmacêuticas sólidas que encerram o fármaco em envólucro mais ou menos elástico. O envólucro pode ser constituído de amido ou de gelatina.

As cápsulas devem atender às exigências de variação de peso, tempo de desintegração e teor de princípios ativos descritos na monografia.

**SUPOSITÓRIOS**

São preparações farmacêuticas sólidas com formato adequado para introdução no reto. Devem fundir à temperatura do organismo ou dispersar em meio aquoso.

Os supositórios devem atender às exigências contidas nas monografias especificadas, bem como ao teste de desintegração (V.1.4.2).

**ÓVULOS**

São preparações farmacêuticas sólidas, com formato adequado, para aplicação vaginal. Devem dispersar ou fundir à temperatura do organismo.

Estas preparações devem atender o teste de desintegração (V.1.4.2).

**COLÍRIOS**

São preparações farmacêuticas líquidas destinadas à aplicação sobre a mucosa ocular.

Devem atender às exigências especificadas nas respectivas monografias. Devem satisfazer às exigências de esterilidade (V.5.1.1).

**MEDICAMENTOS PRESSURIZADOS**

São medicamentos mantidos sob pressão em frasco e sistema de aplicação apropriados.

Devem atender às exigências das respectivas monografias.

**COMPRIMIDOS**

São formas farmacêuticas sólidas obtidas por compressão.

Esta forma farmacêutica deve atender às exigências de desintegração (V.1.4.1), dissolução (V.1.5), dureza (V.1.3.1) e friabilidade (V.1.3.2) descritas nos métodos gerais e previstas nas monografias específicas.

**PREPARAÇÕES TÓPICAS SEMI-SÓLIDAS**

Preparações tópicas semi-sólidas são aquelas previstas para aplicação na pele ou em certas mucosas para ação local ou penetração percutânea de medicamentos, ou ainda por sua ação emoliente ou protetora. As preparações destinadas ao uso oftálmico, ao tratamento de feridas ou à aplicação sobre lesões extensas da pele devem satisfazer às exigências do teste de esterilidade (V.5.1.1).

Distinguem-se 4 categorias de preparações semi-sólidas:

- Pomadas
- Cremes
- Géis
- Pastas.

**Pomadas**

Pomadas são preparações tópicas constituídas de base monofásica na qual podem estar dispersas substâncias sólidas ou líquidas.

**Cremes**

São preparações plásticas obtidas pela dispersão de duas fases líquidas não miscíveis ou praticamente imiscíveis.

**Géis**

Géis são preparações farmacêuticas constituídas por uma dispersão bicoerente de fase sólida em fase líquida.

Géis hidrofóbicos consistem usualmente de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco.

Géis hidrofílicos são preparações obtidas pela incorporação de agentes gelificantes — tragacanta, amido, derivados de celulose, polímeros carboxivinílicos e silicatos duplos de magnésio e alumínio — à água, glicerol ou propilenoglicol.

**Pastas**

Pastas são pomadas contendo grande quantidade de sólidos em dispersão.

**INJETÁVEIS**

Injetáveis são preparações estéreis destinadas à administração parenteral, apresentadas como solu-

ções, suspensões, ou emulsões. Devem atender as exigências de volume (V.1.2), esterilidade (V.5.1.1) e pirogênios (V.5.1.2).

#### Veículos aquosos

Usa-se geralmente água para injeção como veículo para injetáveis aquosos. Soluções de cloreto de sódio ou solução de Ringer ou outras soluções adequadas, preparadas com água para injeção, podem ser usadas em parte ou totalmente ao invés de somente água para injeção, a menos que a monografia especifique de outra forma. Todos os veículos aquosos devem satisfazer às exigências especificadas nas provas de pirogênios (V.5.1.2) e esterilidade (V.5.1.1).

#### Veículos não-aquosos

Veículos não-aquosos utilizados parcial ou totalmente na obtenção de preparações injetáveis podem ser miscíveis ou não miscíveis com a água. Entre os veículos miscíveis com a água, os mais usados são os polialcoois e os polímeros do óxido de etileno. Entre os imiscíveis com a água, os mais usados são os óleos fixos de origem vegetal e os mono e diglicerídeos de ácidos graxos.

Os óleos fixos são inodoros ou quase inodoros e seu odor e sabor não devem lembrar os de ranço. Devem satisfazer às exigências especificadas nas monografias e apresentar as características a seguir:

a) teste de resfriamento — Transferir quantidade de óleo fixo, previamente dessecado a 105 °C por duas horas e resfriado à temperatura ambiente em dessecador contendo sílica-gel, para recipiente de vidro incolor cilíndrico, com diâmetro interno de aproximadamente 25 mm. Fechar o recipiente e mergulhar durante quatro horas em água mantida a 10 °C. O líquido deve permanecer suficientemente claro, para que possa facilmente ser vista uma linha negra de 0,5 mm de espessura, quando mantida verticalmente atrás do cilindro e contra fundo branco;

b) índice de saponificação — Entre 185 e 200 (V.3.3.8);

c) índice de iodo — Entre 79 e 128 (V.3.3.10);

d) substâncias insaponificáveis — Refluxar em banho-maria 10 ml do óleo com 15 ml de hidróxido de sódio (1:16) e 30 ml de álcool etílico, agitando ocasionalmente até que a mistura se torne clara. Transferir a solução para cápsula de porcelana, evaporar o álcool etílico em banho-maria e misturar o resíduo com 100 ml de água. Deve resultar solução clara;

e) ácidos graxos livres — Os ácidos graxos livres em 10 g do óleo devem consumir, no máximo, 2 ml de hidróxido de sódio 0,02 M;

Os mono ou diglicerídeos sintéticos de ácidos graxos devem obedecer às seguintes exigências:

a) são líquidos e permanecem claros quando resfriados a 10 °C,

b) índice de iodo — não maior que 140 (V.3.3.10).

Os veículos não-aquosos devem ser selecionados com especial cuidado, pois não podem ser irritantes, tóxicos ou sensibilizantes e não devem interferir na eficácia terapêutica da preparação.

#### Substâncias adjuvantes

Adjuvantes são substâncias com finalidades específicas adicionadas às preparações injetáveis. Estas substâncias devem ser selecionadas tendo em vista o aumento da estabilidade do produto, não interferência na eficácia terapêutica nem no doseamento do princípio ativo, tampouco causar toxicidade na quantidade administrada ao paciente. Dentre tais substâncias incluem-se os solubilizantes, os antioxidentes, os agentes quelantes, os tampões, os agentes antibacterianos, os agentes antifúngicos, os agentes anti-espumantes e outros, quando especificados nas monografias. Não é permitida a adição de substâncias corantes.

São os seguintes os limites máximos para alguns adjuvantes, a menos que a monografia especifique de outra forma:

a) para agentes contendo mercúrio ou compostos tensoativos catiônicos — 0,01%;

b) para agentes do tipo clorobutanol, cresol e fenol — 0,5%;

c) para dióxido de enxofre, ou quantidade equivalente de sulfito, bissulfito ou metabissulfito de potássio ou sódio — 0,2%.

#### Recipientes para injetáveis

Os recipientes para preparações injetáveis devem ser fabricados com materiais que não provoquem interação com o conteúdo e possuam transparência suficiente para permitir inspeção visual. As tampas, quando usadas, tampouco podem influir na composição ou na conservação do medicamento, oferecendo perfeita vedação, mesmo após perfuradas várias vezes.

Os recipientes para preparações injetáveis são classificados em:

- Recipientes para dose única;
- Recipientes para dose múltipla;
- Recipientes para perfusão.

Os recipientes para dose única, ampolas e cartuchos de uso odontológico, são frascos de vidro ou de material plástico adequado, fechados pela fusão do vidro ou com a utilização de operculos fixos ou móveis. O conteúdo só deve ser utilizado em uma única dose, não podendo ser reaproveitado.

Os recipientes para dose múltipla são frascos de vidro de paredes resistentes que, após cheios com preparações líquidas ou com sólidos para serem dissolvidos ou suspensos, são selados com tampa de outro material. O conteúdo destes frascos pode ser removido para administração em uma única ou em várias doses.

Os recipientes para perfusão são frascos com mais de 50 ml de capacidade, podendo atingir 1 000 ml, selados com tampa de outro material ou não, fabricados de vidro ou de plástico. Os medicamentos envasados nestes tipos de recipientes devem ser administrados em uma única vez, com a utilização de equipos estéreis, e não podem conter agentes bactericidas ou antifúngicos. O uso de outros tipos de adjuvantes deve ser considerado cuidadosamente.

#### *Controle de volume em recipientes*

Proceder como descrito em V.1.2. Determinação de volume em produtos com dose única e injetáveis.

#### *Esterilidade*

As preparações injetáveis devem satisfazer às exigências especificadas na monografia para o *Teste de esterilidade* (V.5.1.1).

#### *Pirrogénios*

As preparações injetáveis devem satisfazer às exigências especificadas na monografia para o *Teste de pirrogénios* (V.5.1.2).



## V. MÉTODOS DE ANÁLISE

## V.1. PROCEDIMENTOS TÉCNICOS APLICADOS A MEDICAMENTOS

### V.1.1. DETERMINAÇÃO DE PESO EM FORMAS FARMACÊUTICAS

#### GENERALIDADES

Efetua-se a determinação de peso em produtos com dose individual e outras formas de apresentação, acondicionados em recipientes de doses múltiplas. As pesagens são feitas em balanças de sensibilidade adequada.

#### *Produtos com dose individual*

A dose individual depende do tamanho ou da quantidade de formas de apresentação. Mediante a determinação do peso individual obtém-se a informação sobre a homogeneidade por unidade.

#### *Produtos com doses múltiplas*

Em contraposição aos produtos com dose individual, as divergências de peso do conteúdo são determinadas a partir da quantidade nominal de enchimento. Deste modo obtém-se informações sobre a homogeneidade do envase.

#### COMPRIMIDOS

Pesar individualmente 20 comprimidos e determinar o peso médio.

Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na tabela, em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

#### DRÁGEAS

Pesar individualmente 20 drágeas e determinar o peso médio.

Pode-se tolerar não mais que cinco unidades fora dos limites especificados na Tabela I, em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

#### CÁPSULAS DURAS

Pesar individualmente 20 cápsulas e determinar o peso médio.

Pode-se tolerar variação dos pesos individuais

em relação ao peso médio, conforme indicado na tabela.

Se uma ou mais cápsulas estiverem fora dos limites indicados, pesar individualmente 20 unidades, remover o conteúdo de cada uma e pesar novamente. Determinar o peso médio do conteúdo pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e a vazia. Pode-se tolerar, no máximo, duas unidades fora dos limites especificados na tabela, em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Se mais que duas, porém não mais que seis, cápsulas, estiverem com variação entre uma e duas vezes o índice da tabela, em relação ao peso médio determinar o peso do conteúdo em mais 40 unidades e calcular o peso médio das 60. Determinar as diferenças, em relação ao novo peso médio. Pode-se tolerar, no máximo, 6 unidades em 60 cápsulas cuja diferença exceda os limites da tabela, em relação ao peso médio, porém nenhuma cuja diferença exceda o dobro dos mesmos.

#### CÁPSULAS MOLES

Proceder como descrito sob o item cápsulas duras, utilizando a seguinte técnica para remoção do conteúdo:

- cortar as cápsulas previamente pesadas e lavá-las com auxílio de éter etílico ou outro solvente adequado. Deixar em repouso à temperatura ambiente até completa evaporação do solvente e

- seguir os conceitos de variação de peso estabelecidos para cápsulas duras.

#### SUPOSITÓRIOS E ÓVULOS

Pesar individualmente 20 supositórios ou óvulos e determinar o peso médio.

Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na tabela, em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Tabela I - Variação de peso em formas farmacêuticas

<i>Formas farmacêuticas</i>	<i>Peso médio ou valor nominal declarado</i>	<i>Limites de variação</i>
Comprimidos, núcleos para drágeas, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas	até 80,0 mg	$\pm 10,0\%$
	entre 80,0 e 250,0 mg	$\pm 7,5\%$
	acima de 250,0 mg	$\pm 5,0\%$
Drágeas e comprimidos revestidos	até 25,0 mg	$\pm 15,0\%$
	entre 25,0 e 150,0 mg	$\pm 10,0\%$
	entre 150,0 e 300,0 mg	$\pm 7,5\%$
	acima de 300,0 mg	$\pm 5,0\%$
Cápsulas duras e moles, cápsulas vaginais	até 300,0 mg	$\pm 10,0\%$
	acima de 300,0 mg	$\pm 7,5\%$
Supositórios e óvulos	para todos os pesos	$\pm 5,0\%$
Cremes, pomadas, pós e granulados	até 60,0 g	$\pm 10,0\%$
	entre 60,0 e 150,0 g	$\pm 5,0\%$
Pós estéreis e liofilizados	abaixo de 40,0 mg	*
	acima de 40,0 mg	$\pm 10,0\%$

(\*) Se o peso declarado for de 40 mg ou menos, a determinação é feita segundo método adequado de doseamento. O valor do conteúdo pode divergir acima ou abaixo de 15% do mesmo.

#### PÓS, GRANULADOS, CREMES E POMADAS

Pesar individualmente 10 embalagens. Remover o conteúdo e lavar os respectivos recipientes utilizando solvente adequado; secar, esfriar à temperatura ambiente e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo.

Determinar o peso médio do conteúdo, o qual não deverá ser inferior ao valor nominal declarado. Os pesos individuais podem divergir do mesmo, de acordo com a porcentagem indicada na tabela.

Caso não seja cumprida essa exigência, determinar o peso individual do conteúdo de 20 embalagens adicionais. O peso médio das 30 embalagens não deve ser inferior ao valor nominal declarado e os pesos individuais podem divergir de acordo com a porcentagem indicada na tabela, sendo que somente 1 embalagem em 30 pode divergir dos limites de variação indicados na tabela.

#### PÓS ESTÉREIS E LIOFILIZADOS

Pesar individualmente 20 unidades, remover o conteúdo e lavar os respectivos recipientes utilizando água e em seguida álcool etílico. Secar em estufa a 105 °C por 1 hora (ou à temperatura mais baixa, até peso constante), esfriar em dessecador e pesar novamente, recolocando a tampa livre da cápsula metálica, no caso de frascos-ampola. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo. Determinar o peso médio das 20 unidades. Somente duas podem divergir do limite especificado na Tabela I, em relação ao peso médio, porém nenhuma pode divergir de  $\pm 15\%$  do mesmo.

Se mais que duas, porém não mais que sete, estiverem com variação entre  $\pm 10\%$  e  $\pm 15\%$  e se mais que 1 divergir mais que  $\pm 15\%$  do peso médio do conteúdo, determinar o peso individual de 40 unidades adicionais e calcular o peso médio das 60. Somente 6 entre os 60 pesos individuais podem divergir mais que  $\pm 10\%$  do peso médio do conteúdo, porém não mais que 1 pode divergir mais que  $\pm 15\%$  do mesmo.

#### INJETÁVEIS

##### Controle do peso contido em recipientes

Os recipientes que contêm sólidos destinados a soluções ou suspensões injetáveis devem ser examinados quanto ao peso de sólidos dispensados e satisfazer às exigências especificadas na monografia.

**Uniformidade de peso** - Os sólidos destinados a soluções ou suspensões injetáveis, cujos pesos médios são menores ou iguais a 40 mg, não estão sujeitos a este teste, mas devem ser submetidos a doseamento apropriado.

Os sólidos, cujos pesos médios são maiores que 40 mg, devem satisfazer às exigências do teste descrito a seguir, quando o mesmo é realizado sobre 20 unidades.

Remover o rótulo do recipiente. Lavar e secar o recipiente externamente, abrir e pesar imediatamente com o seu conteúdo. Esvaziar o recipiente o mais completamente possível por meio de leves batidas e enxaguar com água, se necessário, e a seguir com álcool etílico. Secar o recipiente a 105 °C por uma hora ou, conforme a natureza do

conteúdo, à temperatura mais baixa, até peso constante. Esfriar em dessecador e pesar. A diferença entre o peso do recipiente com o conteúdo e o peso do recipiente vazio representa o peso do conteúdo. Repetir este procedimento com os outros dezanove recipientes. Não mais que dois dos pesos individuais podem desviar mais que 10% do peso médio determinado sobre os vinte recipientes e nenhum deve desviar em mais que 20%.

**Teor declarado** — Para a determinação do teor declarado em um recipiente, proceder a um dos testes que seguem dependendo da exigência da monografia.

**Teste A** — Determinar o peso do conteúdo de dez recipientes seguindo o teste descrito para *Uniformidade de peso*. O peso do conteúdo de cada recipiente não deve desviar do peso declarado no rótulo, em percentual maior que o indicado na Coluna A da Tabela 2. Apenas um recipiente pode ter o peso de seu conteúdo desviado em percentual não maior que o indicado na coluna B da referida tabela.

**Teste B** — Determinar o peso do conteúdo de dez recipientes seguindo o teste descrito para

Tabela 2 — Desvios percentuais

Peso declarado no rótulo (em g)	Desvio de percentual	
	A	B
< 0,12	± 10,0%	± 15,0%
0,12 < 0,3	± 7,5%	± 12,5%
> 0,3	± 5,0%	± 10,0%

*Uniformidade de peso*. Misturar o conteúdo de dez recipientes e proceder ao doseamento indicado na monografia. Após o resultado do ensaio, calcular a quantidade proporcional do princípio ativo contido em cada recipiente. Esta quantidade deve estar de acordo com o estabelecido na variação permitida na monografia e apenas um recipiente pode desviar mais que duas vezes do grau de tolerância permitido na monografia. Quando um ensaio biológico é especificado, calcular, do resultado do ensaio, a potência do conteúdo dos recipientes. A potência deve estar entre os limites fiduciais estabelecidos na monografia.

## V.1.2. DETERMINAÇÃO DE VOLUME EM FORMAS FARMACÊUTICAS

### GENERALIDADES

A determinação do volume nominal em produtos líquidos com dose múltipla é efetuada através do peso do seu conteúdo. As pesagens são realizadas em balanças de sensibilidade adequada. Para produtos líquidos com dose única e para injetáveis, a determinação é realizada através de seringa de vidro previamente calibrada.

### TÉCNICA

#### *Produtos líquidos com dose múltipla*

Pesar individualmente o número de unidades indicadas na Tabela 1, remover o conteúdo e lavar os recipientes utilizando água e em seguida álcool etílico. Secar em estufa a 105 °C por 1 hora ou a temperaturas mais baixas até peso constante, conforme o material do recipiente. Esfriar à temperatura ambiente e pesar novamente, recolhendo a tampa e outras partes correspondentes a cada recipiente. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo. Determinar o peso médio das unidades testadas e anotar os valores mínimo e máximo individuais encontrados.

Para se obter os volumes correspondentes efetuar o seguinte cálculo:

$$\text{em que } V = \frac{m}{d}$$

V = volume em ml,

m = peso do conteúdo em g,

d = densidade do produto em g/ml, determinada a 25 °C ou conforme descrito na monografia.

Tabela 2

Volume declarado ml	Unidades a serem testadas
de 0,5 a 3,0	12
de 3,0 a 10,0	10
maior que 10,0	6

Tabela 3

Volume declarado ml	Excesso mínimo para líquidos	
	móveis/ml	viscosos/ml
0,5	0,10	0,12
1,0	0,10	0,15
2,0	0,15	0,25
5,0	0,30	0,50
10,0	0,50	0,70
20,0	0,60	0,90
50,0 ou mais	2,00 %	3,00 %

O volume médio das determinações não pode ser inferior ao declarado. Nenhuma unidade poderá ultrapassar o índice do desvio máximo citado na Tabela 1.

#### *Produtos líquidos com dose única e injetáveis*

Testar o número de unidades indicadas na Tabela 2. Remover o conteúdo total de cada unidade, com auxílio de seringa, e efetuar a medição. Determinar o volume médio das unidades testadas e anotar os valores mínimo e máximo individuais encontrados. O volume não deve ser inferior ao indicado na Tabela 3.

Tabela 1

Volume declarado ml	Unidades a serem testadas	Desvio máximo tolerado
até 10 ml	12	3,0%
entre 10 ml e 30 ml	10	2,5%
entre 30 ml e 100 ml	6	2,0%
entre 100 ml e 250 ml	3	1,5%
acima de 250 ml	2	1,0%

### V.1.3. DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA EM COMPRIMIDOS

Os testes de resistência mecânica, tais como friabilidade e dureza, são considerados oficiais dentro do contexto legal desta Farmacopéia e como tal constituem elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos com ou

sem revestimento. Estes testes visam, especificamente, a demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por golpes ou fricção durante os processos de revestimento, embalagem, transporte, armazenagem etc.

### V.1.3.1 DUREZA

Dureza é a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é proporcional ao logaritmo da força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade.

O teste consiste em submeter o comprimido à ação de um aparelho que meça a força aplicada diametralmente, necessária para esmagá-lo. A força é medida em newton (N). Para teste de comprimidos, o mínimo aceitável é 30 N (aproximadamente 3 kgf).

quanto ao mecanismo empregado para exercer a pressão. A força pode ser exercida por mola espiral ou por bomba de ar operada manualmente. À medida que a pressão aumenta, um êmbolo ou pistão aplica determinada força no comprimento apoiado em base fixa. Os valores obtidos com o aparelho movido pela bomba de ar podem ser aproximadamente 1,5 vezes maiores que os obtidos com a mola espiral. A dureza mínima aceitável, neste caso, é de 45 N (aproximadamente 4,5 kgf).

#### APARELHAGEM

Podem ser utilizados, essencialmente, dois tipos de aparelhos, os quais diferem basicamente

## V.1.3.2 FRIABILIDADE

Friabilidade é a falta de resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica.

O teste consiste em pesar com exatidão um mínimo de vinte comprimidos, introduzi-los no aparelho e submetê-los à ação do aparelho e retirá-los após efetuadas cem rotações num período de cinco minutos. Após remover qualquer resíduo de poeira dos comprimidos, eles são novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final dos comprimidos representa a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido. Consideram-se aceitáveis os comprimidos com perda inferior a 1,5% do seu peso ou a porcentagem estabelecida na monografia, quando submetidos ao teste descrito.

Para cálculo da porcentagem de friabilidade não são considerados os comprimidos lascados ou que se separam em duas camadas.

## APARELHAGEM

Consiste num cilindro, com 20 cm de diâmetro e 4 cm de espessura, o qual gira em torno de seu eixo, à velocidade de rotação de 20 rpm. O cilindro contém várias lâminas, que recolhem os comprimidos em cada rotação, levando-os a uma altura pré-fixada, de onde caem repetidamente, após cada rotação.



## V.1.4. TESTES DE DESINTEGRAÇÃO

### V.1.4.1. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

O teste de desintegração determina se um comprimido ou cápsula se desintegra dentro do limite de tempo especificado na monografia de cada forma medicamentosa, quando unidades, em número especificado, são submetidas às condições experimentais subsequentemente descritas.

A desintegração é definida, para os fins deste teste, como o estado no qual nenhum resíduo da unidade (cápsula ou comprimido), salvo fragmentos de revestimento ou matriz de cápsula insolúveis, permanece na tela metálica do aparelho de desintegração. Consideram-se também como "desintegradas" as unidades que durante o teste se transformam em massa pastosa que não apresente

que permaneça sobre a tela do aparelho.

#### APARELHAGEM

Consiste de sistema de cestas e tubos, de recipiente apropriado para o líquido de imersão (um béquer com capacidade de 1 l), de termostato para manter o líquido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , e de mecanismo para movimentar verticalmente a cesta e os tubos no líquido de imersão, com frequência constante e percurso específico. O volume do líquido de imersão deverá ser suficiente para que, ao atingir o ponto mais alto do percurso, a parte inferior da cesta fique no mínimo a 25 mm abaixo da superfície do líquido, e que no ponto mais baixo fique no mínimo a 25 mm do fundo do béquer. Os movimentos ascendente e descendente deverão ter a mesma velocidade e a mudança do sentido do movimento deve ser suave.

A cesta consiste em seis tubos de vidro ou acrílico transparente, abertos em ambos os lados. As dimensões dos tubos são: comprimento 77,5 mm, diâmetro interno 21,5 mm e espessura das paredes aproximadamente 2 mm.

Os tubos são mantidos verticalmente, adaptando-se em cada extremidade um disco de material adequado transparente, com diâmetro de 90 mm e espessura de 6 mm, possuindo seis orifícios nos quais são introduzidos os tubos. Os seis orifícios equidistam do centro de cada disco, estando igualmente espaçados. Na face externa do disco inferior encontra-se uma tela de arame (diâmetro de 0,635 mm) de aço inoxidável, com abertura de 2 mm, presa através de três parafusos.

O disco superior possui tampa de aço inoxidável ou acrílico, com diâmetro de 90 mm, que é fixada mediante três presilhas. A tampa possui orifício central com diâmetro de 32 mm que encaixa nas presilhas e seis orifícios igualmente espaçados e

equidistantes do centro, com diâmetro de 19 mm. No teste de desintegração de cápsulas, utiliza-se tela de arame de aço inoxidável presa na face externa da tampa, semelhante à tela adaptada ao disco inferior da cesta.

As partes que constituem a cesta são montadas e mantidas firmemente unidas mediante parafuso metálico central, com diâmetro de 5 mm, com porcas convenientemente situadas. A extremidade superior do parafuso central deve ter dispositivo para fixar a cesta ao mecanismo que produz o movimento vertical do sistema.

Quando indicado, deve ser adicionado em cada tubo da cesta um disco cilíndrico de material adequado transparente, com densidade relativa entre 1,18 e 1,20, diâmetro de  $20,7 \text{ mm} \pm 0,15 \text{ mm}$ , e espessura de  $9,5 \text{ mm} \pm 0,15 \text{ mm}$ . Cada disco possui cinco orifícios, cada um com 2 mm de diâmetro, sendo um orifício no eixo do cilindro e os outros quatro equidistantes, dispostos sobre um círculo de 6 mm de raio relativo ao centro do disco. A superfície lateral do disco possui quatro mossas equidistantes, com profundidade de 2,55 mm, em forma de V, as quais, no lado superior do disco, medem 9,5 mm de largura, e no lado inferior, 1,6 mm. Todas as superfícies do disco são lisas.

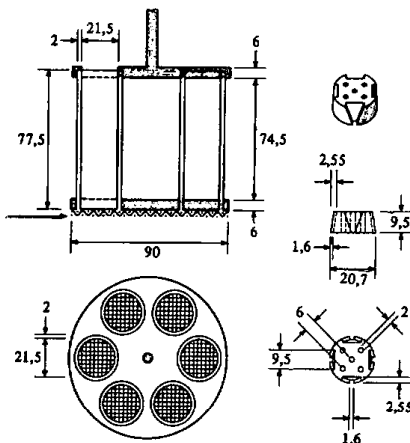
O desenho e montagem da cesta podem variar desde que as especificações para os tubos e abertura das telas sejam mantidas.

#### COMPRIMIDOS

Utilizar inicialmente 6 comprimidos no teste. Colocar 1 comprimido em cada um dos seis tubos da cesta, adicionar um disco a cada tubo e acionar o aparelho, utilizando água mantida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  como líquido de imersão, a menos que outro fluido seja especificado na monografia do medicamento. Ao final do intervalo de tempo especificado, cessar o movimento da cesta e observar o material em cada um dos tubos: todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados. O limite de tempo estabelecido como critério geral para o teste de desintegração de comprimidos é de 30 minutos, a menos que outra especificação se encontre na monografia do medicamento.

#### COMPRIMIDOS COM REVESTIMENTO AÇUCARADO OU FILME

Utilizar inicialmente 6 comprimidos. Colocar 1 comprimido em cada um dos seis tubos da cesta.



Aparelho para desintegração de comprimidos e cápsulas (dimensões em mm).

Se o comprimido possuir um revestimento externo solúvel, mergulhar a cesta em água, à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Colocar um disco em cada tubo, e acionar o aparelho, utilizando água mantida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  como líquido de imersão. Decorridos 60 minutos, cessar o movimento da cesta e observar o material em cada um dos tubos. Se os comprimidos não estiverem completamente desintegrados, testar outros 6 comprimidos, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como líquido de imersão, mantido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após 60 minutos, cessar o movimento da cesta e observar o material em cada um dos tubos: todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados.

#### COMPRIMIDOS COM REVESTIMENTO ENTÉRICO

Utilizar inicialmente 6 comprimidos no teste. Colocar 1 comprimido em cada um dos seis tubos da cesta. Se o comprimido possuir um revesti-

mento externo solúvel, mergulhar a cesta em água, à temperatura ambiente, durante 5 minutos. Acionar o aparelho, sem adicionar os discos, utilizando ácido clorídrico 0,1 M mantido a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  como líquido de imersão. Decorridos 60 minutos, cessar o movimento da cesta e observar os comprimidos: estes não devem estar desintegrados, rachados ou amolecidos. Colocar um disco em cada tubo e acionar o aparelho, utilizando solução tampão fosfato pH 6,8 (para comprimidos com revestimento de goma-laca recomenda-se ajustar o pH deste tampão para 7,5), mantida a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , como líquido de imersão. Decorrido o tempo especificado na monografia, ou 45 minutos, cessar o movimento da cesta e observar o material em cada um dos tubos; todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados, podendo restar apenas fragmentos de revestimento insolúveis.

#### CÁPSULAS GELATINOSAS

Aplicar o teste conforme descrito para comprimidos omitindo o uso dos discos. Utilizar uma tela com abertura de 2 mm, de arame de aço inoxidável adaptada à tampa da cesta, conforme descrito no item *Aparelhagem*. Observar as cápsulas após 45 minutos ou conforme especificado na monografia do medicamento: todas as cápsulas devem estar completamente desintegradas, ou restando apenas fragmentos insolúveis de consistência mole.

#### CÁPSULAS GASTRO-RESISTENTES

Utilizar a cesta conforme descrito para Cápsulas Gelatinosas e proceder conforme descrito para Comprimidos com Revestimento Entérico.

#### COMPRIMIDOS SUBLINGUAIS

Aplicar o teste conforme descrito para Comprimidos, omitindo o uso de discos. Após 5 minutos, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados.

V.1.4.2. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO DE  
SUPOSITÓRIOS, ÓVULOS E COMPRIMIDOS VAGINAIS

Considera-se desintegração completa quando o supositório ou óvulo apresentar:

- a) dissolução completa;
- b) separação completa de seus componentes, acumulando-se substâncias graxas fundidas na superfície do líquido, depositando-se os pós insolúveis no fundo do recipiente e dissolvendo-se os componentes solúveis da amostra, sendo que a distribuição dos componentes ocorre de um ou mais dos modos descritos acima;
- c) amolecimento da amostra que pode ser acompanhado pela mudança da sua forma sem que ocorra separação completa de seus componentes; o amolecimento deve ser tal que, ao pressionar a amostra amolecida com bastão de vidro, não se perceba existência de camada mais dura na sua superfície;
- d) ruptura da cápsula gelatinosa de óvulos, permitindo liberação de seus componentes;
- e) ausência de resíduo sobre o disco perfurado ou, quando houver, tenha a consistência de massa mole que não ofereça resistência à pressão de bastão de vidro.

APARELHO

O aparelho (Fig. 1) consiste de cilindro de vidro ou plástico, transparente, com paredes de espessura apropriada, em cujo interior se encontra preso, por três ganchos de metal, um dispositivo metálico que consiste de dois discos perfurados de aço inoxidável, contendo cada um 39 orifícios de 4 mm de diâmetro cada. O diâmetro de cada disco é tal que permite a sua introdução no cilindro transparente, ficando os discos afastados de, aproximadamente, 30 cm. A determinação é levada a efeito utilizando-se três aparelhos, contendo cada um uma única amostra. Cada aparelho é introduzido no interior de bécquer de, pelo menos, 4 litros de capacidade, contendo água à temperatura de 36-37°C (a não ser que a monografia especifique diferentemente). O bécquer é provido de agitador que opere em velocidade lenta e dispositivo que permita inverter o cilindro sem retirá-lo da água.

PROCEDIMENTO

Usar três supositórios ou óvulos. Colocar cada um deles sobre o disco inferior do dispositivo,

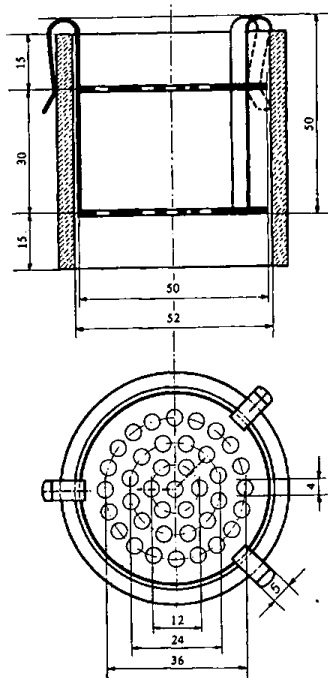
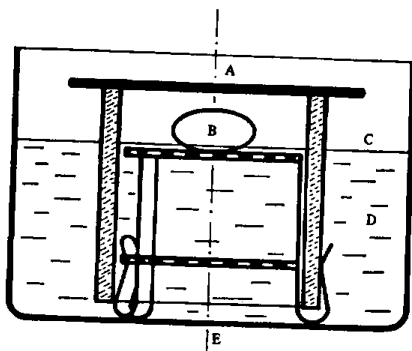


Fig. 1 Aparelho para desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais (dimensões em mm).

DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DESINTEGRAÇÃO DE SUPÓSITÓRIOS, ÓVULOS  
E COMPRIMIDOS VAGINAIS

V.1.A.2.-2



- A - Placa de vidro      D - Água  
B - Comprimido vaginal      E - Fundo do recipiente  
C - Superfície da água

Fig. 2 Aparelho para desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais.

introduzir e fixar o disco no interior do cilindro. Inverter o aparelho cada 10 minutos. Examinar as amostras após decorrido o tempo prescrito na monografia. O teste é considerado satisfatório se todas as amostras se apresentam desintegradas.

*Procedimento para comprimidos vaginais*

Usar o aparelho descrito em desintegração de supositórios e óvulos, montado conforme Figura 2. Introduzir o cilindro em béquer de diâmetro adequado contendo água a 36-37 °C que deve cobrir uniformemente as perfurações do disco. Utilizar três aparelhos, colocando em cada um deles um comprimido vaginal sobre o disco superior. Cobrir o aparelho com uma placa de vidro para assegurar a umidade adequada. Examinar o estado de cada amostra após decorrido o tempo prescrito na monografia. O teste é considerado satisfatório se todas as amostras se apresentam desintegradas.

## V.1.5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

O teste de dissolução determina a porcentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro do período de tempo especificado na monografia de cada produto, quando o mesmo é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O teste visa a demonstrar se o produto atende às exigências constantes da monografia do medicamento para comprimidos e cápsulas.

### APARELHAGEM

O aparelho de dissolução consiste de sistema contendo as seguintes partes: (1) um recipiente de forma cilíndrica e fundo arredondado com a parte superior achatada, de vidro, plástico ou qualquer outro material transparente e inerte, que não reaja, adsorva ou interfira com o medicamento a ser testado. Sua capacidade é de um litro e suas dimensões são: altura de 160 a 175 mm e diâmetro interno de 100 a 105 mm. Pode ser adaptada tampa de material transparente com um furo central, para permitir a colocação de agitadores e um outro para permitir as coletas de amostras e a inserção do termômetro; (2) uma haste metálica (de aço inoxidável) para agitar o meio de dissolução, podendo ter em seus extremos dois tipos de agitadores: pás ou cestas (vide Figs. 1 e 2). A haste deve ser centralizada em relação ao fundo do recipiente que contém o meio de dissolução, e, ao rodar suavemente, seu eixo não deve ser desviado mais que 0,2 mm em relação ao eixo vertical do recipiente; (3) um dispositivo com seletor de velocidade que imprima à haste a velocidade de rotação especificada na monografia do produto e capaz de manter essa velocidade dentro dos limites de  $\pm 2\%$ . A rotação não deve produzir efeitos indesejáveis na dinâmica do sistema.

Os recipientes são submergidos em banho de material transparente e tamanho adequado, o qual deve possuir dispositivo capaz de manter temperatura homogênea de  $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$  durante o período do teste. Deve-se ter cuidado especial para excluir, da montagem e suas vizinhanças, qualquer vibração, agitação ou movimento externo que altere de forma significativa a dinâmica do sistema. De preferência, a montagem da aparelhagem deve permitir a visualização das amostras testadas e dos agitadores durante o teste.

### Pás

Quando especificado na monografia utiliza-se como agitador haste de aço inoxidável, contendo uma pá em sua extremidade, sendo que a haste e

a pá formam um conjunto único, podendo ser revestido de material inerte. As pás devem obedecer às especificações da Fig. 1. Durante o teste, deve ser mantida distância de  $25\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$  entre o extremo inferior da pá e o fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução. Logo após adicionar a amostra ao meio de dissolução, inicia-se a agitação (tempo zero) com velocidade pré-fixada e durante o tempo especificado na monografia correspondente.

É importante que as amostras se depositem no centro do fundo do recipiente que contém o meio de dissolução. Caso a amostra flutue, é possível envolvê-la com um pequeno pedaço de arame em espiral, de material inerte, com poucas voltas, tendo o cuidado especial para que a mesma fique folgada e que não seja danificada durante a operação.

### Cesta

Quando especificado na monografia, utiliza-se como agitador uma haste de aço inoxidável, que possui em sua extremidade uma cesta desmontável, do mesmo material, conforme especificações na Fig. 2. A tela utilizada na confecção da cesta deve ter uma abertura de 0,250 mm, a menos que outra especificação seja dada na monografia. A amostra deve ser colocada dentro da cesta seca, no início do teste. Durante o teste deve ser mantida distância de  $25\text{ mm} \pm 2\text{ mm}$  entre a parte inferior da cesta e o fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução.

### MEIO DE DISSOLUÇÃO

Utiliza-se o meio de dissolução especificado na monografia do produto. Os gases naturalmente dissolvidos no meio de dissolução devem ser retirados antes do início do teste, pois ao serem liberados sob a forma de pequenas bolhas durante o teste causam certa turbulência no meio, alterando significativamente os resultados. Quando o meio de dissolução for solução tampão, o pH deve ser ajustado a  $\pm 0,05$  unidades do valor do pH especificado na monografia do produto.

### TEMPO DE DISSOLUÇÃO

Quando um único tempo for especificado na monografia do produto, o mesmo representa o tempo máximo dentro do qual deve ser dissolvida a quantidade mínima, em porcentagem, de princípio ativo estabelecida na mesma. Não obstante, se esta quantidade for obtida em tempo menor que o especificado, o teste pode ser dado por terminado ao final deste tempo. Quando mais de um tempo for especificado na monografia,

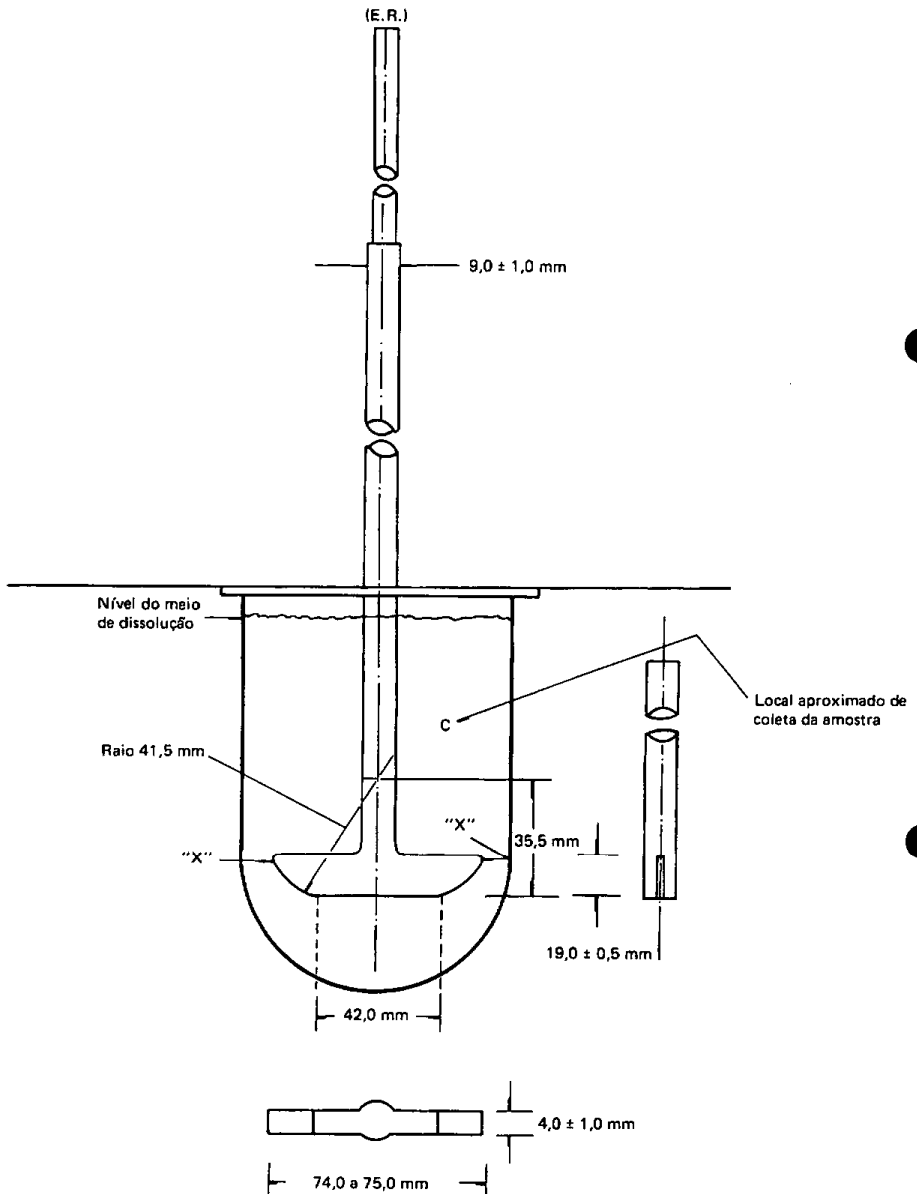


Fig. 1 Pás para agitação do meio de dissolução. A tolerância em excentricidade do agitador ao girar em torno do eixo de rotação (E.R.) é de 0,1 mm, medindo-se nas duas extremidades indicadas pela letra "X".

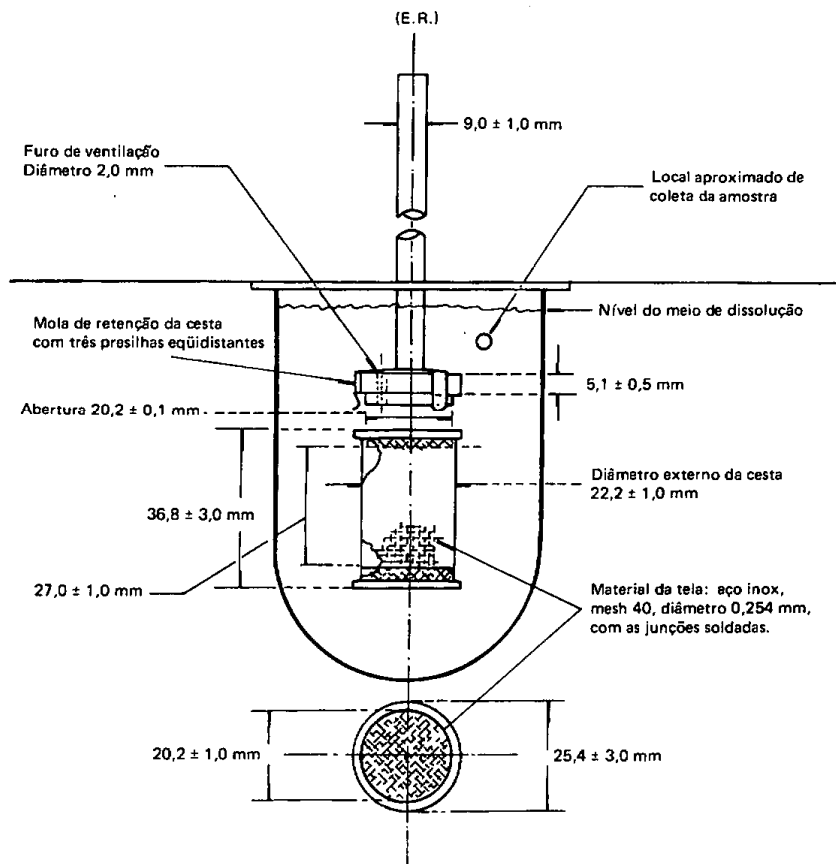


Fig. 2 Cesta para agitação do meio de dissolução. A tolerância em excentricidade do agitador ao girar em torno do eixo de rotação (E.R.) é de 0,2 mm, medindo-se na base da cesta montada.

devem ser tomadas alíquotas ao final de cada tempo indicado.

#### PROCEDIMENTO

Montar e calibrar a aparelhagem conforme especificações do fabricante, a fim de reduzir ao mínimo fatores que alterem significativamente a dinâmica do sistema (excentricidade, vibração etc.). Adicionar o volume medido do Meio de Dissolução especificado na monografia do produto, convenientemente desaerado, ao recipiente da aparelhagem de dissolução. Manter a temperatura do meio a  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , retirando-se o termômetro antes de iniciar a agitação. Caso se usem as pás como dispositivo de agitação, colocar a amostra (comprimido ou cápsula) no recipiente de dissolução. Caso se use a cesta, colocar a amostra dentro da cesta. Em ambos os casos, retirar cuida-

dosamente, quando presentes, as bolhas de ar formadas na superfície das amostras, ao entrarem em contato com o meio de dissolução. Caso não seja possível retirar as bolhas nos primeiros minutos do teste, desprezar o resultado se este diferir significativamente da média dos demais resultados, realizando novo teste. Imediatamente, dar início à agitação, conforme velocidade pré-fixada. Em intervalos de tempo especificados na monografia do produto, retirar da zona média, entre a superfície do meio de dissolução e a parte superior do cesto ou pás, amostra para análise (veja Figs. 1 e 2). A menos que especificado na monografia do produto, reponha o volume da amostra retirado com líquido de dissolução. Ao final de cada tempo especificado, colocar alíquotas do meio de dissolução no local correto de coleta de amostra (ver Figs. 1 e 2). Após filtração e diluição (caso necessário) da alíquota, a análise do medica-

mento é efetuada mediante a técnica de detecção indicada na monografia do produto. Repetir o teste com doses unitárias adicionais, conforme necessário, considerando os critérios de aceitação.

Considerar as possíveis interferências nos cálculos dos resultados e efetuar as correções necessárias. Fatores de correção acima de 25% do valor declarado no rótulo invalidam o teste.

**Nota:** Caso o material da cápsula interfira na análise, testar a cápsula vazia, isenta de traços de seu conteúdo, no mesmo volume de meio de dissolução especificado, e efetuar a análise conforme as exigências descritas na monografia do produto.

#### CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

A menos que a monografia do produto especifique diversamente, a amostra será satisfatória quando os resultados preencherem às seguintes exigências:

<i>Estágio</i>	<i>Nº Amostras Testadas</i>	<i>Critério de Aceitação</i>
$E_1$	06	Cada unidade apresenta resultados maiores ou iguais a $T^* + 5\% \dagger$
$E_2$	06	Média de 12 unidades ( $E_1 + E_2$ ) é igual ou maior do que $T$ e nenhuma unidade apresenta resultados inferiores a $T - 15\% \dagger$
$E_3$	12	Média de 24 unidades ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) é igual ou maior do que $T$ e não mais que 2 unidades apresentam resultados inferiores a $T - 15\%$ .

\* O termo  $T$  ( $T_{\infty}$  ou  $T_r$ ) pode ser expresso por uma das seguintes maneiras, conforme especificado nas monografias:

a) Como teor real das unidades do produto, ( $T = T_{\infty}$ ), — determinado para cada amostra — e que estabeleça condições assegurando que esta foi completamente dissolvida, por exemplo, após a conclusão da prova elevar a velocidade de rotação a pelo menos 150 rpm, até que não seja detectado aumento no teor da amostra dissolvida, em quantidade superior a dois por cento, observado em períodos não menores que 10 minutos.

b) Como teor rotulado ( $T = T_r$ ), quando este se encontra dentro dos limites especificados na monografia.

† Os valores 5% e 15% representam porcentagens de  $T_{\infty}$  ou  $T_r$ , conforme o caso.

#### *Estágio $E_1$*

Num primeiro estágio ( $E_1$ ) são testadas seis unidades. Se cada unidade individualmente apresentar resultado igual ou maior do que  $T + 5\%$ , o produto será aprovado, não sendo necessário efetuar o segundo.

$T - 15\%$ , o resultado do teste será considerado satisfatório.

#### *Estágio $E_2$*

Caso o critério para o primeiro estágio não for atendido, repete-se o teste com mais seis comprimidos ( $E_2$ ). Se a média das doze unidades testadas ( $E_1 + E_2$ ) for maior ou igual a  $T$  e se nenhuma das unidades testadas apresentar resultados inferiores a

#### *Estágio $E_3$*

Caso o critério para o segundo estágio ainda não for satisfatório, repete-se o teste com mais 12 unidades. Se a média das 24 unidades testadas ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) for maior ou igual a  $T$  e se no máximo duas unidades apresentarem resultados inferiores a  $T - 15\%$ , o produto é aprovado. Se a amostra ainda não satisfizer a este terceiro critério, o produto é reprovado.



## V.2. MÉTODOS FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS

### V.2.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA

Para se efetuar a medição da massa, as balanças devem apresentar capacidade e sensibilidade de acordo com o grau de precisão requerido.

Tratando-se de atividades que exijam pesagens exatas, na determinação de massas iguais ou maiores que 50 mg, utilizar balança analítica de 100-200 g de capacidade e 0,1 mg de sensibilidade e para quantidades inferiores a 50 mg, microbalança analítica de 20 g de capacidade e 0,01 mg de sensibilidade.

#### APARELHAGEM

As balanças analíticas podem ser de dois tipos principais: de braços iguais (dois pratos) ou de prato único. Ambas necessitam de jogo de massas calibradas ou devem possuir dispositivo adequado que possibilite a verificação da carga aplicada (por exemplo: microbalanças que utilizam medição magnética), desde que sejam calibradas periodicamente por meio de massas de referência aferidas.

As balanças analíticas devem apresentar as seguintes características:

- Armário ou caixa de proteção, com aberturas apropriadas para permitir operações em seu interior e excluir correntes de ar;
- Base de material pesado e resistente (mármore ou metal, por exemplo);
- Indicador de nível (gravimétrico ou hidráulico) e dispositivo que possibilite seu nivelamento;
- Sistema amortecedor (magnético, pneumático ou hidráulico) para restabelecer prontamente o equilíbrio;
- Dispositivo para deposição ou remoção de carga, bem como sistema que possibilite a leitura da mesma (por intermédio de mostradores e/ou projeção óptica de escala etc.) quando se tratar de balança de prato único.

Devem, também, suportar sua carga total sem sofrer tensões inadequadas que possam comprometer sua sensibilidade em pesagens sucessivas nestas condições. A balança analítica de um só prato é a que melhor se adapta a estas exigências.

A balança não deve ser sobrecarregada.

#### *Localização da balança*

A balança analítica deve assentar-se nivelada sobre mesa ou prateleira firme e pesada, protegida por amortecedores de choque, como esteiras de cortiça ou lâminas de borracha, ou ainda sobre bancada de concreto, apoiada a pilares que estejam fixos no chão ou conectados aos elementos da construção do prédio a fim de impedir vibrações. Deve estar em local isolado, preferencialmente separado do laboratório, isento de umidade e do ataque de gases e vapores ácidos, à distância de fontes de calor (luz solar direta, fornos, estufas, mufas etc.) e de correntes de ar.

#### *Conservação e limpeza*

Os pratos e demais partes da balança, inclusive sua caixa de proteção, devem permanecer limpos, isentos de pó e substâncias acidentalmente caídas no prato da balança ou no piso da caixa. Tais materiais devem ser removidos imediatamente.

Os corpos a serem pesados não devem ser colocados diretamente sobre os pratos. Para tanto, utilizam-se papéis ou recipientes adequados como béqueres, vidros de relógios, cadinhos, cápsulas de porcelana e pesa-filtros com ou sem tampa.

As partes móveis da balança e os pesos não devem ser tocados com as mãos. Usa-se, para este fim, pinça apropriada, que deve ser guardada na caixa de pesos.

Agentes dessecantes, tais como sílica-gel ou cloreto de cálcio, podem ser colocados no interior da caixa de proteção, para manutenção de atmosfera relativamente seca.

Quando a balança não estiver em uso, suas partes deverão permanecer fechadas e o travessão elevado.

A sensibilidade da balança deve ser periodicamente inspecionada por técnico habilitado.

#### *Utilização da balança*

O material a ser pesado deve estar em equilíbrio térmico com o ar do interior da caixa de proteção da balança a fim de evitar erros devidos às correntes de convecção, além da condensação da umidade sobre os corpos frios.

A balança deve estar nivelada na ocasião de seu uso. A posição de equilíbrio com ou sem carga deve ser conferida várias vezes com 1/10 da carga

total e com a carga total. A diferença de equilíbrio encontrada em duas determinações sucessivas, feitas com pesos iguais, não deve exceder a 0,1 mg, para balanças analíticas e 0,01 mg, para microanalíticas.

Tanto os pesos quanto o material a ser pesado

devem ser depositados no centro do prato. Durante as operações de pesagem, o travessão e o suporte devem estar elevados e as portas da caixa de proteção fechadas.

A balança deve ser travada antes de cada operação.

## V.2.2. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E FAIXA DE FUSÃO

Temperatura ou ponto de fusão de uma substância é a temperatura corrigida na qual esta se encontra completamente fundida.

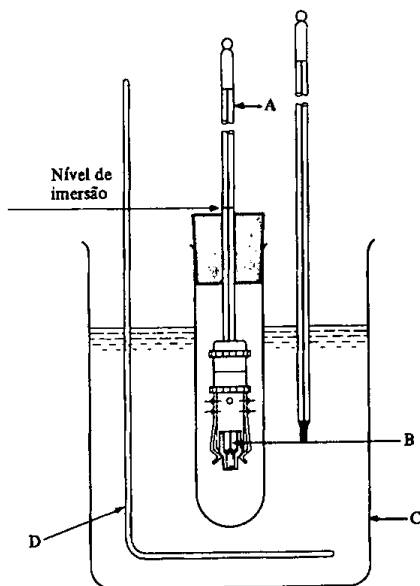
Faixa de fusão de uma substância é aquela compreendida entre a temperatura corrigida na qual a substância começa a fluidificar-se ou a formar gotículas na parede do tubo capilar e a temperatura corrigida na qual está completamente fundida, o que é evidenciado pelo desaparecimento da fase sólida.

Existem, basicamente, três métodos para determinação da temperatura e da faixa de fusão.

### MÉTODO DO CAPILAR

#### APARELHAGEM

Consiste do aparelho apresentado na Figura.



Aparelho para determinação do ponto de fusão pelo método do capilar. A, termômetro; B, tubo capilar; C, béquer; D, agitador.

O béquer deve ter capacidade de 150 ml e conter líquido apropriado para o banho de imersão de acordo com a temperatura desejada. Esses líquidos podem ser: parafina líquida de alto ponto de ebulição, sílica fluida de alto ponto de ebulição, ácido sulfúrico concentrado, etilenoglicol e água.

O agitador deve misturar o líquido rapidamente, mantendo homogênea a temperatura do meio. O termômetro, calibrado até sua marca de imersão, deve abranjer uma faixa de  $-10$  a  $360^{\circ}\text{C}$ , com divisões de  $1^{\circ}\text{C}$  e colocado a 2 cm do fundo do béquer.

O capilar de vidro borossilicato deve ser fechado em uma das extremidades e ter aproximadamente 8 cm de comprimento, 0,9 a 1,1 mm de diâmetro interno e paredes com 0,10 a 0,18 mm de espessura. Para observar o tubo capilar deve-se empregar lente de aumento. Como fonte de calor, utilizar bico de gás ou chapa elétrica.

#### PROCEDIMENTO

Pulverizar a substância em análise e dessecar em estufa a vácuo sobre sílica-gel, pentóxido de fósforo ou outro agente dessecante durante 24 horas.

Introduzir porção do pó no tubo capilar seco e compactá-lo, batendo o capilar sobre superfície dura de modo a formar coluna de aproximadamente 4 mm de altura.

Aquecer o banho rapidamente, sob agitação constante. Quando a temperatura atingir  $10^{\circ}\text{C}$  abaixo da pressuposta faixa de fusão, regular a velocidade de aumento da temperatura para  $1^{\circ}\text{C}$  por minuto.

Quando o banho estiver  $5^{\circ}\text{C}$  abaixo da faixa de fusão, introduzir o capilar no banho, de forma que sua parte inferior esteja bem próxima do meio do bulbo do termômetro.

As temperaturas obtidas são corrigidas mediante adaptação de termômetro auxiliar ao dispositivo anterior, de forma que seu bulbo encoste no termômetro do banho, na zona média da coluna emergente de mercúrio, quando a substância funde, lendo-se nesta altura a temperatura  $t$  marcada no termômetro auxiliar.

O cálculo da correção a ser adicionada a cada uma das temperaturas, que definem o ponto de fusão, é efetuado através da expressão

$$0,00015 N(T-t)$$

em que

$N$  = número de graus correspondentes à coluna emergente,

$T$  = temperatura lida no termômetro padrão,  
 $t$  = temperatura lida no termômetro auxiliar.

### MÉTODO DO BLOCO METÁLICO AQUECIDO

#### APARELHAGEM

Consiste de bloco metálico de elevada condutividade térmica, resistente às substâncias sob

análise e de superfície plana e polida, como bronze, aço inoxidável e similares.

O bloco deve conter cavidade cilíndrica interna, paralela à sua superfície superior e a cerca de 3 mm desta, com dimensões adequadas para acomodar termômetro calibrado.

O bloco deve ser uniformemente aquecido através de resistência elétrica ou chama microajustável. O aparelho deve ser calibrado constantemente com substâncias apropriadas e de comprovado grau de pureza.

#### PROCEDIMENTO

Aquecer o bloco rapidamente até temperatura de 10 °C abaixo do ponto de fusão previsto e, então, ajustar o aquecimento para incrementos de temperatura da ordem de 1 °C por minuto.

A intervalos regulares, colocar algumas partículas da amostra, previamente pulverizada e seca, sobre a superfície metálica, na região imediatamente acima do bulbo do termômetro. Limpar a superfície após cada ensaio. Anotar a temperatura  $t_1$  na qual a substância funde imediatamente após o contacto com o metal. Interromper o aquecimento. Durante o resfriamento, colocar novamente algumas partículas da amostra, a intervalos regulares, no mesmo local do bloco, limpando a superfície após cada ensaio. Anotar a temperatura  $t_2$  na qual a substância solidifica instantaneamente ao contacto com o metal.

O ponto de fusão instantâneo da amostra é calculado mediante a seguinte expressão:

$$\frac{t_1 + t_2}{2}$$

#### MÉTODO DO CAPILAR ABERTO

Este método é empregado para determinação do ponto de fusão de substâncias graxas de consistência pastosa.

#### APARELHAGEM

Deve-se empregar aparelho semelhante ao descrito no Método do Capilar, com as seguintes modificações:

- o banho de aquecimento deve ser a água;
- o termômetro deve ser graduado em 0,2 °C, abrangendo faixa de -10 a 100 °C e
- o tubo capilar, semelhante àquele empregado no Método do Capilar, deve ser aberto em ambas as extremidades.

#### PROCEDIMENTO

Fundir a substância rapidamente à temperatura não superior a 10 °C acima do ponto de fusão completo. Agitar e, se necessário, filtrar através de filtro de papel seco.

Inserir a substância fundida na extremidade do capilar até formar coluna de 8 a 12 mm de altura. Esfriar o capilar contendo a amostra à temperatura de 15 °C, mantendo-a, no mínimo, por 16 horas. Prender o tubo capilar no termômetro de forma tal que a coluna de substância se localize na parte média do bulbo de mercúrio. Colocar o sistema em banho de água a 15 °C, à profundidade de 3 cm da superfície da água. Aquecer com agitação constante para que a temperatura aumente 2 °C por minuto.

A temperatura na qual a substância começa a ascender no capilar é o ponto de fusão.

## V.2.3. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE EBULIÇÃO E FAIXA DE DESTILAÇÃO

Temperatura ou ponto de ebulição de um líquido é a temperatura corrigida na qual o líquido ferve sob pressão de vapor de 100 kPa (760 mm de Hg).

Faixa de destilação é o intervalo de temperatura corrigida para a pressão de 100 kPa (760 mm de Hg), dentro do qual o líquido, ou fração específica do líquido, destila inteiramente.

### APARELHAGEM

Usar aparelho como o sugerido na Figura, em que A é balão de destilação com capacidade de 100 ml, conectado a condensador B, na extremidade do qual se introduz o adaptador C, ligado a uma proveta de 50 ml graduada em 0,2 ml. O termômetro deve ser adaptado ao balão de forma que o bulbo de mercúrio fique no centro do gargalo e a cerca de 5 mm abaixo do nível do tubo lateral. O aquecimento (a gás, elétrico ou através de banho) deve ser selecionado de acordo com a natureza da substância.

### PROCEDIMENTO

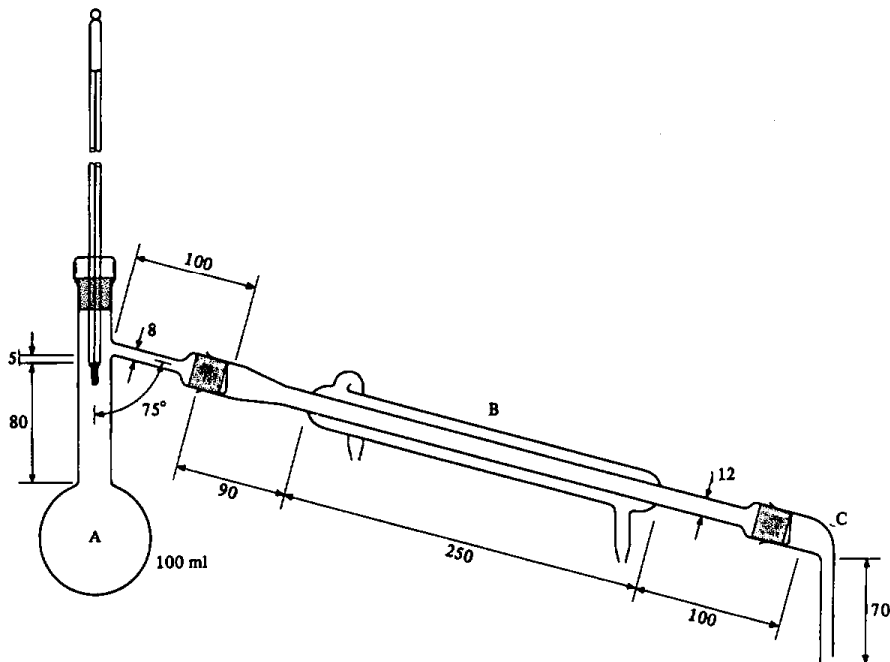
Introduzir no balão cerca de 50 ml da amostra de modo a não penetrar no tubo lateral. Adicionar pérolas de vidro ou outro material poroso adequado. Adaptar o termômetro no balão e aquecer, lentamente, protegendo o sistema contra corrente de ar.

Registrar a temperatura na qual forem coletadas as cinco primeiras gotas do destilado. Ajustar o aquecimento para obter o destilado à vazão de 3 a 4 ml por minuto. Anotar a temperatura quando todo o líquido ou fração prescrita estiverem totalmente destilados. Manter o destilado à mesma temperatura na qual o líquido foi originalmente medido e anotar o volume do destilado.

Quando o líquido é puro, a maior parte destila à temperatura constante (dentro de uma faixa de 0,5 °C), que é o ponto de ebulição do líquido.

Líquidos que destilam abaixo de 80 °C devem ser resfriados a 10-15 °C antes de se medir o volume e a proveta que recebe o destilado deve estar mergulhada em banho de gelo.

Quando o ponto de ebulição está acima de



Aparelho para determinação da faixa de destilação (dimensões em mm). A, balão de destilação; B, condensador; C, adaptador.

140-150 °C, pode-se substituir o condensador de água por condensador de ar.

Corrigir as temperaturas observadas de acordo com o tipo de termômetro utilizado e com a diferença na pressão barométrica normal 100 kPa (760 mm de Hg), considerando 0,1 °C para cada 0,36 kPa (2,7 mm de Hg) de variação, adicionando

ao resultado se a pressão real for mais baixa, ou subtraindo se for maior que 100 kPa (760 mm de Hg).

Comparar os valores obtidos do ponto de ebulição, faixa de destilação e volume do destilado com as respectivas especificações das monografias.

## V.2.4. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE CONGELAMENTO

Temperatura ou ponto de congelamento de líquido ou de sólido fundido é a mais alta temperatura na qual ele se solidifica.

Para substâncias puras que fundem sem decomposição, o ponto de congelamento do líquido é igual a seu ponto de fusão.

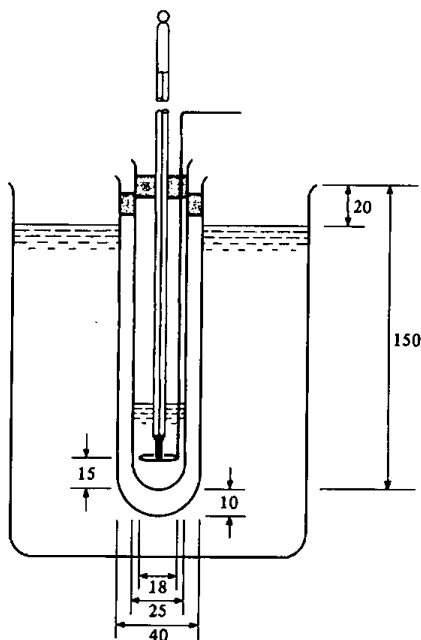
### APARELHAGEM

O aparelho da Figura consiste em tubo de ensaio de aproximadamente 25 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento, suspenso por intermédio de rolha adequada dentro de segundo tubo maior, de 40 mm de diâmetro interno e 140 mm de comprimento, formando, assim, camisa de ar que evita mudança brusca de temperatura. O sistema acima é fixo por garra no centro de béquer com capacidade de 1000 ml, contendo água ou solução refrigerante.

O tubo interior é vedado com rolha de modo a conter haste agitadora e termômetro com divisões de  $0,2^{\circ}\text{C}$ . O bulbo do termômetro deve estar fixo a aproximadamente 15 mm do fundo do balão. O agitador é bastão de vidro adaptado com anel em sua extremidade inferior como indicado na Figura.

### PROCEDIMENTO

Colocar a amostra no tubo interno em quantidade suficiente para cobrir o bulbo do termômetro. Esfriar o tubo interior, mantido na camisa de ar, em mistura refrigerante adequada a  $5^{\circ}\text{C}$  abaixo do ponto de congelamento esperado. Quando a amostra estiver resfriada a cerca de  $5^{\circ}\text{C}$  acima do ponto de congelamento, mover verticalmente o agitador, entre o topo e o fundo, à razão de aproximadamente 20 ciclos por minuto e registrar a temperatura do termômetro de 30 em 30 segundos. Interromper a agitação quando a



Aparelho para determinação do ponto de congelamento (dimensões em mm).

temperatura permanecer constante ou aumentar, antes de permanecer constante, o que acontece enquanto ocorre a solidificação.

Continuar registrando a temperatura, no mínimo, até 3 minutos após a temperatura começar a cair novamente. A maior temperatura observada durante a solidificação da substância corresponde ao seu ponto de congelamento.

## V.2.5. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE MASSA E DENSIDADE RELATIVA

Densidade de massa ( $\rho$ ) de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20 °C. A densidade de massa da substância é calculada a partir de sua densidade relativa pela fórmula:

$$\rho_{20} = 0,99703 \cdot d_{20}^{20} + 0,0012$$

expressa em g/ml ou kg/l.

Densidade relativa de uma substância é a razão de sua massa, pela massa de igual volume de água, ambas a 20 °C ( $d_{20}^{20}$ ), ou por massa de igual volume de água a 4 °C ( $d_4^{20}$ ):

$$d_4^{20} = 0,998234 \cdot d_{20}^{20}$$

### Procedimento

A densidade relativa da substância pode ser determinada através de picnômetro, balança

hidrostática ou densímetro. O uso desses dois últimos é condicionado ao tipo de aparelhagem disponível.

### Método do picnômetro

Utilizar picnômetro limpo e seco, com capacidade de, no mínimo, 5 ml, que tenha sido previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, a 20 °C.

Colocar a amostra no picnômetro. Ajustar a temperatura para 20 °C, remover excesso da substância, se necessário, e pesar. Obter o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio.

O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C, é a densidade relativa ( $d_{20}^{20}$ ).



## V.2.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Índice de refração ( $n$ ) de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade no interior da substância.

Quando um raio de luz monocromática passa de um meio transparente para outro de densidade óptica diferente, é refletido ou refratado, exceto quando incide perpendicularmente à superfície de contacto entre os meios. A relação entre o seno do ângulo de incidência,  $\text{sen } i$ , e o seno do ângulo de refração,  $\text{sen } r$ , é constante, não variando com o ângulo de incidência. Essa relação equivale ao índice de refração. Pode-se, pois, definir o índice de refração como a relação entre o seno do ângulo de incidência e o seno do ângulo de refração, isto é,  $n = \text{sen } i / \text{sen } r$ . Para fins práticos mede-se a refração com referência ao ar e à substância e não com referência ao vácuo e à substância, porquanto as diferenças entre os valores obtidos com ambas as medidas não são significativas para fins farmacopéicos.

Em substâncias isotrópicas, o índice de refração é característica constante em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão. Por esta razão, este índice é útil não só para identificar a substância, mas também para detectar a presença de impurezas. É empregado para caracterizar principalmente gorduras, óleos graxos, ceras,

açúcares e solventes orgânicos, bem como para identificar certos fármacos. É igualmente usado para determinar a pureza de óleos voláteis.

Geralmente determina-se o índice de refração em função da luz de sódio no comprimento de onda 589,3 nm (raia D) e à temperatura de  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Daí expressar-se o valor do índice de refração como  $n_D^{20}$ .

### Refratômetros

Os refratômetros utilizados normalmente em análise farmacopéica usam luz branca, mas são calibrados de modo a dar o índice de refração em termos de comprimento de onda 589,3 nm, correspondente ao da luz da raia D de sódio.

Visto que o índice de refração varia significativamente com a temperatura, durante a leitura deve-se ajustar e manter a temperatura a  $20^\circ\text{C}$ . Quando não for possível, deve-se corrigir o valor obtido consultando a tabela de correção.

A calibração do aparelho faz-se com água destilada, cujo índice de refração é 1,3330 a  $20^\circ\text{C}$  e 1,3325 a  $25^\circ\text{C}$ . Antes de operá-lo, convém verificar se apresenta erro inicial, que deverá ser descontado da leitura.

## V.2.7. DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

**Viscosidade** é expressão da resistência de líquidos ao escoamento, ou seja, ao deslocamento de parte de suas moléculas sobre moléculas vizinhas. A propriedade oposta à viscosidade é denominada fluidez.

A unidade dinâmica (sistema CGS) de viscosidade é o *poise*. É, por definição, a força, em dinas, necessária ao deslocamento de camada plana de líquido, com área de 1 cm<sup>2</sup>, sobre outra camada idêntica, paralela e distanciada da primeira em 1 cm, à velocidade de 1 cm/s. O *poise* é, contudo, demasiado grande para a maioria das aplicações, recorrendo-se daí ao *centipoise*, cP, correspondente a um centésimo de *poise*. Às vezes é conveniente utilizar-se a viscosidade cinemática, que consiste na relação entre a viscosidade dinâmica e a densidade. Neste caso, no sistema CGS, a unidade é o *stoke*. A exemplo do que ocorre com viscosidade absoluta (medida em *poise*), é mais conveniente exprimir-se viscosidade cinemática em *centistokes* (100 *centistokes* = 1 *stoke*) para caracterizar a maioria dos líquidos usuais em Farmácia e Química.

A determinação da viscosidade — ensaio para o qual a especificação da temperatura é imprescindível devido à sua influência decisiva sobre o resultado (em geral, a viscosidade é inversamente proporcional à temperatura) — é efetuada com base em propriedades diversas. O método mais freqüente baseia-se no tempo de escoamento de líquidos através de capilares (viscosímetros de Ostwald, Ubbelohde, Baumé e Engler) devido à simplicidade e ao preço acessível dos aparelhos. Viscosímetros que têm como princípio de funcionamento a determinação do tempo de queda livre de esferas através de tubos contendo o líquido sob ensaio (Höppler) ou a velocidade de rotação de eixos metálicos imersos no líquido (Brookfield, entre outros) são igualmente empregados.

Embora seja possível a determinação de viscosidade absoluta, com base nas dimensões exatas do viscosímetro empregado, é mais freqüente a prática da calibração prévia do aparelho com líquido de viscosidade conhecida, permitindo, por comparação, avaliação relativa da viscosidade do líquido sob ensaio. Assim, empregando-se viscosímetro de Ostwald ou similar, determinam-se os tempos de escoamento  $t_1$  e  $t_2$  de volumes iguais dos líquidos de referência e amostra, de densidade  $d_1$  e  $d_2$ , respectivamente. Sendo  $\eta_2$  a viscosidade do líquido de referência, a viscosidade absoluta (cP) do líquido amostra pode ser calculada pela equação:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2}, \text{ ou melhor, } \eta_1 = \eta_2 \frac{t_1 d_1}{t_2 d_2}$$

O quociente  $\eta_2 / t_2 d_2$  possui valor constante, k, para cada líquido de referência, no mesmo viscosímetro. Assim, conhecido este valor (geralmente encontrado no manual do aparelho), simplifica-se a equação:

$$\eta = k t d$$

O valor de k pode também ser determinado experimentalmente, medindo-se o tempo de escoamento de líquido padrão, puro, e aplicando-se a equação:

$$k = \eta / t d$$

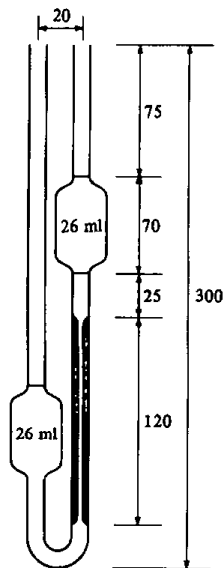
Empregando-se água como padrão — usual para determinação de líquidos de baixa viscosidade — adotam-se os valores de viscosidade abaixo, conforme a temperatura do ensaio:

°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

### Viscosímetro de Ostwald

O viscosímetro de Ostwald é o mais simples e popular dentre os aparelhos disponíveis. Consta de tubo dobrado em U (Figura), com um dos ramos munido de ampola terminada em capilar. Há dois traços de referência, um imediatamente acima da ampola e o outro sobre o capilar. O outro ramo é suficientemente largo para permitir seu enchimento com o líquido sob ensaio até a altura de cerca de 5 mm abaixo do traço de referência inferior. Para possibilitar maior gama de viscosidades passíveis de determinação, empregam-se coleções de viscosímetros, com diferentes calibres. O aparelho indicado para determinada avaliação é o que permite escoamento da amostra em período não inferior a 60 segundos.

Para a determinação propriamente dita, transferir para o viscosímetro escolhido, lavado e seco, quantidade suficiente de líquido para atingir nível da ordem de 5 mm abaixo do traço de



Viscosímetro de Ostwald (dimensões em mm).

referência inferior. Fixar o aparelho em termostato ( $20^{\circ}\text{C}$ ) e, após aguardar que o líquido no interior do aparelho adquira a temperatura controlada, aspirar o líquido pelo tubo capilar/ampola (por meio de tubo de borracha fixado na extremidade) até que o nível do líquido exceda ligeiramente o traço de referência superior. Soltar então o tubo e, no instante em que o menisco atingir o traço de referência superior, acionar cronômetro de precisão, retravando-o quando o menisco passar pelo traço de referência inferior. Registrar o tempo decorrido e repetir o ensaio diversas vezes com intervalos de alguns minutos até que tempos sucessivos não difiram em mais de 0,5 segundos. Determinar a densidade do líquido sob ensaio (V.2.5), corrigindo o valor para a densidade relativa à água, a  $20^{\circ}\text{C}$ , e calcular a viscosidade do líquido amostra pela fórmula indicada, empregando a constante  $k$  fornecida ou determinada por procedimento similar.

## V.2.8. DETERMINAÇÃO DO PODER ROTATÓRIO E DO PODER ROTATÓRIO ESPECÍFICO

Muitas substâncias orgânicas têm a propriedade de desviar o plano da luz polarizada quando esta passa através delas (no caso de serem líquidas) ou de soluções que as contêm (quando se trata de sólidas). Estas substâncias são chamadas *opticamente ativas* e podem ser *dextrogiros* ou *levogiros*. O caráter dextrogiro é indicado pelo sinal (+) e o levogiro pelo sinal (-).

A atividade óptica é função da estrutura química da substância e de sua concentração. A determinação do poder rotatório serve para estabelecer tanto a *identidade* quanto a *pureza* da substância. Além disso, às vezes, a atividade óptica presta-se para indicar o valor terapêutico de uma substância.

O poder rotatório varia com a temperatura, o comprimento de onda (quanto mais curto, maior o ângulo de desvio), a natureza da substância e sua concentração. Se a solução contiver duas substâncias opticamente ativas e estas não reagirem entre si, o ângulo de desvio será a soma algébrica dos ângulos de desvio de ambas.

O poder rotatório é medido em polarímetros, cuja precisão varia de 0,01 a 0,05° de rotação angular. Os mais usados trabalham com a luz de sódio ou lâmpada de vapor de mercúrio. Determina-se o ponto zero do polarímetro com o tubo vazio e fechado para as substâncias líquidas ou cheio com o solvente para as soluções de substâncias sólidas.

### Poder rotatório

Poder rotatório de uma substância é o ângulo que a luz polarizada forma com o plano de polarização ao atravessar a substância, caso seja líquida, ou solução, se for sólida. Mede-se o poder rotatório ( $\alpha$ ) em uma camada de espessura apropriada, à temperatura indicada e no comprimento de onda especificado na monografia. Geralmente, usa-se camada de 1 dm de espessura, temperatura de 20 °C  $\pm$  0,5 °C e comprimento de onda da raia D de sódio (589,3 nm).

### Poder rotatório específico

O poder rotatório específico,  $[\alpha]_D^{20}$ , de uma substância líquida é o ângulo de rotação, medido no comprimento de onda da raia D de sódio, à temperatura de 20 °C  $\pm$  0,5 °C, calculado em função de uma camada de 1 dm de espessura e dividido pela densidade relativa a 20 °C. É dado pela expressão

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l d}$$

em que

$l$  = comprimento, em dm, do tubo do polarímetro,

$d$  = densidade relativa da substância.

O poder rotatório específico,  $[\alpha]_D^{20}$ , de uma substância sólida é o ângulo de rotação, medido no comprimento de onda da raia D de sódio,  $\lambda = 589,3$  nm, à temperatura de 20 °C  $\pm$  0,5 °C, calculado em função de uma camada de 1 dm de espessura de uma solução que contém 1 g da substância por ml. É dado pela expressão

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100\alpha}{lc}$$

em que

$l$  = comprimento, em dm, do tubo do polarímetro,

$c$  = concentração da substância expressa em porcentagem p/V.

Às vezes a medida do poder rotatório específico é realizada em outras condições especificadas nas monografias. Em qualquer caso, porém, devem ser feitas pelo menos cinco medidas: o valor procurado será a média dos valores obtidos. Outrossim, a menos que se indique diferentemente, o poder rotatório e o poder rotatório específico referem-se à substância seca, anidra ou isenta de solvente em todas as monografias em que se fornecem os valores da umidade, perda por dessecação ou conteúdo de solvente.

## V.2.9. DETERMINAÇÃO DA PERDA POR DESSECAÇÃO

Este ensaio visa a determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia. No caso de ser a água a única substância volátil, basta determinar seu teor segundo um dos métodos descritos sob o título "Determinação de água" (V.2.20.). Para os demais casos, o procedimento adotado é o descrito abaixo, sendo a opção de método a ser adotado especificada nas monografias.

### PROCEDIMENTO

Reduzir a substância a pó fino caso se apresente na forma de cristais volumosos. Pesar exatamente cerca de 1 a 2 g e transferir para pesa-filtro chato previamente dessecado durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Pesar o pesa-filtro, tampado, contendo a amostra. Agitar o pesa-filtro brandamente para distribuir a amostra da maneira mais uniforme possível, a uma profundidade ideal de 5 mm. Colocar o pesa-filtro na estufa, retirar a tampa, deixando-a também na estufa. Secar a amostra (geralmente a 105 °C) e por um determinado prazo (geralmente 2 horas) especificado na monografia. Esfriar à temperatura ambiente em dessecador. Pesar.

Repetir a operação até peso constante.

*Observação:* No caso de a substância fundir a uma temperatura mais baixa que a especificada para a determinação, manter o pesa-filtro com seu conteúdo por 1 a 2 horas à temperatura de 5 a 10 °C abaixo do ponto de fusão, antes de secá-la à temperatura especificada. Quando a substância se decompõe à temperatura de 105 °C, ela deve ser dessecada a uma temperatura mais baixa. Em ambos os casos, pode-se realizar a secagem à pressão reduzida, em dessecador.

### Cálculo

A porcentagem de perda por dessecação é dada pela equação

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

em que

$P_a$  = peso da amostra,

$P_u$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação,

$P_s$  = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

## V.2.10. DETERMINAÇÃO DE CINZAS SULFATADAS (RESÍDUO POR INCINERAÇÃO)

Cinzas sulfatadas compreendem o resíduo não volátil à incineração na presença de ácido sulfúrico, conforme a técnica especificada. Em geral, o ensaio visa a determinar o teor de constituintes ou impurezas inorgânicas contidos em substâncias orgânicas. Também se destina à determinação de componentes inorgânicos em misturas e da quantidade de impurezas contidas em substâncias inorgânicas termolábeis.

### PROCEDIMENTO

Pesar exatamente cerca de 1 g — ou a quantidade especificada na monografia — de substância

pulverizada, transferir para cadinho (preferivelmente de platina) previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado, e juntar cerca de 2 ml de ácido sulfúrico SR. Aquecer brandamente sobre chapa quente até carbonização e incinerar cuidadosamente a cerca de 800 °C até desaparecimento do carvão. Resfriar e juntar cerca de 1 ml de ácido sulfúrico SR para umedecer o resíduo, aquecer sobre chapa quente e incinerar novamente. Acrescentar pequena quantidade de carbonato de amônio (neutralização do ácido residual) e incinerar até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas sulfatadas em relação à substância sob ensaio.

## V.2.11. DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DOS PÓS

O grau de divisão ou a granulometria de pós é expresso pela referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado.

Ao determinar a granulometria de pó resultante de redução de drogas vegetais, nenhuma porção da droga pode ser rejeitada durante o processo de redução, moagem ou peneiramento, exceto nos casos em que tal procedimento seja indicado na respectiva monografia.

Os tamises empregados são de aço inoxidável, latão, crina ou seda, não sendo permitido o revestimento dos fios.

Na descrição dos pós são utilizados os termos abaixo:

- Pó grosso**      aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355  $\mu$ m.
- Pó moderadamente grosso**      aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710  $\mu$ m e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250  $\mu$ m.
- Pó semi-fino**      aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha de 355  $\mu$ m e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 180  $\mu$ m.
- Pó fino**      aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com

abertura nominal de malha de 180  $\mu$ m.

**Pó finíssimo**      aquele cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 125  $\mu$ m.

A determinação da granulometria de pós resultantes de drogas vegetais e produtos químicos pulverizados é feita pelo processo descrito abaixo, com o auxílio de tamises, cujas características estão padronizadas na tabela anexa.

### PROCEDIMENTO

Para pós grossos, moderadamente grossos e semi-finos utilizar amostras de 25 a 100 g de pó. Colocar a amostra sobre o tamis de malha apropriada, provido de tampa e recipiente para a coleta do pó. Agitar o tamis em movimentos horizontais rotativos e movimentos verticais por 20 minutos no mínimo, ou até que a operação esteja completa. Pesquisar cuidadosamente o pó recolhido e a fração remanescente sobre o tamis.

Para pós finos e muito finos proceder como descrito acima, porém utilizando amostras não superiores a 25 g. Agitar o tamis por 30 minutos, no mínimo, ou até que a operação esteja completa.

No caso de pós oleosos ou pós tendentes a obstruir as aberturas do tamis, a tela do mesmo deve ser escovada periodicamente.

Pode-se determinar também a granulometria com o auxílio de tamises operados por dispositivos mecânicos. Estes dispositivos reproduzem os movimentos horizontais e verticais da operação manual, através de ação mecânica uniforme. A operação mecânica deve ser executada de acordo com as instruções do fabricante do equipamento.

## Abertura de malha dos tamises

<i>Abertura nominal da malha</i>	<i>Diâmetro recomendado de fios</i>	<i>Tolerância da abertura média</i>	<i>Área de peneiramento % (aproximada)</i>	<i>Nº do tamis (aproximado)*</i>
mm	mm	± mm		
4,00	1,40	0,13	55	4
3,35	1,25	0,10	53	5
2,80	1,12	0,09	51	6
2,00	0,90	0,07	48	8
1,70	0,80	0,06	46	10
1,40	0,71	0,05	44	12
1,18	0,63	0,04	43	14
1,00	0,56	0,03	41	16
µm	µm	± µm		
710	450	25	37	22
600	400	21	36	25
500	315	18	38	30
425	280	15	36	36
355	224	13	38	44
300	200	15	36	52
250	160	13	37	60
180	125	11	35	85
150	100	9,4	36	100
125	90	8,1	34	120
106	71	7,4	36	150
90	63	6,6	35	170
75	50	6,1	36	200
63	45	5,3	34	240
53	36	4,8	35	300
45	32	4,8	34	350

\* O número do tamis corresponde à classificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas — ABNT (1972).



## V.2.12. COR DE LÍQUIDOS

A avaliação da cor de líquidos é executada por comparação da solução sob análise — preparada conforme instruções da monografia — e soluções-padrão de cor (SC). Tais soluções encontram emprego como referência para alguns fármacos e em testes de carbonização com ácido sulfúrico especificados em diversas monografias.

O processo comparativo, salvo especificação em contrário, deve ser executado em tubos de ensaio de vidro transparente e fundo chato, com diâmetro da ordem de 16 mm, do tipo empregado em ensaio-limite de impurezas. Os tubos devem ser os mais uniformes possíveis.

Para a avaliação, utilizar volumes de 10 ml tanto para a amostra quanto para o padrão, assegurando altura aproximada de 50 mm para os líquidos nos tubos. Observar os tubos transversalmente contra fundo branco, sob luz difusa. É importante comparar as soluções nas mesmas condições, inclusive de temperatura (25 °C).

As soluções-amostra são preparadas de modo a apresentarem coloração semelhante à da solução de referência especificada.

### PADRÕES BÁSICOS

As soluções de referência de cor (SC) são obtidas a partir de 3 soluções básicas, a serem preparadas e armazenadas em frascos herméticos. Destas — com base na Tabela anexa, contendo instruções de preparação de 20 soluções-padrão de cor (SC) designadas com as letras do alfabeto, de A a T — preparar a solução ou soluções especificadas para a comparação. Transferir os volumes indicados (deixar a água por último) e homogeneizar diretamente nos tubos de comparação.

#### *Solução base de cloreto cobaltoso*

Preparar mistura de 25 ml de ácido clorídrico e 975 ml de água. Dissolver 65 g de cloreto de cobalto(II) em aproximadamente 900 ml desta mistura e completar o volume para 1000 ml com a mesma. Transferir, com auxílio de pipeta, 5 ml desta solução para frasco de iodo de 250 ml, juntar 5 ml de peróxido de hidrogênio SR e 15 ml de hidróxido de sódio 5 M. Ferver durante 10 minutos, resfriar e adicionar 2 g de iodeto de potássio e 20 ml de ácido sulfúrico 0,26 M. Dissolver com tiossulfato de sódio 0,1 M SV, juntando 3 ml de amido SI como indicador. Corrigir o volu-

me de titulante consumido por determinação em branco. Cada ml de tiossulfato de sódio 0,1 M SV equivale a 23,79 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar o volume da solução adicionando quantidade suficiente de mistura de ácido clorídrico e água para obter solução contendo exatamente 59,5 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por ml de solução.

#### *Solução base de sulfato cúprico*

Preparar mistura de 25 ml de ácido clorídrico e 975 ml de água. Dissolver 65 g de sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) em 900 ml desta mistura e completar o volume para 1000 ml com a mesma mistura. Transferir, com auxílio de pipeta, 10 ml desta solução para frasco de iodo de 250 ml, juntar 40 ml de água, 4 ml de ácido acético glacial, 3 g de iodeto de potássio e 5 ml de ácido clorídrico. Titular o iodo liberado com tiossulfato de sódio 0,1 M SV, juntando 3 ml de amido SI como indicador. Corrigir o volume de titulante consumido por determinação em branco. Cada ml de tiossulfato de sódio 0,1 M SV equivale a 24,97 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar o volume da solução adicionando quantidade suficiente de mistura de ácido clorídrico e água para obter solução contendo exatamente 62,4 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  por ml de solução.

#### *Solução base de cloreto férrico*

Preparar mistura de 25 ml de ácido clorídrico e 975 ml de água. Dissolver cerca de 55 g de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) em aproximadamente 900 ml desta mistura e completar o volume para 1000 ml com a mesma mistura. Transferir, com auxílio de pipeta, 10 ml desta solução para frasco de iodo de 250 ml, adicionar 15 ml de água, 3 g de iodeto de potássio e 5 ml de ácido clorídrico. Deixar em repouso durante 15 minutos. Completar o volume da solução para 100 ml com água e titular o iodo liberado com tiossulfato de sódio 0,1 M SV, juntando 3 ml de amido SI como indicador. Corrigir o volume de titulante consumido por determinação em branco. Cada ml de tiossulfato de sódio 0,1 M SV equivale a 27,03 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Ajustar o volume da solução adicionando quantidade suficiente de mistura de ácido clorídrico e água para obter solução contendo exatamente 45,0 mg de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  por ml de solução.

Composição das soluções padrão de cor (SC)

SC	Partes de			
	Solução base de cloreto cobaltoso	Solução base de cloreto férico	Solução base de sulfato cúprico	Água
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
E	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
O	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

## V.2.13. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

**Espectrofotometria de absorção atômica** destina-se ao doseamento de quase todos os elementos químicos, à exceção de gases raros, halogênios, oxigênio, enxofre, nitrogênio, fósforo e carbono. É, pois, essencialmente método de alta sensibilidade para o doseamento de átomos, íons ou complexos iônicos de elementos metálicos. Compreende a medida da intensidade de luz absorvida em dado comprimento de onda pelos átomos na promoção eletrônica ao estado excitado, ao serem atomizados em uma chama. Se o processo de absorção é efetuado em chama sob condições controladas e reproduzíveis, a absorvância (logaritmo do inverso da transmitância) é proporcional ao número de átomos do elemento dosado, permitindo o estabelecimento de retas de calibração que, por sua vez, permitem a determinação de concentrações desconhecidas em função da absorvância observada.

### Equipamento

O espectrofotômetro de absorção atômica consta de fonte emissora de luz, sistema de nebulização-combustão e de sistema fotodetector.

A fonte emissora de luz compreende lâmpada, cujo elemento emissor é idêntico ao que se deseja dosar. Assim, para a análise de amostra de zinco, por exemplo, emprega-se "lâmpada de catodo oco" em que o catodo contém zinco. A aplicação de potencial aos eletrodos da lâmpada excita os átomos de zinco do catodo e estes, ao reverterem ao estado fundamental, emitem radiação precisamente no comprimento de onda (linha espectral) do zinco.

No sistema de nebulização-combustão — compreendendo atomizador e chama — o elemento sob análise é liberado no seu estado atômico ou elemental. A solução contendo a amostra é introduzida na chama, geralmente alimentada com mistura ar-hidrogênio ou ar-acetileno, esta última permitindo temperaturas de chama da ordem de 2300 °C. Existem espectrofotômetros de absorção em que a chama é substituída por forno de alta temperatura. Tais equipamentos são mais eficientes na redução da amostra ao estado atômico e, por conseguinte, mais sensíveis.

O sistema fotodetector, por sua vez, destina-se à leitura e quantificação da radiação incidente. Compreende dispositivo óptico de dispersão (monocromador ou filtro), capaz de isolar a luz no comprimento de onda da linha espectral do elemento sob análise, e detector propriamente dito (fotomultiplicador) acoplado a instrumento de leitura digital ou analógico.

A radiação interferente emitida pela chama

pode ser eliminada por meio de modulação da fonte, o que significa empregar radiação cuja intensidade varia com determinada frequência. Dessa forma, o detector recebe dois tipos de sinais: um sinal alternado, proveniente da fonte, e um contínuo, emitido pela chama. O sistema de detecção reconhece apenas o sinal alternado, ignorando o sinal contínuo, não modulado.

### Solventes

O solvente ideal para a espectrofotometria de absorção atômica interfere o menos possível nos processos de absorção e produz átomos neutros na chama. Se existir diferença significativa de tensão superficial ou viscosidade entre solução amostra e soluções de referência, ocorrerão variações nas velocidades de aspiração e nebulização e, em consequência, diferenças significativas nos sinais produzidos. A acidez das soluções também influi sobre o processo de absorção. Daí a importância de os solventes empregados no preparo da solução-amostra e soluções de referência serem os mesmos ou, ao menos, os mais similares possíveis com relação a estes aspectos, devendo também permitir o preparo de soluções facilmente aspiráveis pelo tubo de alimentação da chama. A presença de sólidos nas soluções pode provocar interferências, razão pela qual recomenda-se manter o seu nível abaixo de 2%, sempre que possível.

### OPERAÇÃO

Para operar o espectrofotômetro de absorção atômica, recomenda-se obediência às instruções do fabricante. A calibração do aparelho é executada pela introdução de solvente (geralmente água) na chama e acerto de 100% de transmitância (zero de absorvância). Para a execução da análise, há dois métodos, recomendando-se o primeiro, salvo instruções em contrário.

#### Método I (Calibração direta)

Preparar ao menos três soluções de referência do elemento a ser dosado, abrangendo a faixa de concentrações recomendada pelo fabricante do aparelho para o elemento sob análise. Todos os reagentes empregados no preparo da solução-amostra devem ser igualmente incluídos, nas mesmas concentrações, às soluções de referência. Após a calibração do aparelho com solvente, conforme indicado acima, introduzir na chama, três vezes, cada uma das soluções de referência e, após estabilização da leitura, registrar o resultado, lavando o nebulizador-combustor com água

após cada operação de introdução. Traçar curva de calibração plotando a média de absorvâncias (ou transmitâncias) de cada grupo de três leituras com a respectiva concentração. Preparar a solução da substância a ser dosada conforme indicado na monografia, ajustando sua concentração para que esta fique situada dentro da faixa de concentrações das soluções de referência. Introduzir a referida solução amostra na chama, registrar a leitura e lavar o nebulizador-combustor com água. Repetir esta seqüência duas vezes e, adotando a média das três leituras, determinar a concentração do elemento pela curva de calibração.

#### *Método II (Adição padrão)*

Adicionar a cada um de, ao menos, três balões volumétricos similares, volumes iguais de solução

da substância a ser dosada, preparada conforme indicado na monografia. Juntar a todos os balões, com exceção de um, volumes medidos da solução de referência especificada, de modo a obter uma série de soluções contendo quantidades crescentes do elemento sob análise. Diluir convenientemente o volume de cada balão com água. Após calibrar o espectrofotômetro com água, como indicado acima, registrar três vezes as leituras de cada solução. Transferir os resultados das leituras de absorvância (ou transmitância) e as concentrações correspondentes para gráfico cujos eixos interceptem em zero de elemento adicionado e zero de leitura. Extrapolar a linha reta que une os pontos até a interceptação do eixo de concentrações. A distância entre este ponto e a intersecção dos eixos representa a concentração do elemento dosado na solução amostra.

## V.2.14. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO NO ULTRAVIOLETA, VISÍVEL E INFRAVERMELHO

Quando a energia eletromagnética luminosa atravessa uma solução contendo átomos e moléculas, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitido. A radiação absorvida, por sua vez, depende da quantidade de moléculas presente (vale dizer, da concentração da solução) e da estrutura destas moléculas. Ao estudo desta dependência entre átomos e moléculas de substâncias e a natureza e quantidade de radiação eletromagnética absorvida por elas denomina-se espectrofotometria de absorção.

De acordo com a peculiaridade da técnica e equipamentos e, principalmente, o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção enquadra-se nas regiões ultravioleta, visível ou infravermelho do espectro da luz. Espectrofotometria de absorção atômica também é incluída na categoria.

É utilizada como técnica de identificação e quantificação das substâncias farmacopéicas.

### RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA

Radiação eletromagnética consiste de energia propagada na forma de ondas. Como tal, apresenta comprimento de onda característico (a distância linear entre dois pontos correspondentes localizados sobre duas ondas adjacentes). Na região luminosa do espectro eletromagnético, o comprimento de onda,  $\lambda$  (lambda), é geralmente especificado em nanômetros, nm, correspondendo a unidade a  $10^{-9}$  m e, mais raramente, em micrometros,  $\mu$ m ( $10^{-6}$  m) ou em angstroms Å ( $10^{-10}$  m).

As faixas de comprimento de onda de energia eletromagnética de interesse para a espectrofotometria de absorção são as seguintes:

Região	Faixa de comprimento de onda
ultravioleta distante	100 - 200 nm
ultravioleta	200 - 380 nm
visível	380 - 780 nm
infravermelho próximo	780 - 3.000 nm
infravermelho	3,0 - 15 $\mu$ m
infravermelho distante	15 - 300 $\mu$ m

Outras formas de caracterização das ondas eletromagnéticas são o número de onda,  $\bar{\nu}$  correspondendo ao número de ondas por cm ( $\bar{\nu}_{\text{cm}^{-1}} = 1/\lambda_{\text{cm}}$ ) e frequência,  $\nu$  (nu), número de ciclos completos irradiados por segundo, especificada em Hertz (1 Hz = 1 ciclo/s).

A energia eletromagnética é melhor compreendida se considerada fluxo de partículas denominadas fótons (ou quanta). Cada fóton contém determinada energia cuja magnitude é proporcional

à frequência ( $E=h\nu$ , em que h corresponde à constante universal de Planck), vale dizer, inversamente proporcional ao comprimento de onda ( $\nu=c/\lambda$ , em que c corresponde à velocidade da luz).

### INTERAÇÃO ENERGIA-MATÉRIA

Moléculas, que constituem a matéria, também são dotadas de energia, sendo esta relacionada à sua capacidade de movimento. Participam da energia total da molécula a energia derivada de translação (energia translacional, devida à movimentação da molécula como um todo); de vibração (energia vibracional, devida ao movimento relativo de átomos ou grupos de átomos constituintes da molécula); de rotação (energia rotacional, devida à rotação da molécula em torno de um eixo) e, finalmente, a energia eletrônica, gerada pela configuração de elétrons na molécula. Destes quatro componentes, apenas a energia translacional não se relaciona com fenômenos espectrofotométricos.

Admite-se que moléculas podem absorver energia, elevando seu estado energético. Tal elevação, contudo, não é de natureza contínua; realiza-se necessariamente em etapas (degraus) levando às chamadas transições energéticas do estado fundamental para outros, mais altos. Transições na energia eletrônica são características da região ultravioleta e visível enquanto as energias vibracional e rotacional ocorrem na região infravermelho do espectro.

As transições eletrônicas ocorrem em porções da molécula denominadas cromóforos, caracterizados principalmente por insaturações e grupos carbonílicos. Compreendem promoções de elétrons de orbitais moleculares ocupados, geralmente  $\sigma$  e  $\pi$  ligantes e não ligantes, para os orbitais de energia imediatamente superiores, antiligantes  $\pi^*$  ou  $\sigma^*$  (orbitais antiligantes são representados com asteriscos).

Na região do infravermelho ocorrem transições de energia vibracional por ser a radiação nesta região insuficientemente energética para promover transições eletrônicas. As vibrações induzidas por radiação infravermelha compreendem estiramentos e tensionamentos de ligações inter-atômicas (simétricos e assimétricos) e modificações de ângulos de ligações (vibrações de deformação no plano e fora do plano).

### USOS QUANTITATIVOS DA ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO

A análise espectrofotométrica quantitativa tem como princípio a relação proporcional existente

entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da solução da substância.

Considerada uma solução diluída de substância capaz de absorver luz de dado comprimento de onda (luz monocromática) em solvente transparente (não absorvente neste comprimento de onda), verifica-se que o decréscimo na intensidade da luz ao atravessar a solução é diretamente proporcional à intensidade da radiação incidente, à concentração da substância absorvente e à espessura da camada de solução (distância percorrida pela luz na solução).

Estabelecido ainda o conceito de transmitância,  $T$ , como quociente entre a intensidade de radiação transmitida pela solução,  $I_0$ , e a intensidade da radiação incidente,  $I$ , teremos para o princípio do parágrafo anterior – a lei de Beer – a seguinte formulação:

$$\log(I_0/I) = A = kbc$$

em que

$A$  = absorvância, logaritmo do inverso da transmitância ( $A = 10 \log I_0/I$ ), antigamente conhecida por densidade óptica ou extinção,

$k$  = constante de proporcionalidade, característica do soluto (substância absorvente de radiação),

$b$  = distância percorrida pela luz na solução (espessura),

$c$  = concentração da solução.

Quando a concentração,  $c$ , é expressa em mol/l e a espessura,  $b$ , em centímetros, a equação torna-se:

$$A = \epsilon bc$$

em que  $\epsilon$  (épsilon) corresponde à absorvidade molar (antigamente, coeficiente de extinção molar). Se, por outro lado, a concentração,  $c$ , for expressa em g/litro temos:

$$A = abc$$

em que  $a$  corresponde à absorvidade, relacionada com a absorvidade molar pela igualdade  $a = aM$ , em que  $M$  é o peso molecular da substância.

A intensidade da absorção de luz ultravioleta por substâncias cromóforas é, em geral, expressa como absorvidade molar, nas condições de máxima absorção,  $\epsilon_{\max}$ . Se o peso molecular da substância não for conhecido, é possível expressar a intensidade de absorção pela equação

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = A/bc$$

em que  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  corresponde à absorvância de solução a 1% da substância quando o caminho óptico (distância percorrida pela luz na solução)

é 1 cm, ou seja, quando se empregam cubetas espectrofotométricas com espessura de 1 cm.

A proporcionalidade entre absorvância e concentração prevista na lei de Beer é, por vezes, desobedecida. Desvios de proporcionalidade devem-se principalmente a alterações de concentração de solutos por causa de associações entre moléculas de soluto ou moléculas de soluto e solvente ou ainda pela ocorrência de dissociações ou ionizações. Outra causa possível para desvios é a chamada radiação policromática (falta de monocromaticidade da radiação incidente).

Desvios reais da lei de Beer – insignificantes a concentrações até 0,01  $M$  – podem ocorrer em função de a constante da lei estar relacionada não apenas à absorvidade mas também ao índice de refração. Outrossim, quando a concentração do soluto é elevada, pode ocorrer alteração na distribuição de carga das partículas de soluto, modificando sua absorção em dado comprimento de onda.

#### EQUIPAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Espectrofotômetros são dotados fundamentalmente de (1) fonte de luz (lâmpada de tungsténio para luz visível e de hidrogénio ou deutério para luz ultravioleta); (2) dispositivo monocromador compreendendo filtro (colorímetros e espectrocolorímetros) ou dispersor de luz (prisma ou, mais freqüentemente, grade de difração) equipado com seletor de comprimento de onda; (3) compartimento de cubetas, para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática e (4) fotodetector associado a conversor-amplificador e instrumento para medida da luz transmitida pela amostra (analógico ou digital).

Espectrofotômetros podem dispor de registradores gráficos que permitem a obtenção de espectros de absorção. Tal recurso é importante para fins de identificação; em espectrofotômetros de infravermelho é quesito indispensável e em aparelhos de ultravioleta e visível permite, a par de eventual caracterização da substância, a determinação simplificada de parâmetros como os comprimentos de onda de absorção máxima e mínima ( $\lambda_{\max}$  e  $\lambda_{\min}$ , respectivamente). O primeiro é usualmente o escolhido para a determinação quantitativa da substância em análise.

Espectrofotômetros adequados à elaboração de espectros são dotados de mecanismo de feixe duplo em lugar do mais tradicional feixe único. Permitem que amostra e "branco" (solvente empregado no preparo da solução de amostra, necessário ao acerto do zero de absorvância ou 100% de transmitância da escala do instrumento do espectrofotômetro) sejam lidos simultânea e continuamente, assegurando manutenção da calibração de zero ao longo da varredura de comprimentos de onda. Aparelhos de feixe único exigem

ajuste inicial do zero, sendo este válido apenas no comprimento de onda selecionado para a leitura.

As cubetas utilizadas para as soluções espectrofotométricas apresentam janelas para passagem da luz incidente e transmitida de material transparente à radiação empregada. Na região do visível empregam-se cubetas de sílica enquanto o ultravioleta requer cubetas de quartzo. No infravermelho são necessárias celas de NaCl, KBr, LiF, CaF<sub>2</sub>, entre outros sais. É fundamental que as cubetas — normalmente com espessura de 1 cm (tolerância de 0,005 cm) — sejam as mais idênticas possíveis, vale dizer, apresentem a mesma transmitância espectral quando preenchidas com o mesmo solvente. As cubetas devem ser manipuladas com cautela, evitando-se tocá-las na superfície das janelas, e lavadas com soluções de detergentes suaves, enxaguadas com água destilada e, a seguir, com solvente orgânico volátil, que não deixe resíduo ao evaporar.

#### CALIBRAÇÃO DE ESPECTROFOTÔMETROS

A calibração dos aparelhos deve ser realizada periodicamente. A escala de comprimentos de onda pode ser calibrada empregando-se determinadas fontes de luz que apresentem raios espectrais de intensidade conveniente, distribuídas de maneira adequada na região do espectro a ser verificada. Os valores exatos das posições das linhas características da lâmpada de quartzo de arco de mercúrio são os seguintes: 253,70; 302,25; 313,16; 334,15; 365,48; 404,66 e 453,83 nm. A escala de comprimentos de onda também pode ser testada por meio de filtros de vidro adequados, que apresentam bandas de absorção na região do visível e do ultravioleta. São bastante utilizados os filtros-padrão de vidro contendo didímio — mistura de praseodímio e neodímio — ou hólmio.

Os valores exatos para a posição das raias características dos filtros de vidro contendo hólmio são os seguintes: 241,5 ± 1; 287,5 ± 1; 360,9 ± 1 e 536,2 ± 3 nm. A escala de comprimentos de onda pode, opcionalmente, ser calibrada com solução de perclorato de hólmio SR, que apresenta as seguintes absorções características: 241,2; 278,2; 361,5 e 536,3 nm. As tolerâncias admissíveis são de 1 nm na região do ultravioleta e de ± 3 nm na região do visível.

A calibração da escala de comprimento de onda em espectrofotômetros de infravermelho é efetuada mediante conferência dos picos de absorção de poliestireno (filme), dióxido de carbono, vapor de água ou amônia.

A escala de absorvância, por sua vez, pode ser calibrada empregando-se solução de dicromato de potássio, grau espectrofotométrico. Os valores de absorvância específica e a tolerância máxima para os comprimentos de onda correspondentes são os seguintes:

$\lambda$ (nm)	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$	faixa admissível
235	124,5	122,9 a 126,2
257	144,0	142,4 a 145,7
313	48,6	47,0 a 50,3
350	106,6	104,9 a 108,2

#### IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

Diversas monografias incluem espectros de absorção no ultravioleta como prova de identificação. Nestes casos, haverá especificação da extensão de varredura, solvente, concentração da solução e espessura da cubeta a empregar. Alguns fármacos requerem o uso de padrões de referência. Nestes casos, fica subentendido que as leituras de padrão e amostra são efetuadas simultaneamente (em sucessão imediata) e em condições idênticas quanto a comprimento de onda, largura de fenda, posição das cubetas etc.

O preparo das soluções-padrão em geral compreende a elaboração de soluções com até 10% de tolerância na concentração especificada. Entretanto, cabe corrigir exatamente a concentração com base na tomada de ensaio. Se o padrão de referência utilizado não tiver sido previamente dessecado, calcular a absorvidade com base na concentração da substância anidra.

#### DETERMINAÇÕES QUANTITATIVAS NO ULTRAVIOLETA E NO VISÍVEL

Doseamentos espectrofotométricos na região ultravioleta em geral requerem comparação da absorvância da solução de amostra — preparada na concentração especificada na monografia — com padrões de concentração conhecida. Procedese inicialmente à leitura das soluções-padrão e, em seguida, à da amostra, com o menor intervalo de tempo possível entre as duas etapas e em condições experimentais idênticas.

As soluções de referência são preparadas a partir dos Padrões de Referência de forma similar à descrita na "Identificação por espectrofotometria no ultravioleta".

Quando os doseamentos forem executados com elevada frequência, é dispensável o emprego de padrões de referência para cada determinação. Nestes casos, é admissível recorrer a curvas de calibração — gráficos de absorvância *versus* concentração — preparadas pela leitura em comprimento de onda de absorvância máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de soluções de concentração crescente de padrões de referência. A determinação da concentração da solução-amostra é então obtida por interpolação. A restrição a este procedimento reside na ocorrência de desvios da lei de Beer, tomando-o recomendável somente quando a manutenção da proporcionalidade for confirmada dentro do intervalo de 75-125% da concentração de trabalho (solução-amostra). Curvas de calibração devem ser

conferidas com frequência, em especial se o espectrofotômetro empregado não for o rotineiro ou quando os reagentes tiverem sido preparados a partir de lotes novos. Em caso de dúvida, recorrer à técnica primária de comparação direta com padrões de referência.

Doseamentos colorimétricos (na região visível do espectro eletromagnético) seguem o mesmo esquema dos doseamentos na região do ultravioleta, inclusive o referente a curvas de calibração. Admite-se, contudo, maior tolerância quanto aos comprimentos de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\max}$ ) especificados na monografia em relação aos observados experimentalmente. Recomenda-se que a determinação quantitativa seja efetuada no  $\lambda_{\max}$  observado quando este não diferir em mais de  $\pm 0,5$  nm (200 e 280 nm);  $\pm 2$  nm (280 e 320 nm); e  $\pm 5$  nm (320 e 780 nm) em relação ao valor especificado na monografia. Desvios mais pronunciados tornam necessária a recalibração do espectrofotômetro.

O cálculo para determinação de concentração da solução-amostra em referência à solução-padrão baseia-se na equação da lei de Beer, igualmente válida para ambas:

$$A_p = ab C_p$$

$$A_a = ab C_a$$

em que  $A_p$  e  $C_p$  representam, respectivamente, absorvância e concentração da solução-padrão e  $A_a$  e  $C_a$ , absorvância e concentração da solução-amostra. Se as concentrações são expressas na mesma unidade e as cubetas não diferem nas dimensões, absortividade,  $a$ , e caminho óptico,  $b$ , assumem o mesmo valor nas duas equações, que podem, portanto, ser combinadas:

$$C_a = C_p (A_a/A_p)$$

#### IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO

Capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais (salvo isômeros ópticos), a espectrofotometria no infravermelho é ensaio de identificação por excelência. Algumas monografias especificam a execução de espectros para comparação com espectros de referência. Como opção — havendo disponibilidade de Padrão

de Referência — pode-se efetuar os dois espectros simultaneamente (padrão e amostra) para comparação por superposição.

Pequenas quantidades de impurezas não afetam significativamente o espectro, mas alguns fatores, como polimorfismo, variação no tamanho e orientação dos cristais, técnica de trituração e formação de hidratos, podem originar diferenças.

Das três regiões de infravermelho do espectro eletromagnético, a região intermediária (3,0 a 15,0  $\mu\text{m}$ ) é mais empregada para fins de identificação. Nesta região do espectro, tetracloreto de carbono é praticamente transparente (em películas de até 1 mm de espessura) entre 4000 e 1700  $\text{cm}^{-1}$  (2,5 a 6  $\mu\text{m}$ ). Alternativas usuais são o clorofórmio, o diclorometano e o dibromoetano. Dissulfeto de carbono é adequado como solvente até 250  $\text{cm}^{-1}$  (40  $\mu\text{m}$ ), exceto nas zonas de 2400-2000  $\text{cm}^{-1}$  (4,2-5,0  $\mu\text{m}$ ) e 1800-1300  $\text{cm}^{-1}$  (5,5-7,5  $\mu\text{m}$ ), em que apresenta forte absorção.

Óleo mineral — que absorve nas regiões entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  e 1500-1350  $\text{cm}^{-1}$  — é alternativa frequente aos solventes orgânicos. Dispersões da amostra no óleo são preparadas triturando-se cerca de 2 a 5 mg de substância com quantidade suficiente de óleo para se obter pasta fina e cremosa, que é intercalada, para leitura, entre duas placas de cloreto de sódio ou de outro sal apropriado. Igualmente aceita é a preparação de pastilhas de haletos de potássio. A amostra sólida (1 a 1,5 mg) é triturada com cerca de 300 mg de sal (geralmente brometo de potássio, grau espectrofotométrico, seco e bem pulverizado) e a mistura, homogênea, é introduzida em molde e comprimida a vácuo. Forma-se disco, que, fixado em suporte apropriado, é submetido à leitura.

Amostra e substância de referência, quando for o caso, devem ser preparadas simultaneamente, em condições idênticas. Consideram-se aceitáveis espectros em que os picos de absorção máxima apresentem transmitância entre 5 e 25%. Se o espectro da substância analisada apresentar alguma diferença em relação ao espectro de referência, cabe dissolver iguais porções de ambas as substâncias (ou somente a amostra se a comparação estiver sendo feita em relação aos espectros de referência em solvente apropriado, evaporar as soluções até secura sob as mesmas condições e repetir a execução dos espectros com os resíduos. Se a diferença notada for devida a polimorfismo, deixará de existir.



## V.2.15. ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCÊNCIA

Algumas substâncias podem ser analisadas com maior sensibilidade e especificidade por meio de métodos fluorométricos do que por outras técnicas espectrofotométricas. A espectrofotometria de fluorescência, ou espectrofluorimetria, compreende a medida da fluorescência emitida quando estas substâncias — ditas fluorescentes — são expostas à radiação ultravioleta, visível ou outras também de natureza eletromagnética. Tais radiações promovem a excitação de elétrons da molécula para níveis energéticos mais elevados. Após curta permanência no estado excitado — cerca de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  segundos — os elétrons reverterem ao estado fundamental por meio de processo não radiativo, denominado desativação por colisão, aliado a processo radiativo chamado luminescência (fluorescência ou fosforescência), ao contrário do que ocorre com a maioria das substâncias em que a reversão não compreende emissão de luz. Na desativação por colisão, a energia se perde como calor nos choques entre as moléculas. No processo radiante, o excesso de energia é reemitido com intensidade máxima em comprimento de onda maior (em 20 a 30 nm) que o da radiação excitatória absorvida devido à perda energética compreendida no processo.

Sendo de natureza fluorescente, a radiação emitida pela substância cessa quando a fonte de energia é retirada e esta característica a distingue da fosforescência, que prossegue por algum tempo após o término da excitação.

A intensidade da luz emitida por uma solução fluorescente é, em determinadas condições, proporcional à concentração do soluto e, em consequência, aproveitável para fins analíticos. Não sendo praticável a determinação absoluta da intensidade de fluorescência, recorre-se a determinações referenciadas a soluções-padrão. O fundamento da espectrofluorescência consiste, pois, em excitar a substância com radiação no comprimento de onda de máxima absorção e medir comparativamente a intensidade da luz fluorescente emitida frente a um padrão.

### DEFINIÇÕES

**Intensidade de fluorescência** — Expressão empírica da atividade fluorescente, em unidades arbitrárias proporcionais à resposta do detector.

**Espectro de excitação de fluorescência** — Representação gráfica do espectro de ativação, apresentando a intensidade da radiação emitida por substância ativada (ordenada) e o comprimento de onda da radiação incidente excitatória (abscissa).

**Espectro de emissão de fluorescência** — Representação gráfica da distribuição espectral da radiação emitida por substância ativada, apresentando a intensidade da radiação emitida como ordenada e o comprimento de onda como abscissa.

### APARELHO

A determinação da intensidade de fluorescência pode ser efetuada em simples fluorímetro de filtro (fluorômetro), em espectrofotômetros de absorção adaptados ou em espectrofotômetro de fluorescência (espectrofluorímetro).

O fluorímetro de filtro compreende fonte de luz, filtro primário, câmara de amostra, filtro secundário e sistema de detecção. Nos fluorímetros deste tipo, o detector encontra-se disposto a  $90^\circ$  em relação à luz incidente. Tal disposição em ângulo reto permite que a luz incidente atravesse a solução da amostra sem interferir com o sinal fluorescente captado pelo detector. Claro está que tal mecanismo não impede que parte da luz difusa atinja o detector devido às propriedades difusoras inerentes às soluções ou em função da presença de partículas sólidas suspensas. Esta dispersão residual é controlada com emprego de filtros. O filtro primário seleciona a radiação de comprimento de onda apropriado à excitação da amostra enquanto o filtro secundário seleciona a radiação fluorescente de comprimento de onda maior, bloqueando o acesso da radiação dispersa ao detector.

Em sua maioria, os detectores de fluorímetros de filtro são equipados com válvulas fotomultiplicadoras, havendo, contudo, diferenças entre tipos de equipamentos quanto à região espectral de máxima sensibilidade. Amplificada a corrente elétrica gerada no fotomultiplicador, obtém-se leitura correspondente em instrumento analógico ou digital.

Espectrofotômetros de fluorescência, por sua vez, diferenciam-se de fluorímetros por não disporem de filtros e sim de monocromadores de prisma ou de grade de difração, proporcionando a esperada superioridade em seletividade de comprimento de onda e flexibilidade.

Tanto fluorímetros como espectrofotômetros de fluorescência permitem emprego de diversas fontes de luz. Lâmpadas de mercúrio ou tungstênio, embora comuns, são substituídas com vantagem pela lâmpada de arco de xenônio à alta pressão, pois esta proporciona, ao contrário das demais, espectro contínuo desde o ultravioleta até o infravermelho. De qualquer forma, a radiação

é muito intensa e não deve jamais ser observada com os olhos desprotegidos, sob risco de lesões permanentes.

Os monocromadores, por sua vez, dispõem de ajuste de largura de fenda. Fendas estreitas propiciam maior resolução e pureza espectral enquanto fendas largas asseguram maior intensidade de luz em detrimento destas características. A largura de fenda a ser adotada é função da diferença entre os comprimentos de onda da luz incidente e emitida, assim como do nível de sensibilidade necessário à análise.

A câmara de amostra geralmente permite uso de tubos redondos e cubetas quadradas, do tipo empregado em espectrofotometria de absorção, salvo pela necessidade de as quatro paredes verticais serem polidas. Volumes de amostra da ordem de 2 a 3 ml são adequados embora alguns instrumentos possam estar dotados de cubetas pequenas, com capacidade para 0,1 a 0,3 ml ou ainda de suportes para capilares que requerem volumes ainda menores.

#### CALIBRAÇÃO DO APARELHO

Fluorímetros e espectrofluorímetros devem ser calibrados com substâncias fluoróforas estáveis de modo a assegurar resultados reprodutíveis. As variações são, em geral, devidas a alterações na intensidade das lâmpadas ou na sensibilidade do fotomultiplicador. O fluoróforo pode ser amostra pura da substância a analisar ou qualquer outra substância fluorescente de fácil purificação, cujos comprimentos de onda de absorção e fluorescência sejam semelhantes aos da substância em análise. Quinina em ácido sulfúrico 0,05 M é padrão adequado para fluorescência azul; fluoresceína em hidróxido de sódio 0,1 M é apropriada para fluorescência verde e rodamina é fluoróforo de escolha na fluorescência vermelha.

A escala de comprimentos de onda do espectrofotômetro de fluorescência também requer calibração periódica.

#### PREPARO DAS SOLUÇÕES

A escolha do solvente utilizado na preparação de soluções fluorescentes requer precauções. Natureza, pureza e pH do solvente são parâmetros relevantes na intensidade e distribuição espectral da fluorescência. Em conseqüência, é recomendável ater-se ao volume especificado em métodos estabelecidos. Muitas substâncias apresentam fluorescência em solventes orgânicos, mas são praticamente não fluorescentes quando dissolvidas em água. Assim, cabe a experimentação em diversos solventes para determinar a propriedade fluorescente de uma substância.

Soluções destinadas à espectrofotometria de fluorescência são 10 a 100 vezes menos concentradas que as empregadas em espectrofotometria de absorção. Para fins quantitativos, é fundamental que a intensidade da fluorescência guarde relação linear com a concentração da amostra dentro de limites compatíveis com a técnica. Se a solução for muito concentrada, parte significativa da luz incidente será absorvida na periferia da cubeta e menor será a quantidade de radiação a alcançar a região central. Isto significa que a própria substância atuará como "filtro interno". Todavia, tal fenômeno é raro, considerando-se que a espectrofotometria de fluorescência é técnica de elevada sensibilidade, permitindo o emprego de soluções de concentrações da ordem de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M.

Devido aos limites de concentração usualmente estreitos nos quais a fluorescência é proporcional à concentração da substância, tem-se como regra a obediência à relação  $(c-d)/(a-b) = 0,40$  a 2,50. Nesta,  $a$  é a intensidade de fluorescência da solução de referência;  $b$ , a intensidade do branco correspondente;  $c$ , a intensidade da solução-amostra e  $d$ , a intensidade do branco correspondente.

As determinações de fluorescência são sensíveis à presença de partículas sólidas nas soluções. Tais impurezas reduzem a intensidade do feixe incidente, produzindo falsas leituras elevadas devido a reflexões múltiplas na cubeta. É, portanto, necessário eliminar estes sólidos por centrifugação ou filtragem antes da leitura, tendo em mente, contudo, que alguns papéis de filtro podem conter impurezas fluorescentes.

A presença de oxigênio dissolvido no solvente exerce efeito atenuador sobre a intensidade da fluorescência e cabe eliminá-lo usando, por exemplo, passagem de corrente de nitrogênio, hélio ou qualquer gás inerte na solução, previamente à leitura.

Controle de temperatura também é relevante. Em algumas substâncias, a emissão fluorescente pode cair de 1 a 2% por grau de temperatura aumentado. Daí — se o objetivo for máxima precisão — ser recomendado emprego de cubetas termostabilizadas. Entretanto, para análise de rotina, não há necessidade deste recurso desde que as determinações sejam realizadas com rapidez suficiente para evitar aquecimento devido à exposição da solução à luz intensa.

Algumas substâncias fluorescentes são sensíveis à luz e, quando expostas à radiação luminosa intensa do espectrofotômetro de fluorescência, podem se decompor em produtos mais ou menos fluorescentes. Tal efeito pode ser detectado observando-se a resposta do detector em relação ao tempo e atenuado com a redução da intensidade luminosa incidente pela utilização de filtros.

## V.2.16. TURBIDIMETRIA E NEFELOMETRIA

Turbidimetria e nefelometria — variantes de espectrofotometria — destinam-se à avaliação quantitativa de substâncias em função da turbidez de suas suspensões, proporcional a seu poder de difração sobre luz incidente (efeito Tyndall).

Na turbidimetria, também conhecida por opacimetria, mede-se a intensidade da luz transmitida no mesmo sentido de direção da luz incidente. Embora haja turbidímetros — destinados especificamente à aplicação —, colorímetros e espectrofotômetros convencionais são satisfatórios à medida da luz transmitida desde que ajustados para comprimento de onda apropriado.

A nefelometria (ou difusimetria), por sua vez, compreende a medida da intensidade de luz difundida (refletida) pelas partículas em suspensão, em ângulo reto ao feixe de luz incidente. Mais uma vez, a par de nefelômetros, é possível empregar-se colorímetros e espectrofotômetros na medida nefelométrica. Para tanto, cabe modificá-los de forma a permitir a captação perpendicular ao ângulo da luz incidente, seja por transferência da fonte de luz, seja por alteração de posição do fotossensor. Fluorímetros — a exemplo de nefelômetros — destinam-se à medida de luz dispersa (posicionamento do fotossensor em ângulo de 90° em relação à luz incidente), sendo, portanto, compatíveis com a nefelometria. Colorímetros e espectrofotômetros comerciais freqüentemente dispõem de acessórios para adaptação dos instrumentos à medida nefelométrica.

### *Turbidância*

Turbidância (S) — em analogia à transmitância (T), definida em V.2.14 — é a expressão oficial de dispersão da luz produzida por partículas suspensas. É determinável por turbidimetria ou nefelometria, correspondendo à equação

$$S = \frac{P_0}{P} = k \frac{bd^3}{d^4 + \lambda^4} C$$

em que

$P_0$  = intensidade da radiação incidente,

$P$  = intensidade da radiação transmitida,

$b$  = espessura da camada de amostra (cubeta),

$C$  = concentração da amostra,

$d$  = diâmetro médio das partículas,

$\lambda$  = comprimento de onda,

$k$  = constante de proporcionalidade, dependente da natureza da suspensão e do método de medida.

Uma suspensão avaliada em dado instrumento, sob luz monocromática, apresenta turbidância que corresponde ao produto da concentração  $C$  por uma constante de proporcionalidade  $k$ , que combina os demais parâmetros da equação acima. Tem-se, portanto,  $S = k \cdot C$ , expressão da lei de Lambert-Beer, permitindo que procedimentos turbidimétricos e nefelométricos sejam análogos aos adotados em espectrofotometria. É, contudo, relevante observar que a proporcionalidade só é verdadeira para suspensões muito diluídas, pois reflexões secundárias provocam excessivo desvio de linearidade quando o número de partículas em suspensão ultrapassa determinado limite.

Outra fonte de erro em medidas turbidimétricas e nefelométricas é a decantação das partículas em suspensão. Tal ocorrência pode ser minimizada com o aumento da viscosidade, com a incorporação de colóide protetor — gelatina, goma arábica ou amido — ao meio líquido da suspensão.

### *Procedimento*

O procedimento básico para o emprego de técnicas turbidimétricas ou nefelométricas obedece aos princípios da metodologia espectrofotométrica, compreendendo elaboração de reta de calibração com suspensões de concentração conhecida. Na prática, é permissível a plotagem contra valores de transmitância em vez de turbidância.

As etapas de procedimento compreendem, em resumo: (1) ajustar o instrumento no comprimento de onda especificado na monografia (para colorímetros, na falta de especificação, empregar filtro que forneça luz na faixa azul); (2) preencher a cubeta com a suspensão mais concentrada e ajustar a leitura de transmitância para 100% (transmitância oferece mais linearidade que absorvância); (3) medir a transmitância das demais suspensões-padrão e traçar reta de calibração e (4) medir a transmitância da amostra determinando sua concentração pela reta de calibração.

### *Comparação visual*

Medidas de turbidez podem ser executadas por comparação visual, técnica pela qual a suspensão de amostra é confrontada com suspensão ou suspensões-padrão. Para tanto, empregar tubos de ensaio idênticos, de fundo plano com 70 ml de capacidade e cerca de 23 mm de diâmetro interno. Os tubos devem ser comparados horizontalmente sobre fundo escuro, com fonte de luz lateral.

## V.2.17. CROMATOGRAFIA

Métodos cromatográficos compreendem a distribuição de um soluto entre duas fases – móvel e fixa – atuando a fase fixa por adsorção, partição, filtração em gel ou troca iônica. A cromatografia constitui processo de separação. Identificação ou determinação quantitativa dos componentes de

uma amostra só é possível quando os métodos cromatográficos são combinados com técnicas apropriadas de detecção e medida.

Os principais tipos de cromatografia são: em camada delgada, em papel, em coluna, líquida de alta pressão e de gás.

## V.2.17.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

## EQUIPAMENTO

Consiste em placas de vidro, alumínio ou outro material rígido e inerte, recoberto com fina camada de adsorvente ou suporte, disponíveis comercialmente ou preparadas segundo procedimento descrito a seguir, e cuba de vidro (ou outro material transparente e inerte) provida de bordos e tampas esmerilhados, de modo a promover vedação completa.

## PREPARAÇÃO DAS CROMATOPLACAS

Preparar suspensão de adsorvente ou suporte e, com auxílio de aparelho apropriado, espalhar camada uniforme (geralmente 250 a 500  $\mu\text{m}$  de espessura) sobre as placas, previamente limpas e desengorduradas. Utilizar placas de 20 cm de comprimento e largura variável (20, 10 ou 5 cm). Deixar secar ao ar e, em seguida, colocar na estufa a 100-105 °C por 1 hora. Guardar ao abrigo da umidade. Quando a monografia assim especificar, ativar as cromatoplasas, aquecendo-as em estufa, a 100-105 °C, por 1 hora. As placas de celulose constituem exceção, não devendo ser dessecadas nem ativadas.

## PROCEDIMENTO

A não ser que a monografia prescreva diferentemente, desenvolver as cromatoplasas em cuba saturada. Para isso, forrar as paredes da cuba internamente com papel de filtro introduzindo o eluente em quantidade suficiente para impregná-lo. Deixar, no fundo, camada de 5 a 10 mm de eluente. Fechar a cuba, deixando-a em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente.

Aplicar as soluções em exame na forma de manchas circulares ou bandas de cerca de 1 cm de largura sobre a placa, à distância não inferior a 1,5 cm das bordas laterais e inferior a 1,5 cm das bordas superiores. A distância entre os pontos de aplicação não deve ser inferior a 1,5 cm. Deixar evaporar o solvente, marcar distância de 10 a 15 cm a partir do ponto de aplicação das amostras e introduzir a cromatoplasa na cuba, colocando-a na posição tão próxima da vertical quanto possível, de modo tal que os pontos de aplicação fiquem acima do nível do eluente. Fechar a cuba e deixar desenvolver o cromatograma até que o eluente atinja o limite marcado. Remover a cromatoplasa, deixar secar, e visualizar de acordo com o prescrito na monografia.

## V.2.17.2. CROMATOGRAFIA EM PAPEL

## EQUIPAMENTO

Consiste em cuba de vidro, provida de bordas e tampa esmerilhadas e de dimensões adequadas para conter o papel cromatográfico, que pode ser adaptado para cromatografia ascendente ou descendente.

Utilizar papel para cromatografia, cortado no sentido das fibras em tiras de comprimento variável e largura não inferior a 4,5 cm.

Para cromatografia descendente, utilizar cuba com tampa provida de orifício central, fechado por rolha de vidro ou outro material inerte. Na parte superior da cuba há cubeta suspensa, que contém dispositivo para prender o papel (geralmente vareta de vidro). De cada lado da cubeta há guias de vidro, que sustentam o papel de modo a não tocar nas paredes da cuba cromatográfica.

Para a cromatografia ascendente, na parte superior da cuba há dispositivo que permite sustentar o papel cromatográfico e que pode ser baixado sem abrir a cuba.

## PROCEDIMENTO

Quando a técnica utilizada for a de cromatografia ascendente, traçar linha fina com lápis a 3 cm da borda inferior do papel; se a cromatografia é descendente, traçar linha à distância tal que a mesma fique poucos centímetros abaixo da vareta que prende o papel na cubeta do eluente. Aplicar as amostras na forma de manchas circulares ou bandas de 1 cm de largura sobre a linha traçada com lápis. Se o volume total a ser aplicado produzir mancha de diâmetro superior a 1 cm,

aplicar a amostra em porções, deixando-se evaporar o solvente antes de aplicar a porção seguinte. Quando mais de uma amostra for cromatografada sobre o mesmo papel, distanciar os pontos de aplicação, no mínimo, 3 cm.

## CROMATOGRAFIA DESCENDENTE

Introduzir na cuba camada de eluente especificado na monografia, tampar e deixar em repouso por 24 horas. Aplicar a amostra no papel, colocando-o adequadamente sobre as guias de maneira que a extremidade superior permaneça dentro da cubeta suspensa e prendê-lo com a vareta de vidro. Fechar a cuba e deixar em repouso por 1 hora e meia. Em seguida, através do orifício na tampa introduzir o eluente na cubeta. Desenvolver o cromatograma até a distância ou tempo prescritos, protegendo o papel da incidência de luz direta. Remover o papel, marcar o percurso da fase móvel, secar e visualizar da maneira prescrita na monografia.

## CROMATOGRAFIA ASCENDENTE

Colocar no fundo da cuba recipiente contendo o eluente, fechar a cuba e mantê-la em repouso por 24 horas. Aplicar a amostra sobre o papel introduzindo-o na cuba e deixar em repouso por 1 hora e meia. Sem abrir a cuba, baixar o papel de modo a colocar sua extremidade inferior em contato com o eluente e desenvolver o cromatograma até a distância ou tempo prescritos. Retirar o papel, marcar o percurso do eluente, secar e visualizar da maneira prescrita na monografia.

## V.2.17.3. CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## EQUIPAMENTO

Colunas cromatográficas são constituídas de tubos de vidro ou outro material inerte e transparente, e de comprimento e diâmetro variáveis, em cuja parte inferior há estrangulamento e torneira para regulagem do fluxo do eluente. Em algumas colunas, a parte inferior apresenta uma placa porosa, cuja finalidade é evitar a saída da fase fixa. Na parte superior da coluna poderá haver dilatação de forma esférica destinada a conter volume maior de solvente. Os tipos de cromatografia em coluna podem ser: por adsorção, partição ou troca iônica.

## PROCEDIMENTO

**Cromatografia em coluna por adsorção** — Suspende a fase fixa na fase móvel introduzindo, a seguir, no tubo de vidro, cuja parte basal foi previamente obturada por chumaco de algodão, de modo a formar coluna de adsorvente isenta de bolhas de ar. Deixar sedimentar o adsorvente, retirar o excesso de eluente e colocar a amostra no topo da coluna. Em seguida, adicionar fase móvel e deixá-la fluir pela ação da gravidade ou pela aplicação de pressão positiva no topo da coluna. O eluato é controlado, recolhendo-se frações conforme especificado na monografia e examinando-se cada fração por método adequado.

**Cromatografia em coluna por partição** — Utilizar fase líquida imiscível com fase móvel para ser adsorvida na superfície de suporte sólido. Desenvolver a cromatografia da mesma maneira que a cromatografia de adsorção. De acordo com a monografia, saturar a fase móvel com a fase fixa, antes de ser usada para a eluição. Geralmente, o adsorvente e a fase fixa são mais polares do que a fase móvel. Em alguns casos utiliza-se a cromatografia de partição de fase reversa, em que o adsorvente polar se transforma em não polar

pela silanização ou outros meios (tratamento com parafinas, por exemplo), e a fase fixa é menos polar do que a fase móvel. Proceder à coleta e ao controle de frações conforme a monografia.

**Cromatografia em coluna por troca iônica** — Utilizar como fase fixa resina de troca iônica. Troca de íons consiste em intercâmbio reversível de íons presentes na solução com íons do polímero resinoso, celulose modificada ou suporte de sílica-gel. A escolha da resina, forte ou fraca, aniônica ou catiônica, dependerá em grande parte do pH no qual deverá ocorrer a troca iônica e da natureza de ânions ou cátions a serem trocados. As resinas fortemente ácidas e fortemente básicas são convenientes para a maioria das aplicações analíticas. Emprega-se, na prática, grande excesso (200-300%) de resina sobre a quantidade da amostra estequiometricamente calculada; a capacidade das resinas varia de 2 a 5 milimoles por g (peso seco).

**Tratamento da resina e preparo da coluna** — Suspende a resina de troca iônica em água e deixar em repouso por 24 horas. Introduzi-la em coluna adequada e, tratando-se de resina aniônica, convertê-la em básica passando através da coluna solução de hidróxido de sódio SR, à velocidade de 3 ml por minuto, até que o eluato forneça reação negativa para cloreto. Passar, em seguida, água isenta de dióxido de carbono. Em caso de resina catiônica, a conversão para a forma ácida dá-se pela passagem de ácido clorídrico SR através da coluna, seguida de lavagem com água isenta de dióxido de carbono até que o eluato forneça reação neutra.

Desenvolve-se coluna de troca iônica de maneira análoga à descrita para cromatografia de adsorção. Terminada a operação regenera-se a resina lavando-a com hidróxido de sódio SR (colunas aniônicas) ou com ácido clorídrico SR (colunas catiônicas) e, em seguida, com água isenta de dióxido de carbono até reação neutra.

## V.2.17.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO

## EQUIPAMENTO

É constituído por uma ou mais bombas, sistema injetor de amostra, coluna cromatográfica e sistema de detecção que permite determinar presença e concentrações dos componentes da amostra.

O comprimento, o diâmetro interno da coluna, a temperatura da operação, a composição e a vazão do eluente, a natureza da fase estacionária e os meios de detecção são descritos nas monografias.

Quando a monografia estabelecer a "eficiência mínima da coluna", esta é definida em termos do número de pratos teóricos por metro, pela expressão

$$N = \frac{5,54}{C} \times \left( \frac{D_R}{l_h} \right)^2$$

em que

- N = número de pratos teóricos por metro,  
 $D_R$  = distância, ao longo da linha-base, entre o ponto de injeção da amostra e a perpendicular à linha-base traçada do máximo do pico de interesse,  
 C = comprimento da coluna em metros,  
 $l_h$  = largura do pico de interesse à metade da altura, expressa na mesma unidade de medida que  $D_R$ .

O fator de resolução (R) entre picos medidos no cromatograma é, no mínimo, 1,0 (exceto se a monografia estabelecer diferentemente). O fator de resolução é definido pela expressão

$$R = 2(D_{Rb} - D_{Ra}) / (l_a + l_b)$$

em que

- R = fator de resolução,  
 $D_{Ra}$  e  $D_{Rb}$  = distâncias medidas ao longo da linha-base, entre os pontos de injeção e a perpendicular à linha-base, traçada dos respectivos máximos de dois picos adjacentes,  
 $l_a$  e  $l_b$  = largura dos respectivos picos na linha base.

Os valores de  $l_a$ ,  $l_b$ ,  $D_{Ra}$ ,  $D_{Rb}$  devem ser expressos nas mesmas unidades de medida.

## PROCEDIMENTO

A preparação das soluções é descrita na monografia. Registrar o cromatograma e repetir a determinação para assegurar-se da reprodutibilidade. Determinar as áreas dos picos ou, alternativamente, quando a simetria o permitir, a altura dos picos produzidos por componentes de interesse. A partir dos valores obtidos, calcular o teor destes componentes em relação a padrões internos ou externos.



## V.2.17.5. CROMATOGRAFIA A GÁS

## EQUIPAMENTO

Consiste em bloco injetor conectado a coluna de material apropriado, contendo fase fixa que recobre suporte sólido, medidor de fluxo para gás de arraste, e sistema de detecção que permite determinar presença e concentrações de componentes da amostra. As especificações do equipamento e as condições de operação são descritas nas monografias.

Quando a monografia estabelecer "eficiência mínima da coluna", esta é definida em termos do número de pratos teóricos por metro, pela expressão citada em V.2.17.4.

O fator de resolução (R) entre picos medidos no cromatograma é, no mínimo, 1,0 (exceto se a monografia estabelecer diferentemente). O fator de resolução é definido pela expressão

$$R = 2(D_{R_a} - D_{R_b}) / (l_a + l_b)$$

em que

R = fator de resolução,

$D_{R_a}$  e  $D_{R_b}$  = distâncias, medidas ao longo da linha-base, entre os pontos de injeção e a perpendicular à linha-base, traçada dos respectivos máximos de dois picos adjacentes,

$l_a$  e  $l_b$  = largura dos respectivos picos na linha-base.

Os valores de  $l_a$ ,  $l_b$ ,  $D_{R_a}$  e  $D_{R_b}$  são expressos nas mesmas unidades de medida.

## PROCEDIMENTO

O preparo das amostras é descrito na monografia. Determinar o ajuste do aparelho e os volumes a serem injetados, de modo a produzir resposta adequada. Ajustar a vazão do gás de arraste para otimizar a qualidade e a velocidade do desenvolvimento do cromatograma. Nos casos em que se utiliza padrão interno, procede-se à injeção de amostra para determinar se há presença de picos interferentes com o pico do padrão interno. Observada a presença de picos interferentes, proceder à correção das condições de operação.

Injetar os volumes selecionados das soluções descritas na monografia e registrar os cromatogramas resultantes. Repetir a determinação para assegurar-se de resposta consistente. Determinar as áreas dos picos ou, quando a simetria dos mesmos permitir, suas alturas. A partir dos valores obtidos calcular o teor dos componentes em exame.

## V.2.17.6. MATERIAL PARA CROMATOGRAFIA

**CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

Os materiais abaixo relacionados são utilizados na preparação de cromatoplaças, de acordo com o método geral de cromatografia em camada delgada. Podem ser utilizadas cromatoplaças prontas, disponíveis comercialmente, desde que correspondam ao teste de verificação do poder de separação ou qualquer outro teste adicional especificado na monografia.

**CELULOSE**

Pó fino homogêneo, com tamanho médio das partículas inferior a 30  $\mu\text{m}$  e que correspondem ao teste de verificação do poder de separação.

*Teste de verificação do poder de separação*

Preparar cromatoplaças utilizando suspensão de 15 g de celulose em 100 ml de água com auxílio de agitador mecânico. Preparar solução a 0,025% (p/V) de cada um dos seguintes corantes: preto brilhante BN, amaranço S, amarelo rápido AB e tropeolina O em mistura de volumes iguais de água e metanol. Aplicar 10  $\mu\text{l}$  desta solução sobre a cromatoplaça e desenvolver usando como fase móvel a mistura de 50 volumes de 1-propanol 10 volumes de acetato de etila e 40 volumes de água. Deixar o solvente subir 10 cm. O cromatograma deverá mostrar quatro manchas distintas e bem separadas, sendo, pela ordem, uma preta, uma vermelha e duas amarelas, contando a partir do ponto de aplicação.

**CELULOSE F 254**

Pó fino, homogêneo, com tamanho médio das partículas inferior a 30  $\mu\text{m}$ , contendo indicador fluorescente com intensidade ótima a 254 nm. Corresponde ao teste de verificação do poder de separação descrito para celulose. Para o preparo da cromatoplaça utilizar a suspensão de 25 g em 100 ml de água.

**CELULOSE G**

Pó fino, homogêneo, com tamanho médio das partículas inferior a 30  $\mu\text{m}$ , contendo agente adesivo. Corresponde ao teste de verificação do poder de separação descrito para celulose.

**SÍLICA-GEL G**

Pó fino homogêneo. O tamanho de partículas varia entre 10 e 40  $\mu\text{m}$ . Contém cerca de 13% (p/p) de sulfato de cálcio hemidratado. Corresponde aos seguintes testes:

*Teor de sulfato de cálcio*

Misturar 0,25 g de sílica-gel G, 3 ml de ácido clorídrico 2M e 100 ml de água e agitar vigorosamente por 30 minutos. Filtrar, lavar o resíduo com água e proceder com a titulação complexométrica de cálcio no filtrado combinado com águas de lavagem. Cada ml de edetato dissódico 0,05 M equivale a 7,255 mg de sulfato de cálcio hemidratado.

*Alcalinidade*

O pH da suspensão preparada pela agitação de 1 g de sílica-gel G com 10 ml de água isenta de dióxido de carbono por cinco minutos é, aproximadamente, 7,0.

*Verificação do poder de separação*

Preparar cromatoplaça conforme indicado em método geral para cromatografia em camada delgada. Preparar solução a 0,01% (p/V) de cada um dos seguintes corantes: azul de indofenol, vermelho Sudan G e amarelo de dimetila em tolueno. Aplicar 10  $\mu\text{l}$  sobre a cromatoplaça e desenvolver utilizando tolueno como fase móvel. Deixar o solvente subir 10 cm. O cromatograma deverá mostrar 3 manchas separadas: a mancha correspondente ao azul de indofenol junto do ponto de aplicação, a mancha correspondente ao amarelo de dimetila, no meio do cromatograma e a mancha correspondente ao vermelho Sudan G, entre as duas primeiras.

**SÍLICA-GEL GF 254**

Pó fino, homogêneo, branco, com tamanho médio das partículas variando de 10 a 40  $\mu\text{m}$ , contendo cerca de 13% (p/p) de sulfato de cálcio hemidratado e indicador fluorescente, com intensidade máxima a 254 nm. Corresponde a testes de teor de sulfato de cálcio, alcalinidade e verificação do poder de separação descritos para sílica-gel G. Corresponde ainda a teste de fluorescência.

*Fluorescência*

Preparar cromatoplaças segundo descrito em método geral para cromatografia em camada delgada. Preparar solução de ácido benzóico a 0,1% (p/V) em mistura de 9 partes de 2-propanol e 1 parte de ácido fórmico anidro. Aplicar sobre a cromatoplaça, separadamente, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{l}$  desta solução e desenvolver o cromatograma usando como eluente mistura de 9 partes de 2-propanol e 1 parte de ácido fórmico anidro. Após desenvolvimento e secagem verificar a mancha escura de ácido benzóico sobre fundo fluorescente verde amarelado, no terço superior do cromatograma.

**CELULOSE MICROCISTALINA**

Pó fino, homogêneo, com tamanho médio das partículas inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Corresponde ao teste de verificação do poder de separação descrito para celulose. Para o preparo da placa utilizar suspensão de 15 g em 100 ml de água.

**KIESELGUHR G (Terra de diatomáceas G)**

Pó fino, acinzentado, aparecendo coloração cinzenta mais pronunciada quando misturado com água. O tamanho médio das partículas varia de 10 a 40  $\mu\text{m}$ . Trata-se de terra de diatomáceas natural, extraída com ácido clorídrico e calcinada, a qual se adicionaram cerca de 15% de sulfato de cálcio hemidratado. Corresponde aos testes:

**Teste de verificação do poder de separação**

Preparar cromatoplasmas usando suspensão da amostra em solução 0,02 M de acetato de sódio anidro. Preparar solução contendo 0,1% (p/V) de cada um dos seguintes açúcares: lactose, sacarose, frutose, D-glicose e D-galactose em piridina. Aplicar 10  $\mu\text{l}$  da solução sobre a cromatoplasma e desenvolver o cromatograma utilizando como fase móvel a mistura de 65 volumes de acetato de etila, 23 volumes de 2-propanol e 12 volumes de água. Deixar secar em estufa a 110 °C e esfriar. Nebulizar a cromatoplasma com cerca de 10 ml da solução de anisaldeído e aquecer a 110 °C por 10 minutos. O cromatograma deverá mostrar cinco manchas separadas e bem definidas.

**Alcalinidade**

O pH de suspensão preparada pela agitação de 1 g de *Kieselguhr G* com 10 ml de água isenta de dióxido de carbono por 5 minutos deverá situar-se entre 7,0 e 8,0.

**KIESELGUHR H (Terra de diatomáceas H)**

Pó fino, acinzentado, aparecendo coloração cinzenta mais pronunciada quando misturado com água. O tamanho médio das partículas varia de 10 a 40  $\mu\text{m}$ . Corresponde ao teste de verificação do poder de separação descrito para *Kieselguhr G* e a teste de alcalinidade.

**Alcalinidade**

O pH de suspensão preparada pela agitação, por 5 minutos, de 1 g de *Kieselguhr H* com 10 ml de água isenta de dióxido de carbono situa-se entre 6,4 e 8,0.

**SÍLICA-GEL H**

Pó fino homogêneo, com tamanho de partículas variando entre 10 e 40  $\mu\text{m}$ . Corresponde a teste de verificação do poder de separação descrito para sílica-gel G.

**SÍLICA-GEL HF 254**

Pó fino, homogêneo, branco, com tamanho médio de partículas variando entre 10 e 40  $\mu\text{m}$ , contendo cerca de 1,5% (p/p) de indicador fluorescente com absorção máxima em 254 nm.

Corresponde a testes de verificação do poder de separação e alcalinidade descritos para sílica-gel G e a teste para fluorescência descrito para sílica-gel GF 254.

**SÍLICA-GEL SILANIZADA HF 254**

Pó branco, fino e homogêneo. Possui propriedade de repelir a água; quando agitado com água permanece na superfície do líquido. Corresponde ao teste de verificação do poder de separação.

**Verificação do poder de separação**

Proceder à cromatografia em camada delgada, utilizando cromatoplasmas preparadas da maneira descrita a seguir:

Agitar vigorosamente, durante 2 minutos, 30 g de sílica-gel silanizada HF 254 com 60 ml de mistura de água e metanol 2:1. Utilizando dispositivo apropriado, espalhar camada uniforme da suspensão de aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  sobre placas de vidro, medindo 20 por 5 cm, cuidadosamente limpas e desengorduradas. Deixar secar ao ar e, em seguida, aquecer em estufa a 110 °C por 30 minutos. Preparar mistura de laurato de metila, misturado de metila, palmitato de metila e estearato de metila, 0,1 g cada. Adicionar a esta mistura 40 ml de solução de hidróxido de potássio a 3,0% (p/V) em etanol a 90%, previamente decantada e aquecer por 1 hora em banho-maria, sob refluxo. Esfriar, adicionar 100 ml de água, acidificar a mistura com ácido clorídrico 2 M e extrair com 3 porções, de 10 ml cada, de clorofórmio. Reunir os extratos clorofórmicos, secá-los com sulfato de sódio anidro, filtrar e evaporar até secura. Dissolver o resíduo em 50 ml de clorofórmio.

Aplicar sobre a cromatoplasma 3 porções de 10  $\mu\text{l}$  cada, desenvolver o cromatograma usando como fase móvel mistura de 1,4-dioxana, água e ácido acético glacial (65:25:10). Retirar a cromatoplasma da cuba, aquecer a 120 °C em estufa por 30 minutos, deixar esfriar e nebulizar com solução a 3,5% (p/V) de ácido fosfomolibdico em 2-propanol. Aquecer a 150 °C em estufa até que as manchas sejam visíveis. Expor a cromatoplasma a vapores de amônia até que o fundo se tome branco; cada cromatograma mostra 4 manchas distintas, bem separadas.

**CROMATOGRAFIA EM COLUNA****Óxido de alumínio anidro**

Óxido de alumínio neutro ou básico, desidratado e ativado pelo tratamento com calor, consis-

tindo em  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Todo o óxido de alumínio neutro deve passar pelo tamis de 150  $\mu\text{m}$  e ser retido no tamis de 75  $\mu\text{m}$ .

#### *Óxido de alumínio básico*

Grau básico de óxido de alumínio comercial ativado, adequado para cromatografia em coluna. Corresponde aos testes arrolados a seguir.

**Alcalinidade** — O pH de suspensão a 10% (p/V) em água isenta de dióxido de carbono e agitada durante 5 minutos situa-se entre 9,0 e 10,0.

**Atividade** — Empacotar, em coluna cromatográfica medindo 1 cm de diâmetro e comprimento adequado, óxido de alumínio básico em quantidade suficiente para formar coluna de 5 cm de comprimento. Aplicar, sobre a mesma, mistura de 5 ml de solução de *Amarelo Sudan* e 5 ml de *Sudan Vermelho G* e eluir com 20 ml de mistura de 1 volume de benzeno e 4 volumes de éter de petróleo 60-80 °C. O *Sudan Vermelho G* forma faixa de aproximadamente 1 cm de profundidade na parte de cima da coluna, seguindo-se faixa incolor e, abaixo desta, faixa amarela de *Amarelo Sudan*.

#### *Óxido de alumínio desativado*

Adicionar 1,5 a 2,0% de água ao óxido básico de alumínio, misturar bem e deixar em repouso por uma noite em recipiente bem vedado. O óxido de alumínio desativado corresponde ao teste que segue:

— Empacotar em coluna adequada de óxido de alumínio desativado em quantidade suficiente para formar coluna de 20 cm de altura e 1 cm de diâmetro, usando hexano, como fase móvel. Adicionar no topo da coluna solução de 0,25 mg de calciferol em 10 ml de hexano. Quando o nível da solução estiver atingindo o do suporte, começar a eluir com solução a 17,5% ((V/V) de éter em hexano. Se necessário, ajustar a velocidade de eluição para 1 a 2 ml por minuto. Coletar 200 ml de eluato: não se verifica presença de calciferol. Coletar 100 ml seguintes do eluato: verificar presença de, no mínimo, 95% do calciferol utilizado no teste. Para determinação da solução de calciferol, seguir prescrição da monografia.

#### *Óxido de alumínio neutro*

Óxido de alumínio neutro, comercial, adequado para a cromatografia de coluna. Corresponde ao seguinte teste:

— Empacotar em coluna cromatográfica, medindo 1 cm de diâmetro e de comprimento adequado, óxido de alumínio neutro em quantidade suficiente para formar coluna de 5 cm de altura.

Aplicar, sobre a coluna, mistura de 5 ml de solução de azobenzeno e 5 ml de solução de metoxiazobenzeno e eluir com mistura de 1 volume de benzeno e 4 volumes de éter de petróleo 60-80 °C. O metoxiazobenzeno forma faixa brilhante amarela, de 3 a 5 cm de profundidade, na parte superior da coluna. Imediatamente abaixo forma-se faixa amarela, mais pálida, de aproximadamente 2 cm de largura: corresponde ao azobenzeno.

#### *Óxido de alumínio com 7% de água*

Passar óxido de alumínio neutro triidratado através de tamis de 106  $\mu\text{m}$  e, em seguida, através de tamis de 53  $\mu\text{m}$ . Misturar 9 partes de material retido no tamis de 53  $\mu\text{m}$  com 1 parte do material que passou através do mesmo tamis. Aquecer a mistura em forno a 780-820 °C por 7 horas, esfriar, evitando contato com umidade, e transferir para recipiente bem vedado. Adicionar 7% de água ao óxido de alumínio anidro assim obtido, vedar o recipiente e misturar bem seu conteúdo, fazendo rolar o recipiente vedado. Deixar em repouso por, no mínimo, 12 horas, agitando ocasionalmente.

#### *Óxido de alumínio com 4% de água*

Proceder como descrito para óxido de alumínio com 7% de água, adicionando apenas 4% de água à alumina anidra.

#### *Carmelose*

Substância trocadora de cátions, fracamente ácida, monofuncional na forma fibrosa.

**Tratamento preliminar** — Agitar parte de carmelose (carboximetilcelulose) com 15 volumes de hidróxido de sódio 0,5 M e deixar em repouso por 30 minutos. Remover o líquido sobrenadante e lavar o resíduo com água até que as águas de lavagem mostrem pH 8,0. Agitar o resíduo lavado com 15 volumes de ácido clorídrico 0,5 M e deixar em repouso por 15 minutos. Repetir o tratamento com ácido e, finalmente, lavar com água até que as águas de lavagem mostrem reação praticamente neutra. Suspender em água contendo 1% (p/V) de álcool benzílico e estocar até o momento de uso.

#### *Diatomita lavada (auxiliar de filtração)*

Pesar 500 g de diatomita calcinada (tipo Celite 545) e adicionar 2000 ml de ácido clorídrico. Misturar, deixar em repouso por 12 horas, agitando ocasionalmente. Filtrar e lavar o resíduo sobre o filtro com água até reação neutra ao tornassol. Lavar com 500 ml de metanol e, em seguida, com 1000 ml de mistura de volumes iguais de metanol e éter. Secar o resíduo lavado a 100 °C até que não se perceba mais odor do solvente. Armazenar em recipientes bem vedados.

## CROMATOGRAFIA A GÁS

### SUPORTES

#### *Suporte de terra de diatomáceas branco*

Trata-se de grânulos brancos de sílica constituídos, principalmente, de esqueletos de diatomáceas submetidos à calcinação. Encontra-se no comércio sob várias formas. As mais utilizadas são:

- *suporte de diatomáceas lavado com ácido.* Trata-se de suporte de diatomáceas lavado com ácido clorídrico para remover impurezas metálicas, reduzir atividade de superfície e prevenir formação de cauda nos picos.
- *suporte de diatomáceas silanizado.* Trata-se de suporte de diatomáceas tratado com dimetildiclorossiloxana ou qualquer outro agente silanizante, para reduzir a atividade de superfície e prevenir formação de cauda nos picos.
- *suporte de diatomáceas com álcali.* Trata-se de suporte de diatomáceas lavado com solução de hidróxido de potássio para reduzir formação de cauda nos picos de compostos básicos.

Encontram-se disponíveis comercialmente suportes de diatomáceas de alto desempenho. Tais suportes podem ser adequados para algumas determinações. A monografia estabelecerá, quando necessário, o grau do suporte considerado ade-

quado para aquela determinação, assim como o tamanho de partículas adequado.

#### *Suporte de terra de diatomáceas róseo*

Trata-se de grânulos róseos, obtidos a partir da diatomita natural, moldada em tijolos, com auxílio da argila, os quais são calcinados e quebrados em seguida. Este suporte é mais denso do que o suporte de terra de diatomáceas branco e, como o anterior, também existe no comércio com vários graus de desempenho.

#### *Fases estacionárias*

Grande variedade de substâncias químicas são utilizadas como fase estacionária, incluindo macrogéis, ésteres de alto peso molecular, amidas, hidrocarbonetos, polissiloxanas e seus derivados e polímeros poliaromáticos microporosos. A escolha da fase estacionária adequada para determinação cromatográfica deve ser objeto de seleção criteriosa. As monografias poderão fazer referência a tipos de fases estacionárias disponíveis comercialmente. No entanto, estas referências não impedem o uso de produto de origem diferente, contanto que apresentem características semelhantes.

#### *Padrões internos*

Os reagentes utilizados como padrões internos não devem conter impurezas que produzam picos capazes de interferir com a determinação descrita na monografia.

## V.2.18. POLAROGRAFIA

A polarografia, método analítico eletroquímico, fundamenta-se na medida da corrente elétrica resultante da eletrólise de substâncias eletroativas (reduzíveis ou oxidáveis) sob determinado potencial de eletrodo e condições controladas. Em outras palavras, a técnica implica no registro do aumento da corrente em eletrodo polarizável durante a eletrólise de substância dissolvida no meio eletrolítico em função do aumento da tensão aplicada ao sistema. O gráfico desta evolução da corrente em relação à tensão — o polarograma — fornece informações quali e quantitativas sobre constituintes eletro-redutíveis ou eletro-oxidáveis da amostra.

Dentre as variantes de metodologia polarográfica, a mais simples é a técnica em corrente contínua. Requer — a exemplo da potenciometria — o emprego de dois eletrodos, o de referência (geralmente eletrodo de calomelano saturado, ECS) e o microeletrodo indicador (geralmente eletrodo de mercúrio gotejante, EMG). Em alguns casos emprega-se um terceiro eletrodo, auxiliar. O ECS — de elevada área superficial — fornece potencial constante durante o ensaio, enquanto o EMG — gotas de mercúrio de dimensões reprodutíveis fluindo periodicamente da extremidade de capilar ligado ao reservatório do metal — assume o potencial que lhe é conferido pela fonte externa. O equipamento polarográfico compreende — além dos eletrodos — a cuba de eletrólise, fonte de alimentação variável, dotada de voltímetro e microamperímetro e registrador gráfico.

De forma simplificada, a técnica consiste na dissolução da amostra (o método tem sensibilidade para concentrações de espécie eletroativa na faixa de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  M) em eletrólito de suporte, responsável pela manutenção de pequena corrente residual, mas que se mostra inerte na faixa de potencial de transformação da amostra. Inicialmente, o controle de tensão da fonte (potenciômetro de precisão) encontra-se totalmente fechado. Nestas condições, a tensão fornecida ao microeletrodo é nula e não haverá indicação de corrente no microamperímetro. A abertura gradual do potenciômetro fará com que pequeno potencial alcance os eletrodos. Sob esta tensão, ainda reduzida, água e eventuais íons derivados de impurezas da amostra tendem a adquirir elétrons no EMG (catodo, neste caso), reduzindo-se e provocando a indicação de pequena passagem de corrente. Elevação progressiva da tensão aplicada acentuará o processo de redução e o aumento quase proporcional da corrente. Atinge-se afinal o potencial necessário à redução da amostra, o que se reflete em elevação acentuada da corrente lida no microamperímetro e registrada no pola-

rograma. Há, contudo, limite para a proporcionalidade da elevação tensão-corrente. Enquanto a corrente se eleva (e a redução se processa), ocorre diminuição progressiva da concentração da espécie eletroativa original junto à superfície do eletrodo. Em dado momento — a velocidade da eletrólise sendo constante — tal concentração atinge nível insuficiente para permitir elevação adicional da corrente e esta última passa a ser limitada pela velocidade com a qual a espécie eletroativa consegue migrar da periferia da solução eletrolítica para a superfície do EMG. Surge o patamar observado no polarograma (Fig. 1), sendo a corrente medida — então denominada corrente de difusão — parâmetro proporcional à concentração de espécie eletroativa na amostra (aspecto quantitativo da polarografia). Superado determinado nível de tensão, a corrente volta a se elevar. Esse aumento é causado pela reação do eletrólito de suporte. Sua presença, em elevadas concentrações, impede que as moléculas eletroativas da amostra alcancem o microeletrodo por migração elétrica e assegura, por isso, que a corrente limite seja efetivamente regulada apenas por difusão.

Ao se empregar microeletrodo de mercúrio gotejante, a superfície do eletrodo é constante-

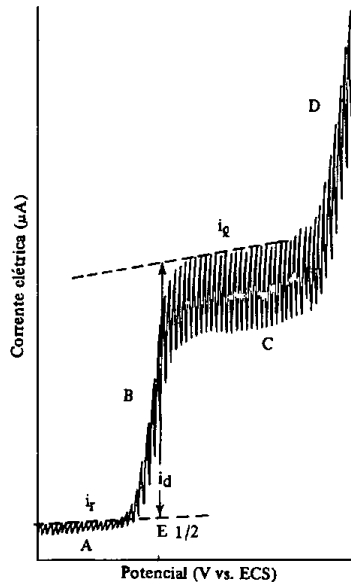


Fig. 1 Polarograma de espécie eletro-redutível.

mente renovada (forma-se gota nova a cada 3-5 segundos), ocorrendo, daí, variação na corrente medida dentro de dado intervalo; a corrente é mais baixa quando a gota se forma, chegando ao máximo no instante da queda. O fenômeno explica a forma "dente de serra" característica da onda polarográfica.

#### POLAROGRAMA

A Fig. 1 ilustra polarograma típico (EMG), caracterizado por 4 fases distintas. Na fase A aparece a corrente capacitiva,  $i_c$ , incorporada à corrente farádica,  $i_f$ , resultante da oxidação ou redução de impurezas do eletrólito suporte ou da amostra. O conjunto destas correntes denomina-se corrente residual,  $i_r$  ( $i_r = i_c + i_f$ ). Na fase B do polarograma ocorre a corrente farádica,  $i_f$ , devida à conversão da substância sob ensaio. A eletrodecomposição leva à escassez desta substância junto ao microeletrodo, verificando-se o patamar (fase C) onde aparece a corrente limite,  $i_l$ . Esta compreende a soma das correntes residual e de difusão ( $i_l = i_r + i_d$ ) em que a corrente de difusão — proporcional à concentração da espécie eletroativa na amostra — tem seu valor determinado pela inversão da equação

$$i_d = i_l - i_r$$

Duas outras correntes indesejáveis — a de migração e a de convecção — podem incorporar a corrente limite. A primeira é suprimida pelo emprego de eletrólito de suporte inerte na faixa de potencial empregada, em concentrações, no mínimo, 100 vezes maiores que as da espécie eletroativa. A corrente de convecção, por sua vez, é minimizada pela não agitação da solução.

Finalmente, a fase D do polarograma, no qual ocorre reversão da proporcionalidade tensão-corrente, corresponde à redução de outras espécies eletroativas, quando presentes, ou, mais frequentemente, à eletrólise do suporte.

#### Equação de Ilkovic

A equação de Ilkovic estabelece relações entre variáveis compreendidas na medida polarográfica e a corrente de difusão no EMG:

$$i_d = 708nD^{1/2}Cm^{2/3}t^{1/6}$$

em que

$i_d$  = corrente de difusão, em  $\mu A$ , medida imediatamente antes da queda da gota de mercúrio do capilar,

708 = constante dependente de diversos parâmetros, incluindo a unidade adotada para as variáveis, dimensão da gota de mercúrio e instante da medida de  $i_d$ ,

- $n$  = número de elétrons necessários à redução ou oxidação de uma molécula ou íon de substância eletroativa,  
 $D$  = coeficiente de difusão, em  $cm^2/s$ ,  
 $C$  = concentração de substância eletroativa, em milimoles/litro;  
 $m$  = massa do fluxo de mercúrio, em mg/s,  
 $t$  = tempo de vida da gota, em s.

A constante 708 — englobando constante natural e o valor do faraday — é estabelecida para operação a  $25^\circ C$  e é aplicável à polarografia de corrente contínua amostrada, na qual, em vez do registro contínuo de corrente, efetua-se apenas a leitura da corrente ao término da vida da gota de mercúrio, permitindo obtenção de polarograma linear. Entretanto, ao empregar-se instrumentos dotados de amortecedor de "dente de serra" no registrador, considera-se a corrente média dos pulsos. A corrente de difusão obtida segundo a equação de Ilkovic passa a ser a média para toda a vida da gota de mercúrio. Neste caso a constante adquire o valor 607.

As variáveis compreendidas na equação de Ilkovic devem ser controladas para que a corrente de difusão seja efetivamente proporcional à concentração de espécie eletroativa na amostra analisada. Alguns íons e moléculas orgânicas em solução aquosa modificam seu coeficiente de difusão à razão de 1 a 2% para cada grau centígrado aumentado, tornando necessário que a célula polarográfica tenha sua temperatura controlada com tolerância de  $\pm 0,5^\circ C$ . Os parâmetros  $m$  e  $t$ , relacionados com dimensão e velocidade de renovação da gota de mercúrio, dependem da geometria do capilar, sendo a corrente de difusão proporcional à raiz quadrada da altura da coluna de mercúrio. Alturas adequadas — medindo-se da extremidade do capilar até o nível de mercúrio no reservatório — situam-se entre 40 e 80 cm. O diâmetro interno do capilar neste caso é de 0,04 mm para comprimentos entre 6 e 15 cm. A altura exata do capilar é ajustada para permitir a formação de uma gota a cada 3-5 segundos, com circuito aberto e capilar imerso no eletrólito sob ensaio.

Assim, se durante um ensaio em particular todos os parâmetros — à exceção da concentração da espécie eletroativa — forem mantidos constantes, a equação de Ilkovic pode ser escrita como

$$i_d = KC$$

em que K representa o conjunto de variáveis mantidas constantes.

Esta relação direta entre corrente de difusão e concentração é usualmente adotada mediante a determinação prévia da corrente de difusão de solução padrão de referência, de concentração conhecida. Em seguida, sob condições idênticas,

determina-se a corrente de difusão da amostra e, finalmente, sua concentração:

$$\frac{(i_d)_P}{(i_d)_A} = \frac{C_P}{C_A}$$

em que P e A correspondem, respectivamente, a padrão e amostra.

Uma vez que polarógrafos, em sua maioria, são dotados de registradores automáticos, é mais fácil determinar graficamente correntes de difusão pela medida — com auxílio de régua — da altura da onda polarográfica (ver Fig. 1). Os valores anotados, em cm, podem ser diretamente aplicados à fórmula, sem necessidade de sua conversão em unidades de corrente elétrica:

$$\frac{A_P}{A_A} = \frac{C_P}{C_A}$$

em que  $A_P$  e  $A_A$  correspondem às alturas das ondas polarográficas do padrão e da amostra, respectivamente.

#### Potencial de meia-onda

A medida da altura da onda polarográfica para fins de análise quantitativa deve ser efetuada traçando-se linhas retas rentes aos picos das oscilações da corrente residual e da corrente limite e unindo-se, por meio de terceira reta paralela ao eixo das abscissas, os prolongamentos das duas primeiras. A reta vertical é traçada passando pelo ponto de inflexão da onda polarográfica, correspondendo à metade da distância entre a corrente residual e a corrente limite ( $I = 1/2i_d$ ). A projeção desta reta sobre o eixo das ordenadas fornece o chamado potencial de meia-onda, parâmetro empregado para caracterizar substâncias eletroativas (aspecto qualitativo da polarografia). O potencial de meia-onda,  $E_{1/2}$ , é dado em volts *versus* ECS (eletrodo de referência), salvo quando houver especificação diferente, e seu valor como parâmetro de identificação decorre de sua independência da concentração e características do EMG. Entretanto, varia em função da composição, pH e temperatura do meio eletrolítico.

#### Remoção de oxigênio

O oxigênio é reduzido no EMG em duas etapas, convertendo-se inicialmente em peróxido de hidrogênio e, em seguida, em água. O fato de tais reações ocorrerem em potenciais mais negativos que zero volts, *versus* ECS, podendo assim interferir com a onda polarográfica da amostra, torna necessário eliminar o gás dissolvido na solução previamente à determinação. A melhor forma consiste em borbulhar nitrogênio isento de oxigênio através da solução durante um período de 10 a 15 minutos imediatamente antes do ensaio, tomando a precaução de previamente

saturar o nitrogênio (para evitar alterações na solução eletrolítica devidas à evaporação) borbulhando-o através de pequeno volume de solução eletrolítica em recipiente separado.

É importante manter a cuba eletrolítica parada e sem vibrações durante o registro polarográfico com o intuito de se evitar a formação de correntes de convecção. Em consequência, é necessário retirar o tubo de nitrogênio da solução durante o registro. Soluções alcalinas podem ser desoxigenadas pela adição de bissulfito de sódio, desde que este não interaja com integrantes da solução eletrolítica.

#### Máximo polarográfico

Efetuada a redução da espécie eletroativa (EMG catodizado), muitas vezes a onda polarográfica eleva-se acentuadamente antes de cair, de forma igualmente acentuada, até o valor da corrente limite. O fenômeno é denominado máximo polarográfico e a corrente correspondente recebe o nome de corrente de adsorção ( $i_a$ ). Traz o inconveniente de dificultar a medida da onda polarográfica (corrente de difusão) e suas causas — ainda pouco esclarecidas — compreendem a adsorção de eletrólito à superfície da gota de mercúrio. A eliminação do máximo polarográfico é, contudo, facilmente efetuada mediante adição de quantidades diminutas de determinados tensoativos (supressores de máximo) ao meio eletrolítico. Sobressaem, para tal fim, solução de gelatina a 0,005% (p/V) e solução de vermelho de metila a 0,01% (p/V), entre outras.

#### Advertência

Vapores de mercúrio são tóxicos. Ao manusear o metal, trabalhar em área ventilada e evitar derrames que, caso ocorram, devem ser imediata e cuidadosamente recolhidos.

#### POLAROGRAFIA DE PULSO

Polarografia de pulso consiste em variante de técnica, superior, pela precisão e sensibilidade, à polarografia de corrente contínua no doseamento e na identificação de elevado número de substâncias em baixas concentrações, incluindo elementos de traço, metabólitos e, evidentemente, fármacos. Sua sensibilidade, cerca de 10 vezes mais elevada que a da polarografia contínua, permite doseamentos na faixa de  $10^{-6} M$ .

Em lugar da aplicação linearmente progressiva de potencial e medida contínua da corrente desenvolvida, a polarografia de pulso compreende a aplicação de pulsos de potencial crescente ao EMG, coincidentes com o período final de vida das gotas de mercúrio, cada pulso apresentando potencial ligeiramente superior ao anterior. A corrente, por sua vez, é amostrada no instante final de duração do pulso de potencial, período



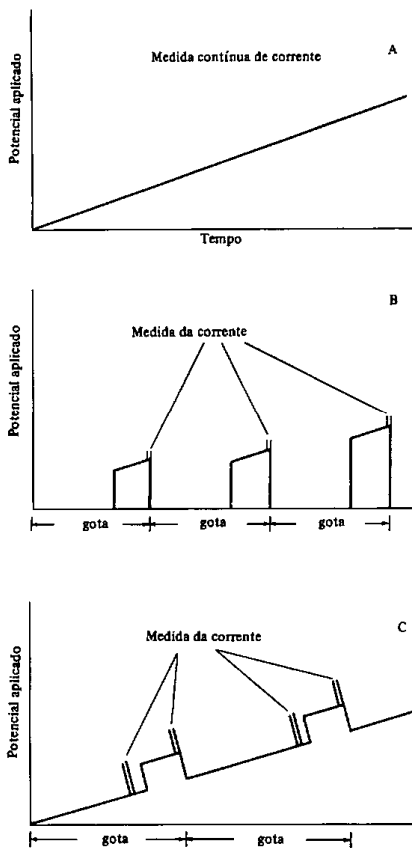


Fig. 2 Medida da corrente em relação ao tempo na polarografia de corrente contínua (A); na polarografia de pulso (B) e na polarografia de pulso diferencial (C).

no qual a corrente capacitiva adquire valor praticamente nulo e a corrente residual se compõe quase que exclusivamente de corrente farádica. Por outro lado, a técnica de pulsos não provoca

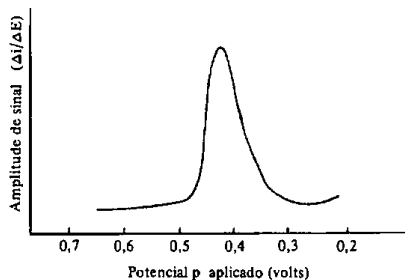


Fig. 3 Pico polarográfico obtido na polarografia de pulso diferencial.

diminuição acelerada da camada de difusão (concentração de espécie eletroativa junto ao eletrodo), propiciando a obtenção de correntes de difusão mais elevadas para concentrações equivalentes. Daí o aumento de sensibilidade inerente à técnica. Outro aspecto favorável da polarografia de pulso é a maior facilidade na medida da corrente limite, isenta de oscilações, ao contrário do que ocorre na polarografia de corrente contínua.

Na polarografia de pulso diferencial, pulsos constantes, de pequena amplitude, são sobrepostos a uma rampa de potencial de tensão linearmente crescente. A medida da corrente é efetuada duas vezes a cada pulso — imediatamente antes da aplicação do pulso e, novamente, em seu instante final — registrando-se apenas a diferença entre os dois valores medidos (Fig. 2). O registro gráfico deste sistema de medida diferencial fornece curva semelhante à derivada da onda polarográfica, mostrando pico característico (Fig. 3). O potencial do pico polarográfico corresponde a  $E_{1/2} - \Delta E/2$ , em que  $\Delta E$  representa a altura do pico. Graças à natureza do polarograma, que apresenta picos em vez de ondas polarográficas tradicionais, a polarografia de pulso diferencial propicia resolução mais elevada, a ponto de permitir doseamentos simultâneos de espécies eletroativas com potenciais de meia onda próximos entre si, em concentrações da ordem de  $10^{-7} M$ .

## V.2.19. DETERMINAÇÃO DO pH

## DETERMINAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DO pH

A determinação potenciométrica do pH é feita pela medida da 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:

$$\text{pH} = \text{pH}_t + (E - E_t)/K,$$

em que

$E$  = potencial medido quando a célula contém a solução problema,

$E_t$  = potencial medido quando a célula contém a solução tampão,

$\text{pH}$  = valor de pH da solução problema,

$\text{pH}_t$  = valor de pH da solução tampão, e

$K$  = variação do potencial por unidade de variação de pH — teoricamente equivale a 0,0591631 + 0,000198 ( $t-25$ ), em que  $t$  corresponde à temperatura na qual se opera.

Os aparelhos comercialmente utilizados para a determinação de pH são instrumentos potenciométricos, providos de amplificadores eletrônicos de corrente com célula de vidro-calomelano. Estes são capazes de reproduzir valores correspondentes a 0,02 de unidades de pH. A escala de pH é calibrada não só em milivolts, mas também em unidades correspondentes de pH. Dessa forma, não há necessidade de se aplicar a equação acima, que traduz a medida eletrométrica de pH. Uma vez que as medidas de atividade hidrogeniônica são sensíveis a variações de temperatura, todos os medidores de pH são equipados com ajuste eletrônico de temperatura.

*Soluções-tampão para calibração do medidor de pH*

São empregadas visando à aferição do aparelho, permitindo linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas. As mais importantes são: tetraoxalato de potássio 0,05 M, biftalato de potássio 0,05 M, fosfato equimolar 0,05 M, tetraborato de sódio 0,01 M e hidróxido de cálcio saturado a 25 °C.

## Valores de pH das soluções-tampão usadas na padronização

Temperatura °C	Tetraoxalato de potássio 0,05 M	Biftalato de potássio 0,05 M	Fosfato equi- molar	Tetraborato de sódio 0,01 M	Hidróxido de cálcio saturado a 25 °C
10	1,67	4,00	6,92	9,33	13,00
15	1,67	4,00	6,90	9,28	12,81
20	1,68	4,00	6,88	9,23	12,63
25	1,68	4,01	6,86	9,18	12,45
30	1,68	4,02	6,85	9,14	12,29
35	1,69	4,02	6,84	9,10	12,13
40	1,69	4,04	6,84	9,07	11,98

São preparadas da seguinte maneira:

**Tetraoxalato de potássio, 0,05 M** — Dissolver 12,61 g de  $\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em água, para perfazer 1000 ml.

**Biftalato de potássio, 0,05 M** — Dissolver 10,12 g de  $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ , previamente dessecado a 100 °C durante 1 hora, em água, para perfazer 1000 ml.

**Fosfato equimolar, 0,05 M** — Dissolver 3,53 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 3,39 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , cada qual dessecado a 120 °C durante 2 horas, em água, para perfazer 1000 ml.

**Tetraborato de sódio, 0,01 M** — Dissolver 3,80 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , em água, para perfazer 1000 ml. Evitar absorção de dióxido de carbono.

**Hidróxido de cálcio, saturado a 25 °C** — Agitar excesso de hidróxido de cálcio com água e decantar a 25 °C antes de usar. Proteger de modo a evitar absorção de dióxido de carbono.

Tais soluções devem ser recém-preparadas com água isenta de dióxido de carbono e empregadas em prazo de três meses, tomando-se cautela para evitar o crescimento de fungos e bactérias. Aceita-se o emprego de conservantes desde que não interfira na medição potenciométrica do pH.

**MODO DE OPERAÇÃO***Aferição do aparelho*

1. Retirar o béquer contendo solução de KCl na qual está mergulhado o eletrodo quando o medidor não está em uso;
2. Lavar o eletrodo com jatos de água destilada e enxugá-lo com papel de filtro;
3. Imergir o eletrodo em solução-tampão de referência, verificando-se a temperatura em que se vai operar;
4. Ajustar o valor de pH até o valor tabelado, mediante o botão de calibração;
5. Lavar o eletrodo com várias porções de um segundo tampão de referência, imergir o eletrodo neste e verificar o valor de pH registrado. Este não deve apresentar variações que superem 0,07 ( $\pm 0,07$ ) do valor tabelado para este segundo padrão. Vale dizer que existem determinados aparelhos que possuem acoplados frascos com detergentes aniônicos, empregados como soluções de lavagem entre cada uma das operações de determinação ou aferição dos valores de pH. A água também se presta a esta função;
6. Se não houver precisão nas medidas, verificar possíveis danos nos eletrodos e trocá-los.

*Determinação do pH da solução-problema*

1. Após aferição conveniente, lavar o eletrodo com água (ou soluções próprias) e com várias porções da solução-problema. Para diluição das

amostras, usar água destilada isenta de dióxido de carbono;

2. A primeira determinação fornece valor variável, havendo necessidade de proceder a novas leituras. Os valores encontrados posteriormente não deverão variar mais do que  $\pm 0,05$  de unidade em três leituras sucessivas;

3. Para determinações que exijam alta precisão, as temperaturas das soluções-tampão e problema, dos eletrodos e das águas de lavagem não devem diferir acima de  $2^\circ\text{C}$  entre si. Assim, para que se reduzam os efeitos de histerese térmica ou elétrica dos eletrodos, as soluções devem estar à mesma temperatura por, no mínimo, 30 minutos antes do início da operação;

4. É importante que, após a utilização do aparelho, se conserve o eletrodo em solução apropriada, normalmente de KCl.

**DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DO pH**

Baseia-se no emprego de soluções indicadoras ou de papéis indicadores, que têm a propriedade de mudar de coloração conforme a variação do pH. Neste caso trata-se de medida aproximada, indicando, apenas, uma faixa de valores, mais ou menos larga, conforme o indicador empregado. A determinação é levada a efeito adicionando-se gotas da solução indicadora à solução em exame ou umedecendo-se com esta solução papéis indicadores e observando-se a mudança de coloração. As cores desenvolvidas pelos indicadores em diversas faixas de pH constam do anexo XII.1.

## V.2.20. DETERMINAÇÃO DE ÁGUA

Diversas substâncias farmacopéicas encontram-se na forma hidratada ou contêm água absorvida, tornando relevante o estabelecimento de teores-limite e sua determinação em ensaio de especificação. Três métodos são descritos — volumétrico, destilação azeotrópica e gravimétrico —, sendo recomendada para cada substância a adoção do método especificado na respectiva monografia.

## V.2.20.1. MÉTODO VOLUMÉTRICO

Baseia-se na reação quantitativa entre água e solução anidra de iodo e dióxido de enxofre dissolvidos em piridina e metanol. A amostra pode tanto ser titulada diretamente (método direto) quanto por retorno (método indireto). No último caso, incorpora-se excesso de reagente à amostra e, após aguardar-se o tempo necessário à reação quantitativa, titula-se o excesso de reagente com solução padrão de água em metanol. Esta técnica — de uso irrestrito — é especialmente recomendada para substâncias que liberam lentamente seu conteúdo de água.

## APARELHO

Admite-se o emprego de qualquer equipamento que permita a exclusão adequada da umidade atmosférica e a determinação do ponto final da titulação.

Para substâncias incolores, é possível detectar-se o ponto de equivalência pela mudança de cor do reagente, de amarelo-canário para âmbar. Viragem inversa é observada ao se adotar a titulação por retorno. Todavia, é mais freqüente e preciso determinar-se o final da titulação eletrometricamente. Compreende o uso de dispositivo elétrico capaz de gerar diferença de potencial de 200 mV entre dois eletrodos de platina (área e distanciamento da ordem de 5 mm<sup>2</sup> e 2,5 cm, respectivamente) imersos na solução a titular. Ao ser atingido o ponto de equivalência, ligeiro excesso de reagente provoca elevação brusca do fluxo de corrente para 50 a 150  $\mu$ A durante 30 segundos a 30 minutos, dependendo da natureza da amostra (o período é menor quando a substância é solúvel no reagente).

*Reagente de Karl Fischer*

Adicionar 125 g de iodo à mistura de 670 ml de metanol e 170 ml de piridina e resfriar. Transferir 100 ml de piridina para proveta de 250 ml e, mantendo a piridina fria em banho de gelo, passar corrente de dióxido de enxofre através do solvente até que seu volume atinja 200 ml. Juntar, lentamente e sob agitação, esta solução à mistura de iodo fria previamente preparada. Misturar até dissolução do iodo e aguardar 24 horas antes de padronizar. Quando recém-preparada, a solução reagente neutraliza cerca de 5 mg de água/ml, mas deteriora-se com rapidez. Daí a conveniência de sua padronização até uma hora antes de usar ou diariamente, quando em uso contínuo. Proteger da luz quando em uso. Armazenar o reagente sob refrigeração em frasco âmbar, provido de tampa esmerilhada hermética. Como

opção ao preparo do reagente, pode-se recorrer a soluções reagentes comerciais.

*Padronização do reagente*

Colocar quantidade suficiente de metanol no frasco de titulação para cobrir os eletrodos e adicionar quantidade suficiente de reagente para fornecer a cor característica da viragem ou a indicação de 100-150  $\mu$ A CC no microamperímetro quando da aplicação de 200 mV entre eletrodos.

Na determinação de traços de água (menos de 1%), empregar tartarato de sódio diidratado (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub> · 2H<sub>2</sub>O) — cujo teor de água após secagem a 150 °C durante 3 horas corresponde a 15,66% — como padrão de referência. Rapidamente, juntar 150 a 350 mg de sal, exatamente pesados, ao frasco de titulação e titular até o ponto de equivalência. O título do reagente, em mg de água/ml de reagente, é fornecido pela equação

$$2(18,2/230,08) (P/V)$$

em que

18,2 = peso molecular da água,

230,08 = peso molecular do tartarato de sódio diidratado,

P = massa, em mg, da tomada de ensaio de sal,

V = volume, em ml, de reagente consumido na titulação.

Para a determinação precisa de quantidades significativas de água (mais de 1%), usar água como referência. Rapidamente, transferir 25 a 250 mg de água, exatamente pesados por diferença, para o frasco de titulação e titular até o ponto de equivalência. Calcular o título do reagente, T, em mg de água/ml de reagente, pela fórmula (P/V), em que P é a massa, em mg, da água e V é o volume, em ml, de reagente consumido.

*Padronização de solução padrão de água (método indireto)*

Preparar solução de água em metanol, diluindo 2 ml de água em quantidade suficiente de metanol para completar 1000 ml. Padronizar esta solução titulando alíquota de 25 ml com reagente previamente padronizado conforme o procedimento acima. Calcular o conteúdo de água, em mg/ml de solução, pela fórmula

$$(V' \times T)/25$$

em que

V' = volume, em ml, de reagente consumido,

T = título do reagente, em mg/ml.

## PROCEDIMENTO

Determinar teores de água pelo método direto, salvo quando houver especificação diversa na monografia.

**Método direto.** Salvo quando a monografia especificar de modo diverso, transferir 35 a 40 ml de metanol para frasco de titulação e titular com o reagente padronizado até viragem visual ou eletrométrica, com o intuito de eliminar a água presente como impureza no metanol (desconsiderar o volume consumido, pois ele não entra nos cálculos). Rapidamente, adicionar ao frasco quantidade exatamente pesada de amostra, tal que contenha 10 a 250 mg de água (ou a quantidade especificada na monografia), misturar e titular até viragem visual ou eletrométrica. Calcular o conteúdo de água, em ml, na tomada de ensaio pela fórmula ( $V \times T$ ) em que  $V$  é o volume, em ml, de reagente consumido e  $T$  é o título do reagente.

**Método indireto (por retorno).** Quando a monografia assim o especificar, transferir 35 a 40 ml de metanol ao frasco de titulação e titular com o reagente padronizado até viragem visual ou eletrométrica, com o intuito de eliminar a água presente como impureza no metanol (desconsiderar o volume consumido, pois ele não

entra nos cálculos). Rapidamente, adicionar ao frasco quantidade exatamente pesada de amostra tal que contenha 10 a 250 mg de água; misturar e juntar volume exatamente medido de reagente, sendo este volume superior ao necessário para a neutralização da água presente na tomada de ensaio. Deixar em repouso pelo tempo necessário para que a reação se complete e titular o excesso de reagente com solução-padrão de água, até viragem visual ou eletrométrica. Calcular o conteúdo, em mg, de água na tomada de ensaio pela fórmula

$$T [V' - (V \times R)]$$

em que

$T$  = título do reagente,

$V'$  = volume, em ml, do reagente adicionado em excesso após a incorporação da tomada de ensaio,

$V$  = volume, em ml, de solução-padrão de água necessário à neutralização do excesso de reagente,

$R$  = volume, em ml, de reagente por ml de solução-padrão de água, determinado na padronização desta última.

Caso a monografia especifique, calcular o teor de água em porcentagem.

## V.2.20.2. MÉTODO DA DESTILAÇÃO AZEOTRÓPICA

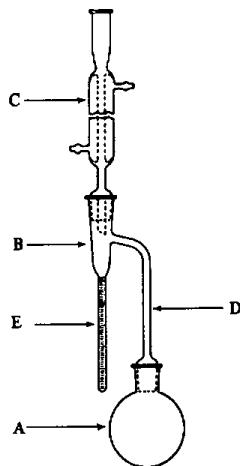
À semelhança do método volumétrico, o azeotrópico permite a determinação de água contida em amostras de natureza múltipla. A água presente é destilada com tolueno – solvente com o qual é praticamente imiscível – e separada em tubo receptor apropriado após resfriamento. Convém, contudo, empregar tolueno previamente saturado com água para evitar resultados baixos devido à dissolução de água residual no solvente anidro.

## APARELHO

Empregar o aparelho proposto por Dean e Stark (Figura). Compreende balão de fundo redondo A, com 500 ml de capacidade, conectado pelo tubo cilíndrico D ao tubo receptor B. Este tem capacidade para 5 ml, é graduado com subdivisões de 0,1 ml, assegurando erro de leitura não superior a 0,05 ml e pode, opcionalmente, ser provido de torneira. A parte superior do tubo D liga-se – sempre por meio de juntas esmerilhadas – ao condensador de refluxo vertical C. Partes do balão e do tubo D podem ser guarnecidas com tecido de amianto para maior isolamento térmico. O calor para a destilação deve preferivelmente ser fornecido por aquecedor elétrico dotado de controle por reostato ou banho de óleo.

## PROCEDIMENTO

Limpar o tubo receptor e condensador com mistura sulfocrômica, enxaguar com água e secar em estufa. Introduzir no balão seco 200 ml de tolueno e cerca de 2 ml de água e destilar durante 2 horas. Resfriar e, após cerca de meia hora, medir o volume de água acumulado no tubo graduado. Adicionar ao balão quantidade de amostra tal que contenha 2 a 3 ml de água. Apresentando a substância natureza pastosa, embrulhá-la em folha de alumínio fazendo pacote de dimensão apropriada à sua passagem pelo gargalo do frasco. Se a substância induzir borbulhamento, juntar areia lavada e seca em quantidade suficiente para cobrir o fundo do frasco (opcionalmente, juntar alguns cacos de material cerâmico poroso ou tubos capilares de vidro, do tipo empregado para determinação de ponto de fusão, vedados em uma das extremidades por fusão) com o intuito de regularizar a ebulição.



Aparelho para determinação de água pelo método azeotrópico.

dos em uma das extremidades por fusão) com o intuito de regularizar a ebulição.

Aquecer moderadamente o frasco contendo tolueno e amostra durante 15 minutos e, quando o tolueno começar a destilar, regular o aquecimento para que destilem 2 gotas por segundo. Destilada praticamente toda a água, acelerar a velocidade de destilação para 4 gotas por segundo. Concluída a destilação da água, verter cerca de 10 a 15 ml de tolueno pela boca do condensador de refluxo e prosseguir a destilação durante 5 minutos adicionais. Remover, então, a fonte de calor, aguardar o resfriamento do tubo receptor à temperatura ambiente e deslocar eventuais gotículas de água retidas na parede do tubo receptor com o auxílio de arame de cobre com extremidade envolta em borracha (latex). Uma vez concluída a separação das fases, ler o volume de água no tubo receptor (descontando o volume inicial) e calcular a porcentagem de água na tomada de ensaio.

**V.2.20.3. MÉTODO GRAVIMÉTRICO**

Para substâncias químicas, adotar as especificações da monografia, seguindo o procedimento descrito em V.2.9. Drogas vegetais devem ser preparadas e ensaiadas conforme as instruções em V.4.2.3. Para substâncias biológicas, por sua vez, proceder conforme indicado na monografia.



## V.2.21. ANÁLISE DE SOLUBILIDADE POR FASES

A solubilidade de substância pura em dado solvente, à temperatura constante, é parâmetro característico da substância, podendo, pois, servir para fins de identificação e avaliação de grau de pureza. Neste princípio, baseia-se a análise de solubilidade por fases. O procedimento consiste na adição de porções crescentes de amostra a volumes constantes de solvente no qual a substância analisada mostra apenas ligeira solubilidade, visando à obtenção de solução saturada desta substância. Uma vez promovido o equilíbrio do sistema — por agitação prolongada, sob temperatura constante — determina-se o conteúdo total de soluto na solução sobrenadante (geralmente por técnica gravimétrica) e traça-se o diagrama de solubilidade por fases, plotando a composição da solução, em mg de soluto por g de solvente (ordenadas), pela composição do sistema, em mg de amostra adicionada por g de solvente (abscissas).

A Fig. 1 ilustra diagrama deste tipo. Ao longo do segmento AB, a totalidade do sólido dissolve e é encontrada na solução (inclinação corresponde à unidade). No ponto B a amostra satura a solução e adições subsequentes não acarretam aumento em sua concentração. A inclinação do segmento de reta BC é, portanto, nula e a intersecção do prolongamento desta reta com o eixo dos Y fornece o valor da solubilidade da substância.

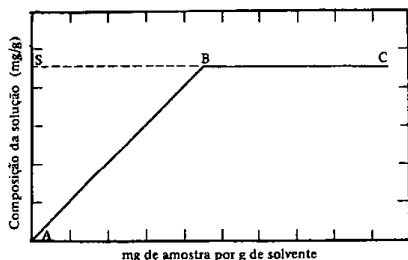


Fig. 1 Diagrama de solubilidade por fases de amostra constituída por uma só substância.

Se a amostra for constituída de duas substâncias (uma delas impureza da outra, por exemplo), o diagrama assume a forma ilustrada na Fig. 2. O segmento AB apresenta inclinação unitária; o ponto B indica saturação da solução com relação a um dos componentes da amostra (geralmente aquele que está presente em maior proporção); o segmento BC indica a solubilização do segundo componente e o segmento CD a saturação da solução com este último (inclinação nula).

O valor da inclinação do segmento BC — fase em que somente o segundo componente é solubilizado — corresponde à proporção deste compo-

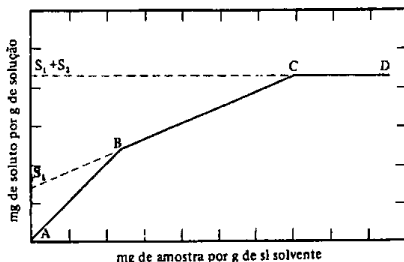


Fig. 2 Diagrama de solubilidade por fases de amostra contendo duas substâncias.

nente na amostra. A subtração deste valor da unidade fornece o conteúdo do primeiro componente na amostra, permitindo o emprego da fórmula (1-I) 100 para a obtenção do teor. A inclinação,  $I$ , é obtida pela fórmula  $(Y_2 - Y_1) / (X_2 - X_1)$ , em que  $Y_1$ ,  $Y_2$  e  $X_1$ ,  $X_2$  correspondem, respectivamente, a projeções de pontos do segmento de reta BC sobre a ordenada (composição da solução) e a abscissa (composição do sistema). A extrapolação do segmento BC fornece o limite de solubilidade,  $S_1$ , em mg de soluto por g de solvente, do primeiro componente, enquanto o prolongamento da reta do segmento CD até o eixo dos Y leva à soma das solubilidades dos dois componentes,  $S_1 + S_2$ .

A ocorrência de desvios pronunciados nos pontos que constituem os segmentos de reta do diagrama indica falta de equilíbrio no sistema, embora estes também possam ser atribuídos à existência de solução sólida ou a desvios do comportamento teórico. Se necessário, a inclinação  $I$  pode ser calculada por aproximação gráfica ou a partir do método estatístico dos mínimos quadrados.

Uma peculiaridade da análise de solubilidade por fases é não ser técnica aplicável a misturas cujos componentes estão presentes na amostra na proporção de suas solubilidades. Neste caso particular, ambos os componentes promovem saturação no mesmo ponto, fornecendo, como resultado, diagrama de fases equivalente ao de substância pura.

#### ESCOLHA DE SOLVENTE

A escolha de solvente para análise de solubilidade por fases é baseada na solubilidade do componente presente em maior proporção na amostra e no método de doseamento adotado para a determinação da concentração da solução formada. Sendo mais usual a técnica gravimétrica, convém

ao solvente apresentar volatilidade suficiente para permitir sua evaporação a vácuo, mas insuficiente para dificultar operações de transferência e pesagem. Recomendam-se solventes com ponto de ebulição entre 60 e 150 °C. Em termos de solubilidade, é conveniente que o solvente apresente capacidade de solubilização de amostra em proporção não inferior a 4 mg/g nem superior a 50 mg/g. A solubilidade ótima compreende a faixa de 10 a 20 mg.

Recomendações adicionais incluem a inércia do solvente frente aos componentes da amostra (prevendo-se, inclusive, a possibilidade de formação de solvatos ou sais) e o emprego de solvente de pureza e concentração conhecida (traços de impurezas afetam intensamente a solubilidade), admitindo-se, contudo, o emprego de misturas.

#### APARELHAGEM

Compreende banho-maria termostatizado, frascos e ampolas apropriadas e balança analítica, com precisão de  $\pm 10 \mu\text{g}$ .

O banho d'água é provido de termostato com tolerância de controle de temperatura não superior a 0,1 °C, especialmente na faixa de 25-30 °C, usual para os ensaios. O banho é equipado com haste horizontal rotativa (25 rpm) provida de garras fixadoras para as ampolas. Como alternativa, pode ser usado vibrador (100 a 120 vibrações/segundo) igualmente provido de garras fixadoras de ampolas.

A ampola — com capacidade para 15 ml —, ao lado do chamado frasco de solubilidade também

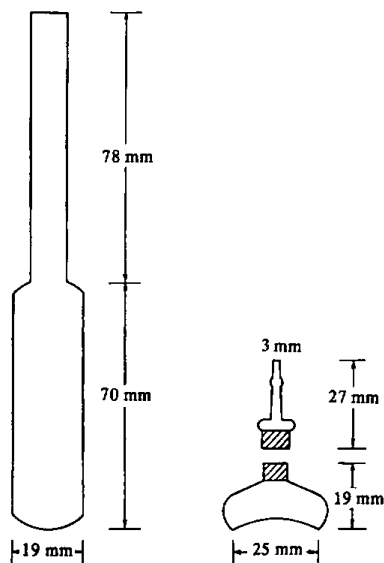


Fig. 3 Ampola utilizada na análise de solubilidade por fases.

empregado nos ensaios, está ilustrada na Fig. 3. Recipientes de especificação diferente são admissíveis desde que herméticos e apropriados à técnica descrita.

#### PROCEDIMENTO

##### Composição do sistema

Pesar com exatidão um mínimo de 7 ampolas de 15 ml rigorosamente limpas. Transferir quantidades crescentes exatamente pesadas de amostra para cada ampola, de modo que a primeira contenha quantidade apenas ligeiramente menor que a solubilizável em 5 ml de solvente e a última contenha ligeiro excesso de amostra. Após transferir 5,0 ml de solvente para cada ampola, resfriá-las em mistura de gelo seco e acetona e selá-las com maçarico ar/gás, tomando a precaução de guardar fragmentos de vidro resultantes do processo.

Permitir às ampolas atingir a temperatura ambiente e pesá-las, juntamente com seus respectivos fragmentos de vidro. Calcular a composição do sistema, em mg/g, para cada ampola, pela fórmula:  $1000(M_2 - M_1)/(M_3 - M_2)$ , em que  $M_2$  corresponde à massa da ampola contendo amostra;  $M_1$  é a massa da ampola vazia e  $M_3$  é a massa da ampola contendo amostra, solvente e eventuais fragmentos de vidro.

##### Equilíbrio

O período necessário ao estabelecimento de equilíbrio nos sistemas contidos nas ampolas é variável de acordo com a natureza da amostra, método de agitação (rotação ou vibração) e temperatura. A experiência indica prazo médio de 1 a 7 dias para agitação por vibração e 7 a 14 dias para o processo rotacional. Para confirmar a promoção de equilíbrio, aquecer a penúltima ampola da série a 40 °C com o intuito de obter supersaturação. O resultado é positivo se o ponto correspondente a esta ampola for coerente com os demais no diagrama de fases. Todavia, resultado diverso não significa necessariamente não ter sido atingido o equilíbrio. Há substâncias com tendência a permanecer em solução supersaturada e, sendo este o caso, cabe a execução de série de análises, variando-se o período de espera com o fim de assegurar a coerência dos pontos da curva de solubilidade.

##### Composição da solução

Atingido o equilíbrio, colocar as ampolas em suporte apropriado para que permaneçam em posição vertical, com os gargalos acima do nível da água do banho termostatizado. Aguardar a decantação dos sólidos nas ampolas, abri-las e coletar 2,0 ml de cada uma por meio de pipeta provida de chumaço de algodão ou de outro material capaz de atuar como filtro. Remover o material filtrante da pipeta e transferir o líquido

límpido para frasco de solubilidade (Fig. 3) tarado e devidamente identificado, pesando cada frasco após a operação. Esfriar os frascos em banho de gelo seco e acetona e, em seguida, evaporar o solvente sob pressão reduzida. Aumentar gradativamente a temperatura de evaporação, tomando a precaução de não exceder o limite compatível com a estabilidade da amostra e dessecar o resíduo até peso constante. Calcular a composição da solução em cada frasco, em mg/g, pela fórmula  $1000(P_3 - P_1)/(P_2 - P_3)$ , em que  $P_3$  corresponde à massa do frasco contendo o resíduo da evaporação;  $P_1$  é a massa do frasco de solubilidade vazio (tara) e  $P_2$  é a massa do frasco contendo a solução.

Traçar diagrama de fases com base nos valores obtidos e determinar a pureza porcentual da amostra em função da inclinação do segmento de reta.

*Aplicação da análise de solubilidade por fases na purificação de substâncias*

Enquanto as soluções obtidas no processo analítico descrito contêm essencialmente todas as impurezas presentes na amostra em proporção

aumentada em relação à amostra original, prestado-se — após evaporação do solvente — à determinação qualitativa das impurezas, a fase é adequada, pela elevada pureza, ao preparo de padrões de referência para outros ensaios analíticos.

**PROCEDIMENTO**

Pesar quantidade apropriada de amostra e suspendê-la em solvente adequado de modo a — alcançado o equilíbrio — dissolver somente 10% do material. Fechar o frasco e aguardar estabelecimento do equilíbrio à temperatura ambiente (em geral, 24 horas são suficientes). Em seguida, recolher a solução sobrenadante límpida e evaporar, à temperatura ambiente ou próxima desta, até secura. Pelo fato de a solução conter as impurezas da amostra original, obtém-se, por este procedimento, material em que a proporção de impurezas encontra-se aumentada, sendo a relação de enriquecimento aproximadamente igual à razão da massa da amostra pela massa de sólidos dissolvidos no volume de solvente empregado. Purificar o resíduo não dissolvido por lavagem e secagem (padrão de referência).

## V.2.22. ELETROFORESE

Eletroforese consiste em técnica de separação quantitativa para componentes de mistura de várias espécies iônicas. Num campo elétrico unidirecional, cada íon migra isoladamente, independente dos outros íons, em direção ao pólo de sinal de carga oposto ao seu, conservando sua estrutura e suas propriedades. A mobilidade eletroforética é função da carga elétrica do íon, do gradiente de tensão do campo e da viscosidade do meio.

A separação processa-se em suporte embebido em líquido tamponado de pH constante ou de gradiente de pH, que se coloca dentro de cuba adequada. Os suportes recomendados são: papel de filtro, acetato de celulose, gel de ágar ou de agarose, gel de amido, gel de poliácridamida, camadas porosas de vidro em pó, areia, amido, cloreto de polivinila, celulose ou sílica-gel.

A aparelhagem consiste geralmente em cuba fechada dentro da qual se coloca suporte com o material a analisar entre dois compartimentos eletródicos contendo tampão. Este recipiente costuma ser retangular, com dimensões de acordo com o número máximo de análises simultâneas a executar. Aplicam-se tensões de corrente contínua de 100 a 300 volts, para íons grandes, e de 1000 a 10.000 volts para íons menores; as correntes usadas não ultrapassam 20 mA. A temperatura deve ser mantida constante, se necessário por resfriamento.

Após a separação eletroforética, os componentes

separados são identificados por métodos adequados. A sensibilidade, que normalmente permite detectar microgramas de substâncias, pode ser aumentada por técnicas imunológicas. Todas as substâncias ionizáveis podem ser analisadas por eletroforese; para as não-polares indica-se a análise cromatográfica.

A eletroforese serve para:

- caracterizar uma substância pela comparação de sua mobilidade com aquela de um padrão;
- verificar a pureza de um produto pela ausência de contaminantes iônicos de cargas diferentes e
- determinar as concentrações relativas dos componentes iônicos de uma mistura.

A versatilidade da eletroforese permite escolher técnicas apropriadas para cada caso dentro de grande variedade de condições, conforme se observa nas tabelas seguintes. O gradiente de voltagem é indicado em kilovolt por metro - kV/m -, onde o numerador representa a tensão entre os eletrodos e o denominador a distância entre eles. Assim, uma tensão de 200 V, por exemplo, entre eletrodos distantes de 10 cm terá gradiente de 2 kV/m. O suporte usado nestes exemplos seguintes é o papel de filtro. As mobilidades relativas foram calculadas em relação à mobilidade de íon mais lento (mobilidade = 1).

Tabela I - Quadro geral

Tampão	pH	Material	kV/m	Revelador
A	3,6	cátions inorgânicos	6	ácido violúrico
		aminas	5	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
		ácidos orgânicos	8	nitrato de cério amoniacal
		nucleotídeos	3	difenilcarbazida
		peptídeos e aminoácidos	5	ninidrina
		esteróides hidrossolúveis	2	dinitrofenilhidrazina
A	3,6	vitaminas hidrossolúveis	4	específico para cada vitamina
B	4,9	fosfatídeos	2	molibdato de amônio
C	9,0	proteínas	1	negro de amido
		pigmentos biliares	8	ácido fosfórico
D	9,0	ânions inorgânicos	6	quinidina
		purinas	3	difenilcarbazida
		alcalóides	3	Dragendorff
		monossacarídeos	4	oxalato de anilina
		polissacarídeos	1	vanilina
		corantes hidrossolúveis	5	cores próprias

Tabela 2 – Preparo dos tampões

Tampão	A	B	C	D
pH	3,6	4,9	9,0	9,0
piridina (ml)	10	100	—	—
ácido acético glacial (ml)	100	100	—	—
acetato de sódio anidro (g)	—	4,1	—	—
borato de sódio (g)	—	—	—	6,4
barbital sódico (g)	—	—	8,24	—
metanol (ml) q.s.p.	—	1.000	—	—
água destilada (ml) q.s.p	1.000	—	1.000	1.000

Tabela 3 – Cátions inorgânicos Tampão A

Mobilidades relativas									
As <sup>+++</sup>	1	Pb <sup>++</sup>	11	Cd <sup>++</sup>	28	Zn <sup>++</sup>	43	Mn <sup>++</sup>	55
Ag <sup>+</sup>	5	Cu <sup>++</sup>	19	Pd <sup>++</sup>	36	Ni <sup>++</sup>	45	Mg <sup>++</sup>	57
Fe <sup>+++</sup>	10	Ca <sup>++</sup>	23	Al <sup>+++</sup>	39	Co <sup>++</sup>	54	Fe <sup>++</sup>	62

Tabela 4 – Aminas Tampão A

glicina	1,0	gramina	6,8	fenetilamina	10,2	etilamina	18,0
mescalina	6,0	ornitina	7,0	histamina	14,5	dimetilamina	20,2
arginina	6,2	tiramina	7,2	propilamina	15,2	metilamina	23,0
histidina	6,5	afedrina	8,0	cadaverina	16,0	amônia	25,0
lisina	6,5	creatina	9,2	putrescina	16,8		

Tabela 5 – Ácidos orgânicos Tampão A

δ-aminolevulinato	1,0	oxalato	10,6	levulinato	15,5
hidroxibutirato	7,8	lactato	12,9	maleato	19,0
glutarato	8,2	malato	14,7	citrato	20,0
succinato	9,4	galacturonato	14,7	tartarato	21,7

Tabela 6 Nucleotídeos Tampão A

ácido citidílico (C)	1,0	AA	4,4	AU	7,1	ACC	3,4	ACU	7,1
ácido adenílico (A)	2,9	GC	5,3	GG	9,1	AAC	4,7	AAG	8,1
ácido guanílico (G)	5,9	CU	5,6	GU	9,4	GCC	5,5	AGG	10,2
ácido uridílico (U)	6,2	AG	6,8	UU	9,6	ACG	6,8	AUU	10,7

Tabela 7 – Aminoácidos Tampão A

ácido aspártico	1,0	prolina	5,1	serina	5,7	alanina	6,6
ácido glutâmico	2,8	metionina	5,3	citrulina	5,7	glicina	7,0
taurina	4,1	glutamina	5,3	leucina	5,9	arginina	17,6
hidroxiprolina	4,6	tirosina	5,5	isoleucina	5,9	histidina	18,0
cistina	4,8	fenilalanina	5,5	treonina	5,9	lisina	18,0
asparagina	5,0	triptofano	5,7	valina	6,2	ornitina	18,1
						histamina	20,8

Tabela 8 – Esteróides (fenilidrazonas) Tampão D

estrone	1,0	desoxicortona	1,6
testosterona	1,4	androsterona	1,7
metiltestosterona	1,5	progesterona	1,9

Tabela 9 - Vitaminas Tampão A

fosfato de piridoxal	1,0	ácido nicotínico	9,8
difosfato de tiamina	6,6	monofosfato de tiamina	10,3
ácido ascórbico	7,1	nicotinamida	19,9
fosfato de piridoxamina	8,1	piridoxina	22,6
riboflavina	8,9	tiamina	23,7

Tabela 10 - Proteínas humanas Tampão C

gama-globulina	1,0	2-alfa-globulina	2,2	albumina	3,5
beta-globulina	1,7	1-alfa-globulina	2,7		

Tabela 11 - Ânions inorgânicos Tampão D

periodato	1,0	ortofosfato	5,4	sulfito	6,4	iodeto	7,4
borato	3,0	metavanadato	5,5	ferricianeto	6,6	brometo	7,6
telurato	3,5	molibdato	5,6	clorato	6,9	nitrito	7,6
telurito	4,4	tiocianato	5,8	sulfato	7,1	nitrato	7,6
iodato	4,6	fluoreto	6,1	persulfato	7,3	ferrocianeto	7,7
metafosfato	5,1	bromato	6,1	cloreto	7,3	tiosulfato	7,8

Tabela 12 - Alcalóides Tampão D

papaverina	1,0	cinchonina	4,4	nicotina	6,7
colchicina	1,6	pilocarpina	4,7	cocaína	6,7
ioimbina	2,9	heroína	4,8	mescalina	8,1
estricnina	2,9	morfina	5,0	homotropina	8,1
brucina	3,6	escopolamina	5,4	atropina	8,2
quinina	4,0	tubocurarina	5,6	efedrina	9,3

Tabela 13 - Sacarídeos Tampão D

sacarose	1,0	D-ribose	4,7	D-galactose	5,8
maltose	1,9	D-sorbitol	5,2	L-sorbose	6,1
lactose	2,3	D-frutose	5,6	D-glicose	6,2
glicerol	3,1	L-arabinose	5,7	D-xilose	6,3
D-manose	4,3	D-mentol	5,7		

Tabela 14 -- Preparo de reveladores

**Ácido violúrico**

Contém 1,75 g de ácido violúrico ( $C_4H_3N_3O_4 \cdot H_2O$ ) em água a 100,0 ml.

**p-Dimetilaminobenzaldeído**

Contém 1,0 g de p-dimetilaminobenzaldeído ( $C_9H_{11}NO$ ) em 90,0 ml de acetona e 10,0 ml de ácido clorídrico.

**Nitrato de cério-amoniacal**

Contém 2,0 g de nitrato de cério-amoniacal ( $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ ) em ácido nítrico 1 M a 100,0 ml.

**Difenilcarbazida**

Borrifar com solução 0,2 g por cento (p/V) de sulfato cúprico ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) e secar a 100 °C. Expor durante 5 minutos a vapores de amoníaco e tratar em seguida com solução 0,1 g por cento (p/V) de difenilcarbazida em etanol.

**Ninidrina**

Dissolver 0,4 g de ninidrina e 0,2 g de cloreto cobaltoso ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ) em isopropanol a 100,0 ml.

**Dinitrofenilidrazina**

Misturar 0,3 g de 2,4-dinitrofenilidrazina e 0,3 ml de ácido clorídrico em metanol a 100,0 ml.

**Molibdato de amônio**

Dissolver 0,685 g de molibdato de sódio ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ) e 0,040 g de sulfato de hidrazina em 10 ml de água. Juntar 10 ml de ácido sulfúrico e completar com água a 100,0 ml.

**Negro de amido**

Dissolver 0,5 g de negro de amido ( $C_{22}H_{14}N_6O_9S_2Na_2$ ) em 48 ml de metanol. Juntar 5 ml de ácido acético glacial e completar com água a 100 ml.

**Ácido fosfórico**

Ácido ortofosfórico a 15,0 por cento (V/V).

**Quinidina**

Dissolver 0,3 g de quinidina ( $C_{20}H_{24}N_2O_2$ ) em clorofórmio a 100,0 ml.

**Dragendorff**

Dissolver 1,7 g de nitrato básico de bismuto e 20 g de ácido tartárico em 80 ml de água. Antes do uso, misturar 4 ml desta solução com 2 ml de solução de iodeto de potássio a 4,0 por cento (p/V). Juntar 12 g de ácido tartárico e 60 ml de água.

**Oxalato de anilina**

Dissolver 1,3 g de ácido oxálico ( $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$ ) e 0,9 ml de anilina em água a 100,0 ml.

**Vanilina**

Misturar antes do uso a solução etanólica de vanilina ( $C_8H_8O_3$ ) a 1,0 por cento (p/V) com volume igual de ácido perclórico a 3,0 por cento (p/V).

## V.3. MÉTODOS QUÍMICOS

### V.3.1. REAÇÕES DE IDENTIFICAÇÃO

#### V.3.1.1. ÍONS, GRUPOS E FUNÇÕES

Os métodos clássicos de identificação de funções ou determinados grupos químicos presentes em fármacos consistem em reações que resultam em formação de precipitado, produto colorido, desprendimento de gás, descoloramento do reagente usado ou outro fenômeno qualquer facilmente perceptível. Estes ensaios não são aplicáveis a misturas de fármacos.

##### *Acetato*

1) Aquecer a amostra com quantidade igual de ácido oxálico; desprendem-se vapores ácidos com odor característico de ácido acético.

2) Aquecer a amostra com ácido sulfúrico SR e etanol; desprende-se acetato de etila, de odor característico.

3) Tratar solução neutra da amostra com cloreto férrico SR; produz-se cor vermelho-escura, que desaparece pela adição de ácidos minerais.

4) Dissolver a amostra em água, adicionar 5 gotas de nitrato de lantânio SR, 2 gotas de iodo 0,1 M e 1 gota de hidróxido de amônio SR. Aquecer cuidadosamente até ebulição. Após alguns minutos forma-se precipitado azul ou aparece coloração azul intensa.

##### *Acetila*

Colocar a amostra em tubo de ensaio e juntar 3 gotas de ácido fosfórico SR. Fechar o tubo com tampa atravessada por outro tubo de ensaio menor cheio de água e em cujo exterior se depositou uma gota de nitrato de lantânio SR. Aquecer o conjunto em banho-maria durante cinco minutos (certas substâncias acetiladas se hidrolisam com dificuldade; neste caso a mistura deve ser aquecida lentamente, até ebulição, sobre chama direta). Transferir a gota de nitrato de lantânio SR a uma cápsula de porcelana e misturar com uma gota de iodo SR. Colocar na borda da mistura uma gota de hidróxido de amônio 2 M. Na zona de contato dos dois líquidos aparece lentamente cor azul que persiste por pouco tempo.

##### *Alcalóide*

Dissolver alguns miligramas da amostra em 5 ml de água, juntar ácido clorídrico SR até acidificar a solução e, em seguida, verter 1 ml de iodobismutato de potássio SR; forma-se imediatamente precipitado alaranjado ou vermelho-alaranjado.

##### *Alumínio, íon*

1) Juntar a amostra a hidróxido de amônio 6 M; forma-se precipitado branco gelatinoso, insolúvel em excesso do mesmo reagente.

2) Adicionar a amostra a hidróxido de sódio M ou sulfeto de sódio SR; forma-se precipitado branco gelatinoso, solúvel em excesso do mesmo reagente.

3) À solução da amostra juntar hidróxido de amônio 5 M até que se forme turvação. Adicionar, em seguida, 3 a 4 gotas da solução recém-preparada de quinalizarina 0,05% em hidróxido de sódio 1%. Aquecer até ebulição, resfriar e acidificar com excesso de ácido acético 5 M; produz-se cor violeta-avermelhado.

##### *Amina aromática primária*

Acidificar a solução da amostra com ácido clorídrico 2 M e juntar 4 gotas de nitrito de sódio SR. Após 1 a 2 minutos, acrescentar 1 ml de beta-naftol SR; aparece cor alaranjada intensa ou vermelha, formando-se geralmente precipitado.

##### *Amônia e amina alifática volátil*

Dissolver a amostra em tubo de ensaio, acrescentar óxido de magnésio e aquecer se necessário; desprendem-se paulatinamente vapores alcalinos, que escurecem o papel de prata-manganês colocado na parte superior do tubo.

##### *Amônio, íon*

Juntar à amostra excesso de hidróxido de sódio M a frio; ocorre desprendimento de amônia, de odor característico, e que muda para azul a



cor vermelha do papel de tornassol. A decomposição é acelerada pelo aquecimento.

#### *Antimônio(III), íon*

1) Tratar a solução da amostra, fortemente acidificada por ácido clorídrico (no máximo 2 M), com sulfeto de hidrogênio SR; forma-se precipitado alaranjado de sulfeto de antimônio, insolúvel em hidróxido de amônio 6 M, mas solúvel em sulfeto de amônio SR, hidróxido de sódio 2 M e ácido clorídrico concentrado.

2) Dissolver a amostra em solução de tartarato de sódio e potássio SR; após resfriamento, juntar, gota a gota, sulfeto de sódio SR; forma-se precipitado vermelho-alaranjado solúvel em hidróxido de sódio 2 M.

#### *Arsênio*

1) A uma solução amoniacal da amostra adicionar sulfeto de sódio SR e acidificar com ácido clorídrico diluído; forma-se precipitado amarelo, insolúvel em ácido clorídrico, mas solúvel em soluções alcalinas.

2) Aquecer 5 ml da solução da amostra fortemente clorídrica em banho-maria com volume igual de hipofosfito de sódio SR; forma-se precipitado de cor marrom a preta. Caso se tratar de As(V), a redução é mais lenta; o acréscimo de iodeto de potássio SR exercerá efeito catalítico.

#### *Barbitúrico sem substituinte no nitrogênio*

A uma solução metanólica da amostra juntar algumas gotas de solução contendo nitrato de cobalto SR e cloreto de cálcio SR, misturar e acrescentar, com agitação, algumas gotas de hidróxido de sódio 2 M; forma-se precipitado azul-violeta.

#### *Bário, íon*

1) Tratar solução da amostra com ácido sulfúrico M; forma-se precipitado branco, insolúvel nos ácidos clorídrico e nítrico.

2) Colocar a amostra na zona redutora de chama; esta adquire cor verde-amarela, que se apresenta azul quando vista através de vidro verde.

#### *Benzoato*

1) Tratar solução neutra da amostra com cloreto férrico SR; forma-se precipitado amarelo escuro, solúvel em éter etílico.

2) Acidular solução moderadamente concentrada da amostra com ácido sulfúrico M; forma-se precipitado de ácido benzóico, facilmente solúvel em éter etílico.

#### *Bicarbonato*

1) Tratar a amostra com ácido mineral; produz-se efervescência com desprendimento de gás incolor que, ao reagir com solução de hidróxido de cálcio SR, forma imediatamente precipitado branco.

2) A uma solução fria da amostra juntar fenoltaleína SI; a solução permanece inalterada ou fica apenas levemente colorida.

#### *Bismuto, íon*

Dissolver a amostra em ligeiro excesso de ácidos nítrico ou clorídrico e diluir com água; forma-se precipitado branco que, tratado com sulfeto de hidrogênio, passa a marrom; o composto resultante é solúvel em mistura quente de partes iguais de ácido nítrico e água, mas insolúvel em sulfeto de amônio SR.

#### *Bissulfito*

Tratar a amostra com ácido clorídrico 3 M; desprende-se dióxido de enxofre, reconhecido por seu odor pungente característico e por escurecer papel de filtro umedecido com nitrato de mercúrio(I) SR.

#### *Borato*

1) A uma solução da amostra acidulada com ácido clorídrico, juntar algumas gotas de solução de iodo 0,1% (p/V) e de solução de álcool polivinílico 2% (p/V); produz-se cor verde intensa. A reação é alterada por agentes de oxidação ou redução.

2) Tratar a amostra com ácido sulfúrico, acrescentar metanol e levar a mistura à ignição; ela queima com chama de bordos verdes.

#### *Brometo*

1) À solução da amostra acidificada com ácido sulfúrico SR, juntar água de cloro SR; desprende-se bromo, que confere cor parda à solução; agitando-se esta com clorofórmio, o solvente adquire cor variando de vermelho a marrom-avermelhado e a camada aquosa permanece incolor.

2) Tratar a solução da amostra com ácido nítrico SR e nitrato de prata SR; forma-se precipitado caseoso branco levemente amarelado, insolúvel em ácido nítrico e pouco solúvel em hidróxido de amônio 6 M.

#### *Cálcio, íon*

1) Umedecer a amostra com ácido clorídrico e levá-la à zona redutora da chama; aparece cor vermelho-alaranjada transitória.

2) Dissolver a amostra, juntar 2 gotas de

vermelho de metila SI, neutralizar com hidróxido de amônio 6 M, acrescentar ácido clorídrico 3 M, gota a gota, até acidular a solução e verter oxalato de amônio SR; forma-se precipitado branco de oxalato de cálcio, insolúvel em ácido acético 6 M, mas solúvel em ácido clorídrico SR.

#### Carbonato

1) Tratar a amostra com ácido mineral; produz-se efervescência, com desprendimento de gás incolor que, ao reagir com hidróxido de cálcio SR, forma imediatamente precipitado branco.

2) A uma solução fria da amostra solúvel juntar fenolftaleína SI; aparece cor vermelha.

#### Chumbo, ion

1) Tratar solução da amostra com ácido sulfúrico M; forma-se precipitado branco, insolúvel em ácido clorídrico 3 M ou ácido nítrico 2 M, mas solúvel em hidróxido de sódio M aquecido, em acetato de amônio SR e em excesso de ácido sulfúrico M.

2) Tratar solução da amostra, isenta de ácidos minerais, com cromato de potássio SR; forma-se precipitado amarelo, insolúvel em ácido acético 6 M, mas solúvel em hidróxido de sódio M e em ácido nítrico, a quente.

#### Cianeto

Tratar solução da amostra com sulfato ferroso SR, hidróxido de sódio SR e cloreto férrico SR, aquecer até ebulição e acidular com ácido clorídrico; produz-se coloração ou precipitado azul. Se a quantidade de cianeto presente for pequena, forma-se solução coloidal de coloração azul-esverdeada.

#### Citrato

A 15 ml de piridina adicionar alguns miligramas da amostra dissolvida ou suspensa em 1 ml de água, agitar, juntar 5 ml de anidrido acético à mistura, agitar novamente; aparece cor vermelha clara.

#### Clorato

1) Tratar solução da amostra com nitrato de prata SR em meio de ácido nítrico SR; não se forma precipitado. Verter ácido sulfuroso ou solução recente de nitrito de sódio SR a esta mistura; forma-se precipitado branco, insolúvel em ácido nítrico SR, mas solúvel em hidróxido de amônio 6 M.

2) Submeter a amostra à ignição; forma-se cloreto, identificado por ensaios apropriados.

3) Tratar a amostra seca com ácido sulfúrico; ocorre crepitação desprendendo-se gás amarelo

esverdeado (*para este ensaio usar quantidade pequena de clorato, devendo-se tomar cuidado extremo ao executá-lo, pois o gás que se forma decompõe-se de modo explosivo acima de 45 °C – utilizar capela*).

#### Cloreto

1) Tratar solução da amostra, acidificada com ácido nítrico, com nitrato de prata SR; forma-se precipitado branco caseoso, insolúvel em ácido nítrico, mas solúvel em ligeiro excesso de hidróxido de amônio 6 M.

2) Misturar a amostra seca com igual peso de dióxido de manganês, umedecer com ácido sulfúrico SR e aquecer brandamente; desprende-se cloro, identificado pelo odor e pela produção de cor azul em papel de amido iodetado umedecido.

#### Cobre(II), ion

1) Tratar a solução da amostra com ferrocianeto de potássio SR; forma-se precipitado marrom-avermelhado, insolúvel em ácidos diluídos, mas solúvel em hidróxido de amônio.

2) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico e limalhas de ferro metálico; deposita-se película vermelha de cobre metálico.

3) Tratar solução da amostra com excesso de hidróxido de amônio 6 M; forma-se primeiro precipitado azulado e, em seguida, solução fortemente azulada.

#### Éster

Juntar à amostra solução metanólica de cloridrato de hidroxilamina SR e solução de hidróxido de potássio a 10% (p/v) em álcool, aquecer até ebulição, resfriar, acidular com ácido clorídrico SR e juntar solução de cloreto férrico SI; produz-se cor vermelho-azulada ou vermelha.

#### Ferro

Tratar a amostra com sulfeto de amônio SR; forma-se precipitado preto, que se dissolve em ácido clorídrico 3 M, com desprendimento de gás sulfídrico, caracterizado pelo papel acetato de chumbo.

#### Férrico, ion

1) Tratar solução ácida da amostra com ferrocianeto de potássio SR; forma-se precipitado azul escuro, que não dissolve por adição de ácido clorídrico SR, mas é decomposto por hidróxido de sódio 2 M.

2) Tratar a amostra com tiocianato de amônio SR; produz-se cor vermelha intensa que não desaparece com adição de ácidos minerais diluídos,

mas pode ser extraída com éter etílico, passando a coloração vermelha para a camada etérea.

#### *Ferroso, íon*

1) Tratar solução da amostra com ferricianeto de potássio SR; forma-se precipitado azul escuro, insolúvel em ácido clorídrico 3 M, mas decomposto por hidróxido de sódio M.

2) Tratar solução da amostra com hidróxido de sódio M; forma-se precipitado branco-esverdeado, que passa rapidamente a verde e, em seguida, quando agitado, a marrom.

#### *Fosfato (ou ortofosfato)*

1) Tratar solução neutra da amostra com nitrato de prata SR; forma-se precipitado amarelo, solúvel em ácido nítrico 2 M ou hidróxido de amônio 6 M.

2) Tratar solução nítrica da amostra com molibdato de amônio SR; forma-se precipitado amarelo, solúvel em hidróxido de amônio 6 M; a reação é acelerada pelo calor.

#### *Hipofosfito*

1) Aquecer solução da amostra, acidulada por ácido sulfúrico SR, com sulfato cúprico SR; forma-se precipitado vermelho.

2) Tratar solução da amostra com cloreto mercúrico SR; forma-se precipitado branco, que se torna cinzento na presença de excesso de hipofosfito.

#### *Iodeto*

1) Tratar solução da amostra com água de cloro SR, gota a gota; desprende-se iodo, que muda a cor da solução de amarela para vermelha; agitando-se esta solução com clorofórmio, este adquire cor violeta.

2) Tratar solução da amostra acidificada com ácido nítrico SR, com nitrato de prata SR; forma-se precipitado amarelo caseoso, insolúvel em ácido nítrico SR e hidróxido de amônio 6 M.

#### *Lactato*

Tratar solução da amostra, acidulada por ácido sulfúrico SR, com permanganato de potássio SR e aquecer a mistura; desprende-se acetaldeído, identificado pelo odor característico.

#### *Lítio, íon*

1) Tratar a solução da amostra moderadamente concentrada e alcalinizada por hidróxido de sódio

SR, com carbonato de sódio SR; forma-se, por aquecimento, precipitado branco, solúvel em cloreto de amônio SR.

2) Umedecer a amostra com ácido clorídrico e aquecer na zona redutora da chama; esta adquire cor vermelha intensa.

#### *Magnésio, íon*

1) Tratar solução da amostra com hidróxido de sódio SR; forma-se precipitado branco, que se dissolve com a adição de cloreto de amônio SR.

2) Tratar solução da amostra, na presença de cloreto de amônio SR, com carbonato de amônio SR; não se forma precipitado mas, ao se adicionar fosfato de sódio SR, forma-se precipitado cristalino branco, insolúvel em hidróxido de amônio 6 M.

#### *Mercúrio*

1) Tratar solução da amostra com sulfeto de hidrogênio SR; forma-se precipitado preto, insolúvel em sulfeto de amônio SR e em ácido nítrico 2 M fervente.

2) Aplicar solução da amostra, sem excesso de ácido nítrico, em lâmina de cobre brilhante; forma-se depósito que, ao ser polido, se torna brilhante e prateado.

#### *Mercúrio(II), íon*

1) Tratar solução da amostra com hidróxido de sódio M; forma-se precipitado amarelo.

2) Tratar solução neutra da amostra com iodeto de potássio SR; forma-se precipitado escarlate, muito solúvel em excesso de reagente.

#### *Mercúrio(I), íon*

1) Tratar a amostra com hidróxido de sódio M; o sal decompõe-se, dando cor preta.

2) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico SR; forma-se precipitado branco, que escurece ao ser tratado com hidróxido de amônio 6 M.

3) Tratar solução da amostra com iodeto de potássio SR; forma-se precipitado amarelo que, com o tempo, pode passar a verde.

#### *Nitrato*

1) Aquecer a amostra com ácido sulfúrico e cobre metálico; desprendem-se vapores vermelhos-pardos (realizar em capela).

2) Tratar solução da amostra com igual volume de ácido sulfúrico, esfriar a mistura e juntar 0,5 ml de solução de sulfato ferroso 0,5 M; na interface produz-se cor parda a roxa.

**Nitrato**

1) Tratar a amostra com ácidos minerais diluídos ou com ácido acético 5 M; desprendem-se vapores pardacentos (realizar em capela).

2) Tratar papel de amido iodetado com solução da amostra; o indicador se cora de azul.

3) Adicionar a amostra à solução acidificada de permanganato de potássio SR; desaparece a cor.

**Oxalato**

1) Tratar solução neutra ou alcalina da amostra com cloreto de cálcio SR; forma-se precipitado branco, insolúvel em ácido acético 6 M, mas solúvel em ácido clorídrico.

2) Tratar solução acidificada quente da amostra com permanganato de potássio SR; desaparece a cor.

**Permanganato**

1) Tratar solução da amostra, acidulada por ácido sulfúrico SR, com peróxido de hidrogênio 3% (p/V) SR; a cor desaparece a frio.

2) Tratar solução da amostra, acidulada por ácido sulfúrico SR, com ácido oxálico SR em solução aquecida; a cor desaparece.

**Peróxido**

Tratar solução da amostra, ligeiramente acidulada por ácido sulfúrico SR, com dicromato de potássio SR; aparece cor azul intensa. Agitando a mistura com igual volume de éter etílico e deixando os líquidos se separarem, a cor azul passa para a camada etérea.

**Potássio, íon**

1) Tratar solução alcalina da amostra com tetrafenilborato sódico SR; forma-se precipitado branco.

2) Tratar solução da amostra com ácido acético SR e 1 ml de cobaltinitrito de sódio SR; forma-se imediatamente precipitado amarelo ou amarelo alaranjado, na ausência de íons amônio.

3) Colocar a solução da amostra, acidulada com ácido clorídrico SR, na zona redutora da chama; esta adquire cor violeta; a presença de pequena quantidade de sódio mascara a cor.

4) Tratar solução da amostra com ácido perclórico SR; forma-se precipitado branco cristalino.

**Prata, íon**

1) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico; forma-se precipitado caseoso branco,

insolúvel em ácido nítrico SR, mas facilmente solúvel em hidróxido de amônio 6 M.

2) Tratar a solução da amostra com hidróxido de amônio 6 M e pequena quantidade de formaldeído SR; por aquecimento, deposita-se espelho de prata metálica na superfície do recipiente.

**Salicilato**

1) Tratar a solução diluída da amostra com cloreto férrico SR; produz-se cor violeta.

2) Tratar solução moderadamente concentrada da amostra com ácido mineral; forma-se precipitado cristalino branco de ácido salicílico, que funde entre 156 e 160 °C.

**Sódio, íon**

1) Colocar solução da amostra, acidulada, com ácido clorídrico SR, na zona redutora da chama; esta adquire cor amarela intensa.

2) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico ou nítrico e, em seguida, com acetato de uranila e zinco SR; forma-se precipitado cristalino amarelo-ouro, após agitação por alguns minutos.

**Succinato**

1) Tratar solução neutra da amostra com cloreto férrico SR; forma-se precipitado marrom claro.

2) Tratar solução neutra da amostra com nitrato de prata SR; forma-se precipitado branco, facilmente solúvel em hidróxido de amônio 6 M.

**Sulfato**

1) Tratar solução da amostra com cloreto de bário SR; forma-se precipitado branco, insolúvel em ácido clorídrico SR e em ácido nítrico SR.

2) Tratar solução da amostra com acetato de chumbo SR; forma-se precipitado branco, solúvel em acetato de amônio SR, mas insolúvel em ácido clorídrico ou nítrico SR.

3) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico SR; não se forma nenhum precipitado (*distinção do tiosulfato*).

**Sulfito**

1) Tratar a amostra com ácido clorídrico 3 M; desprende-se dióxido de enxofre, reconhecido por seu odor pungente característico e por escurecer papel de filtro umedecido com nitrato mercurioso SR.

2) Acidificar solução da amostra com ácido clorídrico SR, aquecer com algumas gotas de permanganato de potássio SR e juntar gotas de cloreto de bário SR; forma-se precipitado branco.

**Tartarato**

1) Dissolver alguns miligramas da amostra em água, acidificada com ácido acético SR, adicionar uma gota de solução a 1% de sulfato ferroso e uma gota de peróxido de hidrogênio SR; produz-se cor amarela fugaz. Juntar hidróxido de sódio 2M gota a gota; produz-se cor azul intensa.

2) Acidificar solução da amostra com ácido sulfúrico M, juntar algumas gotas de resorcinol SR e adicionar, cuidadosamente, ácido sulfúrico, de modo a se formarem duas camadas; aquecendo em banho-maria, por alguns minutos, na interface aparece anel vermelho.

**Tiocianato**

Tratar solução da amostra com cloreto férrico SR; produz-se cor vermelha, que não desaparece pela adição de ácidos minerais moderadamente concentrados e pode ser extraída com éter, passando a coloração vermelha para a camada etérea.

**Tiosulfato**

1) Tratar solução da amostra com ácido clorídrico; forma-se precipitado branco, que passa

logo a amarelo, e desprende-se dióxido de enxofre, reconhecido pelo odor.

2) Tratar solução acética da amostra com cloreto férrico SR; produz-se cor violeta escura que desaparece rapidamente.

**Xantina**

Tratar a amostra com 2 gotas de solução concentrada de peróxido de hidrogênio concentrado e 5 gotas de ácido clorídrico 2M, e aquecer até secura em banho-maria; obtém-se resíduo vermelho-amarelado que, tratado com hidróxido de amônio 2M, muda para vermelho-violeta.

**Zinco, íon**

1) Tratar solução da amostra com ferrocianeto de potássio SR; forma-se precipitado branco, insolúvel em ácido clorídrico 3M.

2) Tratar solução neutra ou alcalina da amostra com sulfeto de amônio SR; forma-se precipitado branco.

3) Tratar solução da amostra com solução de hidróxido de sódio 2M, gota a gota; forma-se precipitado branco, flocoso, solúvel em excesso de hidróxido de sódio SR.

**V.3.1.2. IDENTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA****PROCEDIMENTO**

Preparar cromatoplaca utilizando Kieselguhr G como suporte. Introduzir a cromatoplaca na cuba contendo o solvente de impregnação e deixar desenvolver até que o solvente atinja o topo da cromatoplaca. Remover a cromatoplaca da cuba e deixar evaporar o solvente. Preparar solução da amostra a 0,25% (p/V) e solução do padrão a 0,25% (p/V), utilizando como solvente mistura de 9 volumes de clorofórmio e 1 volume de metanol. A não ser que a monografia estabeleça diferentemente, aplicar sobre a cromatoplaca 2  $\mu$ l da solução de amostra, 2  $\mu$ l da solução padrão e 2  $\mu$ l mistura 1:1 das soluções da amostra e do padrão. Desenvolver o cromatograma com o eluente especificado na monografia, deixando-o subir no mesmo sentido que o solvente de impregnação. Remover a cromatoplaca da cuba, deixar evaporar o eluente, aquecer a cromatoplaca a 120 °C por 15 minutos e nebulizar com solução de ácido sulfúrico a 10% (V/V) em etanol a 96%. Aquecer a 120 °C por mais 10 minutos, deixar esfriar e examinar à luz normal e à luz ultravioleta (366 nm). A mancha principal do cromatograma obtida com a solução da amostra corresponderá à mancha principal obtida com a solução do padrão. A mancha principal resultante da aplicação da mistura das soluções de amostra e de padrão aparecerá como única e compacta.

*Solventes de impregnação*

- I Mistura de 1 volume de formamida e 9 volumes de acetona
- II Mistura de 1 volume de 1,2-propanodiol e 9 volumes de acetona
- III Mistura de 1 volume de parafina líquida e 9 volumes de éter de petróleo de faixa de ebulição 40-60 °C.

*Eluentes*

- A Clorofórmio
- B Mistura de 3 volumes de tolueno e 1 volume de clorofórmio
- C Tolueno
- D Mistura de 4 volumes de cicloexano e 1 volume de tolueno
- E Mistura de volumes iguais de cicloexano e éter de petróleo de faixa de ebulição 40-60 °C.
- F Mistura de 2 volumes de ácido acético glacial e 3 volumes de água
- G Mistura de 8 volumes de hexano e 2 volumes de dioxana.

## V.3.1.3. PESQUISAS DE ESTERÓIDES ESTRANHOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

## PROCEDIMENTO I

Preparar cromatoplaças segundo método geral para cromatografia em camada delgada, utilizando sílica-gel G como suporte. Preparar 3 soluções utilizando como solvente mistura de 9 volumes de clorofórmio e 1 volume de metanol nas seguintes concentrações: 1,5% (p/V) da substância em exame – *solução 1*; 1,5% (p/V) do padrão oficial correspondente – *solução 2* e 0,03% (p/V) de cada um dos seguintes padrões oficiais: prednisolona e acetato de cortisona – *solução 3*. Aplicar sobre a cromatoplaça 1  $\mu$ l de cada uma destas soluções, separadamente, e desenvolver o cromatograma utilizando como eluente mistura de 77 volumes de diclorometano, 15 volumes de éter, 8 volumes de metanol e 1,2 volumes de água. Secar o cromatograma ao ar, aquecer a 105 °C por 10 minutos e nebulizar com solução de azul de tetrazólio alcalina SR. A mancha principal do cromatograma

obtida com a *solução 1* corresponde, na distância percorrida, coloração e intensidade, à mancha principal do cromatograma obtido com a *solução 2*. Qualquer mancha secundária obtida com a *solução 1* não deve ser mais intensa do que a mancha correspondente no cromatograma obtida com a *solução 3*.

## PROCEDIMENTO II

Proceder à cromatografia utilizando sílica-gel G como suporte e, como eluente, mistura de 95 volumes de 1,2-dicloroetano, 5 volumes de metanol e 0,2 volumes de água.

Aplicar sobre a cromatoplaça, separadamente, 1  $\mu$ l de cada uma das 3 soluções em mistura de 9 volumes de clorofórmio e 1 volume de metanol, como no Procedimento I, com exceção da solução 3, em que se adiciona acetato de desoxicortona.

**V.3.1.4. PESQUISA DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS A SULFONAMIDAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA****PROCEDIMENTO I**

Proceder à cromatografia em camada delgada utilizando sílica-gel H como suporte. Preparar solução da substância em exame a 1,0% (p/V) utilizando como solvente mistura de 9 volumes de etanol a 96% e 1 volume de hidróxido de amônio 13,5 M - *solução 1*. Preparar solução de sulfanilamida a 0,005% (p/V), usando o mesmo solvente - *solução 2*. Aplicar separadamente sobre a cromatoplaça 10 µl de soluções 1 e 2. Desenvolver o cromatograma usando mistura de 15 volumes de 1-butanol e 3 volumes de hidróxido de amônio M como eluente. Remover a cromatoplaça da cuba, aquecer a 105 °C por 10 minutos e nebulizar com solução a 0,1% (p/V) de 4-dimetilaminobenzaldeído em etanol a 96%, contendo 1% de ácido clorídrico (V/V); qualquer mancha no cromatograma obtida com a solução 1, exceto a mancha principal, não é mais intensa

que a mancha obtida no cromatograma com solução 2.

**PROCEDIMENTO II**

Proceder à cromatografia em camada delgada utilizando sílica-gel H como suporte e mistura de 20 volumes de clorofórmio, 2 volumes de metanol e 1 volume de dimetilformamida como fase móvel. Aplicar sobre a cromatoplaça, separadamente, 10 µl de cada uma das seguintes soluções: 0,25% (p/V) da substância em exame em mistura de 9 volumes de etanol e 1 volume de hidróxido de amônio 13,5 M - *solução 1*; 0,00125% (p/V) de sulfanilamida no mesmo solvente da *solução 1*. Desenvolver o cromatograma, secar ao ar e revelar conforme prescrito no procedimento I: qualquer mancha obtida com a *solução 1*, exceto a mancha principal, não deve ser mais intensa que a mancha obtida no cromatograma da *solução 2*.



## V.3.1.5. IDENTIFICAÇÃO DE FENOTIAZINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Proceder à cromatografia em camada delgada, conforme descrito em métodos gerais. Usar *Kieselguhr G* como suporte. Impregnar a cromatoplaça seca, colocando-a em cuba contendo mistura de 10 volumes de 2-fenoxietanol, 5 volumes de macrogol 300 e 85 volumes de acetona. Deixar o eluente subir pelo menos 17 cm. Remover a cromatoplaça da cuba e utilizar imediatamente.

Aplicar sobre a cromatoplaça, separadamente, 2 µl de cada uma das soluções seguintes: 0,2% (p/V) da substância em exame em clorofórmio – *solução 1* e 0,2% (p/V) do padrão oficial correspondente – *solução 2*, operando em atmosfera de nitrogênio e luz reduzida. Desenvolver o cromato-

grama usando como eluente mistura de 2 volumes de dietilamina e 100 volumes de éter de petróleo de faixa de ebulição 40-60 °C, saturada com 2-fenoxietanol. Remover a cromatoplaça da cuba, deixar ao ar e examinar sob luz ultravioleta com intensidade máxima em 366 nm: observa-se fluorescência, produzida em poucos minutos. Em seguida, nebulizar a cromatoplaça com solução de ácido sulfúrico a 10% (V/V) em etanol e observar a coloração produzida: a mancha principal no cromatograma, obtida com a *solução 1*, corresponde, na distância percorrida, fluorescência e coloração, àquela obtida no cromatograma da *solução 2* e tem a mesma estabilidade pelo período de, pelo menos, 20 minutos depois da nebulização.

**V.3.1.6. PESQUISA DE IMPUREZAS RELACIONADAS A FENOTIAZINAS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA****PROCEDIMENTO**

Preparar cromatoplaças utilizando sílica-gel GF 254 como suporte, operando em atmosfera de nitrogênio e ao abrigo da luz. Preparar solução contendo 2,0% (p/V) da substância em exame em mistura de 95 volumes de metanol e 5 volumes de dietilamina – *solução 1*. Preparar solução a 0,01% (p/V) da substância em exame, utilizando o mesmo solvente – *solução 2*. Aplicar sobre a cromatoplaça, separadamente, 10  $\mu$ l de cada solução recém-preparada. Usar fase móvel especificada na monografia. Deixar o solvente subir 12 cm acima do ponto de aplicação. Remover a cromatoplaça da cuba, secar ao ar e examinar sob luz ultravioleta

com máximo em 254 nm. Desprezar qualquer mancha sobre a linha-base. Qualquer mancha obtida com a *solução 1*, exceto a mancha principal, não é mais intensa que a mancha obtida com a *solução 2*, exceto se a monografia estabelecer diferentemente.

*Fases móveis*

- A Mistura de 80 volumes de cicloexano, 10 volumes de acetona e 10 volumes de dietilamina
- B Mistura de 85 volumes de hexano, 10 volumes de acetona e 5 volumes de dietilamina
- C Mistura de 15 volumes de 1-butanol e 3 volumes de hidróxido de amônio *M*

### V.3.2. ENSAIOS-LIMITE PARA IMPUREZAS INORGÂNICAS

Ensaio-limite consistem em ensaios quantitativos ou semi-quantitativos destinados à identificação de impurezas presentes em fármacos. Visto que estas impurezas se encontram, freqüentemente, em quantidades pequenas, sua detecção, via de regra feita através de reação visível, bem como sua determinação quantitativa exigem certos cuidados, sobretudo no que diz respeito a fatores que podem influir nos resultados, a saber: especificidade do ensaio, sensibilidade do mesmo e controle dos erros passíveis de serem cometidos pelo operador.

Certos ensaios visam a determinar, com precisão, a quantidade de impurezas porventura presentes no fármaco. São os seguintes: (1) limites de substância solúvel; (2) limites de substâncias insolúveis; (3) limites de umidade, substância volátil e solventes residuais; (4) limites de substância não volátil; (5) limites do resíduo pela incineração; (6) limites da perda por dessecação; (7) limites de cinza.

Ensaio-limite de cloreto, sulfato, ferro, metais pesados e arsênio destinam-se a comprovar se o conteúdo de tais impurezas não excede o limite — em microgramas por grama da substância em exame — especificado na monografia.

Os ensaios são realizados em tubos de vidro transparente, de fundo chato, geralmente tubos de Nessler, com capacidade aproximadamente de 70 ml e marca externa correspondente a volume de 45 a 50 ml, e diâmetro interno de 23 mm.

Os tubos empregados devem ser iguais tanto em relação ao diâmetro interno quanto aos outros aspectos, uma vez que a comparação entre cor ou turbidez é direta. Há duas maneiras de interpretação: no primeiro caso, os tubos devem ser observados de cima para baixo, contra fundo branco, se possível com auxílio de luz colocada diretamente por baixo do fundo dos tubos; no segundo caso, a comparação deve ser feita na horizontal, contra fundo escuro, colocando, caso possível, fonte de luz diretamente nas laterais dos tubos.

Quanto ao padrão, pode-se optar por padrão fixo ou padrão variável. No primeiro caso, a quantidade da amostra a ser empregada visando à comparação com o padrão de volume fixo é estabelecida em tabelas (Tabelas I, II e III); no segundo caso, o volume do padrão varia de acordo com o limite de cada impureza em determinada amostra, conforme o especificado na monografia.

V.3.2.1. ENSAIO-LIMITE PARA CLORETOS

*Preparo da amostra*

Em tubos de Nessler colocar a quantidade de amostra especificada na monografia, adicionando 30 a 40 ml de água. Caso a substância já esteja em solução, completar o volume para 30 a 40 ml com água. Neutralizar, se necessário, com ácido nítrico SR. Se após a acidificação a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar através de papel de filtro isento de cloreto. Caso o limite de cloreto para determinada solução da substância corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido clorídrico padrão, não há necessidade de diluir a amostra.

*Preparo do padrão*

Submeter o volume de ácido clorídrico padrão indicado na monografia (HCl 0,01 M), ou indicado

em tabela (Tabela I), ao mesmo tratamento efetuado com a amostra. Utilizar as mesmas quantidades de reagentes empregadas no *Preparo da amostra*.

*Técnica*

Desenvolver em paralelo padrão e amostra: ao tubo padrão e ao tubo amostra adicionar 1 ml de ácido nítrico SR e 1 ml de nitrato de prata SR. Completar o volume para 50 ml com água. Homogeneizar. Deixar em repouso ao abrigo da luz durante 5 minutos. A turbidez desenvolvida pela amostra não deve ser superior à desenvolvida pelo padrão.

Tabela I - Cálculo de limites para cloreto

Equivalentes em parte de Cl<sup>-</sup> por 1 milhão de partes da substância (p/p)  
 Padrão: 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M (=0,0003546 g de Cl<sup>-</sup>)  
 Volume final: 50 ml  
 Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 25 mm

<i>g de Substância</i>	<i>Cl<sup>-</sup> p/Milhão</i>	<i>g de Substância</i>	<i>Cl<sup>-</sup> p/Milhão</i>
0,10	3.546 (=0,355%)	3,8	93
0,15	2.364 (=0,236%)	4,0	88
0,20	1.773 (=0,180%)	4,2	84
0,25	1.418 (=0,142%)	4,4	80
0,30	1.182 (=0,120%)	4,6	77
0,35	1.013 (=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

Sendo o padrão fixo (=0,0003546 g de Cl<sup>-</sup>), se determinada substância contiver 354 partes de Cl<sup>-</sup> por milhão, deverá ser tomado 1 g para obter-se a mesma opalescência do padrão; se ela contiver 71 partes de Cl<sup>-</sup> por milhão, deverão ser tomados 5 g e assim por diante.

V.3.2.2. ENSAIO-LIMITE PARA SULFATOS

*Preparo da amostra*

Colocar quantidade especificada da substância em análise em tubo de Nessler, adicionando 30 a 40 ml de água. Se a substância já se encontrar em solução, acrescentar água, perfazendo volume de 30 a 40 ml. Caso necessário, neutralizar com ácido clorídrico SR. Pode-se, eventualmente, utilizar ácido acético, tanto para a neutralização quanto para a acidificação. Se após a acidificação a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar através de papel de filtro isento de sulfato. Caso o limite de sulfato para determinada solução da substância corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido sulfúrico padrão, não há necessidade de diluir a amostra.

indicado na monografia ( $H_2SO_4$  0,005 M), ou indicado na Tabela 2, ao mesmo tratamento efetuado com a amostra. Utilizar as mesmas quantidades de reagentes empregados no *Preparo da amostra*.

*Técnica*

Desenvolver em paralelo padrão e amostra: ao tubo padrão e ao tubo amostra adicionar 1 ml de ácido clorídrico 3M e 3 ml de cloreto de bário SR. Completar o volume para 50 ml com água destilada. Homogeneizar. Deixar em repouso por cerca de 10 minutos. A turbidez desenvolvida pela amostra não deve ser superior à desenvolvida pelo padrão.

*Preparo do padrão*

Submeter o volume de ácido sulfúrico padrão

Tabela 2 - Cálculo de limites para sulfato

Equivalentes em parte de  $SO_4^{2-}$  por milhão de partes da substância (p/p)

Padrão: 2,5 ml de ácido sulfúrico 0,005 M (= 0,0012008 g de  $SO_4^{2-}$ )

Volume final: 50 ml

Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 25 mm

<i>g de Substância</i>	<i>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> p/Milhão</i>	<i>g de Substância</i>	<i>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> p/Milhão</i>
0,50	2.401 (=0,240%)	4,6	261
0,55	2.183 (=0,220%)	4,8	250
0,60	2.001 (=0,200%)	5,0	240
0,65	1.847 (=0,185%)	5,2	231
0,70	1.715 (=0,171%)	5,4	222
0,75	1.601 (=0,160%)	5,6	214
0,80	1.501 (=0,150%)	5,8	207
0,85	1.412 (=0,141%)	6,0	200
0,90	1.334 (=0,133%)	6,2	194
0,95	1.264 (=0,126%)	6,4	187
1,00	1.200 (=0,120%)	6,6	182
1,2	1.001 (=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

Sendo o padrão fixo (=0,0012008 g de  $SO_4^{2-}$ ), se determinada substância contiver 500 partes de  $SO_4^{2-}$  por milhão, deverão ser tomados 2,4 g para obter-se a mesma opalescência do padrão; se ela contiver 151 partes de  $SO_4^{2-}$  por milhão, deverão ser tomados 8 g e assim por diante.

## V.3.2.3. ENSAIO-LIMITE PARA METAIS PESADOS

O ensaio-limite para metais pesados consiste em verificar se o conteúdo de impurezas metálicas que reagem colorimetricamente com o íon sulfeto não ultrapassa o limite especificado nas monografias em termos de microgramas de chumbo por grama da substância em análise. Analogamente, a reação com tioacetamida pode ser empregada para a determinação do limite de metais pesados, em termos de chumbo.

Em se tratando de metais pesados que normalmente fornecem reação ácida, não há necessidade de proceder à acidificação, como especificado na preparação da amostra, tampouco de neutralizar a solução.

**Métodos de reação com íon sulfeto**

São basicamente três os métodos de preparo da amostra para reação com íon sulfeto empregados como ensaio-limite para metais pesados. O *Método I* é utilizado para substâncias que fornecem soluções límpidas nas condições especificadas. É o mais recomendado, a menos que outros sejam especificados pela monografia. O *Método II* se aplica a substâncias que não apresentam soluções límpidas quando submetidas às condições indicadas para o *Método I*, para aquelas que interferem na precipitação dos metais com sulfeto, bem como para óleos fixos e voláteis. Caso não se apliquem ambos os métodos, recorre-se ao *Método III*, que consiste basicamente em processo de digestão úmida.

**Solução estoque de nitrato de chumbo**

A uma solução de 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 ml de água, adicionar 1 ml de solução nítrica. Completar o volume com água para exatamente 1000 ml. Homogeneizar. A solução obtida deve ser conservada em recipientes de vidro, isentos de sais de chumbo solúveis.

**MÉTODO I**

**Preparo da amostra** — Colocar, em tubo de Nessler de 50 ml, 25 ml da solução da amostra, preparada de acordo com a monografia. Se houver indicação do volume de ácido, calcular a quantidade da substância em gramas, mediante a fórmula 2,0/1000 L, em que L é o limite, em porcentagem, dos metais pesados. Dissolver essa massa em 25 ml de água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M. Diluir com água, perfazendo volume de 40 ml e homogeneizar a solução obtida.

**Solução padrão de chumbo** — Diluir 10,0 ml da solução estoque de nitrato de chumbo para 100,0 ml com água. Cada ml desta solução equi-

vale a 10 µg de Pb. Uma solução de 100 µg de padrão de chumbo por grama de substância em exame corresponde a 1 ppm de chumbo.

**Preparo do padrão** — Para tubo de Nessler de 50 ml transferir 2,0 ml de solução-padrão de chumbo, equivalente a 20 µl de chumbo. Completar com água para volume final de 25 ml. Em seguida, ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M. Diluir com água, perfazendo volume final de 40 ml. Homogeneizar.

**Preparo do tubo controle** — Paralelamente, colocar em outro tubo de Nessler 25 ml da solução da amostra preparada conforme descrito para o *Preparo da amostra*, acrescentando 2,0 ml de solução padrão de chumbo, ajustando o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M. Diluir com água para volume de 40 ml, misturando a solução resultante.

**Técnica** — Acrescentar, a cada uma das preparações, 10 ml de sulfeto de hidrogênio SR recém-preparado. Misturar. Deixar em repouso por 5 minutos. Observar os tubos de cima para baixo, contra fundo branco. A cor obtida com a amostra não deve ser mais escura do que a obtida com o padrão; a cor do tubo-controle (amostra + padrão) da solução deve ser mais intensa que a do padrão ou igual à dele. Se, no entanto, for mais clara, aplicar o *Método II* ao invés do *Método I*.

**MÉTODO II**

**Preparo da amostra** — Colocar em cadinho, de preferência de sílica, que pode ser coberto com tampa adequada, quantidade em gramas especificada na monografia, ou calculada mediante a fórmula 2,0/1000 L, em que L corresponde ao limite de metais pesados em porcentagem. Incinerar, cuidadosamente, à baixa temperatura, a amostra previamente umedecida com quantidade suficiente de ácido sulfúrico. Em seguida, adicionar ao conteúdo do cadinho 2 ml de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico. Aquecer com cuidado, até que não mais se desprendam vapores brancos. Colocar, então, o cadinho em mufla, à temperatura de 500 a 600 °C, por tempo necessário à combustão completa e em seguida esfriar. Adicionar 4 ml de ácido clorídrico 6 M, evaporando em banho-maria, lentamente, até secura. Umedecer o resíduo com 1 gota de ácido clorídrico 6 M, adicionar 10 ml de água quente e digerir por 2 minutos. Alcalinizar com hidróxido de amônio 6 M, colocado gota a gota. Diluir com água para 25 ml, ajustando o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M. Filtrar, caso seja necessário, lavar o cadinho e o filtro com 10 ml de água. Colocar o filtrado e a água de lavagem em tubo

de Nessler, diluindo com água até perfazer volume de 40 ml, misturando em seguida.

**Preparo do padrão** — O preparo do padrão segue a técnica descrita para o *Método I*.

**Técnica** — Adicionar concomitantemente ao tubo padrão e ao tubo amostra 10 ml de sulfeto de hidrogênio SR e homogeneizar. Deixar em repouso por 5 minutos. Observar os tubos de cima para baixo, contra fundo branco; a cor obtida com a amostra não deve ser mais escura do que a obtida com o padrão.

### MÉTODO III

**Preparo da amostra** — A técnica de preparação da amostra varia pouco com o estado físico das substâncias. Para *substâncias sólidas*, colocar, em balão de Kjeldahl de 100 ml, previamente limpo e seco, quantidade da substância indicada na monografia. Se houver formação de muita espuma, utilizar balão de maior capacidade. Segurando o balão em ângulo de 45°, umedecer a substância com quantidade suficiente de mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico. No caso de *substâncias líquidas*, transferir para balão de Kjeldahl, como descrito para substâncias sólidas, o volume especificado na monografia e adicionar, cuidadosamente, alguns poucos ml da mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico. Aquecer cuidadosamente para iniciar a reação. Quando a reação abrandar, adicionar, em porções, a mistura ácida, aquecendo a cada adição. Repetir a operação até que se tenha acrescentado volume total de 18 ml. Aumentar a temperatura de aquecimento, alcançando, lentamente, a fervura, deixando o tempo necessário para que a solução escureça. Em seguida, esfriar e acrescentar 2 ml de ácido nítrico. Aquecer novamente até que a solução não mais escureça. Aquecer vigorosamente a fim de que se produzam vapores brancos densos e adicionar 5 ml de água. Esfriar a mistura. Submeter à fervura, quando novamente se desprendem vapores brancos densos, até que o volume se reduza ao mínimo. Esfriar e adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água, verificando a cor da solução. Caso se observe cor amarela, proceder à adição de 1 ml de peróxido de hidrogênio a 30% (V/V). Ferver até aparecimento de vapores brancos densos, reduzindo o volume a 2 ou 3 ml. Caso a cor persista, repetir o tratamento anterior. Esfriar e diluir cuidadosamente com pequeno volume de água. Transferir, com lavagem, para tubo de Nessler de 50 ml, não permitindo que o volume ultrapasse 25 ml.

**Preparo do padrão** — Colocar, em balão de Kjeldahl de 100 ml, mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico. Adicionar volume de ácido nítrico para igualar a quantidade excedente acrescentada no preparo da amostra. Aquecer, em seguida, a solução a fim de produzir vapores brancos densos. Esfriar. Adicio-

nar, com cuidado, 10 ml de água. Caso tenha sido necessário utilizar peróxido de hidrogênio 30% (V/V) na amostra, acrescentar igual volume, aquecendo, lentamente, com produção de vapores brancos densos. Em seguida, resfriar novamente, adicionar 5 ml de água, misturando a solução. Ferver a mistura, produzindo novamente os vapores e reduzindo o volume para 2 a 3 ml. Esfriar, diluir novamente com pequeno volume de água e acrescentar 2,0 ml de solução padrão de chumbo, misturando em seguida. Transferir a mistura e as águas de lavagem, do balão para tubo de Nessler de 50 ml, até volume total de 25 ml. Homogeneizar.

**Técnica** — Desenvolver em paralelo padrão e amostra: ajustar o pH da solução da amostra e da solução padrão entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de amônio 2 M. Diluir com água, perfazendo volume total de 40 ml. Homogeneizar. Adicionar a cada tubo 10 ml de sulfeto de hidrogênio SR recém-preparado. Homogeneizar. Deixar em repouso por 5 minutos. A cor da amostra não deve ser mais escura do que a do padrão.

### Métodos de reação com tioacetamida

**Solução padrão de chumbo (20 ppm Pb)** — Diluir 0,8 g de nitrato de chumbo e 2 ml de ácido nítrico em água para volume de 250 ml. Transferir 1,0 ml desta solução para balão volumétrico de 100 ml, completando o volume com água.

**Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)** — Diluir 50,0 ml de solução padrão de chumbo (20 ppm Pb) com água, perfazendo 100,0 ml.

**Solução padrão de chumbo (2 ppm Pb)** — Diluir 10,0 ml da solução padrão de chumbo (20 ppm Pb) com água, perfazendo 100,0 ml.

**Solução padrão de chumbo (1 ppm Pb)** — Diluir 5,0 ml de solução padrão de chumbo (20 ppm Pb) com água, perfazendo 100,0 ml.

**Preparo do reagente de tioacetamida** — Dissolver 1 g de tioacetamida em água e completar o volume a 100 ml.

### MÉTODO I

**Preparo da amostra** — Adicionar a 12 ml de solução aquosa da amostra, conforme especificado na monografia do fármaco, 2 ml de solução tampão acetato pH 3,5 e homogeneizar.

**Preparo do padrão** — A 10 ml da solução padrão de chumbo (1 ppm ou 2 ppm de Pb), adicionar 2 ml de solução tampão acetato pH 3,5 e 2 ml da solução em exame. Misturar, deixando em repouso por 2 minutos.

**Técnica** — Nos tubos contendo amostra e padrão acrescentar, concomitantemente, 1,2 ml de reagente tioacetamida. Após 2 minutos, desenvolve-se cor marrom que, no caso da amostra, não deve ser mais intensa do que a do padrão.

**MÉTODO II**

**Preparo da amostra** — Dissolver a quantidade da amostra especificada na monografia em solvente orgânico (dioxana ou acetona, contendo, no mínimo, 15% V/V de água). Transferir 12 ml da solução obtida para tubo de Nessler. Adicionar 2 ml de tampão acetato pH 3,5 e homogeneizar.

**Preparo do padrão** — A 10 ml de solução padrão de chumbo (1 ppm ou 2 ppm de Pb), obtida mediante dissolução de solução padrão de chumbo (20 ppm Pb) com o mesmo solvente empregado para a dissolução da amostra, adicionar 2 ml de tampão acetato pH 3,5 e 2 ml da solução amostra.

**Técnica** — Acrescentar a ambos os tubos — amostra e padrão — 1,2 ml de reagente de tioacetamida. Homogeneizar imediatamente. Aguardar 2 minutos. A cor marrom desenvolvida na amostra não deve ser mais intensa do que a desenvolvida no padrão.

**MÉTODO III**

**Preparo da amostra** — Colocar em cadinho de sílica quantidade da substância especificada na monografia. Juntar 4 ml de solução a 25% (p/V) de sulfato de magnésio em ácido sulfúrico *M*. Misturar e aquecer com cuidado. Caso a mistura seja líquida, evaporar lentamente em banho-maria até secura. Incinerar a amostra até, no máximo, 800 °C. Manter o aquecimento até obter resíduo branco ou acinzentado. Esfriar. Umedecer o resíduo com poucas gotas de ácido sulfúrico *M*. Evaporar. Incinerar novamente por não mais de 2 horas, esfriando logo após. O resíduo assim obtido é dissolvido com duas vezes 5 ml de ácido clorídrico 0,2 *M*, acrescentando-se 0,1 ml de fenoltaleína SI. Adicionar hidróxido de amônio 6 *M* até que se desenvolva cor rósea. Esfriar. Descobrir a solução com ácido acético glacial e acrescentar mais 0,5 ml do ácido. Se necessário, filtrar e diluir a solução com água para volume de 20 ml. Transferir 12 ml da solução obtida para

tubo de Nessler, adicionar 2 ml de tampão acetato pH 3,5 e homogeneizar imediatamente.

**Preparo do padrão** — Submeter, repetidas vezes, volume indicado de solução padrão de 10 ppm de chumbo ao processo de incineração e extração utilizado no preparo da amostra, obtendo 20 ml de solução padrão. Transferir exatamente 10 ml desta solução e misturar com 2 ml da amostra e 2 ml de tampão acetato pH 3,5.

**Técnica** — Em cada um dos tubos referentes à amostra e ao padrão adicionar concomitantemente 1,2 ml de reagente de tioacetamida. A cor marrom que se desenvolve para a amostra não deve ser mais intensa do que a obtida com o padrão.

**MÉTODO IV**

**Preparo da amostra** — Transferir para cadinho de sílica quantidade de substância especificada na monografia, misturando 0,5 g de óxido de magnésio. Incinerar até vermelho escuro sobre chama. Prosseguir até obter massa homogênea branca ou cinzenta. Se após 30 minutos de ignição a cor se mantiver, esfriar, misturar a massa no cadinho com bastão de vidro, repetindo, em seguida, a incineração. Aquecer a 800 °C por aproximadamente 1 hora. Após este período, seguir a técnica de preparo da amostra no *Método III*, iniciando por "o resíduo assim obtido é dissolvido . . .".

**Preparo do padrão** — Misturar o volume especificado de solução padrão de chumbo (10 ppm de Pb) a 0,5 g de óxido de magnésio em cadinho de sílica. Em seguida, secar a mistura em estufa a 105 °C, incinerando logo após. Seguir a técnica de preparo da amostra no *Método III*, iniciando por "o resíduo assim obtido é dissolvido . . .". A 10 ml da solução obtida adicionar 2 ml da solução da amostra.

**Técnica** — Em cada um dos tubos referentes à amostra e ao padrão adicionar 1,2 ml de reagente de tioacetamida. A cor marrom que se desenvolve na amostra não deve ser mais intensa do que a obtida com o padrão.



V.3.2.4. ENSAIO-LIMITE PARA FERRO

**Solução padrão de ferro (100 ppm Fe)** – Dissolver com água, em balão volumétrico de 1000 ml, 0,8634 g de sulfato férrico amoniacal dodecaidratado. Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico SR e completar o volume com água.

**Solução padrão de ferro (20 ppm Fe)** – Transferir 10,0 ml da solução a 0,1726% (p/V) de sulfato férrico amoniacal dodecaidratado em ácido sulfúrico 0,05 M para balão volumétrico de 100 ml, completando o volume com água.

**Solução padrão de ferro (10 ppm Fe)** – Diluir 50,0 ml da solução padrão de ferro (20 ppm Fe) com água, perfazendo volume de 100,0 ml.

**Solução padrão de ferro (2 ppm Fe)** – Diluir 10,0 ml da solução padrão de ferro (20 ppm Fe) com água, perfazendo volume de 100,0 ml.

**Solução padrão de ferro (1 ppm Fe)** – Diluir 5,0 ml de solução padrão de ferro (20 ppm Fe) com água, perfazendo volume de 100,0 ml.

**MÉTODO I**

**Preparo da amostra** – Dissolver quantidade da amostra especificada na monografia ou na Tabela 3 em solvente adequado e diluir para 40 ml com o mesmo solvente ou utilizar 40 ml da solução indicada. A essa solução acrescentar 2 ml de solução de ácido cítrico SR.

**Preparo do padrão** – Empregar 10 ml de solução padrão de ferro (1 ppm de Fe) ou 1 ml da solução padrão de ferro (100 ppm Fe) (Tabela 3) e proceder à mesma técnica indicada para a amostra.

**Técnica** – Concomitantemente, juntar aos tubos contendo a amostra e o padrão 2 gotas de ácido tioglicólico. Misturar e alcalinizar com hidróxido de amônio. Diluir para 50 ml com água. Deixar em repouso por 5 minutos. A cor rósea produzida na amostra não deve ser mais intensa do que a obtida com o padrão.

**MÉTODO II**

**Preparo da amostra** – A 10 ml de solução da amostra especificada na monografia juntar 2 ml de ácido clorídrico 2 M e 0,5 ml de água de bromo. Após 5 minutos, retirar o excesso de bromo por corrente de ar.

**Preparo do padrão** – Submeter 10 ml da solução padrão de ferro (2 ppm de Fe), 1 ml de ácido clorídrico 2 M e 1 ml de água à mesma técnica indicada para a amostra.

**Técnica** – Concomitantemente, juntar aos tubos da amostra e do padrão 3 ml de tiocianato de potássio M. Agitar, deixando em repouso por 5 minutos. A cor obtida com a amostra não deve ser mais intensa do que a produzida pelo padrão.

**MÉTODO III**

**Preparo da amostra** – Colocar em tubo de Nessler a solução preparada de acordo com a monografia da substância.

**Preparo do padrão** – Transferir exatamente

Tabela 3 – Cálculo de limites para ferro

Equivalentes em parte de Fe por 1 milhão de partes da substância (p/p)  
 Padrão: 1 ml da solução de sulfato de amônio e ferro(III) dodecaidratado (= 0,0001 g de Fe)  
 Volume final: 50 ml  
 Tubo Nessler de 20 mm de diâmetro externo

g de Substância	Fe p/Milhão	g de Substância	Fe p/Milhão
0,1	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	1,25	80
0,143	700	1,429	70
0,154	650	1,667	60
0,167	600	2	50
0,182	550	2,5	40
0,2	500	3,333	30
0,222	450	5	20
0,25	400	10	20
0,285	350	20	5
0,333	300		

Sendo o padrão fixo (=0,0001 g de Fe), se determinada substância contiver 1.000 partes de Fe por milhão, deverá ser tomado 0,1 g para obter-se a mesma coloração do padrão; se ela contiver 200 partes de Fe por milhão, deverão ser tomados 0,5 g, e assim por diante.

1 ml da solução padrão de ferro (10 ppm Fe) para tubo de Nessler. Diluir para 45 ml com água e acrescentar 2 ml de ácido clorídrico *M.* Homogeneizar.

Técnica – Adicionar a cada tubo, da amostra e

do padrão, 50 mg de cristais de peroxidissulfato de amônio. Juntar 3 ml de solução de tiocianato de amônio SR. Homogeneizar. A cor obtida com a amostra não deve ser mais intensa do que a desenvolvida para o padrão.

## V.3.2.5. ENSAIO-LIMITE PARA ARSÊNIO

Consiste na determinação de traços de arsênio, presente na substância analisada, mediante sua conversão em arsina ( $\text{AsH}_3$ ), que pode ser detectada espectrofotometricamente ou visualmente. Os limites são estabelecidos em termos de arsênio ou, em certos casos, em  $\text{As}_2\text{O}_3$ .

É importante lembrar que metais ou sais de metais como Cr, Co, Hg, Mo, Ni, Pd e Ag podem interferir na geração de arsina.

## MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Baseia-se na reação entre a arsina liberada e dietilditiocarbamato de prata, que forma complexo vermelho, sendo a absorção medida em espectrofotômetro ou colorímetro. O antimônio é interferente da reação, uma vez que forma estibina, dando resultado falsamente positivo no desenvolvimento de cor com dietilditiocarbamato de prata SR. Quando se suspeita dessa interferência, deve-se comparar as soluções em comprimento de onda de 535 e 540 nm. Neste, a interferência da estibina é desprezível.

Dois métodos podem ser empregados. Estes diferem no que diz respeito ao tratamento da amostra e do padrão. O *Método I* é, em geral, utilizado para substâncias inorgânicas; o *Método II* é empregado para substâncias orgânicas.

O aparelho utilizado compreende, conforme mostra a Fig. 1: (a) gerador de arsina; (b) e (d) juntas; (c) unidade esmerilhada; (e) tubo de absorção. Outro aparelho adaptado, que tenha as características essenciais do apresentado, pode, eventualmente, ser utilizado.

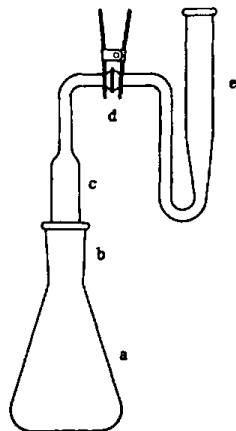


Fig. 1 Aparelho para determinação de arsênio pelo método espectrofotométrico.

A solução estoque padrão de arsênio é preparada do seguinte modo: secar por 1 hora a  $105^\circ\text{C}$  o trióxido de arsênio. Pesar exatamente 132,0 mg e dissolver, em 5 ml de solução de hidróxido de sódio 5 M na proporção de 1:5, em balão volumétrico de 1000 ml. Neutralizar com ácido sulfúrico M adicionando, em seguida, mais 10 ml do referido ácido. Completar o volume com água recém-fervida e resfriada. Transferir 10,0 ml dessa solução para outro balão volumétrico de 1000 ml. Acrescentar 10 ml de ácido sulfúrico M. Completar o volume com água recém-fervida e posteriormente esfriada. Homogeneizar. Conservar a solução em recipiente de vidro. Deve ser utilizada dentro de 3 dias. Cada ml da solução obtida corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de arsênio.

## MÉTODO I

**Preparo da amostra** – Transferir para frasco gerador de arsina a quantidade de substância indicada na monografia, ou calcular essa quantidade, em gramas, mediante a fórmula  $3,0/L$ , em que L é o limite de arsênio em ppm. Dissolver com água, completando o volume para 35 ml. Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M, 2 ml de iodeto de potássio SR, 0,5 ml de cloreto estano forte-mente ácido SR e 1 ml de 2-propanol. Homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Na unidade (c) do aparelho descrito, colocar duas mechas de algodão embebidas em solução saturada de acetato de chumbo SR, deixando entre elas espaço de 2 mm. O excesso da solução deve ser eliminado espremendo-se as mechas de algodão e secando-as à pressão reduzida, à temperatura ambiente. As juntas (b) e (d) devem ser lubrificadas com vaselina e unidas como na Fig. 1.

**Preparo do padrão** – Transferir para o frasco gerador de arsina 3,0 ml de solução padrão de arsênio. Diluir com água até perfazer 35 ml. Proceder da mesma forma descrita para o *Preparo da amostra*.

**Técnica** – Transferir para a unidade de absorção (e) do frasco gerador contendo a amostra e do que contém o padrão 3,0 ml de dietilditiocarbamato de prata SR. Adicionar 3,0 g de zinco granulado (malha de 1 mm) à mistura do frasco gerador de arsina. Imediatamente após esta adição, unir as unidades (c) e (e) ao frasco gerador. Deixar em banho de água à temperatura de  $25^\circ\text{C}$  (tolerância de  $3^\circ\text{C}$ ) por 45 minutos. Em intervalos de 10 minutos agitar vagarosamente. Após este período, transferir o conteúdo da unidade de absorção para cela de 1 cm. Comparar a cor vermelha produzida pelo padrão com a obtida com a amostra. Esta última não deve ser mais intensa do que a primeira.

Caso necessário, determinar a absorção em espectrofotômetro ou colorímetro em comprimento de onda entre 535 e 540 nm, empregando dietilditiocarbamato de prata SR como branco.

#### MÉTODO II

Este método emprega peróxido de hidrogênio na digestão da amostra. Com certas substâncias, pode provocar reação violenta. Assim, é importante que se proceda com a máxima cautela possível em todas as operações. Deve-se tomar cuidado, também, na presença de compostos halogenados, especialmente quando se aquece a amostra com ácido sulfúrico e posteriormente se adiciona peróxido de hidrogênio a 26% (V/V). O aquecimento deve ser mais brando, impedindo que se atinja a temperatura de ebulição da mistura e antes de carbonizar para evitar a perda de arsênio trivalente.

**Preparo da amostra** – Transferir para o frasco gerador quantidade da amostra especificada na monografia ou calculada em gramas mediante a fórmula  $3,0/L$ , em que L é o limite de arsênio em ppm. Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico e pérolas de vidro. Se necessário, empregar maior quantidade do ácido para umedecer completamente a substância, cuidando para que o volume não ultrapasse 10 ml. Proceder à digestão em capela, de preferência usando placa de aquecimento, com temperatura não superior a 120 °C, por tempo necessário ao início da queima. Uma vez iniciada a decomposição da amostra pelo ácido, adicionar, com cuidado e gota a gota, peróxido de hidrogênio a 30% (V/V). Esperar que a reação se abrande e, então, aquecer entre uma gota e outra. Caso haja excesso de espuma, interromper o aquecimento. Assim que diminuir a intensidade da reação, aquecer cautelosamente, com agitação do frasco, para promover aquecimento homogêneo. É necessário que se mantenham as condições oxidantes durante toda a digestão. Para tanto, há que se adicionar pequenas quantidades de solução de peróxido de hidrogênio 30% (V/V) sempre que a mistura se torne marrom ou escureça. Destruída a matéria orgânica, aumentar paulatinamente a temperatura de aquecimento, permitindo que saiam os vapores de trióxido de enxofre, deixando a solução incolor ou cor de palha clara. Esfriar. Acrescentar, com cuidado, 10 ml de água. Misturar. Evaporar até que se formem vapores fortes. Caso necessário, repetir a operação, removendo traços de peróxido de hidrogênio. Esfriar e juntar 10 ml de água. Lavar o frasco e diluir com água, perfazendo 35 ml. Proceder como no *Preparo da amostra do Método I*, iniciando por “Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M...”

**Preparo do padrão** – A 3,0 ml de solução padrão de arsênio, colocado no frasco gerador, juntar 2 ml de ácido sulfúrico. Misturar. Acrescentar o mesmo volume de peróxido de hidrogênio

a 30% (V/V) empregado para o preparo da amostra. Proceder, em seguida, ao aquecimento da solução obtida até que se formem vapores fortes. Esfriar e adicionar, com cuidado, 10 ml de água. Repetir a operação de aquecimento; findo este, esfriar novamente e diluir com água para completar 35 ml. Proceder como para o *Preparo da amostra*.

Técnica – Seguir a descrita para o *Método I*.

#### MÉTODO VISUAL

O método consiste na conversão de traços de arsênio em arsina, por redução com zinco e ácido clorídrico concentrado. A arsina liberada reage com papel de cloreto de mercúrio(II), ou brometo de mercúrio(II), produzindo mancha de cor amarela. No processo, além de  $Hg(AsH_2)_2$ , principal produto da reação, podem ser formados, no caso de se empregar cloreto mercúrico, produtos como  $AsH(HgCl_2)$ ,  $As(HgCl_3)$  e  $As_2Hg_3$ , que produzem mancha amarela ou marrom.

O aparelho empregado para a determinação visual de arsênio é o que aparece à Fig. 2. Consiste, basicamente, de erlenmeyer, geralmente de 100 ml, onde se dá a geração de arsina. Este frasco é fechado com rolha de vidro esmerilhado. Por esta rolha passa tubo de vidro de aproximadamente 200 mm de comprimento e diâmetro interno de

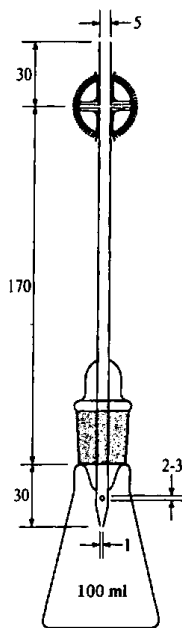


Fig. 2 Aparelho para determinação de arsênio pelo método visual (dimensões em mm).

5 mm. A extremidade inferior desse tubo estreita-se para diâmetro interno de 1 mm. A aproximadamente 15 mm da ponta desse tubo há um orifício com diâmetro de 2 a 3 mm, que deve estar, no mínimo, 3 mm abaixo da superfície mais baixa da rolha de vidro. A extremidade superior do tubo é superfície plana e forma, com o eixo do tubo, ângulo reto. A esta superfície se ajusta, mediante 2 espirais, outra, igualmente plana, de outro tubo de vidro com o mesmo diâmetro interno e 30 mm de comprimento. No tubo inferior, colocam-se 50 ou 60 mg de algodão com acetato de chumbo ou chumaço de algodão e papel de acetato de chumbo enrolado, com peso aproximado de 50 a 60 mg. Em seguida, coloca-se, entre as superfícies planas, disco de papel de brometo mercúrico, ou cloreto mercúrico, com tamanho adequado a recobrir todo o orifício do tubo.

**Preparo da amostra** — No erlenmeyer dissolve-se quantidade especificada de substância em 25 ml de água. Se for solução, ajustar volume para 25 ml.

Em seguida, acrescentar 15 ml de ácido clorídrico, 0,1 ml de solução ácida de cloreto estano SR e 5 ml de iodeto de potássio *M*. Deixar em repouso por 15 minutos.

**Preparo do padrão** — Colocar 1 ml da solução padrão de arsênio (1 ppm As) no frasco gerador e diluir com água para 25 ml. Submeter a solução ao mesmo tratamento dispensado à amostra.

**Técnica** — Adicionar ao frasco contendo a amostra e àquele contendo o padrão 5 g de zinco ativado. Imediatamente após, ligar o tubo ao frasco gerador e deixar em banho de água, à temperatura adequada para que a liberação de arsina seja uniforme. Para melhor visualização da cor, após tempo adequado à liberação de arsina, umedecer os papéis com solução de iodeto de potássio a 10%, colocada em cápsula de porcelana de 10 cm de diâmetro. A cor vermelha inicial desaparece, intensificando a cor amarela. A cor obtida com a amostra não deve ser mais intensa que a obtida com o padrão.

## V.3.2.6. ENSAIO-LIMITE PARA AMÔNIA

Dissolver, em tubo de Nessler, a quantidade indicada da substância em análise em 14 ml de água. Alcalinizar, se necessário, com hidróxido de sódio 2 *M* e diluir para 15 ml com água. Adicionar 0,3 ml de solução de iodeto de potássio mercúrio alcalino. Tampar o tubo, agitar e deixar em repouso por 5 minutos. A cor amarela que se produz não deve ser mais intensa que a produzida pelo trata-

mento análogo de mistura de 10 ml de solução padrão de amônia (1 ppm de  $\text{NH}_3$ ) e 5 ml de água.

*Solução padrão de amônia (1 ppm)*

Diluir 40,0 ml de solução padrão de amônia 2,5 ppm (1,0 ml de solução de cloreto de amônio 0,00741% (p/V) em água a 100,0 ml) com água a 100,0 ml.

### V.3.3. DETERMINAÇÕES EM GORDURAS E ÓLEOS

O controle analítico de substâncias graxas – gorduras, óleos, ceras, resinas, bálsamos, entre outras – consiste no estabelecimento de diversas propriedades físicas e químicas, ao lado da avaliação de especificações de cor, odor, sabor e limites de impurezas. Os principais ensaios físicos compreendem determinação da densidade, das temperaturas de fusão e solidificação, do índice de refração, do desvio polarimétrico e da presença de água e sedimentos. As determinações químicas, por sua vez, constituem o estabelecimento dos chamados índices, entre os quais o de acidez, de ésteres, de saponificação, de iodo, de peróxidos, de hidroxila, de acetila e a dosagem da matéria insaponificável.

#### *Preparo da amostra*

Substâncias graxas líquidas devem apresentar limpidez. Havendo turvação, aquecer o material em banho-maria a 50 °C até seu desaparecimento. Persistindo a turbidez, filtrar através de papel de filtro seco, em funil provido de camisa de água quente. Homogeneizar e pesar, de uma vez, todas as amostras necessárias às diversas determinações.

Substâncias sólidas à temperatura ambiente devem ser mantidas fundidas durante a amostragem.

**V.3.3.1. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA**

Proceder conforme instruções sob o título "Determinação da densidade de massa e densidade relativa" (V.2.5).



**V.3.3.2. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE FUSÃO**

Proceder conforme instruções do Método III, sob o título "Determinação da temperatura e faixa de fusão" (V.2.2).

## V.3.3.3. DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE SOLIDIFICAÇÃO

**Temperatura (ou ponto) de solidificação** é sinônimo de temperatura de congelamento, constituindo constante física para óleos e gorduras. A técnica descrita prevê a separação, por saponificação seguida de hidrólise, dos ácidos graxos contidos na amostra, para posterior determinação da temperatura de solidificação destes.

*Separação dos ácidos graxos*

Transferir 75 ml de solução de hidróxido de potássio em glicerol (preparar dissolvendo 25 g de hidróxido de potássio em 100 ml de glicerol) para béquer de 1000 ml e aquecer a 150 °C. Adicionar 50 ml de amostra tratada conforme indicado acima (clarificada e fundida, se sólida) e prosseguir o aquecimento – com agitação freqüente – não permitindo à temperatura ultrapassar 150 °C. A saponificação é dada por concluída quando a mistura apresentar homogeneidade, sem vestígios de material particulado. Transferir a mistura para outro béquer de 1000 ml, contendo 500 ml de água quase fervente, juntar lentamente 50 ml de solução de ácido sulfúrico a 25% (V/V) e aquecer,

sob agitação freqüente, até separação definida de fase límpida (ácidos graxos). Lavar a fase graxa com água fervente a fim de isentá-la de ácido sulfúrico e mantê-la – em béquer pequeno – sobre banho-maria fervente até decantação da água, deixando límpida a fase oleosa. Filtrar e recolher a mistura de ácidos graxos enquanto ainda quente em béquer seco e dessecá-la a 150 °C durante 20 minutos. Transferir a mistura quente para frasco apropriado e mantê-la em banho de gelo até solidificação.

Para avaliar o grau de pureza dos ácidos graxos separados pelo procedimento acima, transferir – previamente ao congelamento – 3 ml da solução de ácidos graxos dessecados para tubo de ensaio e adicionar 15 ml de etanol. Aquecer a solução até fervura e juntar 15 ml de hidróxido de amônio 6 M. A solução resultante deve ser límpida.

**PROCEDIMENTO**

Proceder conforme instruções sob o título “Determinação da temperatura de congelamento” (V.2.4).

**V.3.3.4. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO**

Proceder conforme instruções sob o título ambiente e a 40 °C, respectivamente, para óleos "Determinação do índice de refração" (V.2.6) e gorduras.  
A determinação deve ser feita à temperatura

**V.3.3.5. DETERMINAÇÃO DO PODER ROTATÓRIO**

Proceder conforme instruções sob o título  
"Determinação do poder rotatório e do poder  
rotatório específico" (V.2.8).

## V.3.3.6. DETERMINAÇÃO DE ÁGUA E SEDIMENTOS

Materiais graxos pouco refinados – especialmente os de origem animal – contêm umidade e matéria estranha, para os quais são estabelecidos limites especificados nas monografias. A técnica de determinação de água e sedimentos em matérias graxas compreende a solubilização da fração lipídica da amostra em benzeno e a leitura, após centrifugação, do volume de fase aquosa contendo sedimentos.

*Centrífuga*

Empregar preferencialmente centrífuga com diâmetro de giro (medida da distância entre as extremidades dos tubos dispostos na horizontal) entre 38 e 43 cm, ajustando a velocidade de rotação para 1500 rpm. Evitar o uso de centrífuga angular. Centrífugas de dimensionamento diverso podem ser empregadas, calculando-se a velocidade de rotação (em rpm) pela fórmula

$$1500 \sqrt{\frac{40,6}{d}}$$

em que  $d$  corresponde ao diâmetro de giro da centrífuga, em cm.

Os tubos devem ser do tipo cônico, providos de tampa, com capacidade para 125 ml e graduados a partir da base.

**PROCEDIMENTO**

Transferir para dois tubos de centrifugação 50 ml de benzeno e adicionar 5 ml de amostra (aquecer ligeiramente o óleo, se necessário, para eliminar turvação provocada pela solidificação de ácido esteárico). Tampar, agitar os tubos com vigor e imergi-los em banho-maria a 50 °C durante 10 minutos. Centrifugar durante 10 minutos e ler os volumes de água e sedimentos nas bases de ambos os tubos. Repetir a operação por mais 10 minutos e repetir a leitura quantas vezes for necessário para que 3 leituras sucessivas forneçam resultado constante. Com base na soma dos volumes de depósito dos dois tubos, calcular a porcentagem, em volume, de água e sedimentos no material graxo.

## V.3.3.7. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ

O índice de acidez pode ser expresso em unidades de massa (mg de hidróxido de potássio necessários à neutralização de ácidos graxos livres em 1 g de amostra) ou de volume (ml de hidróxido de sódio 0,1 M necessários à neutralização dos ácidos graxos livres em 10 g de amostra). A técnica a seguir, compreendendo solubilização da tomada de ensaio em solvente orgânico e neutralização dos ácidos graxos livres nela contidos, leva diretamente à segunda definição, nada impedindo, contudo, a conservação do valor determinado para o primeiro conceito.

Índices de acidez elevados são sugestivos de hidrólise acentuada dos ésteres que compõem a matéria graxa. As causas da degradação incluem tratamentos químicos integrantes do processo industrial de extração e purificação, atividade bacteriana, ação catalítica (calor e luz), estocagem prolongada em condições inadequadas e a presença de impurezas, especialmente umidade. Cabe, todavia, salientar que a detecção de proporção elevada de ácidos graxos livres em uma amostra de óleo ou gordura não guarda relação com grau de rancificação, pois esta decorre de oxidação pelo

ar (e/ou bactérias) dos ácidos graxos livres.

## PROCEDIMENTO

Pesar exatamente cerca de 10,0 g de amostra e dissolver — em erlenmeyer de 250 ml — em 50 ml de mistura de partes iguais de álcool e éter, previamente neutralizada à fenolftaleína SI com hidróxido de sódio 0,1 M SV. Não ocorrendo dissolução, acoplar o frasco a condensador de refluxo vertical e aquecê-lo lentamente, sob agitação freqüente. Óleos saturados com dióxido de carbono (técnica de conservação) devem ser solubilizados na mistura solvente e aquecidos sob refluxo durante 10 minutos para assegurar a expulsão do gás. Opcionalmente, podem ser transferidos — previamente à amostragem — para cápsula de porcelana rasa e mantidos em dessecador à pressão reduzida durante 24 horas.

Para neutralizar os ácidos graxos livres, juntar 1 ml de fenolftaleína SI e titular com hidróxido de sódio 0,1 M SV até persistência da cor rósea pálida durante 30 segundos sob agitação. Proceder a ensaio em branco e corrigir o volume de titulante consumido.

## V.3.3.8. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO

Define-se **índice de saponificação** como a quantidade, em mg, de hidróxido de potássio necessária à neutralização dos ácidos graxos livres e saponificação dos ésteres presentes em 1 g de amostra. Óleos e gorduras naturais — em sua maioria misturas de ésteres triglicéridicos de ácidos de cadeia longa — apresentam índices de saponificação semelhantes. Entretanto, a determinação do índice de saponificação é relevante como indicio da presença de ácidos contendo menos de 16 ou mais de 18 átomos de carbono, pelo fato de seu valor ser inversamente proporcional ao peso molecular médio dos ácidos graxos presentes na amostra. O índice de saponificação também é indicador válido para adulterações de matéria graxa com substâncias insaponificáveis (óleo mineral, por exemplo).

## PROCEDIMENTO

Transferir 1,5 a 2,0 g, exatamente pesados, de amostra para frasco cônico de 250 ml e juntar 25 ml de hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV. Acoplar condensador de refluxo vertical ao

frasco e mantê-lo em banho de água fervente durante 30 minutos sob rotação freqüente. Se a amostra for constituída de óleo saturado com dióxido de carbono (técnica de conservação), transferi-la, previamente à pesagem, para cápsula de porcelana rasa e mantê-la em dessecador à pressão reduzida durante 24 horas. Adicionar 1 ml de fenolftaleína SI e titular o excesso de hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV com ácido clorídrico 0,5 M SV. Proceder à determinação paralela de branco e corrigir o volume de titulante consumido para a amostra. O índice de saponificação é fornecido pela fórmula

$$IS = \frac{V \cdot f \cdot 28,05}{m}$$

em que

V = volume corrigido de ácido clorídrico 0,5 M SV consumido,

f = fator de correção, se houver, do ácido clorídrico SV,

m = massa, em g, da tomada de ensaio.

## V.3.3.9. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ÉSTERES

Define-se índice de ésteres como a quantidade, em mg, de hidróxido de potássio necessária à saponificação dos ésteres presentes em 1,0 g de matéria graxa. Conclui-se que, para substâncias isentas de ácidos graxos livres, o índice de ésteres corresponde ao índice de saponificação. Além disso, é desnecessário determiná-lo quando o índice de acidez e o de saponificação forem conhecidos; neste caso, basta subtrair o primeiro do segundo para se chegar ao índice de ésteres.

## PROCEDIMENTO

Transferir 1,5 a 2,0 g, exatamente pesados, de amostra para frasco cônico de 250 ml e juntar

20 a 30 ml de álcool neutralizado à fenolftaleína SI. Misturar, adicionar 1 ml de fenolftaleína SI e titular com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV. Neutralizados os ácidos graxos livres, juntar ao frasco 25 ml de hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV e prosseguir conforme indicado sob "Determinação do índice de saponificação", a partir de "Acoplar condensador de refluxo . . .", omitindo, contudo, nova adição de fenolftaleína SI.

A diferença entre o número de ml de ácido clorídrico 0,5 M consumidos no ensaio e o número de ml gastos no branco multiplicada por 28,05 e dividida pelo peso da amostra em gramas é o índice de éster.



## V.3.3.10. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE IODO

Define-se **índice de iodo** como a quantidade, em g, de iodo absorvido sob condições determinadas, por 100 g de matéria graxa. O índice de iodo constitui, pois, medida quantitativa do grau de insaturação dos ácidos graxos — esterificados e livres — presentes na amostra.

A técnica descrita baseia-se na incorporação de quantidade exata de mistura de iodo e bromo à amostra; parte é adicionada às duplas ligações das cadeias dos ácidos e o excesso de iodo, liberado pela adição ao meio de quantidade correspondente de iodeto de potássio, é titulado com solução padrão de tiosulfato de sódio.

O valor encontrado na determinação é sugestivo do grau de pureza do material ensaiado assim como da presença de adulterantes: óleos secantes (óleos de linhaça e de fígado de bacalhau, por exemplo) apresentam índices de iodo elevados, acima de 120, enquanto óleos não secantes (azeite de oliva, por exemplo) geralmente fornecem índices inferiores a 100 e gorduras animais, tipicamente saturadas, apresentam índices de iodo reduzidos, abaixo de 90.

## PROCEDIMENTO (MÉTODO DE HANUS)

Transferir cerca de 800 mg de gordura (sólida) ou 200 mg de óleo, exatamente pesados, para frasco de iodo de 250 ml e juntar 10 ml de cloro-

fórmio para dissolução. Adicionar 25 ml de brometo de iodo SR, tampar o frasco e deixá-lo em repouso ao abrigo da luz durante 30 minutos, sob agitação ocasional. Em seguida, adicionar 30 ml de iodeto de potássio SR e 100 ml de água (nessa ordem) e titular o iodo liberado com tiosulfato de sódio 0,05 M SV. Próximo à viragem (a solução titulada adquire cor amarela pálida), juntar 3 ml de amido SR e prosseguir titulando até desaparecimento da cor azul. Executar branco paralelo e proceder à necessária correção do volume de titulante consumido para a amostra. O índice de iodo é obtido pela fórmula

$$\text{Índice de } I_2 = \frac{V \cdot f \cdot 1,269}{m}$$

em que

V = volume corrigido de tiosulfato de sódio 0,05 M SV consumido,

f = fator de correção, se houver, do tiosulfato de sódio SV,

m = massa, em g, da tomada de ensaio.

*Observação:* A tomada de ensaio deve ter grandeza adequada para consumir até cerca de 50% da solução de brometo de iodo. Do contrário, o resultado da determinação não é confiável, sendo necessário repeti-la com tomada de ensaio menor.

## V.3.3.11. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDOS

O índice de peróxidos exprime o volume, em ml, de solução volumétrica diluída de tiosulfato de sódio necessário à titulação indireta (excesso de iodo) dos peróxidos presentes em 1 g de matéria graxa.

O valor encontrado é critério de avaliação para rancidez incipiente (pré-rancidez, caracterizada pela formação de peróxidos instáveis) e indica o estado de conservação da matéria graxa. Os limites são estabelecidos nas monografias.

## PROCEDIMENTO

Transferir cerca de 1 g, exatamente pesado, de amostra para frasco de iodo de 250 ml e juntar

25 ml de mistura de 2 volumes de ácido acético glacial e 1 volume de clorofórmio, agitando até dissolução da amostra. Adicionar 1 ml de solução saturada de iodeto de potássio, tampar o frasco e deixá-lo em repouso durante 1 minuto. Juntar 35 ml de água e titular o iodo liberado com tiosulfato de sódio 0,001 M SV. Próximo à viragem (a solução titulada adquire cor amarela pálida), juntar 1 ml de amido SR e prosseguir titulando até desaparecimento da cor azul. Executar branco paralelo e proceder à necessária correção do volume de titulante consumido para a amostra. O índice de peróxidos é fornecido pela fórmula  $V/m$ , em que  $V$  é o volume corrigido, em ml, de tiosulfato de sódio 0,001 M consumido e  $m$  corresponde à massa, em g, da tomada de ensaio.

## V.3.3.12. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE HIDROXILA

O índice de hidroxila exprime a quantidade, em mg, de hidróxido de potássio necessária à neutralização do ácido formado na acilação — com anidrido acético — das hidroxilas contidas em 1 g de amostra. O método é aplicável a substâncias graxas e derivados, inclusive álcoois graxos, mono e diglicerídios e ácido hidroxies-térico.

O valor determinado é inversamente proporcional ao peso molecular das cadeias constituintes da amostra e índices muito reduzidos, por exemplo, sugerem adulteração da substância com álcoois superiores ou com substâncias graxas não alcólicas (parafinas etc.).

## PROCEDIMENTO

Transferir a quantidade especificada (Tabela anexa), exatamente pesada, de substância para frasco cônico de 250 ml provido de tampa esmerilhada. Juntar 5 ml de mistura anidrido acético-piridina SR e acoplar o frasco a condensador de refluxo (juntas esmerilhadas). Mantê-lo sob aquecimento em banho-maria fervente durante 1 hora, ajustando o nível de água do banho 2 a 3 cm acima do nível de líquido no frasco. Em seguida, adicionar 10 ml de água através do condensador e manter sob aquecimento durante 10 minutos adicionais. Deixar resfriar e verter — ainda pelo

condensador — 15 ml de álcool butílico, previamente neutralizado à fenolftaleína SI com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV. Remover o condensador e — aproveitando para lavar a parede do frasco — adicionar mais 10 ml de álcool butílico neutralizado. Adicionar cerca de 1 ml de fenolftaleína SI e titular com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV até viragem para rosa-pálido. Tratar, paralelamente, outro frasco da forma descrita acima, omitindo a amostra (branco).

O cálculo do índice de hidroxila requer a consideração da acidez livre da amostra original. Para tanto, adotar o volume de titulante obtido na determinação do índice de acidez da amostra ou proceder como segue: transferir para frasco cônico, com 125 ml de capacidade, cerca de 10 g de amostra, exatamente pesados, e juntar 10 ml de piridina recém-preparada e neutralizada à fenolftaleína SI com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV. Juntar cerca de 1 ml de fenolftaleína SI e titular, até viragem para rosa-pálido, com hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV.

Calcular o índice de hidroxila pela fórmula

$$I_{OH^-} = (56,11 M/T_1) [V_1 + (T_1 V_3/T_2) - V_2]$$

em que

M = molaridade exata da solução padrão de hidróxido de potássio alcoólico,

T<sub>1</sub> = massa, em g, da tomada de ensaio empregada para a acetilação,

T<sub>2</sub> = massa, em g, da tomada de ensaio empregada na determinação da acidez livre,

V<sub>1</sub> = volume, em ml, de solução padrão consumida pelo branco,

V<sub>2</sub> = volume, em ml, de solução padrão consumida pela amostra acetilada,

V<sub>3</sub> = volume, em ml, de solução padrão consumida na titulação da acidez livre.

<i>Índice de hidroxila esperado</i>	<i>Massa da tomada de ensaio (g)</i>
0 a 20	10
20 a 50	5
50 a 100	3
100 a 150	2
150 a 200	1,5
200 a 250	1,25
250 a 300	1,0
300 a 350	0,75

## V.3.3.13. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACETILA

O índice de acetila, cujo objetivo é estabelecer o grau de presença de álcoois livres em substâncias graxas, é calculado com base na diferença entre índices de saponificação da substância acetilada pela técnica descrita a seguir e da substância não-acetilada. Corresponde à quantidade de álcali — em mg de hidróxido de potássio — necessária à neutralização do ácido acético liberado na hidrólise de 1 g de substância acetilada.

## PROCEDIMENTO

Transferir 10 g de substância e 20 ml de anidrido acético para balão de fundo redondo e gargalo longo, com 200 ml de capacidade, fixado a condensador de refluxo. Apoiar o frasco sobre tela de amianto em cujo centro tenha sido cortado orifício de cerca de 4 cm de diâmetro e aquecer sobre chama de bico de gás com altura máxima de 25 mm (evitando que a chama alcance a base do balão). Manter em ebulição regular durante 2 horas, resfriar e transferir o conteúdo do balão para béquer de 1000 ml contendo 600 ml de água. Adicionar 0,2 g de pó de pedra-pomes e ferver durante 30 minutos. Resfriar e transferir a mistura

para funil de separação, rejeitando a camada aquosa inferior. Lavar a substância acetilada com 3 ou mais porções de 50 ml de solução saturada quente de cloreto de sódio até que a solução de lavagem não mais forneça reação ácida ao papel de tornassol. Juntar ainda 20 ml de água quente ao funil e agitar, removendo, em seguida, o mais completamente possível, a fase aquosa. Transferir a substância para cápsula de porcelana, juntar 1 g de sulfato de sódio pulverizado (desidratante), misturar bem e filtrar através de papel de filtro pregueado.

Determinar o índice de saponificação da substância original, não-acetilada, e da substância acetilada pelo procedimento acima e calcular o índice de acetila pela fórmula

$$I_{Ac} = \frac{(b - a) 1335}{1335 - a}$$

em que

$a$  = índice de saponificação da substância original,

$b$  = índice de saponificação da substância acetilada.

## V.3.3.14. DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL

Matéria insaponificável em gorduras e óleos é a parcela da substância que, embora solúvel em solventes lipófilos clássicos, não se deixa saponificar por hidróxidos alcalinos. Igualmente incluídos na definição estão os produtos de saponificação lipossolúveis.

A fração insaponificável de óleos e gorduras geralmente consiste de fitosteróides ou colesterol e taxas anormalmente elevadas indicam a presença de adulterantes.

## PROCEDIMENTO

Na falta de especificação de tomada de ensaio na monografia, transferir 5,0 g, exatamente pesados, de matéria graxa para frasco cônico de 250 ml, juntar solução de 2 g de hidróxido de potássio em 40 ml de álcool e aquecer o frasco durante 2 horas sob banho-maria fervente, acoplado-lhe previamente condensador de refluxo vertical. Retirar o condensador e prosseguir no aquecimento até evaporação do álcool e dissolver

o resíduo em 50 ml de água quente. Transferir a solução para funil separador provido de tampa de politetrafluoretileno (Teflon), lavando o frasco com 2 porções de 25 ml de água e juntando também essa água ao funil. Resfriar à temperatura ambiente, juntar algumas gotas de álcool para precipitar a separação de fases e extrair a fase oleosa com 2 porções de 50 ml de éter etílico, combinando os extratos etéreos em outro funil separador. Lavar os extratos combinados com 20 ml de hidróxido de sódio 0,1 M, com 20 ml de hidróxido de sódio 0,2 M e, finalmente, com porções de 15 ml de água até que a última não se avermelhe pela adição de 2 gotas de fenolftaleína SI. Transferir os extratos etéreos, bem como porção de 10 ml de éter etílico empregado na lavagem do funil, para copo tarado. Evaporar o éter até secura em banho-maria fervente e dessecar o resíduo durante 30 minutos a 100 °C. Esfriar em dessecador durante 30 minutos e pesar o resíduo (substância insaponificável na tomada de ensaio). Calcular o resultado em porcentagem.

## V.3.4. ENSAIOS QUÍMICOS

## V.3.4.1. TITULAÇÕES POR DIAZOTAÇÃO

O doseamento com nitritos é método de utilidade na determinação quantitativa de aminas aromáticas primárias, em geral, e de sulfonâmidos, em particular.

Existem, basicamente, dois métodos de doseamento com nitritos:

O método 1 emprega como indicador goma de amido iodetado ou papel de amido iodetado. O excesso de ácido nitroso, em consequência da reação com o ácido iodídrico do indicador, libera iodo, responsável pela cor azul característica da reação com o amido.

O método 2 compreende a determinação potenciométrica do ponto final da titulação. Este método emprega eletrodos adequados — platina-calomelano ou platina-platina —, que devem ter diferença de potencial de 50 a 100 mV. A sensibilidade do dispositivo que mede a corrente deve variar de 0,1 a 1 nA. Pode-se utilizar agitação mecânica ou magnética ou, eventualmente, corrente de nitrogênio através da solução para misturá-la. Após o uso, deve-se ter o cuidado de imergir os eletrodos por alguns segundos em ácido nítrico SR ao qual se adicionou 1 mg/ml de cloreto férrico, lavando-os em seguida com água.

## MÉTODO 1

Técnica — Pesar exatamente cerca de 500 mg, em se tratando de derivado sulfonamídico, ou quantidade especificada na monografia correspondente, quando se trata de outro tipo de amina aromática primária. Transferir para erlenmeyer de 250 ml, adicionando, com agitação, 100 ml de ácido clorídrico SR para dissolver a amostra. Em seguida, adicionar cerca de 30 ml de água e 20 g de gelo picado. Após resfriamento a aproximadamente 15 °C, titular a amostra lentamente com solução de nitrito de sódio 0,1 M SV, previamente padronizada com sulfanilamida padrão. Atinge-se o ponto final de titulação quando uma gota do líquido da solução do erlenmeyer der imediatamente mancha azul sobre a goma de amido iodetado SI, colocada em placa de toque, ou sobre papel de amido iodetado SI umedecido. Para se comprovar o término da titulação, repetir a prova de toque 2 minutos após

a última adição. Esta deve continuar positiva.

Caso tenha sido empregado, inadvertidamente, excesso de titulante, adicionar quantidade conhecida do sulfonamídico e proceder à titulação por retorno. Para tanto, acrescentar quantidade conhecida da amostra e titular o excesso com a solução de nitrito de sódio 0,1 M SV.

O peso, em mg, da amostra correspondente a cada ml de nitrito de sódio 0,1 M SV encontra-se descrito na monografia de cada fármaco em particular.

## MÉTODO 2

Técnica — Pesar exatamente cerca de 500 mg, quando se tratar de sulfonamídico, ou a quantidade especificada na monografia, quando se tratar de outras aminas aromáticas primárias. Transferir para erlenmeyer e adicionar 20 ml de ácido clorídrico SR e 50 ml de água. Agitar até dissolução. Resfriar para 15 °C, mantendo esta temperatura no curso da titulação. Caso for especificado, acrescentar catalisador adequado. Titular, lentamente e sob agitação, com nitrito de sódio 0,1 M SV, previamente padronizado com sulfanilamida. A ponta da bureta deve permanecer pouco acima da superfície da solução, a fim de evitar a oxidação do nitrito de sódio. Deve-se, outrossim, impedir a agitação rápida, que forma um vórtice de ar abaixo da superfície. No início da titulação, a agulha do registrador apresenta deflexão a cada volume do titulante adicionado, voltando, em seguida, ao ponto de origem. Quando a titulação estiver a aproximadamente 1 ml do ponto final calculado, acrescentar volumes de 0,1 ml em intervalos de, no mínimo, 1 minuto. Ao se atingir o ponto final da titulação, não se observa deflexão alguma.

O peso, em mg, da amostra que equivale a cada ml de nitrito de sódio 0,1 M SV adicionado encontra-se especificado na monografia de cada fármaco em particular.

No doseamento de sulfonâmidos ou outras aminas aromáticas primárias na forma de comprimidos, determinar o peso médio de 20 comprimidos e, após pulverização, pesar o equivalente a 500 mg de princípio ativo. No caso de injetáveis ou outras formas líquidas deve-se pipetar quantidade equivalente a 500 mg de princípio ativo. No restante, o procedimento é análogo.

## V.3.4.2. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO PELO MÉTODO DE KJELDAHL

O método de Kjeldahl, descrito na forma de macro e de semi-microtécnica, destina-se à determinação de nitrogênio em substâncias relativamente lábeis como amidas e aminas. Compreende duas fases: (1) mineralização — digestão catalítica da substância orgânica em ácido sulfúrico — com a decorrente conversão quantitativa do nitrogênio presente em sulfato de amônio; (2) destilação do digesto alcalinizado, sendo a amônia liberada no processo doseada por volumetria.

## V.3.4.2.1. MÉTODO I (MACRODETERMINAÇÃO)

Transferir cerca de 1 g de amostra, exatamente pesado, para balão Kjeldahl de 500 ml. Juntar 10 g de sulfato de potássio, 0,5 g de sulfato cúprico e 20 ml de ácido sulfúrico. Inclinando o balão cerca de 45° e aquecer lentamente, mantendo a temperatura abaixo do ponto de ebulição enquanto houver desenvolvimento de espuma. Aumentar a temperatura até que o ácido ferva de modo regular e prosseguir no aquecimento até 30 minutos após a mistura ter ficado límpida e adquirido cor verde-clara. Deixar esfriar, juntar 150 ml de água, misturar e esfriar novamente. Juntar cuidadosamente 100 ml de solução a 40% (p/V) de hidróxido de sódio, permitindo que o álcali escorra pela parede do balão e forme fase independente sob a solução ácida. Adicionar pequena quantidade de zinco granulado e, sem demora, conectar o balão ao bulbo de isolamento previamente fixo a condensador, cuja outra extremidade esteja imersa em 100 ml de solução a 5% (p/V) de ácido bórico em erlenmeyer de 500 ml. Misturar as fases no balão, por agitação suave, e destilar até que cerca de 80% do volume contido no balão tenham sido destilados. Adicionar cerca de 3 gotas de vermelho de metila SI ao frasco receptor e titular com ácido sulfúrico 0,25 M SV. Fazer ensaio em branco e proceder à necessária correção no volume de titulante consumido. Cada ml de ácido sulfúrico 0,25 M SV equivale a 7,003 mg de nitrogênio. Para amostras com baixos níveis de nitrogênio, empregar ácido sulfúrico 0,05 M SV. Neste caso, cada ml equivale a 1,401 mg de nitrogênio.

*Na presença de nitratos ou nitritos*

Transferir quantidade exatamente pesada de amostra, correspondendo a cerca de 150 mg de

nitrogênio, para balão Kjeldahl de 500 ml e juntar 25 ml de ácido sulfúrico contendo 1 g de ácido salicílico dissolvido. Misturar e aguar durante cerca de 30 minutos, agitando com frequência. Juntar 5 g de tiossulfato de sódio, misturar e, em seguida, adicionar 0,5 g de sulfato cúprico. Prosseguir conforme indicado na técnica já descrita, a partir de "Inclinando o balão cerca de 45°...". Quando o conteúdo de nitrogênio na amostra exceder 10%, juntar — previamente à digestão — 0,5 a 1,0 g de ácido benzóico para facilitar a decomposição da substância.

V.3.4.2.2. MÉTODO II  
(SEMI-MICRODETERMINAÇÃO)

Transferir quantidade exatamente pesada de substância, correspondente a 2-3 mg de nitrogênio, para balão de Kjeldahl compatível com o aparelho. Juntar 1 g de sulfato de potássio e 0,1 g de sulfato cúprico e, se for o caso, lavar os sólidos aderentes ao gargalo com fino jato de água. Juntar 7 ml de ácido sulfúrico e, em seguida, 1 ml de peróxido de hidrogênio a 30% (V/V), tomando a precaução de, nas duas adições, permitir que os líquidos escurram pela parede do balão. Aquecer o frasco e manter a digestão até desaparecimento dos resíduos de carbonização e a solução azul-clara se mostrar perfeitamente límpida. Cuidadosamente, juntar 20 ml de água e esfriar. Conectar o balão ao aparelho de destilação indireta, por vapor e, através do funil, juntar 30 ml de solução a 40% (p/V) de hidróxido de sódio. Lavar o funil com água e, sem demora, proceder à destilação. Recolher o destilado em erlenmeyer de 250 ml contendo 15 ml de solução a 5% (p/V) de ácido bórico, cerca de 25 ml de água e 3 gotas de vermelho de metila SI. Certificar-se de que a extremidade do condensador esteja imersa — por meio de tubo de vidro ligado ao condensador por junta apropriada — no líquido coletor, antes de iniciar a destilação. Destilar até que o volume de destilado atinja 80 a 100 ml; remover o frasco coletor, lavar as paredes com pequena quantidade de água e titular com ácido sulfúrico 0,005 M SV. Fazer ensaio em branco e proceder à necessária correção no volume de titulante consumido. Cada ml de ácido sulfúrico 0,005 M SV equivale a 0,1401 mg de nitrogênio.

## V.3.4.3. MÉTODO DE COMBUSTÃO EM FRASCO DE OXIGÊNIO

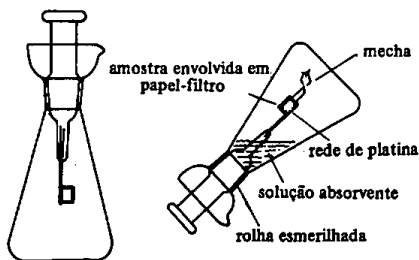
O método do frasco de combustão constitui variedade de análise elementar destinada à identificação e/ou doseamento de substâncias orgânicas segundo seu conteúdo em halogênios ou enxofre.

A amostra é submetida à combustão em frasco apropriado, em ambiente de oxigênio, sendo o halogênio gasoso ou dióxido de enxofre formados no processo absorvidos em soluções apropriadas, nas quais são convertidos em formas químicas doseáveis por métodos volumétricos.

## APARELHAGEM

Compreende frasco de iodo de parede grossa (cerca de 2 mm), de vidro refratário resistente, com capacidade nominal de 500 ml. Para a técnica de determinação de flúor, emprega-se frasco de quartzo.

À base da tampa esmerilhada que acompanha o frasco, fixa-se, por fusão, segmento de bastão de vidro ao qual, também por fusão, é fixado fio de platina em cuja extremidade se encontra anexada rede de platina com abertura de malha 425  $\mu\text{m}$ . As dimensões encontram-se na ilustração anexa.



Frasco de oxigênio para análise de enxofre e halogênios.

## PROCEDIMENTO

*Amostras sólidas*

Pesar a quantidade especificada de substância (correspondente a cerca de 2-3 mg do elemento sob análise) em pedaço de papel de filtro de formato e dimensões apropriadas, dobrar e prender o pacote assim preparado na tela de platina, deixando livre a mecha. Umedecer o gargalo do frasco com água, colocar em seu interior a solução absorvente especificada e borbulhar oxigênio nesta solução com o intuito de expulsar o ar e saturar o ambiente do frasco e a solução absorvente com o gás. Acender a mecha (veja Nota 1) e, sem demora, colocar a tampa no frasco, mantendo-a em posição com firmeza para evitar seu

deslocamento devido à pressão exercida pelos gases de ignição. Iniciada a combustão, inverter o frasco para assegurar vedação líquida na tampa, tomando a precaução de evitar que material incompletamente queimado caia no líquido. Concluída a combustão, agitar o frasco ocasionalmente, até que a fumaça branca formada no processo desapareça. Decorridos 15 a 30 minutos, colocar pequena porção de água na borda do frasco e remover a tampa, permitindo que esta água flua para o interior do frasco, lavando as paredes do gargalo. Lavar tampa, gargalo, fio e rede de platina com água e juntar estas águas de lavagem à solução absorvente. A solução obtida segundo este procedimento é designada solução-amostra. Para o preparo do branco, proceder da maneira descrita, omitindo a amostra (Nota 2).

*Amostras líquidas*

Enrolar pequena quantidade de algodão absorvente em pedaço de papel de filtro provido de mecha e pesar, neste dispositivo, a quantidade especificada da amostra, que é absorvida no algodão. Após a fixação do algodão envolvido no papel de filtro à grade de platina, proceder à combustão tal como descrita para amostras sólidas.

*Determinação de cloro e bromo*

Queimar a quantidade especificada de substância sob exame da forma descrita, empregando como solução absorvente 20 ml de água acrescidos de 1 ml de peróxido de hidrogênio (100 volumes) e 3 ml de hidróxido de sódio 0,1 M. Concluída a absorção, juntar 2 gotas de azul de bromofenol SI e quantidade suficiente de ácido nítrico 0,1 M para virar o indicador de azul para amarelo, incorporando 0,5 ml de excesso. Se a substância em análise contiver enxofre, adicionar algumas gotas de nitrato de bário 0,005 M. Juntar 100 ml de etanol aproveitando a adição para lavar as paredes internas do frasco e, em seguida, 15 gotas de difenilcarbazona SI. Titular com nitrato de mercúrio(II) 0,005 M SV até coloração rósea permanente. Cada ml de nitrato de mercúrio(II) 0,005 M SV equivale a 0,3550 mg de cloro ou a 0,79904 mg de bromo.

*Determinação de iodo*

Queimar a quantidade especificada de substância sob exame da forma descrita, empregando como líquido absorvente 10 ml de água acrescidos de 2 ml de hidróxido de sódio M. Concluída a absorção, juntar 1 ml de solução de hidrato de hidrazina 4 M em água, tampar novamente o frasco



e agitar até descoloramento da solução. Em seguida, proceder como descrito em *Determinação de cloro e bromo* a partir de "Concluída a absorção...". Cada ml de nitrato de mercúrio(II) 0,005 M SV equivale a 1,269 mg de iodo.

#### *Determinação de flúor*

Queimar quantidade especificada de substância sob exame da forma descrita, empregando como líquido absorvente 15 ml de água. Completada a operação, lavar tampa, fio de platina, tela de platina e paredes do frasco (Nota 3) com 40 ml de água. Adicionar 0,6 ml de alizarina SI e, em seguida, gota a gota, hidróxido de sódio 0,1 M até que a cor mude de rosado para amarelo. Adicionar 5 ml de solução tampão acetato pH 3 e titular com nitrato de tório 0,005 M SV até que a cor amarela mude para amarelo rosado. Cada ml de nitrato de tório 0,005 M SV equivale a 0,380 mg de flúor. Havendo dificuldade na identificação do ponto de viragem, fazer ensaio preliminar com solução padronizada de flúor inorgânico.

#### *Determinação de enxofre*

Queimar a quantidade especificada de substância sob exame da forma descrita, empregando

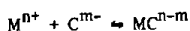
como líquido absorvente 12,5 ml de peróxido de hidrogênio SR. Concluída a absorção, juntar 40 ml de água, aproveitando para lavar tampa, fio e tela de platina e paredes do frasco. Ferver a solução por 10 minutos, esfriar, adicionar 2 ml de ácido acético SR e 20 ml de etanol SR. Titular com nitrato de bário 0,01 M SV, usando 2 gotas de torina SI e 2 gotas de cloreto de metiltionínio SI como indicador até que a cor amarela mude para rósea. Cada ml de nitrato de bário 0,01 M SV equivale a 0,3206 g de enxofre.

#### NOTAS

1. Recomenda-se ao analista usar óculos de segurança e proteção adequada para evitar que estilhaços de frasco o atinjam em caso de acidente.
2. Assegurar-se de que os frascos de combustão estejam escrupulosamente limpos e isentos de traços de solventes orgânicos.
3. Substâncias contendo flúor fornecem teores baixos se a combustão for executada em frascos de vidro borossilicato. Obtém-se resultados satisfatórios em frascos de vidro-soda isento de boro mas o rendimento ideal implica no emprego de frascos de sílica (quartzo).

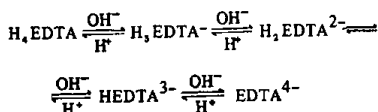
## V.3.4.4. TITULAÇÕES COMPLEXOMÉTRICAS

Complexometria é método analítico volumétrico que compreende a titulação de íons metálicos com agentes chamados complexantes. A reação envolvida é do seguinte tipo:



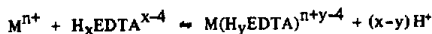
Muitos complexantes, denominados quelantes, são capazes de formar estruturas cíclicas através da coordenação simultânea de vários grupos da molécula, junto ao íon metálico. O ácido edético (etilenodiaminatetracético, EDTA) é exemplo típico. Este ácido consiste no agente complexante mais utilizado em complexometria.

Como a maioria dos agentes complexantes, o EDTA apresenta vários equilíbrios ácido-base em função do pH:



Em pH 2,3, 50% do EDTA estão presentes na forma de  $H_3EDTA^-$ ; em pH 4,5, cerca de 90% encontram-se na forma de  $H_2EDTA^{2-}$ . Em pH 8,1, todo o EDTA é encontrado na forma de  $HEDTA^{3-}$ . Acima de pH 12,5, o EDTA estará ionizado completamente.

Dessa maneira, a formação de complexos em solução compreende uma série de equilíbrios do tipo:



Na complexometria, o ponto de viragem pode ser determinado visual ou instrumentalmente. Via de regra empregam-se indicadores complexantes que exibem profundas alterações de cor mediante coordenação com o metal. Exemplos típicos são: ácido calconcarboxílico, alaranjado de xilenol, calcona, calmagita, murexida, negro de eriocromo-T e violeta de pirocatecol.

O indicador complexométrico atua de forma competitiva com o agente titulante, devendo ser deslocado efetivamente pelo mesmo nas proximidades do ponto de equivalência. De modo análogo ao agente titulante, a ação do indicador também é afetada pelo pH. Assim, a escolha adequada do indicador e o controle do pH (por exemplo, através de tampões) tomam-se fatores decisivos na análise complexométrica.

Há quatro tipos de titulação complexométrica: direta, por retorno, por substituição e indireta.

Na titulação direta, que é mais simples e mais freqüentemente usada, adiciona-se solução padrão

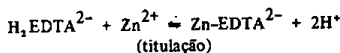
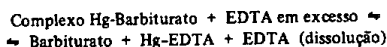
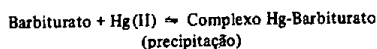
do agente quelante à solução contendo o íon metálico até o ponto de viragem, que é detectado por método conveniente. Emprega-se este método para dosear, pelo EDTA, os íons alumínio, ferro (II), cálcio, magnésio, zinco, cádmio, cobre (II), níquel, cobalto, chumbo (II), bário, manganês, mercúrio e muitos outros.

Na titulação por retorno adiciona-se excesso conhecido da solução padrão do agente quelante à do íon metálico e titula-se este excesso por retorno com solução padrão de um segundo íon metálico, até viragem. Por este método podem ser doseados chumbo (II), alumínio, mercúrio (II) e níquel. Uma das vantagens deste método é a possibilidade de titular metais na forma de sais insolúveis; assim, o sulfato de bário é dissolvido em excesso de EDTA amoniacal e titula-se por retorno com magnésio.

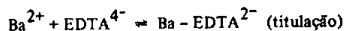
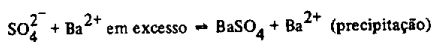
A titulação por substituição consiste em deslocar quantitativamente um segundo metal  $M_{II}$  de um complexo pelo metal  $M_I$  que está sendo doseado e, em seguida, dosear diretamente, por solução padrão do agente quelante, o segundo metal assim liberto; a partir destes dados calcula-se o teor de  $M_I$  no sistema. Usa-se este método para dosear cálcio, chumbo, mercúrio e ferro (III).

A titulação indireta é usada para dosear íons, tais como ânions, que não reagem com um agente quelante. Duas maneiras são utilizadas neste método:

a) Precipita-se quantitativamente a substância doseada fazendo-a reagir com um íon metálico; retira-se o complexo por filtração; redissolve-se este complexo com excesso de solução padrão de EDTA e titula-se este excesso com solução padrão de um íon metálico apropriado. Usando-se este artifício é possível dosear barbitúricos, que não reagem com o EDTA, pela análise complexométrica.



b) Precipita-se o ânion com excesso de metal apropriado e titula-se o metal em excesso no filtrado com solução padrão de EDTA. Desta maneira é possível dosear, por exemplo, os sulfatos.



**PROCEDIMENTOS***Alumínio*

Pesar exatamente a quantidade da substância indicada na monografia, dissolver em 2 ml de ácido clorídrico *M* e 50 ml de água, salvo se a monografia indicar outro tipo de solvente. Juntar 25 ml de EDTA dissódico 0,1 *M* SV e 10 ml da mistura, em volumes iguais, da solução de acetato de amônio 2 *M* e ácido acético 2 *M*. Aquecer até ebulição, deixando a solução ferver durante 2 minutos. Resfriar. Juntar 50 ml de etanol e 3 ml de solução recém-preparada de ditizona em etanol 0,025% (p/V). Titular o excesso de EDTA dissódico com sulfato de zinco 0,1 *M* SV até mudança da cor de azul-esverdeada para violeta-rósea. Cada ml de EDTA dissódico 0,1 *M* SV é equivalente a 2,698 mg de alumínio.

*Bismuto*

Pesar exatamente a quantidade da substância indicada na monografia e dissolver em quantidade mínima de ácido nítrico 2 *M*. Juntar 50 ml de água e ajustar o pH a 1,0-2,0 adicionando gota a gota, e com agitação, ácido nítrico 2 *M* ou hidróxido de amônio 5 *M*. Usar como indicador alaranjado de xilenol SI. Titular lentamente com EDTA dissódico 0,05 *M* SV até mudança da cor de violeta-rósea para amarela. Cada ml de EDTA dissódico 0,05 *M* SV é equivalente a 10,45 mg de bismuto.

*Cálcio*

Pesar exatamente a quantidade da substância indicada na monografia, dissolver em alguns ml de água e acidificar, se necessário, com quantidade mínima de ácido clorídrico 2 *M*. Diluir a aproximadamente 100 ml com água. Titular com EDTA dissódico 0,05 *M* SV até cerca de 2 ml antes do ponto de equivalência previsto. Adicionar 4 ml de hidróxido de sódio 10 *M* e gotas de

calcona SI. Prosseguir a titulação até que a cor mude de rósea para azul intensa. Cada ml de EDTA dissódico 0,05 *M* SV é equivalente a 2,004 mg de cálcio.

*Chumbo*

Pesar exatamente a quantidade da substância indicada na monografia e dissolver em 5 a 10 ml de água, ou na quantidade mínima de ácido acético 5 *M*. Diluir a 50 ml com água. Juntar gotas de alaranjado de xilenol SI e metenamina suficiente (aproximadamente 5 g) para que a solução adquira cor violeta. Titular com EDTA dissódico 0,05 *M* SV ou 0,1 *M* SV, conforme indicado na monografia, até mudança da cor de violeta para amarela. Cada ml de EDTA dissódico 0,05 *M* SV é equivalente a 10,35 mg de chumbo.

*Magnésio*

Pesar exatamente a quantidade da substância indicada na monografia e dissolver em 5 a 10 ml de água, ou na quantidade mínima de ácido clorídrico 2 *M*. Diluir a 50 ml com água. Juntar 10 ml de solução-tampão de cloreto de amônio, pH 10,0, e negro de eriocromo T SI. Titular com EDTA dissódico 0,05 *M* SV ou 0,1 *M* SV, conforme indicado na monografia, até mudança da cor de violeta para azul. Cada ml de EDTA dissódico 0,05 *M* SV é equivalente a 1,215 mg de magnésio.

*Zinco*

Pesar exatamente a quantidade de substância indicada na monografia e dissolver em 5 a 10 ml de alaranjado de xilenol SI e metenamina suficiente (cerca de 5 g) para conferir cor violeta à solução. Titular com EDTA dissódico 0,05 *M* SV ou 0,1 *M* SV, conforme indicado na monografia, até mudança da cor de violeta para amarela. Cada ml de EDTA dissódico 0,05 *M* SV é equivalente a 3,268 mg de zinco.

## V.3.4.5. TITULAÇÕES EM MEIO NÃO-AQUOSO

Os fármacos que não podem ser doseados em meio aquoso, por serem demasiadamente pouco básicos ou pouco ácidos, são doseados em meio não-aquoso, que é método rápido e exato, permitindo, além disso, dosear misturas de fármacos.

Visto que, neste método de doseamento, se usam solventes orgânicos, deve-se levar em conta o alto coeficiente de expansão cúbica da maioria em relação ao da água. Isso porque há possibilidade de ocorrer variação do teor do titulante em meio não-aquoso em função da temperatura. Corrige-se, então, o volume do titulante e, por conseguinte, seu título, multiplicando-o pela fórmula

$$1 + \text{coeficiente de expansão cúbica do solvente} \\ (t_0 - t)$$

em que

$t_0$  = temperatura de padronização do titulante,  
 $t$  = temperatura de utilização do titulante.

São inúmeros os compostos químicos, incluindo os fármacos, que podem ser doseados com vantagem em meio não-aquoso: ácidos carboxílicos, aminoácidos, anidrido de ácidos, enóis do tipo dos barbitúricos e das xantinas, fenóis, haletos de ácidos, imidas, pirróis, sulfas, aminas, compostos de amônio quaternário, compostos heterocíclicos nitrogenados, sais alcalinos dos ácidos orgânicos, sais alcalinos dos ácidos inorgânicos, alguns sais de aminas.

A titulação em meio não-aquoso baseia-se no conceito ácido-básico de Brønsted-Lowry. Segundo esses autores, ácido é a substância que tem a capacidade de doar prótons e base é aquela que tem a capacidade de receber prótons. Assim, substâncias potencialmente ácidas podem funcionar como ácidos somente em presença de base à qual possam doar próton e vice-versa. O solvente desempenha, por conseguinte, papel muito importante na determinação do caráter ácido-básico de uma substância, já que dele depende o meio necessário para que um ou outro caráter seja ressaltado. A água deveria ser o solvente de escolha, porquanto de fácil disponibilidade. No entanto, por seu caráter anfotérico — ácido e básico — pode competir com a base ou com o ácido a ser determinado pela captação ou doação do próton se tais compostos forem mais fracos do que a água. Tais substâncias não seriam, portanto, tituláveis em meio aquoso.

Como resultado da interação entre soluto e solvente, dois são os efeitos possíveis de serem observados: *efeito nivelador* e *efeito diferenciador* do solvente. Pelo *efeito nivelador* não se pode comparar a força, quer ácida quer básica, de dois solutos, visto que se mostrarão idênticos neste particular. Assim é que, em água, os ácidos carbo-

xílicos são fracos, mas tomam-se completamente ionizados quando em amônia líquida. A alta basicidade desta última exerce, portanto, efeito nivelador sobre as forças aparentes dos ácidos nela dissolvidos. Os ácidos carboxílicos assemelham-se, nestas condições, aos ácidos minerais comuns, fortemente ácidos. Analogamente, a força aparente de uma base pode ser ressaltada pelo efeito nivelador de solventes ácidos. Assim, aminas, éteres, amidas, cetonas e nitrocompostos e mesmo certos hidrocarbonetos aromáticos são fracamente básicos na presença de água. Tornam-se, contudo, fortes ao serem dissolvidos em ácido sulfúrico 95 a 100%, que exerce, com isso, seu efeito nivelador. A medida que a acidez do solvente diminui, na seguinte ordem: ácido sulfúrico, ácido acético, fenol, água, piridina e butilamina, as bases vão se tornando progressivamente mais fracas até que percam, com exceção das mais fortes, suas características básicas.

Através do *efeito diferenciador* pode-se, em presença de dois ácidos ou duas bases, proceder à comparação de suas forças. Em solvente fracamente protofílico, como o ácido acético glacial, que forma íon acetônio por adição de um próton, pode-se ordenar de forma decrescente a força de ácidos minerais nele dissolvidos, como segue: ácido perclórico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido nítrico. Analogamente, o ácido acético, por ser anfiprótico, exerce efeito diferenciador em mistura de bases fracas ou muito fracas.

Os solventes empregados na titulação em meio não-aquoso devem satisfazer certas exigências: (1) não devem sofrer reações secundárias com a substância, tampouco com o titulante; (2) devem dissolver a substância permitindo, no mínimo, preparo de solução 0,01 M; (3) devem dissolver o produto da titulação. Se a precipitação for, contudo, inevitável, o precipitado deve ser compacto e cristalino, ao invés de volumoso e gelatinoso; (4) devem permitir com facilidade a visualização do ponto final, seja este medido mediante o uso de indicadores, seja mediante potenciômetro; (5) devem ser de baixo custo e de fácil purificação.

Para a titulação de substâncias de caráter básico — aminas, heterocíclicos nitrogenados, oxazolinas, compostos de amônio quaternário, sais alcalinos de ácidos orgânicos e de inorgânicos fracos e alguns sais de aminas — empregam-se solventes de natureza relativamente neutra ou ácida, sendo o ácido acético glacial o mais empregado. O anidrido acético reserva-se a bases muito fracas, como amidas. Tem igualmente a finalidade de evitar o excesso de água eventualmente presente como umidade adsorvida ou de hidratação do fármaco. A dioxana é freqüentemente utilizada

com ácido acético, uma vez que muitas vezes se recomenda mistura de solventes apróticos com ácidos. Para as de difícil dissolução pode-se empregar mistura de glicóis com outros solventes. Como titulante emprega-se, geralmente, a solução de ácido perclórico em ácido acético. Outros titulantes úteis são ácido perclórico em dioxana, ácido *p*-toluenossulfônico (ácido tósico) e ácido fluorsulfônico. O método de detecção do ponto final do doseamento varia de acordo com o pKa das bases em água. Para aquelas que apresentam pKa da ordem de 4, a detecção é, em geral, por meio de indicadores; para as que apresentam pKa entre 1 e 4, a detecção é potenciométrica. Nesse caso, o eletrodo de vidro-calomelano é útil. Em ácido acético, tal eletrodo funciona de acordo com o previsto teoricamente. No caso do eletrodo de calomelano como referência, é vantajoso substituir a ponte salina de cloreto de potássio aquoso por perclorato de lítio 0,1 M em ácido acético glacial. Após remoção do cloreto de potássio aquoso, lavar com água e depois com solvente não-aquoso.

Quando se trata de sais de ácidos halogenados — cloridrato, bromidrato e iodidrato — deve-se adicionar acetato de mercúrio, que não se dissocia em solução de ácido acético. O íon haleto, base demasiadamente fraca para reagir quantitativamente com ácido perclórico em ácido acético, é substituído quantitativamente pelo íon acetato, que em ácido acético é base forte. Quando se emprega ácido perclórico 0,1 M SV podem-se utilizar quantidades de acetato de mercúrio superiores a 3 g, sem risco de reações secundárias. Quando se trata de ácido perclórico 0,01 M SV, recomenda-se que a quantidade de acetato de mercúrio não ultrapasse 2 moles por mol de composto em exame.

Para a titulação de *substâncias que se comportam como ácidos* — ácidos halogenados, anidridos de ácidos, ácidos carboxílicos, aminoácidos, enóis do tipo de barbitúricos e xantinas, imidas, fenóis, pirróis e sulfas — empregam-se como solventes os de natureza básica ou aprótica. Para os que têm acidez média, utilizam-se bases mais fracas, como dimetilformamida — a presença de água pode provocar hidrólise, produzindo ácido fórmico, que interfere na titulação —, frequentemente empregada, e piridina. Em se tratando de ácidos fracos, empregam-se bases mais fortes, como morfolina, etilenodiamina e *n*-butilamina. Além dessas, certos álcoois e cetonas encontram emprego nessas determinações. Outrossim, selecionando adequadamente os solventes básicos, pode-se proceder à determinação seletiva em mistura de ácidos. É importante que se protejam os solventes da exposição excessiva à atmosfera, devido à interferência de CO<sub>2</sub> na reação. Por isso, pode-se empregar atmosfera inerte ou aparelho especial, durante a titulação. Para determinar a absorção de CO<sub>2</sub> deve-se proceder à titulação

do branco, que não deve exceder 0,01 ml do metóxido de sódio 0,1 M SV por ml de solvente. Duas classes de titulante podem ser empregadas para determinação de substâncias de caráter ácido: (1) os alcóxidos de metais alcalinos e (2) os hidróxidos de alquilamônio quaternário. Dos alcóxidos, o metóxido de potássio, em mistura de metanol-tolueno ou metanol-benzeno, é o mais empregado. O metóxido de lítio em metanol-benzeno é utilizado para os compostos que formam precipitado gelatinoso mediante titulação com metóxido de sódio. Dos hidróxidos, o mais utilizado é o hidróxido de tetrabutilamônio. O método de detecção do ponto final no doseamento de ácidos de pKa em água em torno de 7 pode ser feito com o uso de indicador. Por outro lado, para os ácidos com pKa entre 7 e 11 recomenda-se determinação potenciométrica, ainda que em certos casos se recorra a indicadores, como violeta azóica ou *o*-nitroanilina, com menor precisão, entretanto. O erro alcalino restringe o emprego de eletrodo de vidro com alcóxidos de metais alcalinos, sobretudo em solventes básicos. Assim, pode-se, ainda que sujeito a erros, utilizar o eletrodo de antimônio. Com os hidróxidos de amônio quaternário, em particular os hidróxidos de tetrabutilamônio e o de trimetilhexadecilamônio — em mistura de benzeno-metanol ou álcool isopropílico — tem-se a vantagem de que o sal do ácido titulado é solúvel no meio de titulação. Por outro lado, o ponto de viragem é, em geral, determinado potenciometricamente com sistema de eletrodo de vidro-calomelano. Nesse caso é vantajosa a substituição da ponte salina de cloreto de potássio aquoso do eletrodo de calomelano de referência por cloreto de potássio em metanol.

Os sistemas mais empregados para a titulação em meio não-aquoso estão na Tabela.

#### *Titulação de substâncias de caráter básico*

Dissolver quantidade de substância indicada na monografia em quantidade igualmente especificada do solvente ou mistura de solventes adequados. Juntar o indicador adequado ou, no caso de determinação potenciométrica, empregar o eletrodo adequado, titulando com solução acética de ácido perclórico 0,1 M SV. Paralelamente, proceder à titulação em branco.

Para se calcular o teor porcentual da substância doseada emprega-se a fórmula que segue:

$$\% = \frac{100(n - n') \text{ mEq}}{p}$$

em que

*p* = tomada da amostra em g,

*n* = mililitros de ácido perclórico gasto com a amostra,

$n'$  = mililitros de ácido perclórico gasto com o branco,

$mEq$  = miliequivalente da amostra.

Caso necessário — se  $t_0$  for diferente de  $t$  — corrigir o volume segundo a fórmula indicada anteriormente, a saber:

$$[1 + 0,0011 (t_0 - t)]$$

em que

$t_0$  = temperatura na qual o titulante foi padronizado,

$t$  = temperatura na qual a titulação foi realizada.

#### Titulação de sais de ácidos halogenados

À quantidade de substância especificada na respectiva monografia adicionar solvente ou mistura de solventes adequados. Adicionar entre 5 e 15 ml (geralmente 10 ml) de acetato de mercúrio acético SR para impedir a interferência do halogênio. Titular com ácido perclórico 0,1 M SV como descrito para as substâncias de natureza básica.

#### Titulação de substâncias de caráter ácido

**Método I** — Dissolver quantidade da substância especificada na monografia correspondente no solvente ou mistura de solventes indicados. Adicionar o indicador recomendado ou, se for o caso, usar o eletrodo adequado à determinação potenciométrica. Titular com solução padrão de metóxido de potássio 0,1 M SV, previamente padronizada com ácido benzóico. Cuidar para que não haja absorção de dióxido de carbono. Efetuar ensaio em branco. O cálculo do teor de substância segue a fórmula anteriormente indicada. Analogamente, se houver necessidade, aplicar a fórmula de correção de volume usando o coeficiente de expansão cúbica do benzeno, que é 0,0012.

**Método II** — Dissolver quantidade da substância indicada na monografia correspondente no solvente ou mistura de solventes indicados. Titular com solução de hidróxido de tetrabutilamônio 0,1 M SV, vertida de bureta equipada com absorvedor de dióxido de carbono. Determinar o ponto de viragem potenciometricamente. Efetuar ensaio em branco, fazendo, caso necessário, correção de volume. O cálculo do teor da substância segue a fórmula anteriormente indicada.

Sistemas para titulação em meio não-aquoso

Tipo de Solvente	Solvente <sup>a</sup>	Indicador	Eletrodos
<b>Ácido</b> (para titulação de bases e de seus sais)	Ácido acético glacial Ácido fórmico Ácido propiônico Anidrido acético Cloreto de sulfonila	Alfazurina 2-G Cloreto de metilrosanilina <i>p</i> -Naftolbenzefna Verde de malaquita Vermelho de quinaldina	Mercúrio-acetato de mercúrio Vidro-calomelano Vidro-prata-cloreto de prata
<b>Relativamente neutro</b> (para titulação diferencial de bases)	Acetato de etila Acetonitrila Álcoois Benzeno Clorobenzeno Clorofórmio Dioxana	Alaranjado de metila <i>p</i> -Naftolbenzefna Vermelho de metila	Calomelano-prata-cloreto de prata Vidro-calomelano
<b>Básico</b> (para titulação de ácidos)	<i>n</i> -Butilamina Dimetilformamida Etilenodiamina Morfolina Piridina	Azul de timol <i>p</i> -Hidroxiázobenzeno <i>o</i> -Nitroanilina Timoftelefna Violeta azóico	Aqtimônio-antimônio <sup>b</sup> Antimônio-calomelano Antimônio-vidro Platina-calomelano Vidro-calomelano
<b>Relativamente neutro</b> (para titulação diferencial de ácidos)	Acetona Acetonitrila Álcool <i>r</i> -butílico 2-Butanona Isopropilacetona	Azul de bromotimol Azul de timol <i>p</i> -Hidroxiázobenzeno Violeta azóico	Antimônio-calomelano Vidro-calomelano Vidro-platina

a = solventes relativamente neutros de constante dielétrica baixa, tais como benzeno, clorofórmio ou dioxana, podem ser utilizados junto com qualquer solvente ácido ou básico a fim de aumentar a sensibilidade dos pontos de viragem da titulação.

b = no titulante.

## V.3.4.6. DETERMINAÇÃO DA METOXILA

A técnica destinada à determinação da quantidade de grupos metoxila em substâncias orgânicas consiste na reação do composto a dosear com ácido iodídrico concentrado. O iodeto de metila formado — mais volátil que o ácido iodídrico aquoso — é separado por destilação sob corrente contínua de nitrogênio ou dióxido de carbono, lavado e absorvido em solução bromo-acética. O doseamento compreende a volumetria de retorno de iodo liberado com solução padronizada de tiosulfato de sódio.

## APARELHAGEM

O aparelho empregado na determinação da metoxila consiste de balão de fundo redondo, com 50 ml de capacidade, ao qual se encontra soldado braço lateral capilar, com 1 mm de diâmetro interno, destinado à alimentação de gás de arraste inerte (nitrogênio ou dióxido de carbono). Ao balão conecta-se — por juntas esmerilhadas — condensador vertical de cerca de 25 cm de altura e 9 mm de diâmetro interno, em cujo topo está fixado tubo curvo ( $180^\circ$ ), cuja extremidade, capilar, com 2 mm de diâmetro interno, encontra-se imersa em cerca de 2 ml de água contida em pequeno frasco de lavagem. A saída do lavador consiste em tubo de cerca de 7 mm de diâmetro interno, que termina em tubo removível de 4 mm, imerso no líquido absorvente do primeiro de dois frascos receptores montados em série.

## PROCEDIMENTO

Introduzir no balão quantidade de amostra suficiente para a formação de aproximadamente

50 mg de iodeto de metila ou a quantidade indicada na monografia. Juntar pérolas de vidro, 2,5 ml de fenol fundido e 5 ml de ácido iodídrico. Preparar solução a 10% (p/V) de acetato de potássio em ácido acético glacial e colocar 6 e 4 ml desta solução no primeiro e no segundo tubo receptor, respectivamente, juntando a cada tubo 6 gotas de bromo. Passar corrente uniforme de dióxido de carbono ou nitrogênio através do braço lateral do balão, visando à expulsão contínua de iodeto de metila formado. Aquecer suavemente o balão por meio de micro-bico de Bunsen ou manta de amianto, de forma a permitir que os vapores do líquido em ebulição alcancem a porção mediana do condensador. Manter sob aquecimento durante 30 minutos e transferir quantitativamente, por lavagem, o líquido contido nos dois tubos coletores para erlenmeyer de 250 ml provido de tampa esmerilhada, contendo 5 ml de solução a 25% (p/V) de acetato de sódio. Ajustar o volume do líquido para cerca de 125 ml com água e juntar 6 gotas de ácido fórmico. Agitar o frasco por rotação manual até que o excesso de bromo (cor castanha) desapareça e juntar mais 12 gotas de ácido fórmico. Tampar o frasco, agitá-lo com vigor para assegurar completa remoção dos vapores de bromo e deixá-lo em repouso durante 1 a 2 minutos. Adicionar 1 g de iodeto de potássio e 5 ml de ácido sulfúrico *M* e titular o iodo liberado com tiosulfato de sódio 0,1 *M* SV, empregando amido SI como indicador. Repetir a operação omitindo a substância e proceder à necessária correção do volume de titulante consumido. Cada ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,1 *M* SV equivale a 0,5172 mg de metoxila ( $\text{CH}_3\text{O}$ ).

## V.3.4.7. DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE ENXOFRE

O método compreende o arraste – por corrente de dióxido de carbono ou nitrogênio – de  $\text{SO}_2$  liberado na ebulição da substância em meio ácido aquoso, sua absorção em solução de peróxido de hidrogênio e o doseamento do ácido sulfúrico formado no processo com álcali padronizado.

## APARELHAGEM

O aparelho empregado na determinação de dióxido de enxofre é semelhante ao adotado para a determinação de metoxila. Consiste de balão de fundo redondo, de capacidade para 1000 a 1500 ml, em cuja parede, próximo à base, encontra-se soldado braço lateral capilar destinado à alimentação de gás de arraste (nitrogênio ou dióxido de carbono). Ao balão conecta-se – por juntas esmerilhadas – condensador de refluxo vertical em cuja extremidade superior se encontram ligados dois tubos de absorção em série, ambos preenchidos com 10 ml de solução de peróxido de hidrogênio SR, neutralizada com hidróxido de sódio 0,1 M pela viragem de azul de bromofenol SI.

## PROCEDIMENTO

Transferir ao balão cerca de 500 ml de água e

20 ml de ácido clorídrico. Fixar o balão ao aparelho e passar corrente lenta e uniforme de dióxido de carbono ou nitrogênio, previamente em solução a 6% (p/V) de carbonato de sódio, pelo braço lateral. Aquecer gradualmente a mistura, mantendo-a em ebulição durante cerca de 10 minutos e, em seguida, removendo momentaneamente a fonte de calor, resfriar por imersão progressiva em banho de água, constituído de um recipiente com diâmetro maior que o do balão e altura suficiente para não derramar água quando o balão estiver inteiramente imerso nele. O volume de água deverá ser controlado para que isto não aconteça. Introduzir – removendo momentaneamente o balão do aparelho – cerca de 50 a 100 g de amostra e reiniciar o aquecimento, mantendo a ebulição durante 45 minutos. Desligar a corrente de gás de arraste e transferir quantitativamente, por lavagem com água, o líquido contido nos dois tubos coletores para erlenmeyer de 250 ml e titular com hidróxido de sódio 0,1 M SV pela viragem de azul de bromofenol SI. Repetir a operação omitindo a amostra e proceder à necessária correção no volume de titulante consumido. Cada ml de hidróxido de sódio 0,1 M SV equivale a 3,203 mg de dióxido de enxofre.



## V.3.4.8. DETERMINAÇÃO DO ÁLCOOL

## V.3.4.8.1. MÉTODO POR DESTILAÇÃO

Este método deve ser usado na determinação de álcool, a menos que na monografia seja especificado outro método. É adequado para exame da maioria dos extratos fluidos e tinturas.

Deve ser usado balão destilador com capacidade de duas a quatro vezes o volume do líquido a ser aquecido. A velocidade de destilação deve ser tal que permita a produção de destilados límpidos. Destilados turvos devem ser clarificados por agitação com talco ou com carbonato de cálcio precipitado e filtrados. Em seguida, ajustar a temperatura do filtrado e determinar o teor de álcool pela densidade. Durante todas as manipulações, tomar precauções para minimizar a perda de álcool por evaporação.

Os líquidos que formem demasiada espuma durante a destilação devem ser tratados previamente com ácido fosfórico, sulfúrico ou tânico, até reação fortemente ácida ou com ligeiro excesso de solução de cloreto de cálcio, ou pequena quantidade de parafina ou ainda óleo de silicóna, antes de iniciar a destilação.

Para evitar a ocorrência de ebulição violenta, adicionar fragmentos de material insolúvel e poroso, tal como carbonato de silício ou pérolas de vidro.

## PROCEDIMENTO

*Método 1*

**Líquidos com menos de 30% de álcool** – Transferir para aparelho destilador adequado, por meio de pipeta, amostra de, no mínimo, 35 ml do líquido em que o álcool está sendo determinado, anotando a temperatura na qual o volume foi medido. Juntar igual quantidade de água e destilar coletando volume de destilado que seja menor que a amostra medida cerca de 2 ml. Ajustar a temperatura do destilado àquela em que foi medida a amostra e juntar água suficiente até obter o volume inicial dela. Misturar. O destilado é límpido ou, no máximo, levemente turvo e não contém mais que traços de substâncias voláteis além de álcool e água. Determinar a densidade do líquido a 25 °C. Com o resultado, avaliar a porcentagem, em volume, de  $C_2H_5OH$  contido no líquido examinado, pela Tabela Alcoométrica.

*Método 2*

**Líquidos com mais de 30% de álcool** – Proceder como indicado no método anterior, com a seguinte modificação: diluir a amostra com volume de água duas vezes maior e coletar volume de destilado cerca de 2 ml menor que duas vezes o volume da amostra. Ajustar a temperatura do destilado

àquela em que foi medida a amostra e completar com água a volume igual a duas vezes o volume inicial. Misturar e determinar a densidade a 25 °C. A proporção de  $C_2H_5OH$ , em volume, neste destilado, avaliada pela densidade, é igual à metade daquela do líquido examinado.

*Tratamento especial*

**Ácidos e Bases Voláteis** – Líquidos contendo bases voláteis devem ser tratados com ácido sulfúrico diluído SR, até reação levemente ácida. Se estiverem presentes ácidos voláteis, a preparação deverá ser adicionado hidróxido de sódio SR até reação levemente alcalina.

**Glicerol** – Líquidos contendo glicerol devem ser adicionados de volume tal de água que o resíduo, após a destilação, contenha, no mínimo, 50% de água.

**Iodo** – Soluções contendo iodo livre devem ser tratadas antes da destilação com zinco pulverizado ou descoradas com quantidade suficiente de solução de tiosulfato de sódio 10% (p/V) seguida da adição de algumas gotas de hidróxido de sódio SR.

**Outras substâncias voláteis** – Espíritos, elixires, tinturas e preparações similares que contenham proporções apreciáveis de substâncias voláteis, além de álcool e água, tais como: óleos voláteis, clorofórmio, éter, cânfora etc., devem sofrer o tratamento que segue antes da destilação.

**Líquidos com menos de 50% de álcool** – Misturar a amostra de 35 ml, exatamente medidos, com volume igual de água, em funil separador, saturando esta mistura com cloreto de sódio. Extrair os componentes voláteis, agitando com porção de 25 ml de hexano. Passar a camada inferior para um segundo funil separador e repetir a extração com mais duas porções de hexano. Reunir as porções de hexano e tratar com 3 porções de 10 ml de solução saturada de cloreto de sódio. Reunir as soluções salinas e destilar de maneira usual recolhendo volume de destilado duas ou três vezes o volume da amostra inicial.

**Líquidos com mais de 50% de álcool** – Tomar uma amostra e diluir com água de modo que contenha aproximadamente 25% de álcool e que seu volume final seja cerca de 35 ml. A seguir proceder como indicado para líquidos com menos de 50% de álcool, prosseguindo a partir de "saturando esta mistura com cloreto de sódio".

Na preparação de colódio para destilação, usar água em lugar da solução saturada de cloreto de sódio, indicada anteriormente. Se o destilado obtido for turvo, por estarem presentes óleos voláteis em pequenas proporções, e não foi empregado o tratamento com hexano, ele pode ser clarificado e adequado para a determinação da

densidade, por agitação com cerca de 1/5 de seu volume de hexano ou por filtração através de fina camada de talco.

#### V.3.4.8.2. MÉTODO POR CROMATOGRAFIA A GÁS

Proceder de acordo com as especificações gerais para cromatografia a gás. Usar aparelho eficiente para a determinação quantitativa de álcool.

##### *Solução padrão*

Para líquidos contendo mais de 10% de álcool, preparar duas soluções padrão de álcool em água, de maneira que as concentrações sejam, respectivamente, cerca de 5% abaixo (Solução padrão 1) e cerca de 5% acima (Solução padrão 2) da concentração de álcool esperada na amostra sob exame. Determinar a densidade de cada uma das soluções padrão a 25 °C (V.2.5) e obter a concentração exata de  $C_2H_5OH$  pela Tabela Alcoométrica. Para líquidos contendo menos de 10% de álcool, preparar exatamente duas soluções alcoólicas padrão, de maneira que as concentrações sejam, respectivamente, cerca de 1% menor e cerca de 1% maior que a concentração esperada, diluindo com água. Determinar as densidades das soluções do mesmo modo que as anteriores.

##### EQUIPAMENTO

Sob condições típicas, o instrumento contém uma coluna de 2 m x 4 mm carregada com macrogol (polietilenoglicol) 400 a 20% em sílica cromatográfica calcinada. A coluna é mantida na temperatura de 100 °C; o injetor é equipado com filtro para sólidos e é mantido a 160 °C; como

condutor usa-se gás inerte, como hélio, fluindo com vazão de cerca de 60 ml por minuto.

##### *Procedimento*

Proceder com a amostra e cada uma das soluções padrão como segue: transferir 25 ml para recipiente adequado de rolha esmerilhada, juntar 1,0 ml do padrão interno (acetona, a menos que especificado diferentemente na monografia) para cada 6% de álcool estimado na amostra e misturar. Juntar água somente se for necessário para efetuar a solução. Injetar quantidade apropriada da solução no aparelho. Calcular a relação entre a área do pico do álcool e a área do pico do padrão interno pelos cromatogramas. Calcular a porcentagem de álcool na amostra pela fórmula

$$\frac{P_1 (Y - Z) + P_2 (Z - X)}{(Y - Z)}$$

em que

$P_1$  = porcentagem de álcool na Solução padrão 1,

$P_2$  = porcentagem de álcool na Solução padrão 2,

$X$  = relação entre a área do pico do álcool e a área do pico do padrão interno da Solução Padrão 1,

$Y$  = relação entre a área do pico do álcool e a área do pico do padrão interno da Solução Padrão 2,

$Z$  = relação entre a área do pico do álcool e a área do pico do padrão interno da Solução Amostra.

Se o valor obtido estiver fora da faixa dos valores incluídos pelas soluções padrão, repetir o procedimento usando aquelas que forneçam uma faixa que inclua o valor da amostra.

Tabela alcoométrica

Porcentagem de $C_2H_5OH$		Densidade no ar		Porcentagem de $C_2H_5OH$		Densidade no ar	
Em volume a $15,56^\circ C$	Em peso	$\frac{25^\circ C}{25^\circ C}$	$\frac{15,56^\circ C}{15,56^\circ C}$	Em peso	Em volume a $15,56^\circ C$	$\frac{25^\circ C}{25^\circ C}$	$\frac{15,56^\circ C}{15,56^\circ C}$
0	0,00	1,0000	1,0000	0	0,00	1,0000	1,0000
1	0,80	0,9985	0,9985	1	1,26	0,9981	0,9981
2	1,59	0,9970	0,9970	2	2,51	0,9963	0,9963
3	2,39	0,9956	0,9956	3	3,76	0,9945	0,9945
4	3,19	0,9941	0,9942	4	5,00	0,9927	0,9928
5	4,00	0,9927	0,9928	5	6,24	0,9911	0,9912
6	4,80	0,9914	0,9915	6	7,48	0,9894	0,9896
7	5,61	0,9901	0,9902	7	8,71	0,9879	0,9881
8	6,42	0,9888	0,9890	8	9,94	0,9863	0,9867
9	7,23	0,9875	0,9878	9	11,17	0,9848	0,9852
10	8,05	0,9862	0,9866	10	12,39	0,9833	0,9839
11	8,86	0,9850	0,9854	11	13,61	0,9818	0,9825
12	9,68	0,9838	0,9843	12	14,83	0,9804	0,9812
13	10,50	0,9826	0,9832	13	16,05	0,9789	0,9799
14	11,32	0,9814	0,9821	14	17,26	0,9776	0,9787
15	12,14	0,9802	0,9810	15	18,47	0,9762	0,9774
16	12,96	0,9790	0,9800	16	19,68	0,9748	0,9763
17	13,79	0,9778	0,9789	17	20,88	0,9734	0,9751
18	14,61	0,9767	0,9779	18	22,08	0,9720	0,9738
19	15,44	0,9756	0,9769	19	23,28	0,9706	0,9726
20	16,27	0,9744	0,9759	20	24,47	0,9692	0,9714
21	17,10	0,9733	0,9749	21	25,66	0,9677	0,9701
22	17,93	0,9721	0,9739	22	26,85	0,9663	0,9688
23	18,77	0,9710	0,9729	23	28,03	0,9648	0,9675
24	19,60	0,9698	0,9719	24	29,21	0,9633	0,9662
25	20,44	0,9685	0,9708	25	30,39	0,9617	0,9648
26	21,29	0,9673	0,9697	26	31,56	0,9601	0,9653
27	22,13	0,9661	0,9687	27	32,72	0,9585	0,9620
28	22,97	0,9648	0,9676	28	33,88	0,9568	0,9605
29	23,82	0,9635	0,9664	29	35,03	0,9551	0,9590
30	24,67	0,9622	0,9653	30	36,18	0,9534	0,9574
31	25,52	0,9609	0,9641	31	37,32	0,9516	0,9558
32	26,38	0,9596	0,9629	32	38,46	0,9498	0,9541
33	27,24	0,9581	0,9617	33	39,59	0,9480	0,9524
34	28,10	0,9567	0,9604	34	40,72	0,9461	0,9506
35	28,97	0,9552	0,9590	35	41,83	0,9442	0,9488
36	29,84	0,9537	0,9576	36	42,94	0,9422	0,9470
37	30,72	0,9521	0,9562	37	44,05	0,9402	0,9451
38	31,60	0,9506	0,9548	38	45,15	0,9382	0,9432
39	32,48	0,9489	0,9533	39	46,24	0,9362	0,9412
40	33,36	0,9473	0,9517	40	47,33	0,9341	0,9392
41	34,25	0,9456	0,9501	41	48,41	0,9320	0,9372
42	35,15	0,9439	0,9485	42	49,48	0,9299	0,9352
43	36,05	0,9421	0,9469	43	50,55	0,9278	0,9331
44	36,96	0,9403	0,9452	44	51,61	0,9256	0,9310
45	37,87	0,9385	0,9434	45	52,66	0,9235	0,9289
46	38,78	0,9366	0,9417	46	53,71	0,9213	0,9268
47	39,70	0,9348	0,9399	47	54,75	0,9191	0,9246
48	40,62	0,9328	0,9380	48	55,78	0,9169	0,9225
49	41,55	0,9309	0,9361	49	56,81	0,9147	0,9203
50	42,49	0,9289	0,9342	50	57,83	0,9124	0,9181
51	43,43	0,9269	0,9322	51	58,84	0,9102	0,9159
52	44,37	0,9248	0,9302	52	59,85	0,9079	0,9137
53	45,33	0,9228	0,9282	53	60,85	0,9056	0,9114
54	46,28	0,9207	0,9262	54	61,85	0,9033	0,9092
55	47,25	0,9185	0,9241	55	62,84	0,9010	0,9069
56	48,21	0,9164	0,9220	56	63,82	0,8987	0,9046
57	49,19	0,9142	0,9199	57	64,80	0,8964	0,9024
58	50,17	0,9120	0,9177	58	65,77	0,8941	0,9001
59	51,15	0,9098	0,9155	59	66,73	0,8918	0,8978
60	52,15	0,9076	0,9133	60	67,69	0,8995	0,8955

Porcentagem de $C_2H_5OH$		Densidade no ar		Porcentagem de $C_2H_5OH$		Densidade no ar	
Em volume a $15,56^\circ C$	Em peso	a $25^\circ C$ a $25^\circ C$	a $15,56^\circ C$ a $15,56^\circ C$	Em peso	Em volume a $15,56^\circ C$	a $25^\circ C$ a $25^\circ C$	a $15,56^\circ C$ a $15,56^\circ C$
61	53,15	0,9053	0,9111	61	68,64	0,8871	0,8932
62	54,15	0,9030	0,9088	62	69,59	0,8848	0,8909
63	55,17	0,9006	0,9065	63	70,52	0,8824	0,8886
64	56,18	0,8983	0,9042	64	71,46	0,8801	0,8862
65	57,21	0,8959	0,9019	65	72,38	0,8777	0,8839
66	58,24	0,8936	0,8995	66	73,30	0,8753	0,8815
67	59,28	0,8911	0,8972	67	74,21	0,8729	0,8792
68	60,33	0,8887	0,8948	68	75,12	0,8706	0,8768
69	61,38	0,8862	0,8923	69	76,02	0,8682	0,8745
70	62,44	0,8837	0,8899	70	76,91	0,8658	0,8721
71	63,51	0,8812	0,8874	71	77,79	0,8634	0,8697
72	64,59	0,8787	0,8848	72	78,67	0,8609	0,8673
73	65,67	0,8761	0,8823	73	79,54	0,8585	0,8649
74	66,77	0,8735	0,8797	74	80,41	0,8561	0,8625
75	67,87	0,8709	0,8771	75	81,27	0,8537	0,8601
76	68,98	0,8682	0,8745	76	82,12	0,8512	0,8576
77	70,10	0,8655	0,8718	77	82,97	0,8488	0,8552
78	71,23	0,8628	0,8691	78	83,81	0,8463	0,8528
79	72,38	0,8600	0,8664	79	84,64	0,8439	0,8503
80	73,53	0,8572	0,8636	80	85,46	0,8414	0,8479
81	74,69	0,8544	0,8608	81	86,28	0,8389	0,8454
82	75,86	0,8516	0,8580	82	87,08	0,8364	0,8429
83	77,04	0,8487	0,8551	83	87,89	0,8339	0,8404
84	78,23	0,8458	0,8422	84	88,68	0,8314	0,8379
85	79,44	0,8428	0,8493	85	89,46	0,8288	0,8354
86	80,66	0,8397	0,8462	86	90,24	0,8263	0,8328
87	81,90	0,8367	0,8432	87	91,01	0,8237	0,8303
88	83,14	0,8335	0,8401	88	91,77	0,8211	0,8276
89	84,41	0,8303	0,8369	89	92,52	0,8184	0,8250
90	85,69	0,8271	0,8336	90	93,25	0,8158	0,8224
91	86,99	0,8237	0,8303	91	93,98	0,8131	0,8197
92	88,31	0,8202	0,8268	92	94,70	0,8104	0,8170
93	89,65	0,8167	0,8233	93	95,41	0,8076	0,8142
94	91,03	0,8130	0,8196	94	96,10	0,8048	0,8114
95	92,42	0,8092	0,8158	95	96,79	0,8020	0,8086
96	93,85	0,8053	0,8118	96	97,46	0,7992	0,8057
97	95,32	0,8011	0,8077	97	98,12	0,7962	0,8028
98	96,82	0,7968	0,8033	98	98,76	0,7932	0,7988
99	98,38	0,7921	0,7986	99	99,39	0,7902	0,7967
100	100,00	0,7871	0,7936	100	100,00	0,7871	0,7936

## V.3.4.9. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A análise de aminoácidos é realizada através de duas operações: (1) hidrólise das ligações peptídicas seguida de (2) avaliação de cada aminoácido no hidrolisado resultante.

*Técnica para hidrólise de proteínas e peptídeos isolados*

1. Pesar (ou pipetar, caso esteja em solução) 4 a 10 mg de proteína em tubo de cultura de microrganismos de 20 x 150 mm (com disco de teflon na tampa para melhor vedação), previamente lavado com hidróxido de sódio 0,2 M, enxaguado e seco em estufa.

2. Se a amostra for sólida, pipetar 5 ml de ácido clorídrico sobre a mesma, seguido de água. Se a amostra for líquida, pipetar igual volume de ácido clorídrico, de modo que a concentração final de ácido clorídrico seja 6 M.

3. Passar nitrogênio no interior do tubo na altura da superfície da solução, para eliminação do O<sub>2</sub>, durante 2-3 minutos. Fechar em seguida o tubo com o disco e a tampa rosqueável.

4. Colocar o tubo em posição vertical em estufa regulada a 110 °C ± 2 °C, mantendo-o por 22 h.

5. Remover o tubo da estufa e, ainda na vertical, resfriá-lo em água corrente ou banho de gelo.

6. Transferir quantitativamente o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 10 ml e completar o volume com água destilada.

7. Se houver algum resíduo ou precipitado, removê-lo por centrifugação e filtração em placa de vidro sinterizado ou membrana filtrante de 0,45 µm de porosidade.

8. Pipetar 5,0 ml da solução para balão de evaporador rotatório, procedendo à secagem à pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C.

9. Adicionar ao resíduo do balão 10 ml de água destilada e reevaporar. Esta operação deve ser repetida mais duas vezes, ou até o resíduo não apresentar odor de ácido clorídrico.

10. Solubilizar a película seca formada pelo hidrolisado em volume adequado de tampão citrato pH 2,2 (0,20 M em Na<sup>+</sup>). A solução resultante de aminoácidos deve então ser mantida em frasco de vidro, tampado e sob refrigeração até a realização da análise.

*Técnica para hidrólise de amostras, com baixo teor de proteína, contendo carboidratos e/ou lipídeos*

1. Transferir quantidade de amostra que contenha 10 mg de proteína para balão de 150 ml de fundo redondo e boca esmerilhada.

2. Juntar ao meio 40 ml de ácido clorídrico 6 M, preparado com partes iguais de água destilada e ácido clorídrico. Adicionar algumas pérolas de vidro.

3. Conectar condensador a refluxo e iniciar o aquecimento do balão usando manta elétrica. Manter a suspensão sob ebulição constante e suave por 24 h.

4. Resfriar à temperatura ambiente e transferir quantitativamente o conteúdo para balão volumétrico de 50 ml, completando o volume com água destilada.

5. Seguir as demais etapas conforme os itens 7 a 10 da técnica anterior.

*Misturas de aminoácidos em solução (soros) ou em preparações farmacêuticas*

1. Diluir adequadamente a solução com tampão citrato pH 2,2 (0,20 M em Na<sup>+</sup>), podendo ser analisada em seguida.

2. Caso esteja na forma de pó ou comprimido solubilizar a amostra em ácido clorídrico 0,1 M.

3. Transferir o material para balão volumétrico e completar o volume com o mesmo tampão acima.

4. Filtrar a solução, mantendo-a sob refrigeração (4 °C) até ser analisada.

*Técnica de hidrólise com oxidação de cistina e metionina*

Devido a perdas durante a hidrólise ácida de proteínas, os aminoácidos sulfurados são preferencialmente analisados através de seus respectivos derivados oxidados. A oxidação é promovida por ácido perbórmico, que transforma cistina e cisteína em ácido cistéico e metionina em metionina-sulfona, ambos resistentes às condições de hidrólise.

1. Preparar o ácido perbórmico acrescentando 1 ml de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 90 ml de ácido fórmico.

2. Agitar ligeiramente a solução, mantendo-a em seguida em repouso por 1 h à temperatura ambiente.

3. Resfriar o ácido perbórmico formado em banho de gelo.

4. Pesar a amostra contendo 10 mg de proteína em balão de fundo redondo de 25 ml e adicionar 2 ml de ácido perbórmico gelado.

5. Manter a mistura em banho de gelo durante 4 h, se a amostra for solúvel, ou 16 h, se for insolúvel.

6. Adicionar 0,5 ml de ácido bromídrico 40% para remover o excesso de ácido perbórmico.

7. Acoplar o balão a evaporador rotatório e

remover através de pressão reduzida o bromo residual, fazendo os vapores passar por solução de hidróxido de sódio *M*.

8. Proceder à hidrólise como descrito anteriormente.

*Separação e análise quantitativa de aminoácidos isolados*

A separação dos aminoácidos nos hidrolisados é, normalmente, realizada por cromatografia de

troca iônica, através de resinas de poliestireno sulfonado em analisadores de aminoácidos. Nesses aparelhos, após a separação, os aminoácidos eluídos das colunas cromatográficas formam complexo de coloração azul-violeta pela reação com ninidrina. A determinação quantitativa é feita espectrofotometricamente. No uso de autoanalisadores de aminoácidos, devem ser seguidas as especificações dos respectivos fabricantes.

## V.4. MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA

### V.4.1. PREPARO DE MATERIAL VEGETAL PARA OBSERVAÇÃO E ESTUDOS HISTOLÓGICOS

#### *Amolecimento do material*

Como normalmente os órgãos e tecidos vegetais que compõem os fitofármacos se apresentam secos, para serem observados ao microscópio é conveniente primeiro amolecê-los, mediante tratamento com água quente, ou outro método de amolecimento indicado. O tempo necessário para o amolecimento de cada órgão vegetal varia de acordo com a sua textura. Se se tratar de órgão recém-colhido, apenas os de consistência mais firme necessitam de tal tratamento.

#### *Execução dos cortes*

Uma vez amolecidos, procede-se à preparação dos cortes dos órgãos vegetais a serem observados. Os cortes podem ser realizados com o auxílio de objeto cortante, como navalha, lâmina-de-barbear ou bisturi. Recomenda-se incluir a amostra em material adequado que permita fixar o fragmento a fim de ser seccionado. Entretanto, cortes melhores e mais precisos podem ser obtidos com o emprego de micrótomos. Há, basicamente, três tipos de micrótomos: os de congelação, usados para os materiais mais frágeis; os rotativos, para cortes em série de material incluído em parafina; e os de deslizamento, para aqueles materiais mais resistentes, como é o caso de ramos, partes de caules e de raízes. Neste último caso, método relativamente fácil de preparo do material a ser cortado consiste em sua inclusão em macrogol solúvel em água. Este método é descrito a seguir.

#### *Inclusão do material em macrogol*

- Ferver as amostras para retirar o ar;
- Colocá-las em béquer contendo solução de macrogol a 20%;
- Marcar o béquer, a partir da superfície do líquido, dividindo-o em 5 partes aproximadamente iguais;
- Deixar o material em estufa a 65 °C (por 3 a 4 dias);
- Quando a solução evaporar até 1/5 do seu volume inicial, transferir as amostras para

macrogol puro, derretido, onde permanecem durante 12 a 25 horas, em estufa a 65 °C;

- Retirar da estufa, emblocar e deixar esfriar à temperatura ambiente;
- Aparar os blocos para colocação no micrótomo;
- Cortar o material a seco e
- Lavar os cortes com água e colorir.

#### *Métodos de coloração*

Em histologia vegetal, o emprego de corantes é prática generalizada. Os métodos de coloração podem compreender a aplicação de um só corante (coloração simples) ou de dois ou três corantes diferentes (coloração composta).

**Coloração simples** – alguns corantes que podem ser usados:

- Solução de safranina a 1%: coloração de células com paredes lignificadas;
- Solução de verde malaquita a 1%: coloração de celulose;
- Solução de acridina-laranja a 0,1%: coloração de floema e de células não lignificadas e
- Azul de Astra a 1%: coloração de paredes celulósicas sem impregnação de lignina.

**Coloração composta** – algumas misturas de corantes que podem ser usadas:

- 1) Safranina-azul de Astra – procedimento:
  - Colocar em safranina por 5 a 25 minutos;
  - Lavar duas vezes com água destilada;
  - Colocar em azul de Astra por 10 a 25 minutos;
  - Lavar duas vezes com água;
  - Passar por bateria de álcool: a 50%, a 70%, a 90%, a 95%, álcool absoluto (2 vezes), xilol e
  - Montar em lâminas com bálsamo do Canadá ou resina sintética.
- 2) Safranina-verde malaquita – procedimento:
  - Colocar em verde malaquita por 1 minuto, aquecendo levemente;
  - Lavar duas vezes com água;

- Passar por álcool a 70%, a 95% e novamente a 70%;
- Lavar com água;
- Colocar em safranina por 5 minutos;
- Lavar duas vezes com água;
- Passar por álcool a 70% (3 vezes), a 95% e por álcool absoluto e
- Montar em lâminas com bálsamo do Canadá.

3) Crisoidina-vermelho de acridina-azul de Astra — procedimento:

- Colocar em crisoidina-vermelho de acridina por 5 a 25 minutos;
- Lavar duas vezes com água destilada;
- Colocar em azul de Astra por 5 a 25 minutos;
- Lavar duas vezes com água;
- Passar por álcool a 70% (3 vezes), a 95% e por álcool absoluto e
- Montar em lâminas com bálsamo do Canadá ou com resina sintética.

#### *Preparo e montagem das lâminas*

Os cortes histológicos são montados, entre lâmina e lamínula, em água, glicerol, hidróxido de potássio a 30%, hidrato de cloral a 50%, ou outro líquido qualquer que permita a observação dos tecidos vegetais. O glicerol é mais usado nos estudos microquímicos de mucilagens, gomas, inulina e aleurona. O hidróxido de potássio é agente diafanizador: tem ação sobre proteínas, amido, gorduras, resinas e matérias corantes. O hidrato de cloral também é agente diafanizador e, embora de ação mais lenta que os hidróxidos alcalinos, tem a vantagem de não dissolver o oxalato de cálcio.

Dependendo da finalidade a que se destina, podem-se montar os cortes em lâminas para observação imediata ou em lâminas ditas permanentes.

Nas preparações para observação imediata, depois de selecionados e corados, montam-se os cortes em meio adequado, tomando-se o cuidado de evitar a formação de bolhas de ar. Se o exame promete ser mais prolongado, recomenda-se revestir os bordos da lamínula de um luto, que pode ser esmalte de unhas, bálsamo do Canadá ou solução alcoólica de goma-laca, para evitar a evaporação do meio de montagem, todos eles aplicáveis com o auxílio de pincel macio e pequeno.

Nas preparações permanentes, depois de selecionados e corados, os cortes devem ser desidratados em bateria de álcool, a saber: álcool a 50%, a 70%, a 90%, a 95%, álcool absoluto (duas vezes) e xilol, permanecendo aproximadamente 3 minutos em cada um deles. Depois, são montados, entre lâmina e lamínula, em "Entellan", bálsamo de Canadá ou outro meio conveniente. Deve-se

manter a montagem comprimida através da aplicação de pequenos pesos de chumbo sobre a lamínula, em posição perfeitamente horizontal e sobre papel de filtro, cuja finalidade é a de se precaver contra possíveis extravasamentos do meio de montagem.

#### *Maceração dos tecidos*

Seções de caules, raízes, cascas ou outros órgãos vegetais raramente dão idéia precisa da natureza real de suas células. Para se revelar algumas particularidades, como, por exemplo, espessamentos e pontuações, deve-se empregar um dos métodos indicados para a dissociação de tecidos. Nesses métodos, o órgão a ser estudado é tratado com substâncias químicas capazes de dissolver a lamela média e, desta forma, permitir a separação das células.

Método prático de dissociação de tecidos é o seguinte:

- Cortar o material em pequenos fragmentos ou em fatias com cerca de 300  $\mu$ m de espessura e colocar em água;
- Retirar todo o ar do material, fervendo e resfriando repetidamente;
- Macerar o material em solução de Jeffrey (solução aquosa de ácido nítrico a 10% + ácido crômico a 10%, na proporção de 1:1). O tempo de maceração varia com a natureza do material. Geralmente as células começam a separar-se em cerca de 24 horas. Pode ser usado bastão de vidro de ponta arredondada para amassar muito levemente o material. Se houver dificuldade na separação das células, renovar a solução maceradora;
- Lavar muito bem o material com água de torneira, para remover os ácidos. Verter a mistura com o tecido macerado para funil contendo papel de filtro;
- Lavar o macerado, ainda no funil, com solução saturada de bicarbonato de sódio e, a seguir, com água;
- Fechar a abertura inferior do funil e cobrir o macerado com solução aquosa de safranina a 1%, durante tempo suficiente para boa coloração do material (de 15 minutos a 6 horas);
- Abrir a ponta do funil e lavar novamente com água, até retirar o excesso de corante;
- Desidratar pela adição de soluções de álcool a 50%, a 70%, a 90%, a 95% e álcool absoluto;
- Retirar com pinça o macerado do papel de filtro e colocar em xilol;
- Montar entre lâmina e lamínula, com resina sintética ou bálsamo do Canadá e
- Manter a lâmina em posição horizontal, porém não utilizar peso sobre a lamínula, pois as células maceradas são muito frágeis.



## V.4.2. MÉTODOS DE ANÁLISE DE DROGAS VEGETAIS

### V.4.2.1. AMOSTRAGEM

Para que os resultados dos métodos de análise de drogas vegetais expressem valores representativos da quantidade total de droga disponível, é imprescindível recorrer a técnicas de amostragem definidas e uniformes.

Os procedimentos de amostragem especificados levam em consideração três aspectos: (a) número de embalagens que contêm a droga; (b) grau de divisão da droga e (c) quantidade de droga disponível.

#### *Número de embalagens*

Examinar a integridade dos recipientes de embalagem e a natureza da droga neles contida. Havendo razoável homogeneidade, recolher amostras segundo o esquema abaixo:

<i>Nº de embalagens</i>	<i>Nº de embalagens a serem amostradas</i>
1 a 10	1 a 3
10 a 25	3 a 5
25 a 50	4 a 6
50 a 75	6 a 8
75 a 100	8 a 10
Mais de 100	5% do total de embalagens (10, no mínimo)

#### *Grau de divisão e quantidade de droga*

Consistindo a droga de componentes de dimensões inferiores a 1 cm ou quando ela se constituir de material finamente fragmentado ou pulverizado, empregar aparelho de amostragem (tubo provido de dispositivo de fechamento na base). Recolher

amostras de cima para baixo e de baixo para cima (direção vertical) e lateralmente (direção transversal), perfazendo amostra de, no mínimo, 250 g para até 100 kg de droga. Havendo mais de 100 kg a amostrar, proceder à amostragem seguida de seleção por quarteramento, gerando amostra de 250 g no final do processo.

Para drogas com dimensões superiores a 1 cm, proceder à amostragem manual. Combinar as amostras retiradas de cada embalagem aberta, tomando a precaução de não aumentar seu grau de fragmentação durante a manipulação. Para quantidades de droga até 100 kg, a amostra deve constituir-se de, no mínimo, 500 g. Havendo mais de 100 kg de droga a amostrar, proceder à amostragem seguida de seleção por quarteramento, gerando amostra de 500 g no final do processo.

Em ambos os casos - drogas com dimensões inferiores ou superiores a 1 cm - é permissível amostrar quantidades inferiores às especificadas acima desde que a quantidade total de droga disponível seja inferior a 10 kg. Todavia, a amostra final não deverá ser inferior a 125 g.

#### *Quarteramento*

Distribuir a droga sobre área quadrada, dividida em quatro partes iguais. Com a mão, distribuir a droga sobre a área de modo homogêneo e rejeitar as porções contidas em dois quadrados opostos, em uma das diagonais do quadrado. Juntar as duas porções restantes e repetir o processo, se necessário. Havendo diferença acentuada em dimensões de fragmentos, executar separação manual e anotar as porcentagens aproximadas dos componentes de diferentes graus de divisão encontrados na amostra.

## V.4.2.2. DETERMINAÇÃO DE MATERIAL ESTRANHO

Drogas vegetais devem estar, o quanto possível, isentas de fungos, insetos e outros materiais contaminantes. Não devem apresentar aspecto ou odor anormal, descoramento ou quaisquer outros indícios de deterioração. Materiais estranhos à droga são classificados em três tipos fundamentais: (a) partes do organismo ou organismos dos quais a droga deriva, excetuados aqueles incluídos na definição e descrição da droga, acima do limite de tolerância especificado na monografia; (b) quaisquer organismos, porções ou produtos de organismos além daqueles especificados na definição e descrição da droga em sua respectiva monografia e (c) impurezas de natureza mineral não inerentes à droga, tais como pedras, areia ou terra.

## PROCEDIMENTO

Determinar a quantidade de amostra a ser submetida ao ensaio com base na seguinte tabela:

Raízes, rizomas, cascas e ervas	500 g
Folhas, inflorescências, sementes e frutos	250 g
Materiais particulados ou fracionados (de peso médio inferior a 0,5 g por componente)	50 g

Colher — por quarteamento — a quantidade de tomada de ensaio especificada, a partir da amostra obtida por amostragem segundo o procedimento descrito anteriormente e espalhá-la em camada fina sobre superfície plana. Separar manualmente os materiais estranhos à droga, inicialmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lente de aumento (5 a 10 vezes). Pesar o material separado e determinar sua porcentagem com base no peso da tomada de ensaio.

## V.4.2.3. DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EM DROGAS VEGETAIS

A presença de quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento de microrganismos, insetos e hidrólise — e conseqüente deterioração — de constituintes da droga. Daí a necessidade do estabelecimento de limites de umidade para drogas vegetais, em geral, na faixa de 8 a 14%.

Três métodos são empregados: gravimétrico (dessecação), azeotrópico (destilação de tolueno) e volumétrico (Karl Fischer). O primeiro, tecnicamente mais simples e rápido, não é aplicável quando a droga contém substâncias voláteis além da água. Os demais requerem equipamentos especiais e compreendem técnicas mais complexas, sendo, contudo, aplicáveis com menos restrições.

*Preparo da amostra*

Reduzir — por corte, granulação ou fragmentação — drogas não pulverizadas ou trituradas de forma a limitar a dimensão de seus componentes a, no máximo, 3 mm de espessura. Sementes e frutos, mesmo de dimensões inferiores a 3 mm, devem ser quebrados. Evitar moinhos de alta velocidade ou outros procedimentos que acarretem perda de umidade no preparo da amostra.

*Método gravimétrico*

Proceder conforme descrito em "Determinação da perda por dessecação" (V.2.9). Transferir cerca

de 2 a 5 g, ou o especificado na monografia, exatamente pesados, de amostra preparada conforme instruções anteriores, para pesa-filtro chato tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra durante 30 minutos. Dessecar a amostra por um dos seguintes procedimentos, conforme especificado na monografia:

a) estufa: a 100-105 °C durante 5 horas antes da primeira pesagem, salvo quando houver outra especificação na monografia;

b) dessecador: sobre pentóxido de fósforo, sob pressão atmosférica e temperatura ambiente;

c) pressão reduzida: sobre pentóxido de fósforo, sob pressão não superior a 2,7 kPa (aproximadamente 20 mm de Hg) e temperatura ambiente, salvo quando houver outra especificação na monografia.

O ensaio é dado por concluído quando duas pesagens sucessivas não diferirem entre si por mais de 5 mg. Calcular a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

*Métodos azeotrópico e volumétrico*

Proceder conforme descrito em "Determinação de água" (V.2.20), empregando amostra de droga vegetal preparada conforme descrito em V.4.1.

## V.4.2.4. DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

A determinação de cinzas totais destina-se a estabelecer a quantidade de substância residual não-volátil no processo de incineração especificado. As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não-fisiológicas).

**PROCEDIMENTO**

Pesar exatamente cerca de 3 g – ou a quantidade especificada na monografia – da droga pulverizada, transferir para cadinho (de silício ou platina) previamente calcinado, resfriado e

pesado. Após distribuir a amostra uniformemente no cadinho, incinerá-la aumentando paulatinamente a temperatura, não ultrapassando 450 °C, até que todo o carvão seja eliminado. Resfriar em dessecador e pesar. Nos casos em que o carvão não puder ser eliminado totalmente, resfriar o cadinho e umedecer o resíduo com cerca de 2 ml de água ou solução saturada de nitrato de amônio (oxidante). Evaporar até secura – sucessivamente em banho-maria e sobre chapa quente – e incinerar até peso constante, não excedendo 450 °C. Calcular a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar.

**V.4.2.5. DETERMINAÇÃO DE CINZAS INSOLÚVEIS EM ÁCIDO**

Cinzas insolúveis em ácido compreendem o resíduo obtido na fervura de cinzas totais ou sulfatadas com ácido clorídrico diluído, após filtragem, lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silicosos da droga.

**PROCEDIMENTO**

Ferver o resíduo obtido na determinação de cinzas totais ou sulfatadas durante 5 minutos com 25 ml de ácido clorídrico (70 g/l) SR em cadinho

coberto com vidro de relógio. Lavar o vidro de relógio com 5 ml de água quente, juntando esta água ao cadinho. Recolher o resíduo insolúvel em ácido sobre papel de filtro isento de cinza, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostre neutro. Transferir o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secar sobre chapa quente e incinerar a cerca de 500 °C até peso constante. Calcular a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca ao ar.

## V.4.2.6. DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM DROGAS VEGETAIS

O teor de óleos essenciais em drogas vegetais é determinado pelo processo de destilação por arraste a vapor, com auxílio do equipamento descrito abaixo.

O equipamento (Figura), confeccionado em vidro resistente, de qualidade apropriada, compreende:

1) Balão de fundo redondo, de 500 a 1000 ml de capacidade, de colo curto, provido de uma junta 24/40, fêmea;

2) Condensador, adaptável ao balão através de uma junta esmerilhada 24/40, macho, construído em peça única de vidro, compreendendo as partes descritas a seguir, com as respectivas medidas:

2.1 Tubo vertical (AC) de 210-260 mm de comprimento e 13-15 mm de diâmetro interno;

2.2 Tubo dobrado, com segmentos (CD) e (DE) medindo 145-155 mm de comprimento cada e diâmetro interno de 7-8 mm;

2.3 Condensador de bolas, tipo Allihn (FG), de 145-155 mm de comprimento e diâmetro interno de 15 mm nas bolas e 8-10 mm nos estreitamentos;

2.4 Rolha (junta esmerilhada 14/20) (K') que obtura uma saída lateral (K) provida de junta esmerilhada 14/20 fêmea, na extremidade;

2.5 Tubo (GH) de 30-40 mm de comprimento e 7-8 mm de diâmetro interno, formando as partes (HK) ângulo (GHK) de 30° a 40°;

2.6 Alargamento em forma de pera (J) de 5 ml de capacidade;

2.7 Tubo (JL) provido de escala graduada de 110 a 120 mm, de 3 ml de capacidade e subdividida em vigésimos de mililitro;

2.8 Alargamento em forma de bola (L) de aproximadamente 2 ml de capacidade;

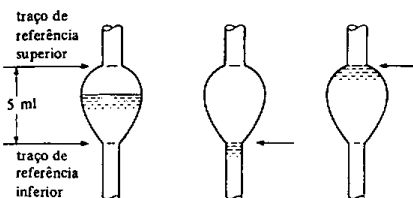
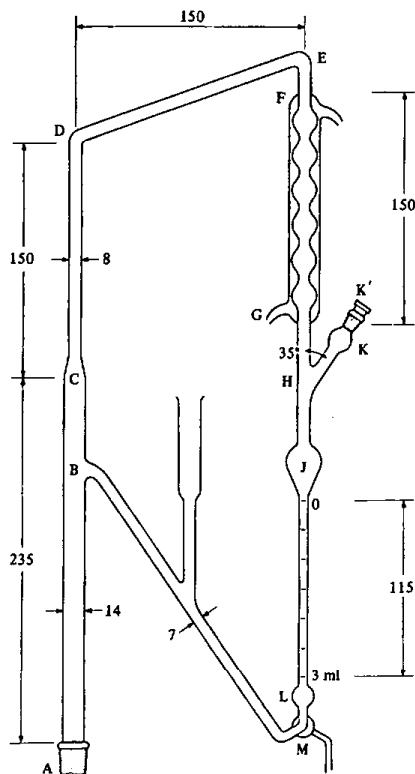
2.9 Torneira de 3 vias e

2.10 Tubo de conexão (BM) de 7-8 mm de diâmetro, provido de tubo de segurança. O ponto de inserção (B) encontra-se 20-25 mm acima da parte mais alta da escala graduada.

3) Fonte de calor que pode ser aquecedor elétrico ou bico de gás dotado de regulação fina da chama e

4) Suporte vertical adequado.

Antes da utilização o equipamento deve ser limpo por lavagens repetidas e sucessivas com acetona, água, mistura sulfocrômica e, novamente, água. Depois de seco deve ser montado em local protegido de correntes de ar.



Aparelho para determinação de óleos essenciais em drogas vegetais (dimensões em mm).

## PROCEDIMENTO

Introduzir no balão o volume do líquido indicado na monografia e pedaços de pedra porosa para regularizar a ebulição. Adaptar o condensador ao balão. Retirar a rolha esmerilhada (K') e, pela abertura (K), introduzir água até que a mesma comece a escorrer em (B). Com auxílio de pipeta volumétrica introduzir xilol, na quantidade

prescrita, apoiando-se a ponta da pipeta no fundo da saída lateral (K). Aquecer o líquido no interior do balão até o início da ebulição e destilar na vazão de 2 a 3 ml por minuto, a não ser que a monografia prescreva diferentemente.

Para determinar a velocidade da destilação, escoar a água com auxílio da torneira de três vias, até que o menisco esteja no nível do traço de referência inferior (Figura). Fechar a torneira e cronometrar o tempo necessário para encher o volume compreendido entre os traços de referência inferior e superior (5 ml). Abrir a torneira e continuar a destilação por 30 minutos. Desligar

o aquecimento, deixar esfriar por 10 minutos e fazer a leitura do volume de xilol no tubo graduado.

Introduzir no balão a quantidade da droga prescrita na monografia e proceder com a destilação por arraste a vapor, como descrito acima, pelo tempo e na velocidade indicada na monografia. Terminada a operação, deixar esfriar por 10 minutos e ler o volume do óleo essencial recolhido no tubo graduado. Subtrair da leitura o volume do xilol determinado anteriormente. A diferença representa a quantidade de óleo essencial contida na amostra. Calcular o resultado em mililitros de óleo essencial por 100 g da droga.

## V.4.2.7. DETERMINAÇÃO DE ÓLEOS FIXOS

A determinação de óleos fixos baseia-se na sua extração por solvente que, depois de evaporado, deixa como resíduo o óleo cuja quantidade é determinada por pesagem.

Caso a amostra contenha teor elevado de componentes hidrossolúveis (carboidratos, uréia, ácido láctico, entre outros) cabe pré-tratamento da amostra, a fim de evitar interferência na determinação de matérias graxas. Para tanto, transferir a tomada de ensaio para funil contendo papel de filtro, lavar com água e secar o resíduo em estufa a 105 °C durante 2 horas.

## PROCEDIMENTO

Transferir cerca de 10 g, exatamente pesados, de droga seca, obtida na determinação da perda por dessecação (V.2.9) para cartucho de celulose e colocá-lo em aparelho extrator Soxhlet, cobrindo-o com algodão desengordurado. Pesar o balão limpo e seco (contendo fragmentos de porcelana ou contas de vidro) e montá-lo no aparelho sobre

banho-maria, tomando a precaução de assegurar vedação na junta esmerilhada do balão (recomenda-se operação em capela). Transferir para o extrator éter de petróleo em quantidade suficiente para realizar três sifonagens e encaixar o condensador de refluxo. Proceder à extração sob aquecimento suficiente para manter o solvente em ebulição moderada durante 4 horas.

Concluída a extração, aguardar esfriamento, transferir o conteúdo do cartucho para almofariz de porcelana e juntar quantidade aproximadamente igual de areia lavada e seca. Pulverizar a droga e transferi-la novamente, no interior do cartucho, para o extrator. Reiniciar e manter a extração, nas condições acima, por período adicional de 2 horas. Desligar o balão do aparelho e evaporar o solvente (de preferência por destilação sob corrente de dióxido de carbono). Transferir o balão para estufa a 105 °C, resfriar e pesar. Repetir a operação até peso constante e calcular a porcentagem de óleos fixos na droga com base na diferença entre a massa da tomada de ensaio e a do resíduo.



## V.4.2.8. DETERMINAÇÃO DO CINEOL

A determinação de cineol compreende a determinação do ponto de congelamento (criometria) do composto de combinação molecular entre cineol e *o*-cresol — cresineol. Sendo esta temperatura proporcional ao conteúdo de cineol no composto, é possível estabelecer-se seu teor pela tabela a seguir.

O método é empregado na dosagem de cineol em essências de eucalipto e niaouli. Determinações em outras essências não são recomendadas sem comprovação prévia de exatidão em vista de alguns constituintes essenciais solubilizarem o cresineol (mesmo na essência de eucalipto, há riscos de erro quando o conteúdo de alfa-terpineol for superior a 12,5%).

Erros também advêm da presença de umidade, seja na essência, seja no *o*-cresol. O *o*-cresol empregado deve ser puro e seco, apresentando ponto de fusão superior a 30 °C. Deve ser conservado em frasco hermético, por ser higroscópico.

## PROCEDIMENTO

Secar a essência em ensaio, agitando-a com sulfato de sódio ou cloreto de cálcio, ambos anidros, em tubo de ensaio ou erlenmeyer provido de tampa esmerilhada. Deixar em contato durante 24 horas e filtrar. Transferir para tubo de ensaio

(cerca de 15 mm de diâmetro e 80 mm de altura) 3,0 g de essência, exatamente pesados, e adicionar 2,1 g de *o*-cresol em sobrefusão. Agitar a mistura com bulbo de termômetro (0-60 °C, graduado em décimos de grau) suspenso sobre o tubo de modo que a extremidade do bulbo não ultrapasse o limite de 5 mm da base do tubo e sem tocar em suas paredes, até indução de cristalização. Anotar a temperatura máxima observada no termômetro, durante a cristalização. Aquecer o tubo a cerca de 5-10 °C acima da temperatura lida e introduzi-lo em outro tubo maior (cerca de 60 mm de diâmetro e 100 mm de altura) de modo a criar camada de ar. Fixar o tubo menor dentro do outro com auxílio de placas de cortiça adaptadas ou por qualquer outro meio e mergulhar o conjunto em banho-maria termostaticado, mantendo a temperatura cerca de 5 °C abaixo do ponto de congelamento previamente anotado para o cresineol. Agitar a mistura com movimentos verticais do termômetro e, ao iniciar-se a cristalização (turvação do líquido), observar a estabilização da temperatura. Havendo flutuações durante a cristalização, considerar sempre a temperatura máxima lida durante o período de congelamento.

Repetir a determinação quantas vezes for necessário para que duas leituras sucessivas acusem variação máxima de 0,1 °C.

## Teor do cineol em essências.

Temp. (°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							

## V.4.2.9. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA

Pesar a quantidade de droga estabelecida na monografia, transferir para proveta de 500 ml provida de rolha esmerilhada e adicionar 50 ml de água. Arrolhar a proveta e agitar manualmente, durante 3 minutos, com duas agitações por segundo. Deixar em repouso por 1 minuto e fazer a leitura da coluna de espuma que se forma a partir da superfície do líquido. Repetir a leitura 30 minutos depois: o índice de espuma (após 1 minuto e após 30 minutos) é o número de ml correspondentes à altura da coluna de espuma.

**V.4.2.10. DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXTRAÍVEIS POR ÁLCOOL  
(EXTRATO ALCOÓLICO)**

Pesar exatamente cerca de 2 g da droga e transferir a amostra para cartucho do extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco. Introduzir no balão do extrator 200 mg de hidróxido de sódio e álcool absoluto em quantidade suficiente. Extrair por cinco horas, retirar o cartucho com o resíduo e secá-lo em estufa a 105 °C por 30 minutos. Pesar o resíduo seco e calcular o teor de substâncias extraíveis por álcool (extrato alcoólico) por diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco. Referir o resultado ao peso da droga seca (Determinação de água em drogas vegetais V.4.2.3).

## V.5. MÉTODOS BIOLÓGICOS

### V.5.1. TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

#### V.5.1.1. ESTERILIDADE

Os testes aqui apresentados são aplicados a insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos que, de acordo com a Farmacopéia, devem ser estéreis, e são adequados para revelar a presença de bactérias, fungos e leveduras nos mesmos. Contudo, resultado satisfatório indica somente que não foi encontrado microrganismo contaminante na amostra examinada. A extensão deste resultado ao restante do lote requer a segurança de que todas as unidades do mesmo tenham sido preparadas de modo a garantir grande probabilidade de que todo o lote passaria pelo teste. Obviamente isso depende das precauções tomadas durante os processos operacionais da fabricação.

#### PRECAUÇÕES DURANTE O TESTE

Os testes não devem ser realizados sob exposição direta de luz ultravioleta ou em áreas sob tratamento com aerossóis. Devem ser efetuados em condições adequadas de forma a evitar contaminação accidental da amostra durante o teste. Isto é conseguido, por exemplo, pelo uso de cabina de fluxo laminar, associado a freqüentes ensaios quanto à contaminação do ar e superfícies, contagens de partículas, determinação de velocidade e direção do fluxo de ar.

#### MEIOS DE CULTURA E FLUIDOS DE DILUIÇÃO E/OU LAVAGEM

A escolha do meio de cultura é de vital importância para oferecer condições ideais à multiplicação dos mais diversos microrganismos, com exigências diferentes para o crescimento. As monografias indicam os meios a serem empregados.

Os meios mais usados atualmente para testes de esterilidade são: *Meio de caseína-soja e Tioglicolato*; o primeiro para leveduras, fungos e aeróbios e o segundo, especialmente, para anaeróbios, embora haja, também, crescimento de aeróbios, leveduras e até mesmo fungos no tioglicolato.

##### a) Meio de tioglicolato fluido (Meio I)

– L-Cistina	0,5 g
– Cloreto de sódio	2,5 g
– Dextrose	5,5 g
– Ágar granulado (umidade não superior a 15%)	0,75 g

– Extrato de levedura (solúvel em água)	5,0 g
– Caseína de digestão pancreática	15,0 g
– Tioglicolato de sódio 0,5 ou ácido tioglicólico	0,5 g 0,3 ml
– Solução de resazurina sódica (1:1000) recém-preparada	1,0 ml
– Água	1 000 ml

*ph* após esterilização:  $7,1 \pm 0,2$ .

Misturar todos os ingredientes, menos o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico, à solução de resazurina sódica, com 1 000 ml de água e aquecer até dissolução total. Dissolver o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico nesta solução e, se necessário, ajustar pH para  $7,1 \pm 0,2$ , após a esterilização, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

Adicionar a solução de resazurina sódica, misturar e distribuir em frascos adequados. Esterilizar durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Desenvolve-se cor rósea na superfície, que não deve exceder um terço da altura; caso mais que um terço adquirir cor rósea, restaurar o meio por aquecimento em banho-maria ou em vapor fluyente.

##### b) Meio de tioglicolato com 1% de penicilinase (Meio II)

Empregar, preferencialmente para produtos contendo penicilina, solução de penicilinase padronizada em termos de unidade Levy. Uma unidade Levy de penicilinase inativa 59,3 unidades de benzilpenicilina em 1 hora, a  $25^\circ\text{C}$ , em solução tampão fosfato pH 7,0. Usar esta solução para inativar a penicilina nas amostras. A penicilinase deve ser adicionada aos tubos após a esterilização, usando técnica asséptica. Número representativo de tubos contendo meio com penicilinase sem o produto deverá acompanhar o teste durante o período de incubação. Quando se empregar meio com penicilinase, realizar controle positivo. Proceder o seguinte teste para verificar se toda a penicilina foi inativada:

– A tubo de meio contendo a amostra, adicionar 1 ml de cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, contendo 50 a 100 células. Após 24 horas de incubação a  $30-32^\circ\text{C}$  observar se ocorreu o crescimento.

c) **Tioglicolato com 1% de polissorbato 80**  
(Meio III)

Empregar nos testes de esterilidade para pomadas oftálmicas. Adicionar 1 ml de polissorbato 80 por litro de meio, antes da esterilização.

d) **Tioglicolato com 0,5% de azolectina e 0,4% de polissorbato 80** (Meio IV)

Empregar para teste de esterilidade de produtos que requeiram inativação de substâncias inibidoras.

e) **Meio de caseína-soja** (Meio V)

Empregar para detecção de bactérias aeróbicas, fungos e leveduras.

- Caseína de digestão pancreática 17,0 g
- Farinha de soja de digestão pa-  
painica 3,0 g
- Cloreto de sódio 5,0 g
- Fosfato de potássio dibásico 2,5 g
- Dextrose 2,5 g
- Água 1 000 ml

*pH após esterilização: 7,3 ± 0,2*

Dissolver todos os ingredientes em água, com ajuda de aquecimento. Resfriar à temperatura ambiente. Se necessário, adicionar hidróxido de sódio 0,1 M, de modo a obter pH 7,3 ± 0,2 após a esterilização. Caso necessário, filtrar; distribuir em frascos adequados e esterilizar por 15 minutos a 121 °C.

f) **Caseína-soja com 1% de penicilinase**  
(Meio VI)

Empregar para produtos contendo penicilina. Preparar e usar conforme o meio II.

g) **Caseína-soja com 0,1% de polissorbato 80**  
(Meio VII)

Preparar e empregar conforme o meio III.

h) **Caseína-soja com 0,5% de azolectina e 0,4% de polissorbato 80** (Meio VIII)

Preparar e empregar conforme o meio IV.

i) **Fluido I**

- Tecido animal de digestão  
péptica 1 g
- Água 1 000 ml

*pH após esterilização: 7,1 ± 0,2*

Dissolver o tecido animal de digestão péptica em água. Filtrar e, caso necessário, ajustar o pH para 7,1 ± 0,2 com hidróxido de sódio 0,1 M. Distribuir em frascos adequados e esterilizar durante 15 minutos a 121 °C.

j) **Fluido II**

É o fluido I com adição de 0,1% de polissorbato 80, antes da esterilização.

k) **Fluido III**

- Tecido animal de digestão  
péptica 5,0 g
- Extrato de carne 3,0 g
- Polissorbato 80 10,0 g
- Água 1 000 ml

*pH após esterilização: 6,9 ± 0,2*

Misturar todos os ingredientes com água e aquecer até dissolução. Filtrar e, se necessário, ajustar pH para 6,9 ± 0,2 com hidróxido de sódio 0,1 M. Distribuir em frascos adequados e esterilizar durante 15 minutos a 121 °C. Ajustar o pH a 6,9 ± 0,2 com solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Distribuir em frascos adequados.

**PRÉ-INCUBAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE DOS MEIOS DE CULTURA**

Os meios de cultura devem apresentar esterilidade e capacidade de promover crescimento de microrganismos que devem ser testadas em cada lote antes do teste das amostras ou em paralelo com ele.

Após a esterilização, os meios de *Tioglicolato fluido* e de *Caseína-soja* devem ser incubados, respectivamente, a 30-35 °C e 20-25 °C durante, no mínimo, 7 dias. Não deve ocorrer crescimento de microrganismos.

Efetuar teste para verificar a capacidade dos lotes de meios em promover o crescimento de microrganismos. Os seguintes microrganismos são adequados para realizar o teste:

a) *Bacillus subtilis* ATCC 6633, ou se não for desejado microrganismo formador de esporo, *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

b) *Candida albicans* ATCC 10.231.

c) *Aspergillus niger* ATCC 16.404.

Meio	Microrganismo	Temperatura de incubação
Tioglicolato fluido	<i>B. subtilis</i> ou <i>M. luteus</i> <i>C. albicans</i> <i>C. sporogenes</i> ou <i>B. vulgatus</i>	30 – 35 °C
Caseína-soja	<i>B. subtilis</i> ou <i>M. luteus</i> <i>C. albicans</i> <i>A. niger</i>	20 – 25 °C

d) *Clostridium sporogenes* ATCC 11.437; se não for desejado microrganismo formador de esporo, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

Inocular pelo menos dois tubos de cada meio, com volume de suspensão de microrganismos que contenha 50 a 100 células, conforme tabela da página anterior.

Este meio será considerado satisfatório desde que todos os tubos inoculados apresentem evidência de crescimento dentro de 7 dias.

Sendo o teste de crescimento realizado concomitantemente com o teste de esterilidade, este é considerado inválido, caso não ocorra proliferação de microrganismo na prova de crescimento.

#### PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Usualmente é necessário efetuar ajuste do processo de diluição antes de iniciar a prova para conseguir densidade específica de 50-100 células viáveis por mililitro da solução, devido à variação entre cepas do mesmo microrganismo, meios de cultura e superfície de ágar inclinado. Para estabelecer, numericamente, uma variação entre o crescimento em um meio e o microrganismo específico, fazer uma série de contagens em placas a partir da diluição  $10^{-6}$  (1:1.000.000), para determinar a densidade bacteriana. Escolher volume adequado desta diluição de tal modo que ao ser diluído em volume conhecido contenha de 50-100 células viáveis por ml. Se o procedimento estiver bem padronizado (como, por exemplo, a área da superfície do ágar inclinado, técnicas de laboratório etc.) é possível reproduzir os resultados com a mesma cepa de bactérias.

#### Procedimento

1) Com o auxílio de alça de platina transferir inóculo da cepa do microrganismo específico para tubo de ensaio contendo ágar nutritivo inclinado. Semear levemente a cultura sobre toda a superfície do ágar inclinado, de modo a obter película uniforme de crescimento;

2) Incubar sob condições ótimas de crescimento do microrganismo específico;

3) Após o período de incubação transferir a cultura do microrganismo da superfície do ágar inclinado para frasco contendo 99 ml de água esterilizada;

4) Homogeneizar a suspensão, no mínimo, 25 vezes por inclinação do frasco;

5) Preparar uma seqüência de diluições desejadas: 1:100; 1:10.000 e 1:1.000.000, a partir da suspensão do frasco original;

6) A homogeneização das suspensões de cada diluição pode ser realizada também com o auxílio de bastão de vidro, por agitação magnética ou pérolas de vidro.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIOSTÁTICA OU FUNGISTÁTICA

Antes de iniciar o teste de esterilidade de insumos farmacêuticos, medicamentos ou correlatos, avaliar seu nível de atividade bacteriostática e/ou fungistática pelo seguinte procedimento:

Preparar, pelo menos, quatro tubos de meio de cultura ou de cada um dos meios de cultura a serem empregados no *Teste de esterilidade*. Adicionar a todos os tubos quantidade do produto em análise, conforme segue (2):

Conteúdo do recipiente (ml)	Volume mínimo de produto (ml)	Volume mínimo de meio (ml)
menos que 10	1 ml, ou o conteúdo total, se menor que 1	15
11 a 50	5	40
51 a 100	10	80

Inocular metade dos tubos com microrganismo aeróbico e a outra metade com anaeróbico, conforme indicado para o *Teste de crescimento nos Meios de cultura* (1). Preparar duplicata do conjunto, em condições idênticas, porém não adicionar o produto a ser testado. Incubar todos os tubos contendo tioglicolato a 30-35 °C e a 20-25 °C, os que contiverem caseína-soja. Se houver crescimento normal dos microrganismos na presença e na ausência do produto, o *Teste de esterilidade*

pode ser realizado sem modificações. Se o crescimento for pequeno ou nulo o produto exerce atividade bacteriostática e/ou fungistática e essa atividade deve ser eliminada antes do teste de esterilidade por meio de agentes neutralizantes ou, no decorrer do mesmo, através da diluição do produto. Deve-se repetir o teste até determinar a relação ideal entre os volumes do produto e do meio, que não interfira no crescimento de microrganismos. Outra maneira de evitar as atividades

(1) Quando se tratar de antibiótico, empregar cepa de microrganismos sensíveis.

(2) Para algodão, gaze e material relacionado, empregar duas peças por tubo.

bacteriostática e/ou fungistática é empregar o método de filtração por membrana, quando a natureza do produto assim o permitir.

#### PROCEDIMENTO PARA O TESTE DE ESTERILIDADE

O teste de esterilidade pode ser realizado de duas maneiras: através do *Método de inoculação* do produto diretamente no meio (*Método Direto*) ou pelo *Método de filtração por membrana*, o qual deve ser empregado sempre que possível.

#### Amostragem

O número de amostras de um produto para teste de esterilidade deve ser, no mínimo, de 20 unidades ou 10% do número de unidades que constituem o lote se este for inferior a 199 unidades. Antes do teste proceder à assepsia das paredes externas dos frascos e ampolas, mergulhando-os em solução antimicrobiana. No caso de artigos cujas embalagens não resistam a esse tratamento, fazer assepsia das amostras por meio de gaze ou pano estéril, embebido em solução antimicrobiana.

Para matérias-primas, amostragem satisfatória é baseada na raiz quadrada do número total de recipientes do lote, conforme abaixo indicado:

Nº total de recipientes do lote	Nº de recipientes a serem abertos para teste
1 a 3	todos
4 a 9	3
10 a 16	4
17 a 25	5
26 a 36	6
37 a 49	7
50 a 64	8
65 a 81	9
82 a 100	10
101 a 121	11

A assepsia dos recipientes deve ser realizada por meio de gaze ou pano estéril, embebido em solução antimicrobiana.

#### *Método de inoculação ou direto*

##### Procedimento

O teste de esterilidade pelo *Método de inoculação ou direto* consiste na transferência asséptica de quantidade do produto a ser examinado para *Meio de tioglicolato fluido* e *Meio de caseína-soja* seguida de incubação a 30-35 °C e 20-25 °C, respectivamente, durante 14 dias.

#### Líquidos

Retirar o líquido do recipiente utilizando pipeta estéril ou seringa e agulha estéreis. Trans-

ferir assepticamente o volume indicado de cada amostra para os tubos contendo *Meio de tioglicolato fluido* e *Meio de caseína-soja* (os volumes mínimos, tanto de material em análise quanto dos meios de cultura, estão especificados no item *Teste de Avaliação da Atividade Bacteriostática ou Fungistática*). Misturar o líquido com o meio sem arejar excessivamente. Incubar o *Meio de tioglicolato fluido* por 14 dias a 30-35 °C e o *Meio de caseína-soja* por 14 dias a 20-25 °C.

Se o material em análise provocar turvação dos meios de cultura, de modo a impedir a observação do crescimento microbiano, transferir porções adequadas de cada tubo para outros tubos contendo os meios, após 3 a 7 dias do início da incubação. Continuar a incubação de todos os tubos até que se completem 14 dias a contar do início do teste.

#### Sólidos

Transferir quantidade de produto na forma de sólido seco (ou de solução ou suspensão do produto preparada pela adição de diluente estéril ao recipiente), correspondente a 300 mg de cada recipiente sob análise, ou todo o conteúdo, se for menor que 300 mg, a volume não inferior a 40 ml de *Meio de tioglicolato fluido* e a 40 ml de *Meio de caseína-soja*. Misturar e proceder como para *Líquidos*.

#### Pomadas e óleos insolúveis em miristato de isopropila

Selecionar 20 recipientes, dividi-los em dois grupos de 10 e tratá-los como segue: transferir assepticamente 100 mg de cada recipiente para frasco contendo 100 ml de veículo aquoso estéril, capaz de dispersar o material em análise homogeneamente por toda a mistura. A escolha do agente dispersante incorporado ao veículo aquoso pode diferir de acordo com a natureza do material em análise; contudo, este agente não deve causar bacteriostase nem fungistase na concentração utilizada; portanto, executar o *Teste de Avaliação da Atividade Bacteriostática ou Fungistática* para esse agente, antes de empregá-lo.

Transferir 10 ml dessa mistura a 80 ml de *Meio de tioglicolato fluido* e 10 ml a 80 ml de *Meio de caseína-soja*. Continuar o procedimento como descrito para *Líquidos*.

#### Algodão purificado, gaze, bandagem e material relacionado

De cada embalagem de algodão, gaze em rolo ou gaze em bandagem a ser analisada, retirar, com instrumentos estéreis, duas porções de 100 a 500 mg das partes mais internas da amostra. Para materiais em embalagem individual, tais como chumaço de gaze, retirar duas porções individuais de 250 a 500 mg, ou duas unidades totais, no caso de unidades pequenas (ex: bandagens menores que 25 a 75 mm). Transferir uma porção para tubo com 40 ml de *Meio de tioglicolato fluido* e



outra para tubos com 40 ml de *Meio de caseína-soja*. Continuar o procedimento como descrito para *Líquidos*.

#### Aparelhos parenterais

Para aparelhos de formas e dimensões que permitam sua imersão total em não mais que 1000 ml de meio de cultura, testar o aparelho intacto, mergulhando uma unidade em *Meio de tioglicolato fluido* e outra em *Meio de caseína-soja*. Verificar se os pequenos canais e orifícios estão em contato com o meio de cultura; caso isto não ocorra, fazer cortes no aparelho para atingir tal objetivo. Não podendo o aparelho ser imerso completamente, dividi-lo em porções adequadas. Não podendo ser dividido, passar *Meio de caseína-soja* e *Tioglicolato fluido* pelo interior de 20 amostras, recolher pelo menos 15 ml destes meios e incubá-lo por 14 dias a 20-25 °C com não menos que 100 ml dos mesmos meios. Continuar o procedimento como descrito para *Líquidos*.

#### Gaze com vaselina

Preparar o *Meio de tioglicolato fluido* conforme descrito no item *Meio de cultura*, adicionando 1,0 g de ágar e 5,0 g de gelatina para cada 1000 ml de meio. Distribuir porções de 300 ml em frascos que permitam o fechamento hermético após a esterilização. Esterilizar durante 15 minutos a 121 °C. Aquecer o meio a 52 °C e transferir assepticamente o conteúdo total de uma embalagem de gaze com vaselina. Fechar hermeticamente e agitar durante 10 minutos em agitador mecânico. Resfriar os frascos em posição inclinada até que a vaselina forme camada sólida vedando a superfície do meio. Quebrar a vedação por uma única e rápida agitação. Incubar a 20-25 °C durante 7 dias e agitar, em agitador mecânico, durante, pelo menos, 10 minutos. Transferir assepticamente 0,5 ml dessa mistura para 15 ml de *Meio de tioglicolato fluido* e 0,5 ml para 15 ml de *Meio de caseína-soja*. Incubar, respectivamente, a 30-35 °C e 20-25 °C durante, pelo menos, 7 dias.

#### Método de filtração por membrana

O teste de esterilidade pelo *Método de filtração por membrana* consiste na dissolução da substância em análise em fluido estéril adequado e a passagem dessa solução através de membrana estéril, que irá reter qualquer contaminação em sua superfície; em seguida esta é lavada, seccionada e transferida assepticamente para meio de cultura adequado. Para realizar o teste é necessário funil apropriado no qual é colocada a membrana e receptáculo para esse funil, que é acoplado a reservatório (que acolherá as soluções filtradas), ligado a bomba de vácuo. A membrana pode ser de nitrato de celulose (empregada, por exemplo, em soluções aquosas, oleosas e alcoólicas fracas) ou acetato de celulose (empregada, por exemplo, em soluções alcoólicas fortes), com diâmetro de 47 mm, porosidade nominal de  $0,45 \mu\text{m} \pm 0,02 \mu\text{m}$  e fluxo de 55 a 75 ml de água por centímetro quadrado por minuto, à pressão de 700 mm a 25 °C. Todo material deve ser esterilizado durante 15 minutos a 121 °C. Não empregar volume de amostra menor que o indicado.

#### Líquidos miscíveis em veículos aquosos

Transferir, assepticamente, o volume indicado abaixo para conjunto de funil e membrana, filtrar, lavar com três porções de 100 ml de *Fluido I*, cortar a membrana ao meio, colocar uma das metades no *Meio de tioglicolato fluido* e a outra no *Meio de caseína-soja*. Incubar, respectivamente, a 30-35 °C e 20-25 °C durante, pelo menos, 7 dias.

Não realizar o teste com volume de amostra inferior ao indicado. Se o volume for insuficiente, aumentar o número de amostras.

#### Líquidos imiscíveis em veículos aquosos

Proceder como para "Líquidos miscíveis em veículos aquosos", substituindo o *Fluido I* pelo *Fluido II*.

Volume de líquido e meio de cultura para Método de Filtração por Membrana

Volume de recipiente (ml)	Volume mínimo de cada recipiente para meio de cultura (ml)	Volume mínimo de cada meio de cultura (ml)	Número mínimo de amostras a serem testadas
menos que 10	1 ml ou conteúdo total se menor que 1 ml	100	20
11 a 50	5	100	20
51 a 100	10	100	20
101 a 500	Conteúdo total	100	10
Acima de 500	500	100	10

*Pomadas e óleos solúveis em miristato de isopropila*

Selecionar 20 unidades, transferir 100 mg de cada unidade para frasco contendo 100 ml de miristato de isopropila, cujo pH seja igual ou superior a 5,5, e que tenha sido esterilizado por filtração em membrana de 0,22  $\mu$ m. Aquecer o miristato de isopropila a 47 °C. Agitar e dissolver a pomada. Transferir a mistura para conjunto de funil e membrana. Umedecer antes a membrana com pequena quantidade do líquido de lavagem, filtrar, lavar com 3 porções de 100 ml de *Fluido II*. Cortar a membrana ao meio, colocar uma das metades no *Meio de tioglicolato fluido* e a outra no *Meio de caseína-soja*. Incubar, respectivamente, a 30-35 °C e 20-25 °C durante, pelo menos, 7 dias. Se a substância contiver vaselina, usar como líquido de lavagem o *Fluido III*.

*Sólidos solúveis*

Transferir uma quantidade de substância em forma sólida (ou de solução ou suspensão da substância preparada pela adição de diluente estéril ao recipiente), correspondente a 300 mg de cada recipiente em análise, ou todo o conteúdo, se for menor que 300 mg, a cerca de 100 a 200 ml de diluente apropriado (*Fluido I* ou *Fluido II*). Filtrar o conteúdo do frasco em conjunto de funil e membrana, lavar com 3 porções de 100 ml de fluido apropriado e prosseguir como para "Líquidos miscíveis em veículos aquosos".

*Algodão purificado, gaze e material relacionado (categorite, suturas etc.)*

Fazer amostragem de acordo com a monografia para *Algodão purificado, gaze e material relacionado*. Transferir o total de amostras para frasco contendo volume suficiente de *Fluido I*, ou, quando for o caso, passar o fluido pelo interior dos tubos ou do equipamento. Agitar vigorosamente. Transferir o líquido para conjunto de

funil e membrana e filtrar. Prosseguir como indicado para "Líquidos miscíveis em veículos aquosos".

*Controle negativo ou branco*

Efetuar constantemente controle negativo, simulando teste com os fluidos e solventes utilizados. O resultado do teste deve ser negativo.

*Observação e interpretação dos resultados*

Durante o tempo de incubação, observar os tubos em análise, periodicamente, para verificar eventual aparecimento de crescimento microbiano. Se, ao final do período de incubação, não ocorrer crescimento microbiano, a amostra é considerada satisfatória para o teste de esterilidade. Se ocorrer crescimento, o produto não corresponde ao teste de esterilidade, a menos que se possa demonstrar o contrário por reteste, ou por meios que comprovem não ter a contaminação causa relacionada com a amostra (ex.: contaminação ambiente, contaminação de controle negativo).

O reteste deve ser feito de maneira idêntica ao teste inicial. Se não aparecer evidência de crescimento, a amostra é satisfatória para o teste de esterilidade. Se houver crescimento no primeiro reteste, isolar e caracterizar o(s) contaminante(s) microbiano(s) do primeiro reteste e comparar com o(s) contaminantes do teste de esterilidade original. Se o contaminante for o mesmo nos dois testes, a amostra não corresponde ao teste de esterilidade. Se os dois contaminantes forem diferentes, deve ser realizado um segundo reteste.

O segundo reteste deve ser feito com o dobro de unidades de amostra utilizadas no teste inicial. Os volumes de cada unidade devem ser os mesmos indicados para o teste inicial. Se não houver evidência de crescimento, a amostra é satisfatória para o teste de esterilidade. Se houver crescimento de qualquer microrganismo, a amostra é considerada insatisfatória para o teste de esterilidade.

## V.5.1.2. PIROGÊNIOS

O teste de pirogênios fundamenta-se na medida do aumento da temperatura corporal dos coelhos, quando se injeta intravenosamente uma dose-limite de 10 ml por kg de peso, durante período não superior a 10 minutos, de solução estéril da substância em análise.

Para os produtos que requeiram preparação preliminar ou que necessitem de condições especiais de administração, seguir as normas recomendadas na monografia.

*Seleção dos animais*

Usar coelhos de ambos os sexos, adultos, sadios, preferencialmente a mesma raça, pesando no mínimo 1,5 kg. Manter os animais em gaiolas individuais em sala de temperatura uniforme ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e livre de perturbações que os possam excitar. Uma semana antes de usar um animal pela primeira vez, iniciar exercício de condicionamento segundo a técnica recomendada para o teste, mas sem a injeção do produto a ser analisado.

Ocorrendo teste de pirogênio negativo, pode-se usar o mesmo animal após 48 horas. Quando o teste de pirogênio for positivo, não se usam os mesmos animais antes de duas semanas.

*Registro da temperatura*

Usar termômetro clínico de precisão, graduado em  $0,1^{\circ}\text{C}$ , com tempo de elevação de temperatura máxima previamente determinado ou qualquer outro dispositivo de registro de temperatura de igual sensibilidade.

Intro uzir o termômetro no reto do animal à profundidade aproximada de 6 centímetros. Se for utilizado dispositivo registrador, que deva permanecer no reto durante o período do teste, conter os coelhos de maneira que fiquem em postura natural de repouso. Quando se empregar termômetro clínico deixar transcorrer o tempo necessário (previamente determinado) para que alcance a temperatura máxima, antes de proceder à leitura.

*Material*

As seringas, agulhas e vidrarias tornam-se apirogênicas a  $250^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos ou a  $200^{\circ}\text{C}$  por uma hora. O cloreto de sódio, a  $200^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

*Procedimento*

Durante as duas horas precedentes, e durante o teste, suprimir alimentação dos três coelhos, dando-lhes somente água.

No máximo 40 minutos antes da injeção da dose do produto a ser testado, determinar a temperatura de controle (inicial) de cada animal mediante duas leituras feitas com intervalo de 30 minutos. A média das duas temperaturas é considerada como a temperatura de controle do animal, que é a base para a determinação de qualquer aumento de temperatura resultante da injeção da solução de teste. Não usar animais com temperatura superior a  $39,8^{\circ}\text{C}$ . Usar no teste somente os animais cujas temperaturas de controle não se desviem de mais de  $1,0^{\circ}\text{C}$  um do outro. Não devem ser usados os animais que apresentarem desvio maior do que  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , nas duas leituras da temperatura controle.

Preparar o produto a ser testado conforme especificado na monografia. Aquecer o mesmo a  $37-38^{\circ}\text{C}$ .

Injetar pela veia marginal da orelha de três coelhos não menos do que 0,5 ml nem mais de 10 ml da solução por kg de peso corporal ou a quantidade indicada na monografia. A injeção não deve durar mais de 10 minutos, a menos que na monografia se especifique tempo diferente.

Registrar a temperatura 1, 2 e 3 horas após a injeção.

*Interpretação*

A temperatura máxima registrada para cada coelho é considerada como sua resposta. Quando as temperaturas medidas após a injeção forem inferiores à temperatura de controle, a resposta equivale à elevação de temperatura zero.

Se nenhum dos três coelhos apresentar elevação de temperatura de  $0,6^{\circ}\text{C}$ , ou mais, sobre suas respectivas temperaturas de controle, e se a soma dos aumentos dos três não exceder a  $1,4^{\circ}\text{C}$ , o produto em exame cumpre os requisitos de ausência de pirogênios.

Se algum coelho apresentar aumento da temperatura de  $0,6^{\circ}\text{C}$ , ou mais, ou se a soma dos aumentos exceder a  $1,4^{\circ}\text{C}$ , repete-se o teste usando-se outros cinco animais.

Se no máximo três dos oito coelhos mostrarem aumentos individuais de temperatura de  $0,6^{\circ}\text{C}$ , ou mais, e se a soma dos oito aumentos de temperatura não exceder a  $3,7^{\circ}\text{C}$ , o produto em exame cumpre os requisitos para ausência de pirogênios.

## V.5.1.3. TOXICIDADE

## TESTE GERAL

*Seleção dos animais*

Usar camundongos sadios, de ambos os sexos, preferencialmente de cepa conhecida, não utilizados previamente em testes biológicos. Mantê-los sob dieta uniforme, água à vontade e temperatura ambiente constante de 20-24 °C. No dia do teste, selecionar camundongos com peso entre 18 e 22 g.

*Preparação da amostra*

A amostra deve ser preparada conforme especificação constante na respectiva monografia e administrada imediatamente.

*Procedimento*

Usar seringas, agulhas e vidraria estéreis. Segundo especificado na monografia, administrar volume da substância sob teste, em cinco camundongos por uma das vias seguintes:

- 1) Intravenosa. Injetar a dose na veia caudal, mantendo-se a velocidade constante de 0,1 ml por segundo ou a indicada na monografia;
- 2) Intraperitoneal. Injetar a dose na cavidade peritoneal;
- 3) Subcutânea. Injetar a dose na região cervical ou abdominal;
- 4) Oral. Administrar a dose por meio de sonda ou outro dispositivo adequado.

*Interpretação*

Manter os animais em observação durante 48 horas ou pelo tempo indicado na monografia. A sobrevivência de todos os camundongos durante o período estabelecido determina a aprovação do produto. A morte de um ou dois animais ou a presença de sintomas anormais requer repetição do teste, empregando-se cinco ou mais camundongos (19,5 a 20,5 g), não utilizados previamente. A amostra cumpre os requisitos do teste se o número de camundongos mortos não exceder 10% do total de animais testados, incluindo o teste original.

TESTE PARA SOROS E VACINAS  
DE USO HUMANO

Salvo especificação diferente constante na monografia, injetar intraperitonealmente uma dose humana<sup>1</sup>, porém não exceder 1,0 ml, em cinco camundongos selecionados conforme descrito no teste geral, e uma dose humana em dois cobaios sadios, pesando entre 250 e 350 g. Neste caso não exceder 5,0 ml.

A amostra é aprovada no teste se nenhum dos animais apresentar sintomas anormais durante os sete dias seguintes. Se um animal morrer ou apresentar sintomas anormais, repetir o teste. A amostra cumpre os requisitos do teste caso nenhum dos animais do segundo grupo morrer ou apresentar sintomas anormais no intervalo de tempo especificado.

A dose humana é a declarada no rótulo ou na bula da preparação a ser examinada.

## V.5.1.4. SUBSTÂNCIAS VASODEPRESSORAS

*Preparação do padrão de referência*

Empregar dicloridrato de histamina, conservado em frasco hermético e opaco, dessecado sobre sílica-gel durante duas horas, antes do uso.

*Solução padrão de referência*

Dissolver, em água estéril, quantidade suficiente e exatamente pesada de dicloridrato de histamina para obter solução contendo o equivalente a 1 mg/ml de histamina (base livre). Conservar sob refrigeração em recipiente de vidro âmbar dotado de tampa esmerilhada, ao abrigo da luz, durante um mês. No dia do teste, preparar solução padrão de referência contendo o equivalente a 1,0 µg/ml de histamina (base livre), em solução fisiológica.

*Solução da amostra*

Preparar a solução da amostra conforme a especificação da monografia respectiva.

*Método sugerido*

Pesar gato adulto e sadio (no caso de fêmea, que não esteja prenhe) e anestesiá-lo através de injeção intraperitoneal de cloralose ou barbitúrico que permita a manutenção de pressão arterial uniforme. Imobilizar o animal e protegê-lo para prevenir perda de calor corporal.

Dissecar a veia femoral ou jugular, preparando-a por inserção de cânula repleta de heparina (1000 unidades/ml de solução fisiológica) para a administração das soluções padrão de referência e amostra.

Expor cirurgicamente a artéria carótida, dissecando-a completamente das estruturas circundantes, inclusive o nervo vago. Inserir uma cânula

conectando-a diretamente ao manômetro de mercúrio ou outro dispositivo apropriado para o registro contínuo da pressão arterial.

Avaliar a sensibilidade do gato à histamina, injetando em intervalos uniformes de, no mínimo, 5 minutos, doses correspondentes a 0,05 µg (dose A); 0,10 µg (dose B) e 0,15 µg (dose C) de histamina (base livre) por kg de peso corporal. Após cada administração, lavar imediatamente a cânula por injeção de aproximadamente 0,5 ml de solução fisiológica, para remover atividade residual. Repetir três vezes a administração da dose B a fim de observar a uniformidade de resposta à mesma dose. O animal é considerado apto à realização do teste se as respostas aos três níveis de dosagem forem nitidamente diferenciadas e as respostas à seqüência de doses B forem aproximadamente similares, correspondendo a quedas de pressão arterial não inferiores a 2,7 kPa (20 mm de mercúrio).

Injetar duas séries de quatro doses, consistindo cada série de duas injeções da dose especificada na monografia da amostra, intercaladas com a dose B, sempre com intervalo uniforme de, no mínimo, 5 minutos.

Medir a alteração da pressão arterial após cada uma das injeções. Na análise dos resultados, considera-se que a amostra cumpre os requisitos do teste se a média de suas respostas depressoras for inferior àquela da dose B.

Terminar o teste administrando uma dose C do padrão para comprovar que a resposta se mantém superior à dose B. Caso isto não ocorra, o teste não é válido.

O animal pode ser usado enquanto permanecer estável e responder, adequadamente, à administração da solução padrão de referência.

## V.5.1.5. HISTAMINA

Usar cobaia com peso entre 250 e 350 g, em jejum de aproximadamente 24 horas. Sacrificar o animal com golpe na nuca e sangria imediata por secção dos vasos cervicais. Retirar aproximadamente 10 cm da porção distal do fêo. Lavar internamente com solução nutritiva. Selecionar porção com cerca de 2 ou 3 cm de comprimento e amarrar duas linhas finas nas extremidades. Efetuar pequena incisão na porção central do tecido. Transferi-lo para cuba-de-órgão-isolado, de 10 a 20 ml de capacidade, à temperatura controlada entre 34 a 36 °C sob corrente de ar ou mistura de 95% de oxigênio e 5% de CO<sub>2</sub>. Fixar uma das linhas no fundo da cuba e amarrar a outra na alavanca destinada a registrar as contrações musculares no quimógrafo ou outro sistema de registro adequado. Ajustar a alavanca para o registro das contrações do fêo com grau de amplificação da ordem de 20 vezes. Lavar a preparação com solução nutritiva e deixá-la em repouso durante 10 minutos.

Adicionar volumes conhecidos — da ordem de 0,2 a 0,5 ml de solução padrão de referência de histamina (1 µg/ml) — para obter resposta submáxima (dose maior). Lavar o fêo três vezes com solução nutritiva. Efetuar as adições sucessivas em intervalos regulares de aproximadamente 2 minutos. Adicionar novas doses de solução padrão de referência de histamina — obtidas por diluição da solução original, de modo a manter os volumes de doses sempre iguais — estabelecendo a dose responsável por resposta cuja intensidade seja a metade da dose maior (dose menor).

Prosseguir o teste adicionando seqüências de 3 doses: dose padrão de referência menor, dose de solução da substância sob teste e dose padrão de referência maior. Ajustar a diluição da amostra para que, ocorrendo contração do fêo, esta seja menor que a produzida pela dose padrão de referência maior.

Estabelecer a reprodutibilidade da contração por repetições sucessivas da seqüência de doses.

Calcular a atividade da substância sob teste em termos de seu equivalente em µg/ml de histamina (base livre), tomando por base as diluições efetuadas. O valor encontrado não deve exceder o limite estabelecido na monografia.

Não ocorrendo contração no teste supracitado por efeito da amostra ensaiada, preparar nova solução da amostra, adicionando quantidade de histamina correspondente ao limite máximo especificado na monografia e observar se a contração produzida é proporcional à quantidade de histamina adicionada. Considerar o teste válido se essa resposta for proporcional e se confirmar reprodutibilidade das contrações induzidas pela seqüência de doses: dose padrão de referência menor, dose de solução da substância sob teste e dose padrão de referência maior. Caso contrário, realizar o teste para substâncias vasodepressoras.

*Solução nutritiva*

(preparar no momento da utilização)

Solução A*	50 ml
Sulfato de atropina	0,5 mg
Bicarbonato de sódio	1,0 g
Dextrose anidra (para uso parenteral)	0,5 g
Água bidestilada (obtida de equipamento de vidro)	950 ml

*\*Solução A*

Cloreto de sódio	160,0 g
Cloreto de potássio	4,0 g
Cloreto de cálcio anidro	2,0 g
Cloreto de magnésio anidro	1,0 g
Fosfato de sódio dibásico	0,05 g
Água qsp	1.000 ml

## V.5.1.6.— CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS EM PRODUTOS QUE NÃO NECESSITAM CUMPRIR COM O TESTE DE ESTERILIDADE

### V.5.1.6.1 — CONTAGEM DE MICROORGANISMOS VIÁVEIS TOTAIS

Este método é capaz de determinar o número total de bactérias e fungos presentes em produtos e matérias-primas não estéreis. O método consiste na contagem da população de microrganismos que apresentem crescimento visível, em 4 dias, em ágar caseína-soja (*Meio I*) a 30-35 °C e em 7 dias, em ágar Sabouraud-dextrose (*Meio II*) a 20-25 °C.

A determinação pode ser efetuada através do *Método de filtração por membrana*, *Método de contagem em placa* ou *Método dos tubos múltiplos*.

Empregar técnicas assépticas na amostragem e na execução do teste. Realizar o teste preferencialmente em capela de fluxo laminar e empregar, quando possível, a técnica de filtração por membrana.

Na amostragem de produtos em processamento, coletar 3 amostras do início, 4 do meio e 3 do fim do processo. Executar o teste na mistura destas amostras.

Utilizar diluição que permita que o número de Unidades Formadoras de Colônias se encontre dentro dos limites sugeridos para o método a ser usado.

#### MÉTODO DE FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

Empregar membrana de nitrato de celulose ou acetato de celulose, com porosidade não superior a 0,45 µm. O equipamento para filtração e a membrana devem ser esterilizados por autoclavagem e devem ser obedecidas precauções durante o teste, conforme descrito na seção V.5.1.1.

Transferir 10 ml ou a quantidade de diluição que represente 1 g da amostra a ser testada, para uma de duas membranas filtrantes e filtrar imediatamente. Se necessário, diluir a amostra de maneira a obter contagem de colônias entre 10 e 100. Lavar ambas as membranas, pelo menos três vezes, com aproximadamente 100 ml de líquido estéril adequado. Transferir uma das membranas, para contagem de bactérias, para superfície de placa de Petri contendo 15-20 ml de *Meio I*. Incubar a 30-35 °C durante 4 dias. Transferir a segunda membrana, para contagem de fungos, para superfície de placa de Petri contendo 15-20 ml de *Meio II*. Incubar a 20-25 °C durante 7 dias. Avaliar o número de colônias desenvolvidas. Calcular o número de microrganismos por grama ou ml de amostra. Se necessário, proceder à contagem de bactérias e fungos separadamente.

#### Preparação de amostras

*Substâncias solúveis em água* — Transferir 10 g ou 10 ml da mistura de amostras para frasco volumétrico contendo 90 ml de tampão fosfato pH 7,2. Agitar até dissolução e ajustar o pH entre 6,5 e 7,5 com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M e completar o volume de 100 ml. Transferir duas alíquotas de 10 ml para dois frascos volumétricos contendo 90 ml do *Fluido I*.

Filtrar, lavar as membranas três vezes com *Fluido I*, incubar, contar as colônias e calcular o número de microrganismos.

*Substâncias oleosas miscíveis em água* — Transferir 10 mg ou 10 ml da mistura de amostras para frasco volumétrico contendo 90 ml de *Fluido II* aquecido a 45-48 °C e completar o volume de 100 ml. Ajustar o pH entre 6,5 a 7,5 com ácido clorídrico 0,1 M ou hidróxido de sódio 0,1 M. Transferir duas alíquotas de 10 ml para dois frascos volumétricos contendo 90 ml de *Fluido II*. Filtrar, lavar as membranas três vezes com *Fluido II*, incubar, contar as colônias e calcular o número de microrganismos.

*Substâncias solúveis em miristato de isopropila* — Transferir 6 alíquotas de 1 g ou 1 ml da mistura de amostras para cada um de 6 frascos volumétricos e completar volume de 100 ml com miristato de isopropila aquecido a 45-48 °C. Agitar os frascos, rapidamente, até dissolução. Filtrar cada uma das soluções através de membrana filtrante e lavar as 6 membranas com *caldo nutriente* esterilizado por filtração e aquecido a 45-48 °C. Transferir 3 membranas para 3 placas de Petri contendo *Meio I* e 3 membranas para 3 placas contendo *Meio II*. Incubar, contar as colônias e calcular o número de microrganismos.

Para produtos de uso tóxico, efetuar teste adicional, transferindo uma membrana para placa contendo *Ágar para fermentação de anaeróbios*, incubando em jarra para anaeróbios a 30-35 °C durante 3 dias.

#### MÉTODO DE CONTAGEM EM PLACA

*Bactérias* — Empregar placas de Petri 100 x 20 mm, adicionando a cada placa 1 ml da mistura de amostras e 15-20 ml de *Meio I* liquefeito a 45 °C, ou alternativamente, dispersar a mistura de amostras na superfície do meio solidificado na placa. Diluir a amostra de maneira que o número de colônias não ultrapasse a 300 por placa. Preparar, pelo menos, duas placas de Petri para cada diluição e incubar a 30-35 °C, durante 4 dias. Contar o número de colônias desenvol-

vidas. Calcular o resultado empregando placas com o maior número de colônias, sem ultrapassar 300 colônias por placa.

**Fungos** — Empregar placas de Petri 100 x 20 mm, adicionando a cada placa 1 ml da mistura de amostras e 15-20 ml de *Meio II* liquefeito a 45 °C, ou, alternativamente, dispersar a mistura de amostras na superfície do meio solidificado na placa. Diluir a amostra de maneira que o número de colônias não ultrapasse a 100 por placa. Preparar, pelo menos, duas placas de Petri para cada diluição e incubar a 20-25 °C, durante 7 dias. Contar o número de colônias desenvolvidas. Calcular o resultado empregando placas com o maior número de colônias, sem ultrapassar 100 colônias por placa.

#### Preparação de amostras

Empregar, no método de contagem em placas, 1 ml de preparações de amostras contendo 10 g ou 10 ml, diluídas ou dissolvidas em 100 ml<sup>1</sup> de diluente adequado, conforme descrito no *Método de filtração por membrana para Substâncias solúveis em água, Substâncias oleosas miscíveis em água e Substâncias solúveis em miristato de isopropila*.

**Cremes e pomadas insolúveis em miristato de isopropila** — Transferir 10 g da mistura de amostras para frasco volumétrico contendo 90 ml de caldo nutriente com 0,1% de tetradeilsulfato sódico, aquecido a 45-48 °C e agitar até mistura homogênea. Transferir 4 alíquotas de 5 ml para, pelo menos, 4 placas de Petri 20 x 150 mm, adicionar a metade delas 20 a 40 ml de *Meio I* e às outras, igual volume de *Meio II*, ambos liquefeitos a 45 °C. Misturar, *homogeneamente*, o ágar com a amostra e deixar solidificar. Incubar, contar as colônias e calcular o número de microrganismos.

Efetuar teste adicional, transferindo duas alíquotas de 1 ml da primeira diluição para duas placas de Petri 10 x 100 mm, contendo 15-20 ml de *Ágar para fermentação de anaeróbios*, incubando em jarra para anaeróbios a 30-35 °C durante 3 dias.

**Cápsulas vazias** — Adicionar 90 ml de tampão fosfato pH 7,2, aquecido a 45-48 °C sobre 50 cápsulas. Agitar até suspensão total e completar o volume de 100 ml (diluição 5:10). Transferir 1 ml desta suspensão para 9 ml de água (diluição 5:100) e, caso necessário, transferir 1 ml da última diluição para 9 ml de água (diluição 5:1000). Transferir alíquotas de 1 ml de cada diluição para, pelo menos, 4 placas de Petri 20 x 100 mm, adicionar a duas delas 15-20 ml de *Meio I* e às outras duas, igual volume de *Meio II*, ambos liquefeitos a 45 °C. Misturar, *homogeneamente*, o ágar com a

amostra e deixar solidificar. Incubar, contar as colônias e calcular o número de microrganismos.

**Gelatinas** — Transferir 10 g da mistura de amostras para frasco volumétrico contendo 90 ml de água estéril aquecida a 48 °C e deixar em repouso durante uma hora (diluição 1:10). Em seguida transferir o frasco para banho-maria a 45 °C durante 30 minutos, agitando vigorosamente a intervalos frequentes.

Diluir 1 ml desta solução com 9 ml de água estéril (diluição 1:100) e, caso necessário, transferir 1 ml da última diluição para 9 ml de água (diluição 1:1000). Prosseguir conforme indicado para *Cápsulas vazias*, a partir de "Transferir alíquotas de . . ."

**Demais substâncias insolúveis ou parcialmente solúveis em água** — Transferir 10 g ou 10 ml da mistura de amostras para frasco volumétrico contendo 90 ml de tampão fosfato pH 7,2 (diluição 1:10). Agitar até dissolução e ajustar o pH entre 6,5-7,5 com ácido clorídrico 0,1M ou hidróxido de sódio 0,1M. Transferir 1 ml desta diluição para 9 ml de água (diluição 1:100) e, caso necessário, transferir 1 ml da última diluição para 9 ml de água (diluição 1:1000). Prosseguir conforme indicado para *Cápsulas vazias* a partir de "Transferir alíquotas de . . ."

**Aerosóis** — Resfriar pelo menos 10 recipientes em mistura de álcool e gelo seco por uma hora. Abrir os recipientes e deixá-los à temperatura ambiente para que o propelente escape. Retirar 10 g ou 10 ml dos recipientes e transferir para frascos contendo 90 ml de tampão fosfato pH 7,2 (diluição 1:10) ou outro diluente apropriado e completar o volume de 100 ml. Transferir 1 ml desta diluição para 9 ml de água (diluição 1:1000). Prosseguir conforme indicado para *Cápsulas vazias* a partir de "Transferir alíquotas de . . ."

**Contagem de colônias** — Usar contador de colônias com iluminação artificial controlada, lupa apropriada e, quando possível, contador registrador. Somente as placas que apresentarem até 300 colônias para bactérias e 100 para fungos deverão ser consideradas para registro dos resultados. Calcular a média aritmética de cada diluição a partir dos valores obtidos das placas. Calcular o número de microrganismos por g ou ml para cada diluição, multiplicando o número de colônias da placa pela diluição usada e relatar a média aritmética dos resultados. Expressar os resultados como Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Exemplo:

Diluição	Colônias p/placas	UFC/g ou ml
1: 100	293	2,93 x 10 <sup>4</sup>
1: 100	100	1,00 x 10 <sup>4</sup>
1: 1000	41	4,1 x 10 <sup>4</sup>
1: 1000	12	1,2 x 10 <sup>4</sup>

(1) Alguns produtos podem requerer o emprego de volumes maiores de diluente.



$$\text{Média: } \frac{(2,93 + 1,00 + 4,1 + 1,2)}{4} \times 10^4$$

$$= 2,3 \times 10^4 \text{ UFC/g ou ml}$$

Caso o número de colônias nas placas de todas as diluições seja menor que 20, registrar a contagem correspondente à menor diluição e expressar como UFC/g ou ml. Se as placas de todas as diluições não apresentarem colônias, registrar a contagem como sendo menor que uma vez a diluição menor correspondente. Por exemplo, se nenhum crescimento for detectado na diluição 1:100, expressar a contagem como menor do que 100 Unidades Formadoras de Colônias/g ou ml.

#### MÉTODO DOS TUBOS MÚLTIPLOS

É utilizado principalmente quando se espera que o produto apresente densidade bacteriana baixa. Deve ser mantida a razão entre o volume da amostra e o volume do meio de cultura a utilizar.

#### Preparação de amostras

Preparar as amostras, inicialmente na diluição 1:10, através dos procedimentos que seguem:

**Amostras sólidas** – Misturar 10 g da amostra com 90 ml de diluente. Se forem necessários volumes maiores, misturar 25 g da amostra com 225 ml de diluente.

**Amostras líquidas** – Misturar 1 ml da amostra com 9 ml de caldo de caseína-soja ou este adicionado de substâncias emulsificantes ou neutralizantes<sup>2</sup> (polissorbato, lecitina de soja etc.).

Preparar diluições 1:100 e 1:1000 a partir da diluição 1:10.

Empregar uma série de doze tubos, contendo 10 ml de caldo de caseína-soja. Aos três primeiros tubos, adicionar 1 ml da amostra diluída, dissolvida ou homogeneizada, na proporção de 1:10, conforme descrito nos métodos anteriores. Aos três tubos seguintes, adicionar 1 ml da diluição 1:100 da amostra e aos próximos três tubos, 1 ml da diluição 1:1000 da amostra. Aos três últimos tubos, adicionar 1 ml do diluente. Incubar os tubos a 30-35 °C durante 4 dias. Os últimos três tubos não devem apresentar crescimento microbiano. Anotar como positivos os tubos que apresentarem crescimento de microrganismos. Isto pode ser caracterizado, também, pela formação de produtos finais de metabolismo (gás, ácido, base etc.) ou pelo exame microscópico direto. No caso de amostras que turvem o meio, confirmar se os tubos são positivos para o cresci-

mento de microrganismos, transferindo uma alçada de cada tubo para outro tubo contendo caldo de caseína-soja ou meio equivalente, ou semeando em meios sólidos, seletivos ou não, incubando, por período adicional. Determinar o Número Mais Provável de microrganismos por g ou ml, através da Tabela I. Sendo necessária maior precisão no teste, pode-se empregar 5 tubos por diluição, avaliando o Número Mais Provável através da Tabela II.

#### Capacidade nutritiva dos meios de cultura e validação dos métodos de contagem

Incubar os microrganismos que seguem em tubos contendo caldo de caseína-soja.

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 P	18-24 hs	30-35 °C
	ou ATCC 6538	18-24 hs	30-35 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	18-24 hs	30-35 °C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	18-24 hs	30-35 °C
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	48 hs	20-25 °C
	ou ATCC 2091	48 hs	20-25 °C

Diluir cada cultura empregando tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0 de modo a obter 100 células por ml. Empregar inóculo dos microrganismos separadamente, como controle do método de contagem, na presença e na ausência de amostra. Não ocorrendo crescimento esperado na presença da amostra, significa que esta possui atividade inibidora. Para eliminá-la, adicionar agentes neutralizantes, como polissorbato 80 a 0,4% e lecitina de soja 0,5%, aumentar o volume de diluente, associar ambos os procedimentos, ou empregar o “Método de Filtração por Membrana”.

#### Meios e diluentes utilizados

##### Ágar de Caseína-soja (Meio I)

Digesto pancreático de caseína	15,0 g
Digesto papaínico de farinha de soja	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: 7,3 ± 0,2	

##### Ágar de Sabouraud-dextrose (Meio II)

Dextrose	40 g
Mistura de partes iguais de caseína tratada por suco pancreático e digesto péptico de tecido animal	10 g
Ágar	15 g
Água	1000 ml
pH após esterilização: 5,6 ± 0,2	
Misturar e ferver para efetuar a solução.	

##### Ágar para Fermentação de Anaeróbios

Extrato de levedura	5 g
Digesto péptico de tecido animal	5 g

(2) Caldo de caseína-soja com 0,1% de polissorbato 80 – usado para pomadas; Caldo de caseína-soja com 0,4% de polissorbato 80 e 0,5% de lecitina de soja – usado em amostras que requerem inativação de substâncias inibidoras; Caldo de caseína-soja com 1% de penicilina – usado para amostras que contenham penicilinas.

Digesto papaínico de farinha de soja . . . . . 10 g  
 Dextrose . . . . . 10 g  
 Cloreto de sódio . . . . . 5 g  
 Ágar . . . . . 20 g  
 Tioglicolato de sódio . . . . . 2 g  
 Água . . . . . 1000 ml  
 pH após esterilização: 7,2 0,2

*Caldo de caseína-soja*

Caseína tratada por suco pancreático . . . . . 17,0 g  
 Farinha de soja por digestão papaínica . . . . . 3,0 g  
 Cloreto de sódio . . . . . 5,0 g  
 Fosfato de potássio dibásico . . . . . 2,5 g  
 Dextrose . . . . . 2,5 g  
 Água . . . . . 1000 ml  
 pH após esterilização: 7,3 0,2

*Caldo Nutriente*

Extrato de Carne . . . . . 3 g  
 Digesto pancreático de gelatina . . . . . 5 g  
 Polissorbato 80 . . . . . 10,0 ml  
 Água . . . . . 1000 ml  
 pH após esterilização: 6,9 0,2

*Fluído I*

Digesto péptico de tecido animal . . . . . 1 g  
 Água . . . . . 1000 ml  
 pH após esterilização: 7,1 0,2

*Fluído II*

Digesto péptico de tecido animal . . . . . 1 g  
 Polissorbato 80 . . . . . 1 ml  
 Água . . . . . 1000 ml  
 pH após esterilização: 7,1 0,2

*Tampão Fosfato pH 7,2*

*Solução-estoque*  
 Fosfato de potássio monobásico . . . . . 34 g  
 Hidróxido de sódio 4% . . . . . (175 ml (aprox.))  
 Água qsp . . . . . 1000 ml

*Dissolver o fosfato de potássio monobásico em 500 ml de água, acertar o pH para 7,2 ± 0,1 com hidróxido de sódio 4%. Completar o volume com água, esterilizar e conservar sob refrigeração. Quando da utilização diluir a solução estoque com água na proporção de 1 para 800 e esterilizar.*

*Tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0*

Fosfato de potássio monobásico . . . . . 3,56 g (equivalente a 0,067 M)  
 Fosfato dissódico 2 H<sub>2</sub>O . . . . . 7,23 g  
 Cloreto de sódio . . . . . 4,30 g  
 Peptona . . . . . 1,0 g  
 Água . . . . . 1000 ml

**Tabela I – Número mais provável e limites de confiança 95%**

Número de tubos cujo crescimento é visível para cada quantidade do produto sob exame			Número Mais Provável de microrganismos por g ou ml	Limite NMP	
100 mg ou 0,1 ml/ tubo	10 mg ou 0,01 ml/ tubo	1 mg ou 0,001 ml/ tubo		Inferior	Superior
0	0	0	< 3	—	—
0	0	1	3	<0,5	9
0	1	0	3	<0,5	13
1	0	0	4	0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1.100	50	4800
3	3	3	>2.400	—	—

Tabela 2 - Índice do número mais provável e limites de confiança 95% Tabela 2 - (Continuação)

Usando 5 tubos com 0,1, 0,01 e 0,001 g					
Número de Positivos NMP			Limite NMP		
0,1	Tubos 0,01	0,001	1g	Inferior	Superior
0	0	0	<2	<0,5	-
0	0	1	2	<0,5	7
0	0	2	4	<0,5	11
0	1	0	2	<0,5	7
0	1	1	4	<0,5	11
0	1	2	6	<0,5	15
0	2	0	4	<0,5	11
0	2	1	6	<0,5	15
0	3	0	6	<0,5	15
1	0	0	2	<0,5	7
1	0	1	4	<0,5	11
1	0	2	6	<0,5	15
1	0	3	8	1	19
1	1	0	4	<0,5	11
1	1	1	6	<0,5	15
1	1	2	8	1	19
1	2	0	6	<0,5	13
1	2	1	8	1	19
1	2	2	10	2	23
1	1	0	8	1	19
1	3	1	10	2	23
1	4	0	11	2	23
2	0	0	5	<0,5	13
2	0	1	7	1	17
2	0	2	9	2	21
2	0	3	12	3	28
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	1	2	12	3	28
2	2	0	9	2	21
2	2	1	12	3	28
2	2	2	14	4	34
2	3	0	12	3	28
2	3	1	14	4	34
2	4	0	15	4	37
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	0	2	13	3	31
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	1	2	17	5	46
3	1	3	20	6	60
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	2	2	20	6	60
3	3	0	17	5	46
3	3	1	21	7	63
3	4	0	21	7	63
3	4	1	24	8	72
3	5	0	25	8	73

4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	0	2	21	7	63
4	0	3	25	8	75
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	2	2	32	11	91
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	3	2	39	13	126
4	4	0	34	12	95
4	4	1	40	14	108
4	5	0	41	14	110
4	5	1	48	16	124
5	0	0	23	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	114
5	0	3	58	19	144
5	0	4	76	24	180
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	64	21	134
5	1	3	84	26	197
5	2	0	49	17	126
5	2	1	70	23	168
5	2	2	94	28	219
5	2	3	120	33	281
5	2	4	148	38	366
5	2	5	177	44	515
5	3	0	79	23	187
5	3	1	109	31	251
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	3	4	257	53	669
5	3	5	253	77	788
5	4	0	130	35	300
5	4	1	172	41	484
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	4	5	436	145	1161
5	5	0	240	68	734
5	5	1	348	118	1005
5	5	2	542	180	1405
5	5	3	920	210	3000
5	5	4	1600	350	5300
5	5	5	1600	800	-

**INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**  
 O limite prescrito em uma monografia deve ser interpretado da seguinte maneira:  
 10<sup>2</sup> microrganismos  
 - limite máximo de aceitação 5 x 10<sup>2</sup>  
 10<sup>3</sup> microrganismos  
 - limite máximo de aceitação 5 x 10<sup>3</sup> etc.

## V.5.1.7. MÉTODO GERAL PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS

Este método permite a detecção da presença de células viáveis de *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, que devem estar ausentes em produtos farmacêuticos não estéreis e matérias-primas de uso direto em sua fabricação.

Conforme a via de administração do produto, além dos quatro microorganismos anteriormente citados é indesejável a presença dos seguintes:

## VIA ORAL (SÓLIDOS E FLUIDOS)

*Bacillus cereus*  
*Enterobacter sp*  
*Candida albicans*  
*Aspergillus flavus e parasiticus*

## VIA NASAL OU RESPIRATÓRIA

*Enterobacter sp*  
*Serratia marcescens*  
*Klebsiella sp*  
*Candida albicans*  
*Proteus sp*  
*Acinetobacter sp*  
*Pseudomonas cepacia*  
*Pseudomonas maltophilia*  
*Pseudomonas stutzeri*

## VIA TÓPICA

*Serratia marcescens*  
*Klebsiella sp*  
*Pseudomonas cepacia*  
*Pseudomonas maltophilia*  
*Pseudomonas stutzeri*  
*Streptococcus sp, grupo B*

## VIA INTRAMAMÁRIA

*Staphylococcus sp*  
*Streptococcus sp, grupo B*  
*Bacillus cereus*  
*Serratia marcescens*  
*Corynebacterium pyogenes*  
*Klebsiella sp*  
*Mycoplasma sp*  
*Enterobacter sp*  
*Pseudomonas sp*  
*Citrobacter sp*  
*Nocardia sp*  
*Proteus sp*  
*Cryptococcus neoformans*  
*Candida sp*

## V.5.1.7.1 – ENRIQUECIMENTO NÃO-SELETIVO

## SUBSTÂNCIAS SOLÚVEIS EM ÁGUA

- 1) Transferir 10 g ou 10 ml da amostra para

frasco contendo 90 ml de tampão fosfato pH 7,2 e agitar até dissolução\*;

- 2) Filtrar através de membrana de 0,45 µm. Lavar com 100 ml de *Fluido I*;

- 3) Colocar a membrana em frasco contendo 300 ml de *Caldo de enriquecimento*;

- 4) Incubar a 30-35 °C, durante 24-48 horas.

## SUBSTÂNCIAS OLEOSAS MISCÍVEIS EM ÁGUA

- 1) Transferir 10 g ou 10 ml da amostra para frasco contendo 90 ml de *Fluido II* aquecido a 45-48 °C\*;

- 2) Filtrar através de membrana de 0,45 µm. Lavar com 100 ml de *Fluido II*;

- 3) Prosseguir conforme itens 3 e 4 de *Substâncias solúveis em água*.

## SUBSTÂNCIAS SOLÚVEIS EM MIRISTATO DE ISOPROPILA

- 1) Transferir 6 porções de 1 g ou 1 ml da amostra para 6 frascos contendo 100 ml de miristato de isopropila aquecido a 45-48 °C. Agitar cada frasco rapidamente até dissolução;

- 2) Filtrar o conteúdo de cada frasco através de membrana de 0,45 µm. Lavar cada membrana com 100 ml de *Caldo nutriente* pré-filtrado e aquecido a 45-48 °C;

- 3) Colocar as membranas em 6 frascos contendo 300 ml de *Caldo de enriquecimento*;

- 4) Incubar a 30-35 °C, durante 24-48 horas.

## POMADAS E CREMES INSOLÚVEIS EM MIRISTATO DE ISOPROPILA

- 1) Transferir 2 porções de 5 g ou 5 ml para 2 frascos contendo 300 ml de *Caldo de enriquecimento* com 0,1% de polissorbato 80. Se necessário, ajustar pH entre 6,5-7,5 com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M;

- 2) Incubar a 30-35 °C, durante 24-48 horas.

## GELATINAS

- 1) Transferir 10 g da amostra para frasco contendo 300 ml de *Caldo de enriquecimento*. Deixar a 48 °C, durante 1 hora, transferir para

\* Não se dispõem de sistema de filtração por membrana, proceder conforme "*Substâncias insolúveis ou parcialmente solúveis em água*".

banho-maria a 45 °C e esperar 30 minutos, agitando a intervalos freqüentes;

- 2) Incubar a 30-35 °C, durante 24-48 horas.

#### SUBSTÂNCIAS INSOLÚVEIS OU PARCIALMENTE SOLÚVEIS EM ÁGUA

1) Transferir 10 g ou 10 ml da amostra para frasco contendo 300 ml de *Caldo de enriquecimento*. Se necessário, ajustar o pH entre 6,5-7,5 com HCl 0,1 M ou NaOH 0,1 M;

- 2) Incubar a 30-35 °C, durante 24-48 horas.

#### V.5.1.7.2. - FASE SELETIVA E TESTES DE CONFIRMAÇÃO

##### *Pseudomonas aeruginosa*

A) Transferir com alça, para placa com *Ágar cetrimida*, o material enriquecido em meio não seletivo, usando o método de estrias em superfície. Nesse meio, as colônias de *P. aeruginosa* apresentam aspecto muito variado; portanto, deve-se proceder a testes de confirmação para cada colônia com aspecto morfológico diferente.

##### B) Testes de confirmação

1. Citocromo oxidase — Colocar uma gota de solução aquosa a 1% de cloridrato de *N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina, recentemente preparada, em colônia suspeita da placa de *Ágar cetrimida*. Colônias de *P. aeruginosa* desenvolvem coloração rósea, que passa a marrom, vermelho escuro e negro entre 10 e 30 minutos. Todas as espécies de *P. aeruginosa* produzem citocromo oxidase. Empregar no trabalho alça de platina, pois alça de níquel-cromo pode interferir no teste;
2. Produção de fluoresceína — Inocular colônia isolada em *Ágar inclinado para detecção de fluoresceína*. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas, e examinar a fluorescência do ágar à luz ultravioleta, no comprimento de onda entre 328 e 210 nm. Cerca de 99% das cepas de *P. aeruginosa* produzem fluoresceína.
3. Crescimento a 41 °C — Inocular colônia isolada em *Ágar inclinado de infusão cérebro e coração*. Incubar o tubo a 41 °C, em banho-maria ou estufa, durante 48 horas. Aproximadamente 99% das cepas de *P. aeruginosa* crescem a 41 °C.

##### *Staphylococcus aureus*

A) Transferir por meio de alça e pelo método de estrias em superfície o material enriquecido em meio não-seletivo para placa com *Ágar sal manitol-vermelho de fenol* ou *Ágar de Vogel-Johnson*. Incubar a 36 °C, durante 48 horas. As colônias de *S. aureus* apresentam-se amareladas, lisas, de consistência untuosa e circun-

dadas por zona diferente, de cor amarela forte, quando multiplicadas em *Ágar sal manitol-vermelho de fenol*. Em *Ágar de Vogel-Johnson* as colônias são de cor negro brilhante e circundadas por zona amarela.

##### B) Testes de confirmação

1. Coloração de Gram — *S. aureus* são cocos Gram-positivos, formando grupamentos semelhantes a cachos de uva.
2. Coagulase — Reconstituir liofilizado de plasma de coelho ou cavalo em água estéril. Inocular colônia suspeita em 0,5 ml de plasma reconstituído. Controles positivo e negativo devem ser procedidos em paralelo. Inocular os tubos em banho-maria a 30-37 °C e verificar a formação de gel. Examinar os tubos em 2, 4 e 24 horas. Se ocorrer formação de gel em 24 horas, o teste é considerado positivo.
3. Desoxirribonuclease — Preparar tubos contendo *Ágar para teste de desoxirribonuclease* com verde de metila. Repicar a colônia suspeita para o meio contido no tubo. Incubar a 30-37 °C, durante 18 horas. Controle positivo deve ser procedido em paralelo para comparação dos resultados. A formação de zona incolor ao redor de crescimento indica reação de desoxirribonuclease positiva. Culturas de *S. aureus* devem apresentar reação positiva.

##### *Salmonella sp*

A) Fazer repique de colônia do meio não-seletivo para placa de *Ágar-verde brilhante*. Colônias de *Salmonella sp* neste meio são razoavelmente grandes e produzem zona avermelhada ao redor. Inocular colônia suspeita em 100 ml de *Caldo de digesto pancreático de caseína*. Incubar a 30-37 °C, durante 24-48 horas. Adicionar 0,5 ml do *reagente de Kovac* e agitar suavemente. Reação positiva (presença de indol) apresentará cor vermelha intensa. *Salmonella sp* é indol negativa.

##### B) Teste de confirmação

1. *Ágar triplíce açúcar-ferro* — Inocular colônia suspeita em *Ágar triplíce açúcar-ferro* contido em tubo. Para isto, furar a base não inclinada com fio reto, retirá-lo e passá-lo pela superfície inclinada. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. Colônias típicas de *Salmonella sp* apresentam reação alcalina (cor vermelha) na parte superior (inclinada) e ácida (cor amarelada) na base, com ou sem produção de gás e H<sub>2</sub>S. Se estas reações forem positivas, prosseguir com os itens que seguem;
2. *Lisina-desacarboxilase* — Inocular colônia suspeita em *Ágar de lisina-ferro*, contido em tubo, empregando o mesmo procedimento

descrito para *Ágar tríplice açúcar-ferro*. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. Colônias típicas de *Salmonella sp* apresentam reação alcalina (cor púrpúrea) em todo meio, com ou sem formação de gás H<sub>2</sub>S;

3. Crescimento a partir de citrato como única fonte de carbono — Repicar a cultura do item A para *Ágar citrato de Simmons* inclinado. Incubar a 30-37 °C, durante 4 dias. Colônias típicas de *Salmonella sp* crescem sobre o meio e mudam a cor da parte inclinada para azul;
4. Urease — Repicar a cultura do item A para *Ágar uréia inclinado*. Incubar a 30-37 °C, durante 4 dias. Colônias típicas de *Salmonella sp* não produzem urease;
5. Fermentação da lactose — Repicar cultura do item A para tubo contendo *Caldo de lactose*. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. A maioria das cepas de *Salmonella sp* não fermenta lactose, permanecendo o meio inalterado.

#### *Escherichia coli*

- A) Fazer repique do meio não-seletivo para placa de *Ágar Mac Conkey*. Colônias de *E. coli* apresentam cor vermelha tijolo. Caso haja crescimento heterogêneo, transferir colônias circundadas de coloração vermelha tijolo para nova placa contendo *Ágar Mac Conkey*.

Inocular colônia suspeita em *Ágar peptonaferrô*. Para inocular este meio, furar a base não inclinada com fio reto, retirá-lo e passá-lo pela superfície inclinada. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. *E. coli* não produz gás H<sub>2</sub>S.

#### B) Teste de confirmação

1. *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio* — Incubar colônia típica da placa de *Ágar Mac Conkey* para placa contendo *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio*. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. Colônias pretas, esverdeadas e brilhantes podem evidenciar a presença de *E. coli*;
2. *Ágar tríplice açúcar-ferro* — Inocular colônia isolada da placa de *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio* em tubo contendo *Ágar tríplice açúcar-ferro*, seguindo o mesmo procedimento empregado para *Salmonella sp*. Colônias típicas de *E. coli* apresentam reação alcalina (vermelha) ou ácida (amarela) na parte superior (inclinada) e ácida (amarela) na base, com ou sem formação de gás e H<sub>2</sub>S;
3. Teste de indol — Inocular tubo contendo *Caldo de digesto pancreático de caseína* com colônia suspeita da placa de *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio*. Incubar a 30-37 °C, durante 48 horas. Adicionar

0,5 ml de reagente de Kovac e agitar o tubo suavemente. Coloração vermelha intensa indica a presença de indol, que é produzido por *E. coli*;

4. Teste de vermelho de metila — Inocular tubo contendo *Caldo vermelho de metila-Voges-Proskauer* com colônia suspeita da placa de *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio*. Incubar a 30-37 °C, durante 18-48 horas. Adicionar 5 a 6 gotas do indicador vermelho de metila SI por 5 ml de cultura. Reações positivas, fortemente ácidas, desenvolvem coloração vermelha-brilhante; reações fracamente positivas desenvolvem coloração vermelha-alaranjada e reações negativas desenvolvem coloração amarela. *E. coli* é vermelho de metila positivo;
5. Teste de Voges-Proskauer — Inocular tubo contendo *Caldo vermelho de metila-Voges-Proskauer* com colônia da placa de *Ágar de eosina-cloreto de metilitionínio*. Incubar a 30-37 °C, durante 24 horas. Adicionar 4 ml do reagente de *Voges-Proskauer* por 5 ml de cultura. Incubar a 35-37 °C, durante 1 hora. O desenvolvimento de cor vermelha de eosina indica a presença de diacetila, produto de oxidação de acetilmetilcarbinol. *E. coli* é *Voges-Proskauer* negativa;
6. Crescimento a partir de citrato como única fonte de carbono — Inocular colônia isolada da placa de *Ágar eosina-cloreto de metilitionínio* em *Ágar citrato de Simmons* inclinado. Incubar a 30-37 °C, durante 4 dias. *E. coli* não utiliza citrato como única fonte de carbono, não ocorrendo crescimento.

#### V.5.1.7.3 — DESCRIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

##### *Caldo de enriquecimento*

Digesto pancreático de tecido animal . . .	5,0	g
Extrato de levedura . . . . .	1,5	g
Extrato de carne . . . . .	1,5	g
Cloreto de sódio . . . . .	3,5	g
Dextrose . . . . .	1,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	3,68	g
Fosfato de potássio monobásico . . . . .	1,32	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	8,0 ± 0,1	
Volume por frasco . . . . .	300	ml

##### *Ágar cetrimida*

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	20,0	g
Cloreto de magnésio . . . . .	1,4	g
Sulfato de potássio . . . . .	10,0	g
Brometo de cetrimônio . . . . .	0,3	g
Glicérol . . . . .	10,0	ml
Ágar . . . . .	13,6	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,2 ± 0,2	
Volume por placa . . . . .	15-20	ml

**Ágar verde brilhante**

Extrato de levedura . . . . .	3,0	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	5,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	5,0	g
Lactose . . . . .	10,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Sacarose . . . . .	10,0	g
Vermelho de fenol . . . . .	80	mg
Verde brilhante . . . . .	12,5	mg
Ágar . . . . .	20,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	6,9 ± 0,2	
Volume por placa . . . . .	15-20	ml

**Ágar Mac Conkey**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	17,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	1,5	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	1,5	g
Lactose . . . . .	10,0	g
Mistura de sais biliares . . . . .	1,5	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Vermelho neutro . . . . .	0,030	g
Cloreto de metilrosanilínio . . . . .	0,001	g
Ágar . . . . .	13,5	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,1 ± 0,2	
Volume por placa . . . . .	15-20	ml

**Ágar sal manitol-vermelho de fenol**

Extrato de carne . . . . .	1,0	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	5,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	5,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	75,0	g
D-Manitol . . . . .	10,0	g
Vermelho de fenol . . . . .	0,025	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,4 ± 0,2	
Volume por placa . . . . .	15-20	ml

**Ágar de Vogel-Johnson**

Digesto pancreático de caseína . . . . .	10,0	g
Extrato de levedura . . . . .	5,0	g
D-Manitol . . . . .	10,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	5,0	g
Cloreto de lítio . . . . .	5,0	g
Glicina . . . . .	10,0	g
Vermelho de fenol . . . . .	25,0	mg
Ágar . . . . .	16,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,2 ± 0,2	

Antes de distribuir o meio nas placas, adicionar 20 ml de solução de telurito de potássio a 1% para 100 ml de meio resfriado a 45-50 °C.

Volume por placa: 15-20 ml.

**Ágar de eosina-cloreto de metilitioníno**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	10,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	2,0	g
Lactose . . . . .	10,0	g
Eosina Y . . . . .	400	mg

Cloreto de metilitioníno . . . . .	65	mg
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,1 ± 0,2	
Volume por placa . . . . .	15-20	ml

**Ágar para detecção de fluoresceína**

Digesto pancreático de caseína . . . . .	10,0	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	10,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	1,5	g
Sulfato de magnésio heptaidratado . . . . .	1,5	g
Glicerol . . . . .	10,0	ml
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,2 ± 0,2	
Volume por tubo . . . . .	10	ml

**Infusão de cérebro e coração**

Infusão de cérebro de novilho . . . . .	200,0	g
Infusão de coração de boi . . . . .	250,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	5,0	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	5,0	g
Dextrose . . . . .	2,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Fosfato de sódio dibásico . . . . .	2,5	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,4 ± 0,2	

**Ágar de infusão de cérebro e coração**

Composição idêntica à infusão de cérebro e coração com adição de 15,0 g de ágar por litro.

Volume por tubo: 10 ml (inclinado)

**Caldo de nitrato enriquecido**

A composição deste meio é idêntica à infusão de cérebro e coração à qual são adicionados 3 g de nitrato de potássio e mais 500 ml de água.

Volume por tubo: 20 ml (com tubo de Durham)

**Ágar para teste de desoxirribonuclease**

Ácido desoxirribonucleico . . . . .	2,0	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Verde de metila . . . . .	0,05	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	15,0	g
Digesto papaínico de farinha de soja . . . . .	5,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Água . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,3 ± 0,2	
Volume por tubo inclinado . . . . .	10	ml

**Caldo de digesto pancreático de caseína**

Digesto pancreático de caseína . . . . .	10,0	g
Água qsp . . . . .	1000	ml
pH após esterilização . . . . .	7,2 ± 0,1	

**Ágar triplíce açúcar-ferro**

Extrato de carne . . . . .	3,0	g
Extrato de levedura . . . . .	3,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	15,0	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	5,0	g
Lactose . . . . .	10,0	g
Sacarose . . . . .	10,0	g
Dextrose . . . . .	1,0	g

Sulfato ferroso . . . . .	0,2	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Tiosulfato de sódio . . . . .	0,3	g
Ágar . . . . .	12	g
Vermelho de fenol . . . . .	0,025	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	7,4 ± 0,2	
<i>Volume por tubo inclinado</i> . . . . .	10	ml

**Ágar de lisina-ferro**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	5,0	g
Extrato de levedura . . . . .	3,0	g
Dextrose . . . . .	1,0	g
L-Lisina . . . . .	10,0	g
Citrato férrico amoniacal . . . . .	0,5	g
Tiosulfato de sódio . . . . .	0,04	g
Púrpura de bromocresol . . . . .	0,02	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,7 ± 0,1	
<i>Volume por tubo inclinado</i> . . . . .	10	ml

**Ágar citrato de Simmons**

Fosfato de amônio monobásico . . . . .	1,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	1,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Citrato de sódio . . . . .	2,0	g
Sulfato de magnésio . . . . .	0,2	g
Azul de bromotimol . . . . .	0,08	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,8 ± 0,2	
<i>Volume por tubo inclinado</i> . . . . .	10	ml

**Ágar uréia**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	1,0	g
Dextrose . . . . .	1,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Fosfato de potássio monobásico . . . . .	2,0	g
Uréia . . . . .	20,0	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Vermelho de fenol . . . . .	0,012	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,8 a 6,9	

Dissolver todos os ingredientes, sem ágar, em 100 ml de água e esterilizar por filtração através de membrana esterilizante. Separadamente, dissolver ágar em 900 ml de água, esterilizar a 121 °C, durante 15 minutos, resfriar a 50 °C, juntar à primeira solução e agitar vigorosamente. Distribuir alíquotas de 10 ml em tubos e deixar solidificar em posição inclinada.

**Caldo vermelho de metila e Voges-Proskauer**

Digesto pancreático de caseína . . . . .	3,5	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	3,5	g
Dextrose . . . . .	5,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	5,0	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,9 ± 0,2	
<i>Volume por tubo</i> . . . . .	10	ml

**Caldo de caseína-soja**

Caseína tratada por suco pancreático . . . . .	17,0	g
Farinha de soja por digestão papaínica . . . . .	3,0	g
Cloreto de sódio . . . . .	5,0	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	2,5	g
Dextrose . . . . .	2,5	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	7,3 ± 0,2	

**Caldo lactose**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	5,0	g
Extrato de carne . . . . .	3,0	g
Lactose . . . . .	5,0	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,9 ± 0,1	
<i>Volume por tubo</i> . . . . .	10-20	ml

**Ágar peptona-ferro**

Digesto pancreático de gelatina . . . . .	15,0	g
Digesto pancreático de caseína . . . . .	2,5	g
Digesto péptico de tecido animal . . . . .	2,5	g
Citrato férrico amoniacal . . . . .	0,5	g
Fosfato de potássio dibásico . . . . .	1,1	g
Tiosulfato de sódio . . . . .	0,08	g
Ágar . . . . .	15,0	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização</i> . . . . .	6,7 ± 0,2	
<i>Volume por tubo</i> . . . . .	10	ml

**Reagente de Kovac**

Álcool amílico ou isoamílico . . . . .	15,0	ml
p-Dimetilaminobenzaldeído . . . . .	1,0	g
Ácido clorídrico concentrado . . . . .	5,0	ml
<i>Dissolver o aldetido no álcool e adicionar o ácido lentamente. Conservar sob refrigeração.</i>		

**Indicador vermelho de metila**

Vermelho de metila . . . . .	0,01	g
Etanol . . . . .	30,0	ml
Água . . . . .	50,0	ml
<i>Dissolver o corante no álcool e completar com água.</i>		

**Reagente Voges-Proskauer**

Solução alcoólica de α-naftol a 5% . . . . .	3,0	ml
Hidróxido de potássio a 40% . . . . .	1,0	ml

**Tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0**

Fosfato de potássio monobásico . . . . .	3,56	g
Fosfato dissódico. 2 H <sub>2</sub> O . . . . .	7,23	g
Cloreto de sódio . . . . .	4,30	g
Peptona . . . . .	1,0	g
Água . . . . .	1000	ml

**Fluido I**

Digesto péptico de tecido animal . . . . .	1	g
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização: 7,1 ± 0,2</i>		

**Fluido II**

Digesto péptico de tecido animal . . . . .	1	g
Polissorbato 80 . . . . .	1	ml
Água . . . . .	1000	ml
<i>pH após esterilização: 7,1 ± 0,2</i>		



**V.5.1.7.4 – ESTERILIZAÇÃO E  
ACONDICIONAMENTO DOS MEIOS  
DE CULTURA**

1) Meios em placas – Esterilizar o meio a 121 °C, durante 15 minutos e distribuir, asepticamente, em placas de Petri estéreis de 100 x 20 mm. Incubar a 30-35 °C, durante 24 horas, e conservar sob refrigeração;

2) Meios em tubos – Dissolver os ingredientes do meio (ferver durante 1 a 2 minutos quando se empregar ágar) e distribuir em tubos 18 x 150 mm, quando se empregar o volume de 10 ml, e em tubos 25 x 200 mm, quando se empregar o volume de 15 a 20 ml. Esterilizar a 121 °C, durante 15 minutos. Incubar a 30-35 °C, durante 24 horas e conservar sob refrigeração.

**V.5.1.7.5 – CAPACIDADE SELETIVA E NUTRITIVA  
DOS MEIOS DE CULTURA E VALIDAÇÃO DO TESTE  
PARA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE PATÓ-  
GENOS.**

Incubar os microrganismos que seguem em tubos contendo os meios indicados, à temperatura de 30-35 °C, durante 18-24 horas.

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 P	caldo de caseína-soja
	ou ATCC 6538	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	caldo de caseína-soja
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	caldo de lactose
<i>Salmonella typhimurium</i> <sup>1</sup>		caldo de lactose

Diluir cada cultura empregando tampão cloreto de sódio-peptona pH 7,0 de modo a obter 1000 células por ml. Testar o método aplicando inóculos de aproximadamente 100 células dos microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonellae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na presença e na ausência da amostra sob exame. Deve ocorrer crescimento e identificação positiva para os respectivos microrganismos.

<sup>1</sup> Não é recomendado número de cepa. Pode ser empregada salmonela não patogênica para o homem, como *Salmonella abony* (NCTC 6017).

## V.5.1.8 – SUBSTÂNCIAS PRESSORAS

*Preparação padrão de referência*

Como preparação padrão, empregar bitartarato de epinefrina. Esta preparação deve ser conservada em frascos herméticos e opacos e dessecada sobre sílica-gel durante 18 horas antes do uso.

*Solução padrão de referência*

Dissolver 91 mg de bitartarato de epinefrina (equivalente a 50 mg de epinefrina base  $C_9H_{13}NO_3$ ) em solução recente de bissulfito de sódio 0,4% (p/V). Completar 50 ml com água e homogeneizar. A solução final terá 1,0 mg de epinefrina (base livre) por ml. Conservar, sob refrigeração, em frasco hermético âmbar. Usar, no máximo, durante 6 meses. Desprezar a solução quando esta apresentar algum sinal de deterioração, tal como mudança de cor.

*Diluição do padrão*

Diluir a solução padrão de referência de epinefrina, em solução fisiológica, de modo que a administração de dose entre 0,1 e 0,5 ml produza aumento de 20 a 70 mm de mercúrio na pressão arterial.

*Método proposto*

Selecionar rato com peso entre 275 e 325 g e anestesiá-lo com anestésico isento de efeitos sobre a pressão arterial. Imobilizar o animal e mantê-lo aquecido para prevenir a perda de calor corporal. Cirurgicamente proceder à intubação traqueal, se necessário, e expor a veia femoral ou jugular, preparando-a para injeções intravenosas. Administrar 200 unidades de heparina por 100 g de peso corporal. Cirurgicamente expor a artéria carótida e canular, conectando-a ao manômetro ajustado para o registro contínuo da pressão arterial.

Injetar, intravenosamente, solução de sulfato de atropina 0,1% (p/V) na proporção de 1 ml por kg de peso corporal. Considerar o receptor musca-

rínico suficientemente bloqueado somente se injeção subsequente de solução recente de cloreto de acetilcolina 0,001% (p/V) na dose de 1 ml por kg de peso não produzir queda transitória na pressão arterial. Se esse mecanismo não estiver suficientemente paralisado, injetar dose de 0,5 ml da solução de sulfato de atropina até paralisia completa.

*Procedimento*

Selecionar dose da diluição padrão que produza aumento entre 2,7 kPa e 9,3 kPa (20 e 70 mm de mercúrio) na pressão arterial. Injetar a dose a intervalos constantes de, no mínimo, 5 minutos para possibilitar o retorno da pressão arterial ao nível basal. Após cada injeção administrar imediatamente 0,2 ml de solução fisiológica para lavar a cânula. Assegurar-se da reprodutibilidade da resposta, repetindo a dose duas ou mais vezes. Administrar nova dose da diluição do padrão de modo a obter resposta hipertensora aproximadamente 20% maior do que a média das respostas da dose menor. Considerar o animal apto para o teste se (1) as respostas para a primeira dose selecionada forem reprodutíveis entre 2,7 kPa e 9,3 kPa (20 e 70 mm de mercúrio) e (2) significativamente menores em relação à resposta da dose maior.

Mantendo constante o intervalo de tempo estabelecido, injetar série de cinco doses na qual se alternem a dose selecionada da diluição padrão e dose de igual volume da substância sob teste, diluída convenientemente. Após cada uma das cinco injeções, medir a variação na pressão arterial.

Calcular a diferença entre cada resposta da amostra e a média das respostas das doses da diluição padrão, imediatamente anterior e posterior. A amostra cumpre os requisitos do teste se a média destas diferenças significar que as respostas obtidas com a solução da amostra não são maiores do que aquelas da diluição padrão. Os resultados devem corresponder ao limite de atividade pressora especificado para este teste na monografia correspondente.

## V.5.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS

## V.5.2.1 – ENSAIO BIOLÓGICO DE OXITOCINA

Determina-se a potência da oxitocina comparando sua atividade com aquela da preparação padrão por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o quarto padrão internacional de oxitocina para avaliação biológica, estabelecido em 1978, que consiste de oxitocina sintética, dessecada, com albumina humana e ácido cítrico (disponível em ampolas que contêm 12,5 unidades). Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Transferir o conteúdo da ampola do padrão internacional para recipiente adequado e adicionar 0,5 ml de ácido acético 0,045 M para cada unidade de oxitocina. Tampar o frasco com algodão e levar a banho-maria fervente, onde deve permanecer, com leve agitação, durante 5 minutos. Resfriar sob água corrente e filtrar. Colocar a solução estoque em ampolas, fechar por fusão do vidro e aquecer em banho-maria fervente durante 20 minutos. Conservar a solução em refrigerador e usar, no máximo, durante 6 meses.

## MÉTODOS PROPOSTOS

## MÉTODO A: HIPOTENSÃO ARTERIAL EM FRANGO

*Diluição do padrão*

No dia do ensaio, efetuar uma primeira diluição da solução estoque em solução fisiológica, de modo a obter solução com potência de 0,4 unidades de oxitocina por ml. Esta concentração é usada para avaliação da sensibilidade do animal.

*Diluição da amostra*

Efetuar diluição da amostra de oxitocina, em solução fisiológica, de modo a obter solução com potência presumida idêntica à da diluição do padrão.

*Animal*

Selecionar um frango doméstico, sadio, pesando entre 1,1 e 2,5 kg. Empregar anestésico de ação prolongada e isento de efeitos sobre a pressão arterial (por exemplo, 5 ml de solução de carba-

mato de etila 2,5% (p/V) por kg de peso do animal). Por dissecação cuidadosa, expor a artéria isquiática conectando-a diretamente ao manômetro de mercúrio ajustado para o registro contínuo da pressão arterial. Canular a veia crural ou braquial, preparando-a para injetar as diluições do padrão e da amostra.

*Avaliação da sensibilidade do animal*

Determinar, através de administração experimental, volumes da diluição padrão que produzam queda rápida e transitória de 20 a 40 mm de mercúrio na pressão arterial. Se necessário, no decorrer do ensaio alterar a concentração do padrão, a fim de que a injeção intravenosa de duas doses, entre 0,15 e 0,5 ml, produza resposta na faixa indicada. A razão entre doses da amostra e do padrão deve ser idêntica e constante no decorrer do ensaio. Se ocorrer taquifilaxia, manifestada por rápido decréscimo na resposta, considerar o frango inadequado para o ensaio.

*Procedimento*

Injetar as duas doses selecionadas do padrão e da amostra, em seqüência aleatória, a intervalos uniformes de 3 a 10 minutos, registrando, no mínimo, 4 respostas para cada dose. Ao invés desta seqüência aleatória, pode-se usar delineamento de blocos ao acaso para eliminar a influência de possíveis alterações de sensibilidade do animal.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

MÉTODO B: CONTRAÇÃO DO ÚTERO DE RATA *IN VITRO*

Usar uma rata em fase sexual estro e pesando entre 120 e 200 g. Sacrificar com golpe na nuca e sangria imediata por secção dos vasos cervicais. Dissecar um corno uterino e suspender em cuba-de-órgão-isolado, contendo solução nutritiva da seguinte composição:

Cloreto de sódio . . . . .	9,0	g
Cloreto de potássio . . . . .	0,42	g
Cloreto de cálcio . . . . .	0,0795	g
Bicarbonato de sódio . . . . .	0,50	g
Dextrose . . . . .	0,50	g
Água (destilada e condensada em condensador de vidro) qsp . . . . .	1.000	ml

Manter a cuba-de-órgão-isolado a 32 °C ou outra temperatura adequada, na qual se evitem as contrações espontâneas e o útero mantenha sua sensibilidade. Oxigenar a solução com mistura de 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. Registrar as contrações do músculo isolado, através de alavanca isotônica de inscrição frontal. Preparar a solução padrão, em solução nutritiva, de modo a obter concentração de 0,02 unidades por ml. Similarmente, fazer a solução da amostra de modo que, com base na potência presumida, apresente a mesma concentração da solução padrão. Estabelecer a curva dose-resposta pela adição de doses da solução padrão. Uma vez completa a resposta, a cada dose substituir a solução nutritiva para relaxar o músculo. As doses

são adicionadas em intervalos uniformes de 3 a 5 minutos conforme a velocidade de recuperação do órgão. Selecionar duas doses da solução padrão que produzam contrações claramente discriminadas entre 20 e 80% da resposta máxima. A razão entre as duas doses do padrão e da amostra deve ser idêntica e mantida constante no decorrer do ensaio.

Adicionar as doses em seqüência segundo o delineamento do quadrado latino (2 x 2), registrando-se, no mínimo, quatro respostas para cada dose do padrão e da amostra.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.2 – ENSAIO BIOLÓGICO DE CORTICOTROFINA

Determina-se a potência da corticotrofina comparando um ou mais dos seus efeitos biológicos com o mesmo efeito da preparação padrão de corticotrofina, por método de ensaio adequado. Quando o material a ser ensaiado se destina à administração subcutânea ou intramuscular, usar o método de ensaio subcutâneo; quando intravenosa, usar o método de ensaio intravenoso.

*Preparação padrão*

Empregar o terceiro padrão internacional de corticotrofina suína (ACTH) para avaliação biológica, estabelecido em 1962, que consiste de corticotrofina suína purificada, liofilizada com lactose (disponível em ampolas contendo 5 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Dissolver o conteúdo total da ampola da preparação padrão de corticotrofina em 2,5 ml de gelatina SR e homogeneizar de modo a obter solução que contenha 2,0 unidades internacionais por ml. Com o mesmo solvente, preparar três diluições do padrão que produzam depleção do nível de ácido ascórbico adrenal variável entre 20 e 80% da resposta máxima. Como aproximação, podem ser tentadas concentrações entre 20 e 600 miliunidades internacionais por ml, aplicando-se doses crescentes segundo progressão geométrica. As soluções devem ser injetadas, no máximo, 4 horas após sua preparação.

*Solução da amostra*

Diluir do mesmo modo que o padrão a fim de obter três diluições da amostra com potência presumida igual a das diluições do padrão.

**MÉTODOS PROPOSTOS****MÉTODO A: SUBCUTÂNEO***Animais*

Usar ratos sadios, do mesmo sexo, cujo peso esteja entre 100 e 200 g; para cada ensaio, a faixa de peso entre os ratos deve ser mantida tão estreita quanto possível e nunca exceder 15 g. Manter os animais em condições uniformes de água, alimentação e temperatura, no mínimo, durante uma semana. Anestesiá-los com éter e hipofisectomizá-los. Após a operação, deixá-los com acesso à alimentação, água e solução de D-glicose a 5% (p/V) em solução fisiológica. Manter a sala isenta de ruídos e com temperatura uniforme

entre 24 e 27 °C. Realizar o ensaio 18 a 36 horas após a hipofisectomia. Para o ensaio, pesar os animais, distribuí-los aleatoriamente em 6 grupos de 6 a 10 ratos, destinando-os respectivamente para as diluições do padrão e da amostra.

*Procedimento*

Injetar subcutaneamente 0,5 ml da respectiva diluição em todos os ratos de cada grupo. Três horas após a injeção, anestesiá-los os animais, retirar as glândulas adrenais, isolar de tecidos circunvizinhos e pesar. Executar a operação tão rápido quanto possível, para evitar perda de peso. Sacrificar os ratos e examinar se a hipofisectomia foi completa. Colocar o par de glândulas adrenais de cada rato em recipiente adequado contendo 8 ml de ácido metafosfórico 2,5% (p/V) e triturar convenientemente. Deixar o homogeneizado em repouso durante 30 minutos.

*Determinação de ácido ascórbico*

Filtrar os extratos de ácido metafosfórico e pipetar 4 ml de cada filtrado para tubos de ensaio contendo 4 ml da solução de acetato de indofenol SR. Misturar por agitação e, 30 segundos depois, ler a absorvância em espectrofotômetro a 520 nm. Calcular a concentração de ácido ascórbico em mg para 100 g de glândula adrenal, a partir da absorvância encontrada e da curva padrão elaborada conforme processo descrito a seguir.

Preparar curva padrão, absorvância-concentração, usando 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 µg de ácido ascórbico por ml em ácido metafosfórico 2,5% (p/V). Transferir 4,0 ml para cinco tubos de ensaio, contendo cada um 4,0 ml da solução de acetato de indofenol SR. Misturar por agitação e, 30 segundos depois, ler a absorvância em espectrofotômetro a 520 nm. Plotar os valores de absorvância-concentração para obter a curva padrão. A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

**MÉTODO B: INTRAVENOSO**

O método subcutâneo proposto é adequado desde que sejam observadas as seguintes modificações:

- 1) Preparar as soluções padrão e amostra em solução fisiológica sem a adição de gelatina e acidificar pela adição de 0,25% (V/V) de ácido acético 5M. Administrar por via intravenosa;
- 2) Cinquenta e cinco a sessenta e cinco minutos depois, retirar as glândulas adrenais.

## V.5.2.3 – ENSAIO BIOLÓGICO DE INSULINA

Determina-se a potência da insulina comparando seu efeito hipoglicemiante com aquele produzido pela preparação padrão de insulina por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o quarto padrão internacional de insulina para avaliação biológica, estabelecido em 1958, que consiste em mistura de 52% de insulina bovina e 48% de insulina suína purificada e recristalizada (contendo 24,0 unidades por mg). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Pesar exatamente quantidade adequada da preparação padrão e dissolver em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico até pH 2,5, de modo a obter solução com 40 unidades internacionais por ml. É conveniente adicionar substância conservante para evitar o crescimento de microrganismos. Conservar a solução entre 2 e 8 °C, evitando o congelamento. Usar a solução, no máximo, durante 6 meses após sua preparação.

## MÉTODOS PROPOSTOS

## MÉTODO A: CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS

*Diluição do padrão*

Diluir a solução padrão em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico, até pH 2,5, de modo a obter duas diluições contendo, respectivamente, por exemplo, dependendo de sensibilidade dos animais, 30 miliunidades (diluição do padrão 1) e 60 miliunidades internacionais de insulina por ml (diluição do padrão 2).

*Diluição da amostra*

Dissolver a amostra em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico, até pH 2,5, de modo a obter duas diluições presumidas de, respectivamente, por exemplo, dependendo da sensibilidade dos animais, 30 miliunidades (diluição da amostra 1) e 60 miliunidades internacionais de insulina por ml (diluição da amostra 2).

*Animais*

Selecionar, no mínimo, noventa e seis camundongos saudáveis, do mesmo sexo, e mantê-los em dieta uniforme e adequada. Para cada ensaio, a faixa de diferença de peso não deve exceder 5 g. Além disso, deixar os animais em jejum, mas com acesso à água, entre 2 e 24 horas antes do ensaio.

*Procedimento*

Distribuir os camundongos, ao acaso, em quatro grupos iguais de 24 animais cada um, identificando cada lote para a administração das duas diluições do padrão e da amostra, respectivamente. Injetar cada dose, subcutaneamente, usando o mesmo volume, usualmente 0,25 ml; nunca exceder, porém, 0,5 ml para cada camundongo. Colocar os animais em recipientes transparentes no interior de um incubador de ar com a parte frontal também transparente, ajustado à temperatura uniforme entre 29 e 35 °C e umidade relativa de 40 a 60%. Pode ser usada uma série de pequenas caixas submersas até três quartas partes de sua altura em banho-maria à temperatura adequada e que possibilite a ventilação necessária das mesmas. Planejar o ensaio de modo que os recipientes dos quatro lotes sejam distribuídos uniformemente no incubador ou em banho-maria. Observar os camundongos durante uma hora e meia após a injeção e registrar o número de animais que entram em convulsão ou morrem. Para recuperar os animais, injetar 0,5 ml de glicose 15% (p/V), subcutaneamente.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI. 7.

## MÉTODO B: GLICOSE SANGÜÍNEA EM COELHOS

*Diluição do padrão*

Diluir volume adequado da solução padrão de modo a obter duas diluições contendo, respectivamente, por exemplo, dependendo da sensibilidade dos animais, 1,0 unidade (diluição do padrão 1) e 2,0 unidades internacionais de insulina por ml (diluição do padrão 2). Usar como solvente solução contendo cresol ou fenol 0,1 a 0,25% (p/V), glicerol 1,4 a 1,8% (p/V) e ácido clorídrico suficiente para produzir pH entre 2,5 e 3,5.

*Diluição da amostra*

Utilizando o mesmo solvente, fazer duas soluções da amostra de modo que, com base na potência presumida, se obtenha, respectivamente, por exemplo, dependendo da sensibilidade dos animais, 1,0 unidade (diluição da amostra 1) e 2,0 unidades internacionais de insulina por ml (diluição da amostra 2).

*Dose a injetar*

Com base em ensaio prévio, selecionar as doses a injetar cujo volume, usualmente, deve estar entre

0,30 e 0,50 ml. Para cada ensaio, esse volume da diluição padrão e da amostra deve ser o mesmo.

#### Animais

Selecionar, no mínimo, 24 coelhos sadios, pesando não menos que 1,8 kg cada um. Uma semana antes do ensaio, colocar os animais nas condições do laboratório, com livre acesso à água e com dieta uniforme.

#### Procedimento

Dividir os coelhos, ao acaso, em quatro grupos

Grupo	1ª injeção	2ª injeção
1	diluição do padrão 1	diluição da amostra 2
2	diluição do padrão 2	diluição da amostra 1
3	diluição da amostra 1	diluição do padrão 2
4	diluição da amostra 2	diluição do padrão 1

Observar que a segunda injeção deve ser feita preferencialmente no dia seguinte, porém nunca exceder uma semana após a primeira injeção. Coletar amostra de sangue através da veia marginal da orelha de cada coelho uma hora e duas horas e meia após cada injeção. Determinar a concentração de glicose de cada amostra por método adequado, tal como o descrito no Método C.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

#### MÉTODO C: GLICOSE SANGÜÍNEA EM CAMUNDONGOS

##### Diluições do padrão

Diluir volume adequado da solução padrão de modo a obter duas diluições contendo, respectivamente, por exemplo, dependendo da sensibilidade dos animais, 50 miliunidades (diluição do padrão 1) e 100 miliunidades internacionais de insulina por ml (diluição do padrão 2). Ajustar a concentração destas diluições conforme a sensibilidade da cepa de camundongos utilizada. Usar, como solvente, solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico até pH 2,5 a 3,5.

Grupo	1ª injeção	2ª injeção
1	diluição do padrão 1	diluição da amostra 2
2	diluição do padrão 2	diluição da amostra 1
3	diluição da amostra 1	diluição do padrão 2
4	diluição da amostra 2	diluição do padrão 1

Exatamente quarenta minutos após cada injeção, coletar amostra de 50 a 100  $\mu$ l de sangue de cada animal, através da exploração do plexo

iguais de, no mínimo, 6 coelhos cada um, destinando-os, respectivamente, para as duas doses do padrão e da amostra. Aproximadamente 20 horas antes do ensaio, deixar para cada coelho quantidade de alimento que deve ser consumida durante 6 horas. Antes de cada fase do ensaio seguir o mesmo horário de alimentação. Durante o ensaio, retirar o alimento e a água até que seja coletada a última amostra de sangue. Injetar, subcutaneamente, a dose indicada para o respectivo grupo, conforme o planejamento a seguir:

#### Diluições da amostra

Utilizando o mesmo solvente, fazer duas soluções da amostra de modo que, com base na potência presumida, se obtenham, respectivamente, por exemplo, dependendo da sensibilidade dos animais, 50 miliunidades (diluição da amostra 1) e 100 miliunidades internacionais de insulina por ml (diluição da amostra 2).

#### Animais

Selecionar, no mínimo, 40 camundongos do mesmo sexo, pesando entre 20 e 25 g. Para cada ensaio, a faixa de diferença de peso não deve exceder 2 g. Manter os animais à temperatura ambiente uniforme, com acesso à água e alimentação.

#### Procedimento

Distribuir os camundongos, por sorteio, em 4 grupos iguais de, no mínimo, 10 animais cada um, identificando cada lote para a administração das duas diluições do padrão e da amostra, respectivamente. Injetar cada dose, subcutaneamente, utilizando 0,1 ml para cada 10 g de peso médio dos animais. Adotar o delineamento duplo cruzado, conforme o esquema a seguir:

venoso ocular com tubo capilar heparinizado. Nas mesmas condições, aplicar a segunda injeção pelo menos duas horas e meia após a primeira ou

no dia seguinte. Centrifugar o sangue para separar o plasma e determinar o teor de glicose pelo método a seguir.

Transferir 25  $\mu$ l do plasma, recentemente separado, para um tubo de ensaio. Adicionar 2,5 ml de reagente de cor, agitar e deixar à temperatura ambiente por 60 minutos. Determinar a absorvância em espectrofotômetro a 510 nm, usando como branco 25  $\mu$ l de água e 2,5 ml de reagente de cor. Determinar o conteúdo de glicose utilizando curva padrão com concentrações variando de 50 a 250 mg por ml.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através do método estatístico descrito na seção VI.5.

## REAGENTES

### Reagente de cor

Dissolver 0,1 g de aminofenazona em 250 ml de tampão fosfato pH 6,0. Juntar 5 ml da solução de glicose-oxidase, 5 ml da solução de peroxidase e 0,33 g de ácido 4-hidroxibenzoico. Completar com tampão fosfato pH 6,0 a 300 ml.

### Solução padrão de glicose

Dissolver 0,100 g de glicose anidra e 0,2 g de ácido benzoico em água até perfazer 100 ml. Armazenar sob refrigeração.

### Solução de glicose-oxidase

Obtém-se a enzima a partir de micélios de

*Aspergillus niger*. Ela catalisa a oxidação aeróbica da glicose. A solução contém no mínimo 735 unidades/ml e no máximo 790 unidades/ml de atividade de glicose-oxidase e no máximo, 15 unidades/ml de atividade de catalase. Pode conter tampões e estabilizantes.

Unidade de atividade de glicose-oxidase é a quantidade capaz de absorver 10 mm<sup>3</sup> de oxigênio/minuto, atuando sobre o substrato glicose, a 30 °C, em pH 5,9, na presença de excesso de catalase.

**Características da solução:** límpida, de coloração marrom-amarelada. Densidade em torno de 1,18 a 1,21. Armazenagem: recipientes bem fechados, sob refrigeração. A estabilidade é de, no mínimo, 6 meses.

### Peroxidase

Preparado liofilizado obtido a partir da raiz de *Cochlearia armoracia* L. Catalisa reações de oxidação com o peróxido de hidrogênio.

**Características:** pó de cor branca a parda.

A solução da enzima a 0,025 por cento (p/V) em tampão fosfato pH 6,0 apresenta:

absorvância 403 nm = mínimo 0,6.  
absorvância 275 nm

**Solução de peroxidase:** contém 1,0 g de peroxidase em tampão fosfato pH 6,0. Apresenta, no mínimo, 820 unidades internacionais/ml.



## V.5.2.4 – DURAÇÃO DO EFEITO DA INSULINA

A duração do efeito hipoglicemiante, produzido por preparações modificadas de insulina, é comparada com a hipoglicemia produzida em coelhos ou cobaias, pela preparação padrão de insulina.

Selecionar os animais a partir de colônia sadia e distribuí-los aleatoriamente em dois grupos iguais de, no mínimo, 10 animais. Aproximadamente dezoito horas antes da realização do ensaio colocar os animais isolados e deixá-los em jejum com livre acesso à água. No início do ensaio, determinar o nível médio de glicose sanguínea de cada grupo. Injetar, subcutaneamente, nos animais de um

grupo solução da amostra e nos do outro solução padrão preparada em solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico para pH 2,5, de modo a conter a potência nominal da amostra: ambas as soluções são injetadas, sem diluições posteriores, em volumes correspondentes ao peso corporal dos animais. Uma, duas, quatro e seis horas após as injeções determinar o nível médio de glicose sanguínea de cada grupo através de método adequado, tal como o descrito no método C do ensaio biológico de insulina (V.5.2.3).

V.5.2.5. ENSAIO BIOLÓGICO DE GLUCAGON

Determina-se a potência do glucagon, comparando sua atividade hiperglicemiante com aquela da preparação padrão por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o primeiro padrão internacional de glucagon suíno para avaliação biológica, estabelecido em 1973, que consiste em glucagon suíno liofilizado com lactose e cloreto de sódio (fornecido em ampolas contendo 1,49 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Reconstituir o conteúdo total da ampola da preparação padrão com 2 ml de solução fisiológica acidificada com ácido clorídrico R a pH 3,0. Diluir a solução resultante com o mesmo solvente, de modo a obter concentração conveniente, como a de 100 milionidades internacionais por ml. Conservar esta solução entre 2 °C e 8 °C e usá-la, no máximo, até dois dias após sua preparação.

**MÉTODO PROPOSTO**

Selecionar, no mínimo, vinte e quatro coelhos adultos, sadios, cada qual com peso entre 1,8 e 2,8 kg. Mantê-los em condições uniformes de temperatura, umidade e dieta adequada, pelo menos durante uma semana. Tratá-los cuidadosamente para evitar excitá-los. Quarenta e oito horas antes do ensaio, injetar intramuscularmente, em cada coelho, 1 ml de acetato de cortisona. Dezesesseis horas antes do ensaio, deixar os animais em jejum, com acesso à água, assim permanecendo até a última coleta de amostra sanguínea. Distribuir os coelhos em quatro grupos iguais de, no mínimo, seis coelhos cada um. Fazer duas diluições da solução padrão, em solução fisiológica acidificada a pH 3,0 com ácido clorídrico, de modo que contenham respectivamente 6 e 24 milionidades internacionais de glucagon por ml. Paralelamente, fazer duas diluições da amostra, usando o mesmo solvente, a fim de obter concentração presumida idêntica à das diluições do padrão. No mesmo horário, em dois dias consecutivos, injetar nos coelhos, subcutaneamente, 1 ml de cada uma das quatro diluições, conforme o planejamento duplo cruzado a seguir:

Grupo	1ª injeção	2ª injeção
1	diluição do padrão 1	diluição da amostra 2
2	diluição do padrão 2	diluição da amostra 1
3	diluição da amostra 1	diluição do padrão 2
4	diluição da amostra 2	diluição do padrão 1

Coletar a amostra sanguínea pela veia marginal da orelha de cada coelho aos vinte e aos sessenta minutos após a injeção. Determinar a concentração de glicose através de método adequado, como o descrito no método C do ensaio biológico de

insulina (V.5.2.3).

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.6. ENSAIO BIOLÓGICO DE HEPARINA

Determina-se a potência da heparina comparando a concentração necessária para inibir a coagulação do plasma citratado de ovelha, recalcificado, com a da preparação padrão de heparina necessária para produzir o mesmo efeito por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o quarto padrão internacional de heparina suína, estabelecido em 1983, que consiste do sal sódico do princípio ativo purificado, isolado da mucosa intestinal suína, liofilizado (disponível em ampolas de 1780 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Dissolver o conteúdo da ampola de heparina padrão em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/V) de modo a obter solução de concentração de 3 unidades internacionais por ml. Conservar sob refrigeração evitando o congelamento.

*Ensaio preliminar*

Determinar, se necessário, através de ensaio preliminar, a concentração mínima aproximada de heparina que, presente em 0,80 ml de cloreto de sódio 0,9% (p/V), inibe a coagulação de 1 ml de plasma na presença de 0,2 ml de cloreto de cálcio 1% (p/V), após 1 hora em banho-maria a 37 °C. Esta concentração, usualmente, está entre 0,5 e 3 unidades internacionais. Para o ensaio, preparar uma diluição do padrão com a concentração determinada em ensaio preliminar.

*Solução da amostra*

Dissolver a amostra em cloreto de sódio 0,9% (p/V) de modo a obter solução com potência presumida à da solução padrão. Preferencialmente, realizar ensaio preliminar.

**METODO PROPOSTO***Plasma*

Coletar sangue de ovelha diretamente no frasco que contém solução de citrato de sódio 8% (p/V),

na proporção de 1 ml para cada 19 ml de sangue. Misturar, imediatamente, por leve agitação e inversão do frasco. A seguir, centrifugar o sangue e reunir todo o plasma no mesmo recipiente. Retirar 1 ml deste plasma e transferir para tubo de ensaio. Adicionar 0,2 ml de cloreto de cálcio 1% (p/V) e homogeneizar três vezes por inversão leve do tubo. Colocar em banho-maria a 37 °C. Considerar o plasma adequado se houver a formação de coágulo sólido em até 5 minutos. Armazenar o lote de plasma em frascos contendo, no máximo, 100 ml cada um e congelar. Evitar o descongelamento parcial antes da utilização. Para o ensaio, descongelar o plasma em banho-maria à temperatura não superior a 37 °C e filtrar em gaze.

*Procedimento*

Usar dez tubos de ensaio de 13 x 100 mm meticulosamente limpos. Adicionar volumes decrescentes da diluição padrão de modo que a dose maior não exceda 0,80 ml e que correspondam a séries geométricas, nas quais cada passo seja aproximadamente 5% menor do que o anterior. Adicionar, a cada tubo, cloreto de sódio 0,9% (p/V) suficiente para completar 0,80 ml. Adicionar 1 ml de plasma a todos os tubos. A seguir, juntar 0,20 ml de cloreto de cálcio 1% (p/V) e anotar a hora. Tampar cada tubo e homogeneizar, invertendo três vezes de tal maneira que toda a superfície interna seja umedecida. Colocar em banho-maria a 37 °C. Similarmente, fazer a série usando a solução da amostra de heparina. Completar todo o processo de preparação e mistura dos tubos da solução padrão e amostra no período de 20 minutos após a adição do plasma. Uma hora, exatamente marcada, após a adição do cloreto de cálcio 1% (p/V) determinar, por observação, a extensão do coágulo em cada tubo, identificando três graus (0,25, 0,50, 0,75) entre o zero (0,00) e a coagulação total (1,00). Se a série não apresentar dois tubos com graduação acima de 0,50 e dois tubos abaixo de 0,50, repetir o ensaio usando soluções do padrão e da amostra com concentração modificada.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.6.

## V.5.2.7. ENSAIO BIOLÓGICO DE SULFATO DE PROTAMINA

## MÉTODO PROPOSTO

*Amostra*

Dissolver em água quantidade suficiente e exatamente pesada de sulfato de protamina, para obter solução contendo 1,0 mg por ml (base livre).

*Solução de heparina*

No dia do ensaio preparar solução de heparina, em solução fisiológica, de modo a obter, respectivamente, potência de 90 ou 115 unidades internacionais por ml, conforme origem da mesma, tecido pulmonar ou mucosa intestinal.

*Plasma*

Empregar o plasma nas condições descritas no ensaio biológico de heparina.

*Solução de tromboplastina-cálcio*

Dissolver, em solução de cloreto de cálcio 2% (p/V), quantidade de tromboplastina determinada, se necessário, através de ensaio preliminar que, em aproximadamente 35 segundos, coagula solução com volumes iguais de plasma e mistura de 4 volumes da solução de cloreto de sódio 0,9% e 1 volume da solução tromboplastina-cálcio.

*Procedimento*

Usar tubos de ensaio de 13 x 100 mm meticulosamente limpos. Em 10 tubos, colocar 2,5 ml de plasma. Colocar os tubos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  e em nove deles adicionar 0,5 ml da amostra. No décimo tubo, que servirá como controle, pipetar 2 ml de cloreto de sódio 0,9% (p/V) e 0,5 ml da solução de tromboplastina-cálcio. Homogeneizar por dispositivo adequado e registrar o tempo de coagulação, isto é, o período entre adição da solução de tromboplastina-cálcio e a formação de fibras de fibrina. É o tempo normal de coagulação do plasma. Pipetar, respectivamente, para os nove tubos restantes, volumes em ml de solução de heparina: 0,43, 0,45, 0,47, 0,49, 0,50, 0,51, 0,53, 0,55 e 0,57. Adicionar cloreto de sódio 0,9% (p/V) para completar 4,5 ml. Tomando os tubos aleatoriamente, adicionar 0,5 ml da solução de tromboplastina-cálcio e determinar o tempo de coagulação individual do modo descrito para o tubo controle.

Calcular a potência em unidades internacionais de heparina neutralizadas por mg, pela fórmula  $N_H/N_P$ , na qual  $N_H$  é o número de unidades internacionais de heparina e  $N_P$  é o número de mg de sulfato de protamina no tubo seguinte àquele em que o tempo de coagulação é, no mínimo, 2 segundos maior do que o do controle.

## V.5.2.8. ENSAIO BIOLÓGICO DE GONADOTROFINA SÉRICA

Determina-se a potência de gonadotrofina sérica comparando seu efeito sobre o aumento de peso de ovários de ratas imaturas com aquele da preparação padrão de gonadotrofina sérica, por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o segundo padrão internacional de gonadotrofina sérica equina para avaliação biológica, estabelecido em 1966, que consiste em princípio ativo extraído de soro de éguas prenhes, liofilizado, com lactose (fornecido em ampolas contendo 1600 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Dissolver o conteúdo total da ampola da preparação padrão de gonadotrofina sérica em tampão albumina-fosfato pH 7,2 de modo a obter solução com concentração de 100 unidades internacionais de gonadotrofina sérica por ml. Com o mesmo solvente, preparar três diluições do padrão de tal forma que a menor dose produza resposta positiva, a maior não produza resposta máxima e, além disso, as três doses estejam em série geométrica como 1:1,2:1,44. Fazer curva dose-resposta a fim de selecionar as doses de acordo com a sensibilidade da colônia de animais.

*Solução da amostra*

Do modo anteriormente descrito, preparar a amostra de gonadotrofina sérica, usando o mesmo solvente, a fim de obter as três diluições da amostra com potência presumida idêntica à das diluições do padrão.

**MÉTODO PROPOSTO**

Selecionar ratas imaturas de 21 a 24 dias de idade e com variação de peso não superior a 10 g. Distribuir os animais ao acaso, em seis lotes iguais, cada qual com seis a dez ratos. Identificar cada lote designando-os, respectivamente, para cada uma das três diluições do padrão e da amostra. Manter os animais em condições uniformes de água, alimentação, temperatura e iluminação. Efetuar, em cada rata, seis administrações de 0,20 ml, subcutaneamente, na área dorsal, com a respectiva solução. Injetar os animais, na tarde do primeiro dia, manhã, meio-dia e tarde do segundo dia e na manhã e tarde do terceiro dia. No sexto dia, sacrificar cada rata, retirar os ovários, isolar da gordura e trompas de Falópio e pesar imediatamente. Registrar o peso combinado dos ovários de cada rata.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.9. ENSAIO BIOLÓGICO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA

Determina-se a potência da gonadotrofina coriônica, comparando seu efeito sobre o aumento de peso da próstata ventral ou vesículas seminais de ratos imaturos com aquele da preparação padrão de gonadotrofina coriônica por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o segundo padrão internacional de gonadotrofina coriônica humana para avaliação biológica, estabelecido em 1963, que consiste em princípio ativo extraído de urina de mulher grávida e liofilizado com lactose (fornecido em ampolas contendo 5300 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Dissolver o conteúdo total da ampola da preparação padrão de gonadotrofina coriônica em tampão albumina-fosfato pH 7,2, de modo a obter solução com a concentração de 10 unidades internacionais de gonadotrofina coriônica por ml. Com o mesmo solvente, preparar três diluições do padrão de modo que as respostas estejam na zona linear da curva dose-resposta e, além disso, estejam em série geométrica como, por exemplo, 1:2:4. Como aproximação inicial, poderiam ser

tentadas doses entre 0,75 e 3,0 unidades internacionais.

*Soluções da amostra*

Do modo anteriormente descrito, preparar a solução da amostra de gonadotrofina coriônica, usando o mesmo solvente, a fim de obter as três diluições da amostra com potência presumida idêntica à das diluições padrão.

**MÉTODO PROPOSTO**

Selecionar ratos imaturos de, aproximadamente, 21 dias de idade e peso semelhante na faixa de 30 a 40 g. Os animais são distribuídos, ao acaso, em seis lotes de, no mínimo, dez ratos. Mantê-los em condições uniformes de água, alimentação, temperatura e iluminação. Identificar cada lote designando-os para cada uma das três diluições do padrão e da amostra. Injetar cada rato, subcutaneamente, na área dorsal, com 0,20 ml da respectiva solução, durante três dias consecutivos, aproximadamente no mesmo horário. No quarto dia, cerca de 24 horas após a última injeção, sacrificar os animais, retirar a próstata ventral ou as vesículas seminais de cada um e pesar imediatamente. Registrar o peso.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.10. ENSAIO BIOLÓGICO DE GONADORELINA

Determina-se a potência da gonadorelina, comparando o efeito estimulante da secreção do hormônio luteinizante da hipófise (avaliado comparando a depleção de ácido ascórbico ovariano de ratas pseudoprenhes) com aquele da preparação padrão por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar a primeira preparação de referência, estabelecida em 1980, que consiste em resíduo liofilizado de solução com aproximadamente 50 µg de gonadorelina, 2,5 mg de lactose e 0,5 mg de albumina de plasma humano (fomecida em ampolas contendo 31 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação à preparação de referência.

## MÉTODO PROPOSTO

*Animais*

Selecionar, no mínimo, 56 ratas de aproximadamente 21 dias e peso semelhante na faixa de 30 a 40 g. Mantê-las em condições uniformes de água, alimentação, temperatura e iluminação.

*Procedimento*

Distribuir as ratas, por sorteio, em sete grupos iguais de oito animais. Identificar cada grupo designando-os respectivamente para as três doses do padrão e da amostra. O sétimo grupo servirá como controle. Injetar todas as ratas, subcutaneamente, no primeiro e terceiro dias com 50 unidades de gonadotrofina sérica e no quinto dia com 50 unidades de gonadotrofina coriônica, cada

qual dissolvida em 0,5 ml de tampão albumina-fosfato pH 7,2.

Estabelecer a curva dose-resposta e selecionar três doses do padrão e da amostra que estejam na região linear. Como aproximação, podem ser tentadas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 µg, de acordo com a sensibilidade da cepa de animais usados. Dissolver as doses em 0,1 ml de tampão albumina-fosfato pH 7,2 contendo gelatina 1% (p/V). Injetar cada rata, subcutaneamente, seis a nove dias após a administração da gonadotrofina coriônica. Três horas após a injeção, sacrificar os animais, remover os ovários, isolá-los de tecidos circunvizinhos e imediatamente pesá-los. Executar a operação tão rapidamente quanto possível para evitar perda de peso. Tratar os ovários de cada rata separadamente, como segue. Homogeneizar convenientemente com solução recente de ácido metafosfórico 2,5% (p/V) e ajustar o volume para 10 ml com a mesma solução. Deixar o homogeneizado em repouso durante 30 minutos.

*Determinação de ácido ascórbico*

Filtrar os extratos de ácido metafosfórico e pipetar 4 ml de cada um para tubos de ensaio contendo 4 ml da solução de acetato de indofenol SR. Misturar por agitação e, 30 segundos depois, ler a absorvância em espectrofotômetro a 520 nm. Calcular a concentração de ácido ascórbico em mg por 100 g de ovário, a partir da absorvância encontrada e da curva padrão elaborada do mesmo modo tratando volumes adequados de solução de ácido L-ascórbico em ácido metafosfórico 2,5% (p/V).

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.11. ENSAIO BIOLÓGICO DE MENOTROFINA

Determina-se a potência de menotrofina em relação à atividade hormonal folículo-estimulante, comparando seu efeito sobre o crescimento e maturação dos ovários de ratas imaturas com aquele da preparação padrão de FSH e LH (ICSH) urinário humano, por método de ensaio adequado. A potência em relação à atividade hormonal luteinizante é estimada comparando a depleção do conteúdo de ácido ascórbico ovariano de ratas pseudoprenhes, com aquela da preparação padrão de FSH e LH (ICSH) urinário humano, por método de ensaio adequado.

**Preparação padrão**

Empregar o primeiro padrão internacional de FSH e LH (ICSH) urinário humano, para avaliação biológica, estabelecido em 1974, que consiste em extrato de urina de mulher após menopausa, liofilizado, com 5 ml de lactose (disponível em ampolas contendo 54 unidades de atividade de folitropina e 46 unidades de atividade de lutrofina). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

**MÉTODOS PROPOSTOS****Atividade da folitropina: FSH**

Selecionar ratas de aproximadamente 21 dias de peso semelhante na faixa de 30 a 40 g. Distribuí-las, por sorteio, em 6 grupos iguais de, no mínimo, oito ratas. Identificar cada grupo designando-os, respectivamente, para as três doses do padrão e amostra.

Estabelecer a curva dose-resposta e selecionar três doses do padrão e da amostra que estejam na região linear. Embora dependa da sensibilidade da colônia de animais, como aproximação podem ser tentadas doses de 0,5, 0,71 e 1,0 unidades por injeção.

Dissolver cada dose em 0,5 ml de tampão albumina-fosfato pH 7,2 contendo 14 unidades de gonadotrofina coriônica. Injetar cada rata, subcutaneamente, na área dorsal. Repetir a injeção 24 e 48 horas depois. Cerca de 24 horas após a última injeção, sacrificar as ratas, remover os ovários e pesá-los. Registrar o peso de ovários por rata.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

**Atividade da lutrofina: LH (ICSH)**

Selecionar ratas de aproximadamente 21 dias de idade e peso semelhante na faixa de 30 a 40 g. Distribuí-las por sorteio, em 6 grupos iguais de, no mínimo, oito ratas. Identificar cada grupo designando-os, respectivamente, para as três doses do padrão e amostra.

Injetar os animais, subcutaneamente, no primeiro e terceiro dias com 50 unidades de gonadotrofina sérica e no quinto dia com 50 unidades de gonadotrofina coriônica, cada qual dissolvida em 0,5 ml de tampão albumina-fosfato pH 7,2. Estabelecer a curva dose-resposta e escolher três doses do padrão e da amostra que estejam na região linear. Embora dependa da sensibilidade da colônia de animais, como aproximação podem ser tentadas doses de 0,5, 1,0 e 2,0 unidades. Seis a nove dias após a aplicação da gonadotrofina coriônica, dissolver cada dose de menotrofina em 0,5 ml de tampão albumina-fosfato pH 7,2 e injetar intravenosamente em cada grupo de animais. Três horas após, sacrificar as ratas, remover os ovários, isolar de tecidos estranhos e pesar imediatamente, executando a operação tão rapidamente quanto possível para evitar perda de peso. Tratar os ovários de cada rata separadamente, como segue. Homogeneizar em solução recente de ácido metafosfórico 2,5% (p/V) e ajustar a 10 ml com a mesma solução. Deixar o homogeneizado em repouso durante 30 minutos. Filtrar os extratos de ácido metafosfórico e pipetar 4 ml de cada filtrado para tubos de ensaio contendo 4 ml da solução de acetato de indofenol SR. Misturar por agitação e, 30 segundos depois, ler a absorvância em espectrofotômetro a 520 nm. Calcular a concentração de ácido ascórbico a partir da absorvância lida e da curva padrão preparada tratando, do mesmo modo, volumes adequados da solução de ácido L-ascórbico em ácido metafosfórico 2,5% (p/V). Expressar o resultado em mg por 100 g de ovário.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.



## V.5.2.12. ENSAIO BIOLÓGICO DE DIGITAL

Determina-se a potência de digital, comparando sua atividade sobre o músculo cardíaco de cobaio com aquela da preparação padrão por método de ensaio adequado.

**Preparação padrão**

Empregar o terceiro padrão internacional de digital, estabelecido em 1949, que consiste em pó seco de folhas de *Digitalis purpurea* (disponível em ampolas contendo 2,5 g). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

**Solução padrão**

Transferir quantidade exatamente pesada da preparação padrão para balão volumétrico de 50 ml e adicionar 10 ml de etanol 80% (V/V) para cada g de pó. Tampar o balão após untar, levemente, a parte esmerilhada com parafina líquida. Agitar continuamente durante 24 horas  $\pm$  2 horas a 25 °C  $\pm$  5 °C ou 48 horas a 10 a 20 °C. Em seguida, centrifugar ou filtrar a mistura, através de vidro sinterizado, evitando a evaporação do solvente. Transferir o líquido para recipiente adequado, bem fechado, e manter a temperatura entre -5 e 5 °C. Usar, no máximo, durante 1 mês. No dia do ensaio diluir a solução padrão em solução fisiológica de modo a obter concentração padrão de digital com 3 a 5 mg por ml.

**Solução da amostra**

Preparar a amostra de digital da mesma maneira, usando o mesmo solvente a fim de obter solução

com potência presumida idêntica à da solução padrão.

**MÉTODO PROPOSTO**

Selecionar, no mínimo, doze cobaios adultos, sadios, de peso entre 200 e 600 g. Para cada ensaio, o peso médio dos dois grupos não deve diferir mais de 10% e o animal mais pesado não deve variar mais do que 100 g, em relação ao mais leve. Separar em dois grupos de 6 cobaios cada um, designando-os, respectivamente, para a solução padrão e amostra. Anestesiá-lo animal com carbamato de etila a 50% (p/V) na dose de 2 ml/kg por via intraperitoneal, dissecar e canular a veia jugular, preparando-a para as administrações intravenosas das soluções do padrão e da amostra. Paralelamente, preparar o animal para a manutenção de respiração artificial. Aleatoriamente, injetar as doses da solução padrão ou da amostra, através da veia jugular, em velocidade lenta e uniforme, como a de 0,5 a 1 ml por minuto.

A duração da infusão pode variar de 20 a 40 minutos, com a duração média dos grupos não diferindo em mais de 10%. Continuar a injeção até que ocorra a parada cardíaca, observável através de eletrocardiograma ou outro dispositivo adequado. Anotar o volume de extrato administrado como sendo a dose letal. Determinar, para cada animal, a dose letal em ml por kg de peso corporal e transformar em logaritmo.

A partir dos resultados calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.4.

## V.5.2.13. ENSAIO BIOLÓGICO DE VASOPRESSINA

Determina-se a potência da vasopressina comparando sua atividade com aquela da preparação padrão de argipressina por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o primeiro padrão internacional de argipressina para avaliação biológica, estabelecido em 1978, que consiste em argipressina sintética liofilizada com albumina humana e ácido cítrico (disponível em ampolas que contêm 8,20 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

*Solução padrão*

Dissolver o conteúdo total da ampola da preparação padrão em cloreto de sódio 0,9% (p/V), de modo a obter solução de 2,0 unidades internacionais por ml. De acordo com a sensibilidade do animal, serão necessárias diluições posteriores, de modo que o volume injetado não seja inferior a 0,1 ml nem superior a 0,5 ml.

*Solução amostra*

Preparar a amostra de vasopressina, do modo anteriormente descrito, usando o mesmo solvente, a fim de que a solução resultante tenha potência presumida idêntica à da solução padrão.

**MÉTODO PROPOSTO***Preparação do animal*

Aproximadamente 18 horas antes do ensaio, selecionar um rato pesando ao redor de 300 g. Injetar, intravenosamente, 10 ml por kg de peso corporal, uma solução preparada do seguinte modo: dissolver 10 mg de cloridrato de fenoxibenzamina em cloreto de sódio 0,9% (p/V), adicionar 0,1 ml de álcool, acidificar com 1 gota de ácido clorídrico e diluir com cloreto de sódio 0,9% (p/V) até completar 10 ml. No dia do ensaio, anestesiá-lo, usando como anestésico carbamato

de etila 5% (p/V) favorável à manutenção de pressão arterial uniforme. Quarenta e cinco a sessenta minutos depois, fixar o rato sobre a mesa de cirurgia. Dissecar a veia jugular ou femoral, inserir cânula adequada com, aproximadamente, 1 mm de diâmetro externo e prepará-la para a administração intravenosa. Administrar 200 unidades de heparina, dissolvida em solução fisiológica para cada 100 g de peso corporal. Dissecar a artéria carótida e conectar a manômetro de mercúrio de 2 a 3 mm de diâmetro interno, ou outro sistema adequado para obter registro contínuo da pressão arterial. Manter o animal aquecido durante a cirurgia, bem como durante o ensaio.

*Determinação da sensibilidade do animal*

Determinar, por experimentação, a dose de solução padrão que, injetada intravenosamente, a intervalos regulares de 12 a 15 minutos, produz elevação da pressão arterial entre 2,7 a 9,3 kPa (20 e 70 mm de mercúrio). A partir desta observação, selecionar duas doses da solução padrão que estejam na razão de aproximadamente 2 para 3 ou de 3 para 5. Após o teste preliminar, selecionar duas doses da amostra que estejam na mesma razão e correspondam, em atividade, àquelas doses selecionadas da preparação padrão. Como referência inicial, podem ser tentadas doses de 6 e 10 mil unidades.

*Procedimento*

Injetar as duas doses selecionadas da solução padrão e da amostra, em seqüência aleatória, a intervalos uniformes de 12 a 15 minutos, registrando pelo menos quatro respostas para cada dose. Após cada injeção, lavar a cânula com 0,2 ml de solução fisiológica. Ao invés desta seqüência aleatória pode-se usar um planejamento de blocos ao acaso para eliminar a influência de variações na sensibilidade do animal sobre o resultado do ensaio.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## V.5.2.14. ENSAIO BIOLÓGICO DE LIPRESSINA

Determina-se a potência da lipressina comparando sua atividade com aquela da preparação padrão por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o primeiro padrão internacional de lipressina, estabelecido em 1978, que consiste em lipressina liofilizada, com albumina e ácido cítrico

(disponível em ampolas contendo 7,7 unidades). Pode ser utilizada outra preparação adequada, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

**MÉTODO PROPOSTO**

Usa-se o método descrito para ensaio biológico de vasopressina.

**V.5.2.15. ENSAIO BIOLÓGICO DE FELIPRESSINA**

Determina-se a potência da felipressina comparando sua atividade com aquela da preparação padrão de felipressina por método de ensaio adequado.

***Preparação padrão de referência***

Empregar preparação padrão de referência de felipressina.

***Solução padrão***

Dissolver quantidade calculada, exatamente pesada, da preparação padrão em solução fisiológica, de modo a obter solução de 0,1 unidade por ml. No dia do ensaio fazer diluição em solução

fisiológica, para obter solução de 0,01 unidade por ml.

***Solução da amostra***

Preparar a amostra de felipressina do mesmo modo, usando o mesmo solvente, a fim de que a solução resultante tenha a potência presumida idêntica à da solução padrão.

**MÉTODO PROPOSTO**

Usa-se o método descrito para ensaio biológico de vasopressina.

Observar, porém, que na determinação da sensibilidade do animal podem ser tentadas, como referência inicial, doses de 2,0 a 5,0 miliunidades.

## V.5.2.16. ENSAIO BIOLÓGICO DA SOMATOTROFINA

Determina-se a potência da somatotrofina comparando seu efeito sobre o aumento de peso corporal, ou da espessura da cartilagem de conjugação da tibia de ratas hipofisectomizadas, com aquele da preparação padrão de somatotrofina por método de ensaio adequado.

*Preparação padrão*

Empregar o primeiro padrão internacional de somatotrofina para avaliação biológica, estabelecido em 1982, que consiste em somatotrofina purificada, liofilizada, com lactose, glicina, manitol e bicarbonato de sódio (disponível em ampolas contendo 4,4 unidades internacionais). Pode ser utilizada outra preparação, cuja potência tenha sido determinada em relação ao padrão internacional.

## MÉTODOS PROPOSTOS

Selecionar, no mínimo, sessenta ratas, da mesma linhagem, de 26 a 30 dias de idade e peso aproximadamente igual. Duas a três semanas antes do ensaio, colocar os animais em condições uniformes de água, alimentação, temperatura e iluminação. Para o ensaio, pesar as ratas e realizar a hipofisectomia. Após a cirurgia, mantê-las à temperatura constante entre 25 e 27 °C e controlar a estabilidade do peso durante, no mínimo, 14 dias. Desprezar aquelas que apresentarem flutuação ponderal maior que 3% nos últimos 10 dias. Dividir aleatoriamente em quatro grupos iguais de, no mínimo, oito ratas cada um, designando-os, respectivamente, para as duas doses do padrão e da amostra. Preparar duas diluições do padrão em bicarbonato de sódio 1,4% (p/V), de modo que estejam em série geométrica como 2:4. Como aproximação inicial podem ser tentadas doses entre 40 e 160 miliunidades internacionais por ml. Paralelamente, fazer duas diluições da amostra, usando o mesmo solvente, a fim de obter concentrações presumidas idênticas à das diluições do padrão.

## MÉTODO A: AUMENTO DE PESO CORPORAL

Injetar 0,5 ml da respectiva solução, subcutaneamente, durante nove dias consecutivos, no mesmo horário. Acompanhar a variação individual, pesando as ratas durante os 10 dias de duração do ensaio. No décimo dia, pesar os animais, sacrificá-los e examinar macroscopicamente se a hipofisectomia foi completa. Desprezar os animais que apresentarem algum vestígio do órgão. Registrar aumento de peso corporal individual.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

## MÉTODO B: MÉTODO DA TÍBIA

Injetar 0,5 ml da respectiva solução, subcutaneamente, durante quatro dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última injeção, sacrificar os animais e examinar se a hipofisectomia foi completa. Desprezar os animais que apresentarem algum vestígio do órgão. Retirar as tíbias e isolá-las dos tecidos circunvizinhos. Cortar com lâmina fina e afiada a parte proximal dos ossos, em sentido longitudinal, corando-os com nitrato de prata da seguinte maneira: lavar os fragmentos dos ossos durante 10 minutos com água, por 10 minutos com acetona e 10 minutos novamente com água. Transferir para solução recente de nitrato de prata 2% (p/V). Dois minutos depois, lavar com água, expondo-os ao mesmo tempo à luz intensa, até que todas as porções calcificadas apresentem coloração marrom-escura. Medir a espessura da cartilagem epifisária, usando microscópio equipado com micrômetro ocular. Efetuar 10 medidas distribuídas diagonalmente ao longo de todo o comprimento da epífise de cada fragmento. Registrar como resposta o aumento médio da espessura da cartilagem epifisária das tíbias de cada rata.

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico descrito na seção VI.5.

V.5.2.17 – ENSAIO MICROBIOLÓGICO DE ANTIBIÓTICOS

Determina-se a potência (atividade) de um antibiótico comparando a dose que inibe o crescimento de microrganismo sensível com a dose da preparação padrão do antibiótico que produz inibição similar.

*Unidade Internacional e Preparação Padrão*

Unidade Internacional é a atividade específica contida em uma quantidade (massa) de Padrão Biológico Internacional ou Preparação de Referência Biológica Internacional. A quantidade equivalente de unidades para uso internacional é estabelecida, sempre que necessário, pela Organização Mundial da Saúde.

Substâncias Químicas de Referência Internacional não apresentam unidades de atividade biológica definidas. Quando são necessários ensaios biológicos, a potência desses produtos é expressa em termos de massa equivalente à da substância pura.

O número de unidades ou a massa equivalente da substância pura, em microgramas, contidos em 1 mg de substância antibiótica, está indicado na monografia de cada um dos produtos inscritos na Farmacopéia.

Para os ensaios microbiológicos da Farmacopéia, Preparações Padrão (Padrões Primários) são os Padrões Internacionais e Preparações de Referência estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde e pela Farmacopéia Européia ou os Padrões e Preparações de Referência brasileiros. Outras preparações adequadas, de uso internacional corrente, nas quais a potência tenha sido determinada em relação às preparações padrão da Organização Mundial da Saúde, possuem valor legal idêntico.

Recomenda-se que sejam preparados e empregados padrões de trabalho (secundários); todavia, é imprescindível que a potência tenha sido determinada por número adequado de ensaios comparativos em relação a padrão primário relevante, validada por análise estatística apropriada e que os dados e resultados sejam arquivados à disposição da fiscalização competente por prazo idêntico ao da validade dos produtos ensaiados.

Para o ensaio de lotes de substâncias antibióticas, para as quais existam Preparações Padrão nacionais, referendadas por organizações internacionais, é obrigatório o uso dessas preparações.

*Soluções*

**Solução 1 (tampão fosfato de potássio a 1%, estéril, pH 6,0)**

Dissolver 2,0 g de fosfato de potássio dibásico e 8,0 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C

e, se necessário, ajustar o pH para 5,9-6,1 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

**Solução 2 (tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 8,0)**

Dissolver 16,73 g de fosfato de potássio dibásico e 0,523 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C e, se necessário, ajustar o pH para 7,9-8,1 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

**Solução 3 (tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 4,5)**

Dissolver 13,6 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C e, se necessário, ajustar o pH para 4,4-4,5 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

**Solução 4 (tampão fosfato de potássio a 10%, estéril, pH 6,0)**

Dissolver 20,0 g de fosfato de potássio dibásico e 80,0 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C e, se necessário, ajustar o pH 5,9-6,1 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

**Solução 5 (tampão fosfato de potássio 0,2 M, estéril, pH 10,5)**

Dissolver 35,0 g de fosfato de potássio dibásico e 2,0 ml de hidróxido de potássio 10 M em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C e, se necessário, ajustar o pH para 10,4-10,6 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

**Solução 6 (ácido clorídrico metanólico 0,1 M)**

Diluir 10,0 ml de ácido clorídrico 1,0 M em metanol suficiente para perfazer 1000 ml.

**Solução 7 (solução de álcool isopropílico a 80%)**

Diluir 800 ml de álcool isopropílico em água suficiente para perfazer 1000 ml.

**Solução 8 (tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 7,0)**

Dissolver 13,6 g de fosfato de potássio dibásico e 4,0 g de fosfato de potássio monobásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. Esterilizar a solução por 20 minutos em autoclave a 121 °C e, se necessário, ajustar o pH para 6,8-7,2 com ácido fosfórico 6 M ou hidróxido de potássio 10 M.

*Meios de cultura*

Podem ser empregados meios de cultura desidratados, disponíveis no comércio que, quando

reconstituídos com água destilada, conforme as especificações do fabricante, possuam a mesma composição que o meio confeccionado com os ingredientes individualmente indicados para sua obtenção.

#### Meio de cultura nº 1

Dissolver 6,0 g de peptona seca, 4,0 g de caseína de digestão pancreática, 3,0 g de extrato de levedura, 1,0 g de dextrose e 15,0 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 6,6.

#### Meio de cultura nº 2

Dissolver 6,0 g de peptona seca, 3,0 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne e 15,0 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 6,6.

#### Meio de Cultura nº 3

Dissolver 5,0 g de peptona seca, 1,5 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne, 2,5 g de cloreto de sódio, 1,0 g de dextrose, 3,68 g de fosfato de potássio dibásico e 1,32 g de fosfato de potássio monobásico, em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,0.

#### Meio de cultura nº 4

Dissolver 6,0 g de peptona seca, 3,0 g de extrato de levedura, 1,5 g de extrato de carne, 1,0 g de D-glicose e 15,0 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 6,6.

#### Meio de cultura nº 5

Usar o meio de cultura nº 2, porém, o pH, após esterilização, deverá ser 7,8.

#### Meio de cultura nº 6

Dissolver 40,0 g de dextrose e 10,0 g de peptona seca em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 5,6.

#### Meio de cultura nº 7

Usar o meio de cultura nº 1, esterilizado e resfriado a 50 °C. Preparar solução aquosa contendo 10 mg de neomicina por ml e esterilizar por filtração em membrana com porosidade de 0,22 µm. Adicionar, asepticamente, solução estéril de sulfato de neomicina, para obter concentração final com potência de 100 µg de neomicina por ml de meio.

#### Meio de cultura nº 8

Usar o meio de cultura nº 2, porém, o pH, após esterilização, deverá ser ajustado para 5,8-6,0.

#### Meio de cultura nº 9

Dissolver 17,0 g de caseína de digestão pancreática, 3,0 g de soja de digestão papáfnica, 5,0 g de cloreto de sódio, 2,5 g de fosfato de potássio dibásico, 2,5 g de dextrose e 20,0 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,3.

#### Meio de cultura nº 10

Usar o meio de cultura nº 9, adicionando, porém, ao invés de 20,0 g, 12,0 g de ágar e 10,0 ml de polissorbat 80 (esse último adicionado após aquecer o meio para dissolver o ágar, diluindo, imediatamente, com água para perfazer 1000 ml). O pH, após esterilização, deverá ser 7,3.

#### Meio de cultura nº 11

Usar o meio de cultura nº 1, mas o pH, após esterilização, deverá ser ajustado para 8,0.

#### Meio de cultura nº 12

Preparar como o meio de cultura nº 1, adicionando, porém, 300 mg de sulfato de manganês hidratado ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ) para cada 1000 ml de meio.

#### Meio de cultura nº 13

Dissolver 10,0 g de peptona seca e 20,0 g de dextrose em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 5,6.

#### Meio de cultura nº 14

Dissolver 10,0 g de glicerol, 10,6 g de peptona seca, 10,6 g de extrato de carne e 3,0 g de cloreto de sódio em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,0.

#### Meio de cultura nº 15

Preparar como o meio de cultura nº 14, adicionando, porém, 17,0 g de ágar para cada 1000 ml de meio.

#### Meio de cultura nº 16

Dissolver 15,0 g de caseína de digestão pancreática, 5,0 g de soja de digestão papáfnica, 5,0 g de cloreto de sódio, e 15,0 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,3.

#### Meio de cultura nº 17

Dissolver 17,0 g de caseína de digestão pancreática, 3,0 g de peptona de soja, 2,5 g de dextrose, 5,0 g de cloreto de sódio e 2,5 g de fosfato de potássio dibásico em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,3.

#### Meio de cultura nº 18

Usar o meio de cultura nº 11, mas, após aquecer a solução para dissolver os ingredientes, adicionar 20,0 ml de polissorbat 80. O pH, após esterilização, deverá ser 8,0.

#### Meio de cultura nº 19

Dissolver 9,4 g de peptona seca, 4,7 g de extrato de levedura, 2,4 g de extrato de carne e 15,0 g de cloreto de sódio, 10,0 g de dextrose e 23,5 g de ágar em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 6,1.

#### Meio de cultura nº 20

Dissolver 40,0 g de dextrose, 10,0 g de peptona (seca), 15,0 g de ágar e 0,05 g de clorafenicol (em potência) em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 5,6.

**Meio de cultura nº 21**

Usar o meio de cultura nº 20, esterilizado e resfriado a 50 °C. Adicionar, asepticamente, 2,0 ml de solução estéril de cicloeximida para cada 100 ml de ágar fundido. Preparar solução contendo 10,0 mg de cicloeximida por ml, em água, e esterilizar, por filtração, em membrana com porosidade de 0,22 µm.

**Meio de cultura nº 22**

Dissolver 15,0 g de peptona seca, 5,0 g de farinha de soja de digestão papáinica, 4,0 g de cloreto de sódio, 0,2 g de sulfito de sódio, 0,7 g de L-cistina, 5,5 g de dextrose e 15,0 g de ágar, em água suficiente para perfazer 1000 ml. O pH, após esterilização, deverá ser 7,0.

**Preparação do inóculo**

**Microrganismos recomendados**

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 P)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 7468)
- *Micrococcus luteus* (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)
- *Streptococcus faecium* (ATCC 10541)
- *Micrococcus luteus* (ATCC 10240)
- *Microsporium gypseum* (ATCC 14683)
- *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601)
- *Micrococcus flavus resistente à neomicina* (ATCC 14452)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619)
- *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607)

Com a finalidade de indicação, foram arrolados microrganismos disponíveis na ATCC. Os mesmos germens podem também ser obtidos de outras fontes: INCQS, CIP, NCIB, NCPF, NCTC, NCYC e SSI. A correspondência entre os microrganismos e os endereços das entidades fornecedoras dos mesmos encontram-se indicadas na seção XIII.5.

**Procedimento 1**

*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

**Preparação da suspensão**

Manter o microrganismo em tubos contendo 10 ml do meio de cultura nº 1 inclinado. Incubar o tubo a 32-35 °C, por 24 horas. Empregando 3 ml de solução fisiológica estéril, transferir a cultura crescida sobre o meio do tubo inclinado para maior superfície de ágar, como em frasco de Roux contendo 250 ml do meio de cultura nº 1. Incubar o frasco de Roux a 32-35 °C. Lavar a

cultura resultante na superfície do meio com 50 ml de solução fisiológica estéril.

**Padronização da suspensão**

Diluir a suspensão preparada, com solução fisiológica estéril, de modo a obter a transmitância de 25% no comprimento de onda de 580 nm, empregando colorímetro adequado e tubos de ensaio com 13 mm de diâmetro como cuba de absorção. Determinar a quantidade de suspensão a ser adicionada a cada 100 ml de ágar ou caldo nutriente para produzir zonas de inibição claras e definidas ou relação satisfatória dose-resposta no método turbidimétrico. O inóculo dos microrganismos submetidos ao procedimento 1 pode ser estocado à temperatura de 4 °C, respectivamente, pelos seguintes períodos: 1 semana, 2 semanas, 2 semanas, 2 semanas, 6 meses, 1 semana, 2 semanas e 2 semanas.

*Micrococcus flavus*. Efetuar como indicado no Procedimento 1. Empregar, entretanto, no tubo com meio inclinado e no frasco de Roux, meio de cultura nº 7, incubando o frasco por período de 48 horas. A suspensão pode ser estocada por duas semanas, à temperatura não superior a 4 °C.

**Procedimento 2**

*Bacillus subtilis*. Efetuar como indicado no Procedimento 1. Na preparação da suspensão, porém, empregar, no frasco de Roux, o meio de cultura nº 12, cujo período de incubação é de 5 dias. Na padronização da suspensão proceder a choque térmico e padronizar a suspensão como segue: centrifugar e decantar o líquido sobrenadante. Ressuspender o sedimento com 50 a 70 ml de solução fisiológica estéril e aquecer a suspensão por 30 minutos a 70 °C. Executar testes em placas, para se assegurar da viabilidade dos esporos e determinar a quantidade dos que deverão ser adicionados a cada 100 ml de meio, para obter zonas de inibição adequadas. A suspensão pode ser estocada, por 6 meses, em temperatura não superior a 4 °C.

**Procedimento 3**

*Bacillus cereus*. Efetuar como indicado no Procedimento 1. Entretanto, incubar o frasco de Roux por uma semana. Na padronização da suspensão, proceder a choque térmico e padronizar a suspensão como segue: aquecer a suspensão por 30 minutos, a 80 °C. Lavar três vezes a suspensão de esporos com 20 a 25 ml de água estéril. Ressuspender os germens em 50 a 70 ml de água estéril e promover novo choque térmico por 30 minutos a 70 °C. Executar testes em placas para se assegurar da viabilidade dos esporos e determinar a quantidade dos que deverão ser adicionados a cada 100 ml de ágar, para obter zonas de inibição adequadas. A suspensão pode ser estocada, por 6 meses, à temperatura não superior a 4 °C.

**Procedimento 4**

*Microsporium gypseum*. Incubar o microrganismo,



por 6 a 8 semanas, a 25 °C, em frascos de Erlenmeyer de 3 l, contendo 200 ml de meio de cultura nº 6. Verificar o crescimento por esporulação. Quando a esporulação for 80% ou mais, recolher os conídios da camada micelial com espátula estéril ou outro instrumento adequado. Os conídios estão na parte superior da camada flutuante. Manter os conídios em 50 ml de solução fisiológica. Determinar, experimentalmente, a quantidade de conídios para o ensaio. A suspensão pode ser estocada, por dois meses, à temperatura não superior a 4 °C.

#### Procedimento 5

*Streptococcus faecium*. Manter o microrganismo em quantidades de 100 ml de meio de cultura nº 3. Para realizar o ensaio, preparar subcultura, transferindo, com alça de platina, microrganismos da cultura estoque para o mesmo caldo nutriente e incubar, por 16 a 18 horas, a 37 °C. Determinar, experimentalmente, a quantidade de germens para o ensaio. Manter essa cultura sob refrigeração por prazo não superior a 24 horas.

#### Procedimento 6

*Saccharomyces cerevisiae*. (ATCC 9763). Manter o microrganismo em tubos contendo 10 ml de meio de cultura nº 19 inclinado. Incubar os tubos a 32-35 °C, durante 24 horas. Inocular 100 ml de caldo nutriente — meio de cultura nº 13 — e incubar, por 16 a 18 horas, a 37 °C. Padronizar a suspensão conforme descrito no Procedimento 1. A suspensão pode ser estocada, por 4 semanas, à temperatura não superior a 4 °C.

#### Procedimento 7

*Saccharomyces cerevisiae*. (ATCC 9763 e ATCC 2601). Seguir o indicado no Procedimento 1. Incubar, porém, o tubo inclinado e o frasco de Roux, com o meio de cultura nº 19, a 30 °C, o último por período de 48 horas. A suspensão pode ser estocada, por 4 semanas, à temperatura não superior a 4 °C.

#### Procedimento 8

*Mycobacterium smegmatis*. Manter o microrganismo em tubos com meio inclinado contendo 10 ml do meio de cultura nº 16 e efetuar repiques semanalmente. Incubar o tubo a 37 °C, por 48 horas. Usando 3 ml de solução fisiológica estéril, transferir as culturas que cresceram no ágar inclinado para frasco de erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio de cultura nº 14 e 50 g de pérolas de vidro. Agitar a cultura por rotação à velocidade de 130 ciclos por minuto, num raio de 3,5 cm e à temperatura de 27 °C, por período de cinco dias. Determinar a quantidade de suspensão a ser adicionada a cada 100 ml de ágar por intermédio de ensaio em placas. A suspensão pode ser estocada, por duas semanas, à temperatura não superior a 4 °C.

#### Dessecação de substâncias antibióticas

Usar para dessecação dos padrões o procedimento indicado nos Métodos de Ensaio Microbiológico e, para as amostras, o método especificado para cada antibiótico na respectiva monografia.

#### Método 1

Em ambiente de baixa umidade relativa, pulverizar, caso necessário, a amostra para obter pó fino. Empregar na preparação da amostra quatro unidades, quando forem analisadas formas farmacêuticas como comprimidos, cápsulas, drágeas ou pastilhas. Transferir aproximadamente 100 mg de amostra 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 da amostra.

#### Método 2

Proceder conforme o Método 1. Empregar, porém, pesa-filtro tarado provido de tampa com tubo capilar de diâmetro interno da ordem de 0,20 a 0,25 mm, e dessecar sem remover a tampa.

#### Método 3

Proceder conforme o Método 1. Dessecar, porém, a amostra a 110 °C, sob pressão de 10,67 kPa ou menos, durante três horas.

#### Método 4

Proceder conforme o Método 1. Dessecar, porém, a amostra a 40 °C, sob pressão de 10,67 kPa ou menos, durante duas horas.

#### Método 5

Proceder conforme o Método 1. Dessecar, porém, a amostra a 100 °C, sob pressão de 5 mm de Hg ou menos, durante quatro horas.

#### Método 6

Proceder conforme o Método 1. Dessecar, porém, a amostra a 40 °C, sob pressão de 10,67 kPa ou menos, durante três horas.

#### Método 7

Proceder conforme o Método 1. Dessecar, porém, a amostra a 25 °C, sob pressão de 10,67 kPa ou menos, durante quatro horas.

#### Método 8

A substância antibiótica não é submetida à dessecação.

**Método de ensaio microbiológico**

Todo o material deve ser adequado para o uso pretendido e deve ser minuciosamente limpo, após cada utilização, para remover qualquer vestígio de antibiótico. O material deve permanecer coberto quando não estiver em uso. Toda vidraria destinada ao trabalho com o microrganismo deve ser esterilizada em estufa entre 200 °C e 220 °C por período de 2 horas. Na diluição da solução padrão e amostra empregar frascos volumétricos, pipetas ou equipamentos cuidadosamente calibrados.

**V.5.2.17.1. - ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR DIFUSÃO EM ÁGAR**

Para cada antibiótico relacionado na Tabela 1, apresentada a seguir, verificar o meio de cultura (conforme a relação dos meios de cultura), a quantidade de meio a ser usada na camada base e na camada semeada e o microrganismo de ensaio. O volume de inóculo a ser adicionado a cada 100 ml de meio de cultura deve ser determinado experimentalmente. Entretanto, como referência inicial, sugere-se quantidade de inóculo a ser adicionado por 100 ml de meio.

Preparar a camada base através da adição de quantidade apropriada de ágar fundido nas placas de Petri, as quais devem ser especialmente selecionadas, ter fundo plano, possuir dimensões de 20 por 100 mm e tampa de material apropriado. Distribuir o ágar uniformemente nas placas, que devem ser colocadas em superfície nivelada para assegurar que a camada de meio tenha profundidade uniforme. Colocar a tampa de cada placa ao lado dessa; se for utilizada tampa não porosa, deixá-la levemente entreaberta para evitar o acúmulo de umidade condensada a partir da camada de ágar quente. Após o endurecimento do ágar, tampar as placas. Para preparar a camada semeada — superfície —, adicionar o volume de inóculo determinado para a quantidade apropriada de meio de cultura que tenha sido fundido e resfriado entre 48 °C e 50 °C. Agitar o frasco, por rotação, para obter suspensão homogênea e adicionar a quantidade indicada do meio inoculado em cada placa de Petri, contendo a camada base não inoculada. Espalhar uniformemente a camada, tampar as placas e permitir o seu endurecimento sobre superfície plana. Após o endurecimento do meio, colocar seis cilindros de aço inoxidável, com diâmetro externo de 8 mm  $\pm$  0,1 mm, diâmetro interno de 6 mm  $\pm$  0,1 mm e comprimento de 10 mm  $\pm$  0,1 mm, sobre a superfície do ágar inoculado, de maneira que formem entre si ângulo de 60° e com raio de 2,8 cm. Também podem ser utilizados cilindros confeccionados em vidro, porcelana ou alumínio e esterilizados nas condições já descritas. Em lugar dos cilindros, podem ser perfurados, no meio, com furador estéril, poços de

5 a 8 mm de diâmetro. Podem, ainda, ser usados discos de papel, confeccionados com papel de qualidade apropriada ou moldes de aço inoxidável. Quando são usados discos de papel, eles devem ser esterilizados, de ambos os lados, por meio de lâmpada de esterilização.

**Preparação da Solução Padrão de Trabalho e da Curva Padrão**

Para assegurar a validade do ensaio, usar pelo menos três\* diferentes doses da substância que está sendo ensaiada, tendo presumidamente a mesma concentração (atividade) que as soluções do padrão de potência conhecida.

As doses usadas na curva de dosagem devem estar em progressão geométrica; por exemplo, pela preparação de séries de diluição na razão 2:1, uma vez que para o sistema ensaiado existe relação linear entre o logaritmo da concentração do antibiótico e o diâmetro da zona de inibição.

A Tabela II, exposta a seguir, indica para cada antibiótico a preparação da solução padrão de trabalho e da curva padrão, compreendendo:

- a) condições de dessecação, conforme *Dessecação de substâncias antibióticas*.
- b) solvente inicial para dissolução do antibiótico, caso seja necessário, e até qual concentração é usado;
- c) solução para diluição até a concentração de trabalho, conforme *Soluções*;
- d) concentração da solução de trabalho, expressa em peso ou Unidades Internacionais por ml de solução;
- e) prazo de validade da solução padrão de trabalho sob refrigeração;
- f) solução empregada para diluição da solução de trabalho, por ocasião da preparação da curva padrão, conforme *Soluções* e
- g) faixas de concentração sugeridas, em peso ou Unidades Internacionais por ml, dentro das quais podem ser encontradas as concentrações adequadas para a curva padrão.

A preparação das amostras dos antibióticos está indicada na respectiva monografia.

\* Em ensaios de rotina, quando a linearidade do sistema foi comprovada em número adequado de experimentos usando o ensaio de três pontos, pode ser empregado ensaio de dois pontos. Quando se emprega o delineamento com mais de três pontos, utilizar placas de 20 x 150 mm. Será aceito, igualmente, o delineamento 5 x 1, adotado oficialmente por outras farmacopéias de uso internacional corrente. Todavia, em caso de controversia ou litígio, deve ser aplicado o ensaio de três pontos.

**Tabela 1 – Ensaio microbiológico por difusão em ágar**

Organismo	Meio de cultura a ser usado (conforme 3. Meios de Cultura)		Volume (ml) de meio a ser aplicado nas camadas		Volume inoculado (ml/l)
	Base	Superfície	Base	Superfície	
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	0
<i>Staphylococcus flavus</i> resistente à neomicina (ATCC 14452)	2	1	21	4	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)		19		8	1
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 7468)	2	1	21	4	0
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 10240)	2	1	21	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	1
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 607)	15	15	10	6	1
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	(
<i>Sclerotinia aeruginosa</i> (ATCC 25619)	9	10	21	4	(
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	0



Tabela 1 – Ensaio microbiológico por difusão em ágar (cont.)

Organismo	Meio de cultura a ser usado (conforme 3. Meios de Cultura)		Volume (ml) de meio a ser aplicado nas camadas		Vol. in ml.
	Base	Superfície	Base	Superfície	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	10	4	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	5	5	21	4	
<i>Staphylococcus luteus</i> (ATCC 9341)	11	11	21	4	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	2	1	21	4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	
<i>Aspergillus gypseum</i> (ATCC 14683)	20	21	6	4	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	8	8	10	4	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538 P)	11	11	21	4	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)		19		8	

**Tabela 1 – Ensaio microbiológico por difusão em ágar (cont.)**

Organismo	Meio de cultura a ser usado (conforme 3. Meios de Cultura)		Volume (ml) de meio a ser aplicado nas camadas		Volume inoculado (ml/l)
	Base	Superfície	Base	Superfície	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	2	1	21	4	4
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P)	2	1	21	4	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	2
<i>Pseudomonas bronchiseptica</i> (ATCC 4617)	9	10	21	4	0
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	2	2	21	4	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P)	2	2	21	4	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	11	11	21	4	0
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	8	8	10	4	(

ocasião do ensaio, através de difusão em placas.

**Procedimento**

Empregar, no ensaio, pelo menos seis placas de Petri. Disponibilizar as soluções, em cada placa, de tal forma que as soluções do material de referência e as da amostra estejam alternadas na camada inoculada e que não estejam adjacentes à concentração mais alta do padrão e da amostra para evitar a sobreposição das zonas. Aplicar as soluções nos cilindros por meio de pipeta que libere volume uniforme de líquido. Quando for usado o sistema de poços, o volume de líquido aplicado deve ser suficiente para enchê-los completamente, e quando forem usados moldes de aço inoxidável, adicionar volume de 0,2 ml.

Incubar as placas na temperatura indicada, que não deverá ter variação superior a  $\pm 0,5$  °C, durante período de 16 a 18 horas. Em seguida, medir o diâmetro das zonas de inibição; empregar dispositivo adequado para medida, como paquímetro, régua milimetrada ou projetor óptico.

Para alguns microrganismos, o procedimento pode ser melhorado se as placas preparadas permanecerem à temperatura ambiente por período de 30 minutos a 2 horas, durante o qual ocorre a difusão do antibiótico para o meio.

**Cálculo da Potência**

A partir dos resultados, calcular a potência da substância que está sendo examinada e seus limites de confiança, através de método estatístico padrão, descrito na seção VI.5.

**V.5.2.17.2. - ENSAIO MICROBIOLÓGICO POR TURBIDIMETRIA**

Inocular o meio de cultura recomendado para o ensaio com quantidade conhecida do microrganismo sensível ao antibiótico, de modo que, após incubação de aproximadamente quatro horas, a turbidez bacteriana no meio seja de fácil medida e mantenha correlação entre a dose e a resposta da substância em análise.

A seguir, descrever-se-ão os antibióticos a serem ensaiados pelo método turbidimétrico (Tabela III), com microrganismo, meio de cultura, volume de inóculo padronizado sugerido como referência inicial e temperatura de incubação para cada caso.

**Preparação da Solução de Trabalho e da Curva Padrão**

Para assegurar a validade do ensaio a ser executado, empregar pelo menos três doses\* da preparação padrão e da substância que está sendo examinada, as quais devem ter, presumidamente, a

mesma concentração que as soluções do padrão de potência conhecidas. As doses usadas devem estar em progressão logarítmica.

A preparação das amostras dos antibióticos está indicada na respectiva monografia.

A Tabela IV, apresentada a seguir, indica, para cada antibiótico, a preparação da solução padrão de trabalho e da curva padrão, compreendendo:

- a) condições de dessecação, conforme *Dessecação de substâncias antibióticas*;
- b) solvente inicial para dissolução do antibiótico, caso seja necessário, e até qual concentração é usado;
- c) solução para diluição do antibiótico até a concentração de trabalho, conforme *Soluções*;
- d) concentração de solução de trabalho, expressa em peso ou Unidades Internacionais por ml de solução;
- e) prazo de validade da solução padrão de trabalho sob refrigeração;
- f) solução empregada para diluição da solução de trabalho, na ocasião da preparação da curva padrão, conforme *Soluções*;
- g) faixa de concentração, em peso ou Unidades Internacionais por ml, dentro da qual as concentrações adequadas para a curva padrão podem ser encontradas.

A concentração de referência do ensaio é a dose do meio ou a dose central da curva padrão.

**Procedimento**

Empregar para cada antibiótico o microrganismo e o caldo nutritivo já relacionados. Determinar experimentalmente o volume de inóculo a ser adicionado a 100 ml de caldo a partir da quantidade sugerida como referência inicial. O meio inoculado deve ser preparado e utilizado imediatamente.

Distribuir, em tubos idênticos, volume igual de cada uma das soluções do padrão e da amostra; adicionar para cada tubo volume igual de caldo nutriente inoculado, por exemplo, 1 ml de solução com antibiótico e 9 ml do meio (0,1 ml de solução para gramicidina e tirotricina). Pelo menos dezoito tubos são usados para ensaio por retas paralelas 3 x 3; três tubos para cada concentração do padrão e da amostra. O número de replicações por concentração em cada ensaio deve ser suficiente para assegurar a precisão estatística, especificada na monografia. Incubar, em banho-maria, à temperatura adequada, por 3 a 4 horas, tomando a precaução de assegurar temperatura uniforme e tempo de incubação idêntico para todos os tubos. O tempo adequado deve ser verificado pela observação do crescimento no tubo contendo a concentração de referência do ensaio. Após o período de

\* Pode ser necessário realizar o ensaio com número maior de doses do padrão e da amostra ou repeti-lo e combinar os resultados para obter a precisão requerida.

incubação, interromper a multiplicação dos microorganismos pela adição de 0,5 ml de solução de formaldeído, a 12 por cento, em cada tubo.

Determinar a absorvância para cada tubo em fotocolorímetro apropriado, no comprimento de onda de 530 nm. Padronizar o aparelho em absorvância zero através de branco contendo a mesma

quantidade de caldo nutriente e formaldeído, a 12 por cento, em cada tubo.

#### **Cálculo da Potência**

A partir dos resultados, calcular a potência da amostra e seus limites de confiança, através de método estatístico padrão descrito na seção VI.5.



**Tabela 2 – Preparação da solução padrão de trabalho e da curva padrão**

<i>Solução padrão de trabalho</i>				
<i>a.</i> <i>Concentração</i> <i>(µg/ml)</i>	<i>b.</i> <i>Solvente inicial</i>	<i>c.</i> <i>Solução para diluição</i> <i>(item 2)</i>	<i>d.</i> <i>Concentração da solução de trabalho (µg/ml)</i>	<i>e.</i> <i>Prazo de validade da solução sob refrigeração</i>
---	---	<i>Água estéril</i>	1 mg	7 dias
---	---	<i>Água estéril</i>	0,1 mg	7 dias
---	---	2	0,1 mg	14 dias
---	---	<i>Dimetilsulfóxido</i>	1 mg <sup>1</sup>	Usar no mesmo dia
---	---	<i>HCl 0,01 M</i>	100 U.I.	Usar no mesmo dia
---	---	1	1.000 U.I.	4 dias
---	---	8	2 U.I.	14 dias
---	---	2	1 mg	30 dias
---	---	1	1 mg	14 dias
---	---	1	1 mg	7 dias
---	---	1	1 mg	Usar no mesmo dia
---	---	1	1 mg	7 dias
---	---	1	1 mg	5 dias
---	---	<i>Água estéril</i>	100 µg	7 dias
---	---	1	1 mg	5 dias
---	---	1	1 mg	3 dias
10.000 µg por ml na solução 4	---	1	1 mg	5 dias
---	---	1	1 mg	Usar no mesmo dia
---	---	<i>Água estéril</i>	1 mg	1 dia
---	---	1	1 mg	5 dias
---	---	<i>Água estéril</i>	1 mg	30 dias
---	---	<i>Água estéril</i>	1 mg	30 dias
10.000 µg por ml em álcool etílico	---	1	1 mg	30 dias
---	---	1	1 mg	7 dias
10.000 µg por ml em álcool etílico	---	4	1 mg	14 dias

Tabela 2 – Preparação da solução padrão de trabalho e da curva padrão (cont.)

		Solução padrão de trabalho				
		a.	b.	c.	d.	e.
		Condições de dessecação (item 5)	Solvente inicial	Solução para diluição (item 2)	Concentração da solução de trabalho (µg/ml)	Prazo de validade da solução sob refrigeração
		1	10.000 µg por ml em álcool metílico	2	1 mg	90 dias
na		8	---	1	1 mg	7 dias
		5	---	2	1 mg	30 dias
		1	10.000 µg por ml em álcool metílico	2	1 mg	14 dias
		1	---	2	1 mg	30 dias
		8	---	Água estéril	1.000 U.I.	7 dias
na		8	---	1	100 U.I.	4 dias
		3	---	2	1 mg	30 dias
		8	---	Dimetilformamida	1 mg <sup>4</sup>	90 dias
		8	---	1	1 mg	14 dias
		1	---	2	1 mg	14 dias
		1	---	2	1 mg	14 dias
		4	---	Dimetilformamida	1.000 U.I. <sup>2</sup>	Usar no mesmo
		5	10.000 µg por ml em álcool etílico	2	1 mg	5 dias
		8	---	1	1 mg	3 dias
		1	---	2	1 mg	21 dias
		1	Água estéril <sup>3</sup>	4	10.000 U.I.	14 dias
		8	---	Álcool metílico	1 mg	1 dia
		8	---	2	1 mg	14 dias
		1	---	Água estéril	1 mg	7 dias

Solução de trabalho com dimetilsulfóxido, para obter concentrações entre 10 e 40 µg por ml conforme os pontos da curva padrão.  
 Solução de trabalho com dimetilformamida, para obter concentrações entre 10 e 40 unidades por ml conforme os pontos da curva padrão.  
 Solução de trabalho com dimetilformamida, para obter concentrações entre 40 e 200 µg por ml conforme os pontos da curva padrão.

eritromicina sob a forma de estolato, hidrolisar a solução de trabalho, em banho-maria, a 60 °C, durante 2 horas.

Óptica, tomar precauções durante a pesagem. O padrão de trabalho deve permanecer a -20 °C, em atmosfera de nitrogênio.

temente as soluções do padrão e amostra.

O trabalho deve permanecer durante uma noite à temperatura ambiente para completa dissolução.

**Tabela 3 – Ensaio microbiológico por turbidimetria**

<i>Microorganismo</i>	<i>Caldo nutriente (item 3. Meios de cultura)</i>	<i>Volume de inóculo ml /100 ml</i>
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,2
<i>Saccharomyces cerevisiae (ATCC 9763)</i>	13	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)</i>	3	0,05
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,4
<i>Escherichia coli (ATCC 10536)</i>	3	0,7
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Escherichia coli (ATCC 10536)</i>	3	0,1
<i>Klebsiella pneumoniae (ATCC 10031)</i>	3	0,1
<i>Streptococcus faecium (ATCC 10541)</i>	3	1,0
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,2
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,1
<i>Streptococcus faecium (ATCC 10541)</i>	3	1,0
<i>Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)</i>	3	0,15

pamento estéril em todos os estágios.

Tabela 4 – Preparação da solução padrão e da curva padrão – Método turbidimétrico

Solução Padrão de Trabalho				
	b.	c.	d.	e.
	Solvente inicial	Solução para diluição (item 2)	Concentração da solução de trabalho (/ml)	Prazo de validade da solução sob refrigeração
	---	Água estéril	1 mg	14 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	---	Dimetilsulfóxido	1 mg	Usar no mesmo dia
	---	Água estéril	1 mg	7 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	10.000 µg por ml em álcool etílico	1	1 mg	30 dias
	---	HCl 0,01 M	1 mg	4 dias
	---	HCl 0,1 M	1 mg	4 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	---	HCl 0,1 M	1 mg	5 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	---	Álcool etílico 95%	1 mg	30 dias
	---	Água estéril	1 mg	30 dias
	---	HCl 0,1 M	1 mg	2 dias
	---	HCl 0,1 M	1 mg	4 dias
	---	Água estéril	1 mg	1 dia
	---	HCl 0,1 M	1 mg	1 dia
	---	Álcool etílico 95%	1 mg	30 dias
	---	Água estéril	1 mg	14 dias

comentário estéril em todas as etapas.

solução padrão de trabalho e a curva dose-resposta da gramicidina.

padrão e amostras.

**VI. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS  
APLICÁVEIS AOS ENSAIOS BIOLÓGICOS**

## VI.1. GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

Todos os logaritmos desta secção são em base 10.

SÍMBOLO	DEFINIÇÃO		
$\bar{y}_p \dots \bar{y}_z$			médias das respostas para as preparações padrão e amostra
$A \dots Z$			amostras ensaiadas
$a_1 \dots z_1$	doses das preparações ensaiadas (amostras) $A \dots Z$	$A \dots Z$	soma das respostas para as amostras $A \dots Z$
b	estimativa da inclinação da linha de regressão da resposta em relação ao logaritmo da dose baseada em todas as preparações do ensaio	$A_1, A_2, A_3$	soma das respostas para as doses menor, média e maior da amostra $A$ . Para um ensaio com dois níveis de doses, $A_2$ representa a resposta para dose maior. Similarmente para outras amostras ensaiadas
bl	número de blocos (animais) num ensaio cruzado		
c'	constante usada na avaliação dos limites de confiança (Tabela 15)	$B_1 \dots B_{2n}$	soma das respostas para cada sujeito (1 a 2n) em ensaio duplo cruzado
d	número de níveis de doses para cada preparação num ensaio balanceado	$B'$	total incompleto das respostas em fila ou bloco que tem um valor perdido.
gl	graus de liberdade	C	estatístico usado no cálculo dos limites de confiança (Fórmula 14)
h	número de preparações em um ensaio, incluindo a preparação padrão		Mede a precisão da inclinação
k	número de tratamentos diferentes dentro de um ensaio $k = dh$	$C_1 \dots C_n$	soma de respostas em cada coluna (1 a n) em delineamento quadrado latino
n	número de réplicas para cada tratamento	$C'$	soma incompleta das respostas em uma coluna de delineamento em quadrado latino com um valor perdido
n'	número de estimativas individuais da potência		
p	probabilidade	$\chi^2$	constante estatística da Tabela 18
$P_1 P_2 P_3$	doses menor, média e maior da preparação padrão $P$ ; em ensaios com somente dois níveis de doses, $p_2$ representa a dose maior	$\chi^2_M$	constante estatística para testar homogeneidade de estimativas individuais de logaritmo da potência
$s^2$	estimativa da variância fornecida pelo quadrado médio do erro na análise da variância. Também usado com uma letra índice; por exemplo, $s_M^2$ representa a variância do log potência M	E	soma de quadrados para regressão (Tabela 10)
s	estimativa do desvio padrão, ou seja, a raiz quadrada de $s^2$	F	razão de duas estimativas da variância independentes (Tabelas 4 e 5)
t	estatístico de Student (Tabela 3)	$F_I, F_{II}$	soma das respostas na fase I ou fase II num ensaio cruzado
t'	estatístico de Dunnett (Tabela 12)	$F_1 \dots F_n$	soma das respostas em cada uma das filas 1 a n em delineamento de quadrado latino, ou em cada bloco de um delineamento em blocos ao acaso
v	variância para heterogeneidade entre ensaios	$G_1, G_2, G_3$	estatístico utilizado no teste de valores aberrantes
w	coeficiente de ponderação	$G'$	total incompleto das respostas em um ensaio com exclusão do valor perdido
x	log dose — também usado com índice para indicar uma preparação particular	I	intervalo entre log doses consecutivas
$\bar{x}$	média dos log dose	K	termo de correção usado na análise da variância $K = (\Sigma y)^2 / N$
y	resposta individual ou resposta individual transformada	L	intervalo de confiança em logaritmos
y'	resposta calculada para substituir um valor perdido		

$L_c$	intervalo de confiança em logaritmos para média semi-ponderada		ração padrão $P$ . Para ensaio de somente dois níveis de dosagem, $P_2$ representa as respostas para a dose maior
$L_p \dots L_z$	contrastes lineares para as preparações padrão e amostra (Tabelas 8 e 9)	$Q$	soma de quadrados quadrática. A partir da análise da variância (Tabelas 9 e 10)
$M$	estimativa do log da potência ou do log da razão de potência usada com uma letra índice em um ensaio múltiplo, para denotar uma preparação particular ( $M = \log R$ )	$Q_p \dots Q_z$	contraste quadrático para as preparações padrão e amostra (Tabela 9)
$M_i, M_s$	limites de confiança da estimativa do log da potência	$R$	estimativa da potência da amostra
$\bar{M}$	média de várias estimativas independentes de $M$	$R_i, R_s$	limites de confiança inferior e superior da estimativa de potência
$M'$	estimativa do log da potência da amostra $A$ ou do log da razão de potências antes de corrigir pela potência suposta ( $M' = \log R'$ )	$R'$	estimativa da razão de potências antes da correção pela potência suposta ( $R' = \text{antilog } M'$ )
$M'_s, M'_i$	limites superior e inferior da estimativa do log potência, antes de corrigir pela potência suposta	$R+$	constante específica para testar valores aberrantes (Tabela 2)
$N$	número total de respostas no ensaio	$S_A$	potência suposta para a amostra $A$ , quando se preparam as doses
$N_p, N_A$	número total de respostas para as preparações $P$ e $A$	$T'$	total incompleto das respostas para um tratamento excluindo o valor perdido
$P$	preparação padrão	$V = 1/W$	variância do logaritmo de potência individual
$P$	soma das respostas para a preparação padrão	$W$	ponderação estatística usada na combinação de várias estimativas, independentes do log potência
$P_1, P_2, P_3$	soma das respostas para as doses inferior, média e superior da prepa-	$W'$	semi-ponderação de cada logaritmo de potência numa série de ensaios

## VII.2. FUNDAMENTOS

### *Ensaios biológicos*

São procedimentos destinados a avaliar a potência de princípios ativos contidos nas matérias-primas e preparações farmacopéicas, utilizando reagentes biológicos tais como microrganismos, animais, fluidos e órgãos isolados de animais. A característica dos reativos biológicos é sua variabilidade. Enquanto os reativos físico-químicos podem ser definidos e padronizados para fornecerem resultados idênticos em todos os laboratórios, é impossível definir totalmente os reagentes biológicos, apesar dos esforços de entidades internacionais neste sentido. Essa variabilidade inerente aos reativos biológicos torna imprescindível: 1) o emprego de padrões de referência adequados para se obter potências relativas e 2) o emprego de métodos estatísticos para os delineamentos experimentais e análise dos resultados.

### *Delineamentos experimentais*

O delineamento de um ensaio compreende: a) seleção do conjunto de doses do padrão ( $P$ ) e das amostras do desconhecido ( $A$ ) que serão ensaiados; b) especificação das unidades experimentais (animais, microrganismos, anti-soros, sangue etc.); c) regras pelas quais se distribuirão as doses para as unidades experimentais; d) especificações das medidas ou outros registros que devam ser procedidos em cada unidade experimental. O melhor delineamento experimental é aquele que produz a informação desejada com a maior eficiência.

Por dificuldades práticas, pode ser impossível alcançar este objetivo. Portanto, para cada ensaio podem-se empregar diferentes delineamentos experimentais, de acordo com a disponibilidade de pessoal, reagentes e tempo. Todos os delineamentos que forneçam ensaios válidos e de precisão adequada, como resultado final, são cientificamente aceitáveis. Além disso, devem compreender algum sistema que assegure distribuição ao acaso das unidades experimentais para as diversas doses utilizadas.

### *Acaso e vício*

Deve-se fazer distribuição ao acaso utilizando aparelho empregado em jogos de azar ou tabela de

números aleatórios. Convém assinalar que este procedimento não elimina todos os vícios. Por exemplo, por efeito do acaso, os animais de maior peso poderão ser destinados a determinada dose e esta diferença de pesos viciará os resultados. Portanto, deverá ser criado o equilíbrio, ou seja, deve-se classificar os animais por faixa de peso e distribuir, ao acaso, aqueles de mesmo peso para todas as doses e preparações (padrão e amostra).

### *Análise estatística*

É procedimento matemático aplicado aos resultados experimentais para estimar a potência da amostra e avaliar a validade e precisão do ensaio. Os métodos de análise se relacionam com os delineamentos experimentais utilizados.

### *Resultados*

Expressar os resultados de avaliação biológica como estimativa da potência relativa ( $R$ ), que será a melhor expressão da verdadeira potência relativa ( $\rho$ ), impossível de ser calculada com certeza, devido à variabilidade dos reativos biológicos. Tal estimativa da potência relativa deve ser acompanhada por limites de confiança inferior e superior ( $R_i$ ,  $R_s$ ). Estes limites definem o intervalo de modo que seja pré-determinada a probabilidade ( $p$ ) de a verdadeira potência relativa ( $\rho$ ) estar fora deste intervalo. As probabilidades de erro mais utilizadas nos ensaios biológicos são  $p = 5\%$  e  $p = 1\%$ , também expressas como  $p = 0,05$  e  $p = 0,01$ . As monografias estabelecem especificações para a amplitude aceitável desses intervalos em relação à potência estimada. Estas especificações levam em conta a dificuldade dos métodos e a necessidade prática de se estimar a verdadeira potência com determinada precisão. Nos casos não especificados explicitamente entender-se-á que a probabilidade de erro utilizada no cálculo dos limites é  $p = 0,05$ . Para alcançar os limites de confiança especificados deve-se, às vezes, realizar mais de um ensaio. Para se obter uma estimativa da potência com intervalo de confiança reduzido, deve-se combinar estatisticamente os resultados destes ensaios independentes.

Os procedimentos de cálculo são planejados para o ensaio de amostra única. No caso de serem ensaiadas várias amostras simultaneamente, empregar as modificações descritas neste volume.



### VI.3. VALORES ABERRANTES

Todas as respostas obtidas sem obedecer estritamente o protocolo pré-estabelecido devem ser eliminadas. Quando, após tabular as demais respostas, se observarem valores aparentemente aberrantes, a decisão de mantê-los ou eliminá-los deve basear-se em critérios estatísticos, como os descritos a seguir:

19) **Crítério baseado na variação dentro de um único grupo de respostas supostamente equivalentes.** Em média, para relativamente poucas respostas idênticas dentro do grupo, serão desprezadas observações válidas em 2 ou 4% das provas. Começando com o valor supostamente aberrante, indicar as respostas em ordem de magnitude de  $y_1$  a  $y_N$ , onde  $N$  representa o número de observações no grupo. Calcular

$$G_1 = (y_2 - y_1) / (y_N - y_1), \text{ quando } N = 3 \text{ a } 7$$

$$G_2 = (y_3 - y_1) / (y_{N-1} - y_1), \text{ quando } N = 8 \text{ a } 13 \text{ ou}$$

$$G_3 = (y_3 - y_1) / (y_{N-2} - y_1), \text{ quando } N = 14 \text{ a } 24$$

Se  $G_1$ ,  $G_2$  ou  $G_3$  excedem o valor crítico dado pela Tabela 1 para o valor correspondente de  $N$ ,

existe base estatística para a eliminação do valor suspeito.

20) **Crítério que contempla a amplitude de uma série  $K = 2$  ou mais grupos de igual tamanho.** Os grupos podem receber diferentes tratamentos; porém, todas as  $n$  respostas dentro de cada grupo decorrem do mesmo tratamento. Calcular os intervalos em cada um dos  $k$  grupos, subtraindo a resposta menor da maior. Dividir o maior dos  $k$  intervalos pela soma de todos eles. Comparar este valor ( $R+$ ) com a Tabela 2. Se  $k$  for menor ou igual a 10, usar os valores tabulados na parte superior da tabela; se maior, multiplicar  $R+$  por  $(k + 2)$  e interpolar, se necessário, entre os valores tabulados na parte inferior da mesma. Se  $R+$  exceder o valor tabulado ou interpolado, o grupo com intervalo maior é suspeito ( $p = 0,05$ ) e a observação de seus dados permitirá identificar o valor que, então, se considera aberrante. O procedimento pode ser repetido com os demais intervalos se houver suspeita de valor aberrante em um segundo grupo.

## VI.4. ENSAIOS DIRETOS

Mede-se diretamente as doses de cada preparação (padrão e amostra) necessárias para produzir respostas pré-determinadas em cada unidade experimental de dois grupos equivalentes de animais ou outros reativos biológicos. Exemplo típico é o ensaio biológico de digital. Preparar as soluções do padrão e amostra de modo que contenham aproximadamente a mesma potência, levando em consideração a atividade declarada da amostra ou a estimada em ensaios prévios ( $S_A$ ). Transformar cada resultado (dose eficaz) em logaritmos ( $x$ ) e calcular os valores médios dos logaritmos das doses eficazes para o padrão ( $\bar{x}_P$ ) e para a amostra ( $\bar{x}_A$ ). Calcular a potência relativa da amostra ( $R$ ), antes de ajustar pela potência suposta, como o antilogaritmo de  $M'$ , em que:

$$M' = \bar{x}_P - \bar{x}_A \quad (1)$$

Calcular a variância de  $M'$  como a soma das variâncias das duas médias, a partir da equação

$$s_{M'}^2 = s_x^2 \left( \frac{1}{N_P} + \frac{1}{N_A} \right) \quad (2)$$

em que

$$s_x^2 = \frac{\left[ \sum_P x_P^2 - \left( \sum_P x_P \right)^2 / N_P \right] + \left[ \sum_A x_A^2 - \left( \sum_A x_A \right)^2 / N_A \right]}{N_P + N_A - 2} \quad (3)$$

$N_P$  e  $N_A$  são os números de animais tratados com padrão e amostra;  $\sum_P$  e  $\sum_A$  representam somatórios dos resultados calculados para as duas preparações. Calcular os limites de confiança como:

$$R'_s = \text{antilog} (M' \pm t_{SM'})$$

Obter o valor apropriado de  $t$  na Tabela 3, de acordo com os graus de liberdade (gl) dados pelo denominador da equação (3).

Calcular a potência relativa da amostra e os limites de confiança, levando em consideração a potência suposta da amostra ( $S_A$ ) utilizada para preparar as diluições:

$$R = \text{antilog } M \quad (5)$$

em que

$$M = M' + \log S_A \quad (6)$$

com limites de confiança

$$R_s = \text{antilog} [M \pm t_{SM}] \quad (7)$$

Neste ensaio,  $s_M$  é igual a  $s_{M'}$

Para que o ensaio seja válido, a variância de  $x_P$  deve ser a mesma de  $x_A$ , diferindo somente por erros de amostragem. Para testar, calcular as variâncias e dividir a maior pela menor. Deste modo, obtém-se uma relação de variâncias ( $F$ ).

Calcular a variância de  $x_P$  do seguinte modo:

$$s_{x_P}^2 = \frac{\sum_P x_P^2 - \left( \sum_P x_P \right)^2 / N_P}{N_P - 1} \quad (8)$$

Calcular analogamente  $s_{x_A}^2$  (8a)

A distribuição da razão de variâncias ( $F$ ) encontra-se nas Tabelas 4 e 5, porém para este teste os valores da Tabela 4 correspondem a  $p = 0,10$  e os da Tabela 5 a  $p = 0,02$ . O valor  $F$  do ensaio não deve ultrapassar o valor da tabela, correspondente aos graus de liberdade do numerador e denominador com que se obteve  $F$ . Os graus de liberdade são aqueles dos denominadores das variâncias das equações (8) e (8a).

## VI.5. ENSAIOS INDIRETOS QUANTITATIVOS

### *Natureza e validade*

Em geral não é possível medir diretamente a dose eficaz. Por essa razão, a potência é determinada indiretamente, comparando as respostas produzidas em escala quantitativa, por exemplo, peso, por doses conhecidas do padrão com aquelas produzidas por uma ou mais doses de amostra.

Num intervalo restrito de doses, as respostas ou sua transformação conveniente (logaritmo, probito etc.) apresentam relação linear com o logaritmo das doses correspondentes. Usar dois ou mais níveis de doses do padrão ou, preferencialmente, do padrão e amostra para determinar a posição e a inclinação da reta. Proceder em cada ensaio desta maneira, pois, dependendo da sensibilidade dos reativos biológicos utilizados, pode variar tanto a posição quanto a inclinação da reta.

Cada tratamento consiste de uma dose fixa do padrão ( $p_1, p_2, p_3$  etc.) ou da amostra ( $a_1, a_2, a_3$  etc.) e é administrado a um certo número ( $n$ ) de unidades experimentais (animais, órgãos, culturas, tubos etc.). Registrar  $n$  respostas, ou seja, uma para cada unidade experimental. Para que os métodos apresentados neste capítulo sejam válidos, devem-se cumprir as seguintes condições:

- 1) as unidades experimentais correspondentes a cada tratamento devem ser selecionadas ao acaso;
- 2) para cada tratamento, as respostas ou a transformação das mesmas usadas no cálculo ( $y$ ) constituem amostra de distribuição normal;
- 3) o desvio padrão da resposta ou de sua transformação é independente do nível de resposta, ou seja, é igual para todos os tratamentos, só diferindo pelos erros de amostragem;
- 4) a resposta, ou sua transformação utilizada nos cálculos ( $y$ ), tem relação linear com o logaritmo da dose ( $x$ ) no intervalo de doses utilizadas;
- 5) a linha reta correspondente a uma ou mais amostras deve ser paralela à do padrão.

A partir de estudos preliminares do método de ensaio, é possível supor o cumprimento das condições 2 e 3. De posse dos resultados de cada ensaio, pode-se testar as condições 4 e 5. A condição 4 (linearidade) só pode ser verificada em

ensaio em que se aplicam pelo menos três diluições de cada preparação. Quando se realiza ensaio com somente duas diluições, presume-se que a linearidade do sistema foi previamente estabelecida. A condição 5 (paralelismo) deve ser testada em cada ensaio. Neste, nunca se devem utilizar menos de duas diluições de cada preparação.

Se não for cumprida qualquer das condições de 1 a 5, os métodos de cálculo descritos neste capítulo não são confiáveis e tornam-se necessários estudos para estabelecer as conclusões corretas.

É conveniente que a amostra seja ensaiada com doses cujas respostas sejam aproximadamente iguais àquelas obtidas com as correspondentes doses do padrão. Isto aumenta a precisão do resultado. Denominar a potência suposta para a amostra  $S_A$ .

### *Expressão de potência e restrições*

Realizados os testes de validade correspondentes e sendo satisfatórios os resultados, pode-se expressar a potência relativa de cada amostra em relação ao padrão com uma razão de potências ou converter em unidades apropriadas para cada amostra, por exemplo unidades internacionais, nacionais, unidades de peso etc. Também podem-se calcular os limites de confiança a partir do conjunto de dados obtidos no ensaio.

Para simplificar os cálculos da análise estatística apresentados neste capítulo, é necessário impor as seguintes restrições ao delineamento dos ensaios:

- a) testar cada preparação, padrão e amostra, com o mesmo número de diluições. Apresentam-se fórmulas para ensaios farmacopéicos, utilizando dois e três níveis de doses para cada preparação;
- b) manter constante em cada ensaio a razão de doses consecutivas para todos os tratamentos e
- c) obter o mesmo número de respostas para cada tratamento.

Caso alguma resposta for perdida, esta pode ser estimada pelos métodos apropriados a cada delineamento apresentado neste capítulo; e se se perder um tratamento, atender ao especificado na seção de *Ensaio parcialmente balanceados*.

## VI.5.1. TIPOS DE DELINEAMENTO

**Ao acaso**

Quando as unidades experimentais forem, na sua totalidade, razoavelmente homogêneas e não houver indicação de que a variabilidade da resposta poderá ser menor em certos subgrupos, proceder à distribuição das unidades experimentais para os diferentes tratamentos ao acaso.

Havendo possibilidade de alguns subgrupos como, por exemplo, camadas, posições em estantes ou dias de experimento, serem mais homogêneos que a totalidade das unidades, a precisão do ensaio pode ser aumentada introduzindo-se uma ou mais restrições no delineamento experimental.

**Blocos ao acaso**

Possibilita segregar uma fonte de variação tal como a sensibilidade de diferentes ninhadas de animais ou a variação entre as placas de Petri no ensaio microbiológico por difusão. Este planejamento obriga que cada tratamento seja aplicado uma vez em cada bloco (ninhada, placa etc.) e só pode ser realizado quando o bloco for suficientemente grande para acomodar todos os tratamentos.

**Cruzado**

Utilizar este planejamento quando o experimento puder ser dividido em blocos. Contudo, só é possível aplicar dois tratamentos por bloco. Por exemplo, um bloco pode ser um animal possível de ser testado em duas ocasiões diferentes. Tem como objetivo aumentar a precisão, eliminando a influência da variação dos animais, ao mesmo tempo que se equilibram os efeitos de qualquer diferença entre os níveis gerais de resposta, nas duas etapas do ensaio. Denominar

*duplo cruzado* o ensaio com duas doses do padrão e da amostra, e *triplo cruzado* aquele de três doses de cada preparação. Proceder o ensaio em duas fases conforme o período de tempo definido no método. Dividir os animais em quatro ou seis grupos e realizar um tratamento em cada grupo na primeira fase. Na segunda fase, os animais que receberam uma preparação receberão outra; os animais que receberam doses menores, nesta etapa receberão as maiores. Seguir o esquema da Tabela 6.

**Quadrado latino**

Adequado quando a resposta pode ser afetada por duas fontes de variação, cada qual podendo ter  $k$  níveis diferentes. Por exemplo, se se realiza o experimento em  $k$  dias diferentes e por  $k$  experimentadores, ou se realiza um ensaio de antibióticos por difusão em placa, no qual os tratamentos podem ser aplicados num esquema de  $k \cdot k$ , onde cada tratamento só ocorre uma vez em cada fila e em cada coluna. Utilizar somente quando o número de colunas, filas e tratamentos for igual.

As respostas são registradas em forma de um quadrado denominado latino. Existem muitas possibilidades de quadrados latinos encontradas na literatura especializada. A partir de um podem-se confeccionar outros, alternando ao acaso filas e/ou colunas. A Tabela 7 apresenta exemplo de quadrado latino com duas doses do padrão e da amostra.

Para qualquer delineamento, a distribuição das unidades experimentais nos blocos deve ser feita por procedimento ao acaso, sendo as unidades mantidas o mais uniformemente possível antes e durante o experimento.

## VI.5.2. ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Tem por objetivo estudar a validade do ensaio e calcular o erro residual. Com exceção do cálculo do erro residual, a análise dos dados de um ensaio é idêntica para os delineamentos ao acaso, blocos ao acaso e quadrado latino. A seguir, serão descritas as fórmulas para a análise de cada tipo de ensaio. Consultar o glossário de símbolos. As fórmulas são apropriadas para o caso em que se esteja comparando uma única amostra ( $A$ ) contra o padrão de referência ( $P$ ), como também para o caso de ensaios múltiplos onde estejam incluídas  $h-1$  amostras ( $A \dots Z$ ). As fórmulas para os ensaios cruzados não se enquadram no esquema geral e serão apresentadas separadamente.

Se necessário, transformar as respostas ( $y$ ) para cumprir as condições de validade descritas. Somar todos os valores  $y$  para cada tratamento e para cada preparação, como se observa nas Tabelas 8 e 9. A partir destes dados, obter os contrastes lineares relacionados com as inclinações das linhas dose-resposta.

Quando são ensaiadas três doses de cada preparação se obtêm também contrastes quadráticos,

que representam a curvatura das linhas. Ver fórmulas nas Tabelas 8 e 9.

A variação total de respostas decorrente dos diferentes tratamentos pode ser dividida como se mostra na Tabela 10. As somas de quadrados são obtidas a partir dos valores das Tabelas 8 ou 9.  $K$  representa o quadrado da soma de todas as respostas obtidas no ensaio dividido pelo número total das mesmas:

$$K = \{(\Sigma y)^2/N\}$$

Calcular o erro residual do ensaio subtraindo as variações controladas no delineamento da variação total nas respostas (Tabela 11). Nesta tabela,  $\Sigma y^2$  representa a soma dos quadrados de todas as respostas registradas no ensaio. Convém assinalar que a soma de quadrados reduzida correspondente ao item tratamentos é igual ao somatório das somas de quadrados reduzidas da Tabela 10 e que, para o quadrado latino, o número de respostas replicadas ( $n$ ) é igual ao número de filas, colunas ou tratamentos ( $k$ ).

## VI.5.3. TESTES DE VALIDADE

Para ensaiar a significância das fontes de variação relacionadas na Tabela 10, cada soma de quadrados reduzida obtida na tabela deve ser dividida pelo número correspondente de graus de liberdade para se obter os quadrados médios. O quadrado médio do erro residual ( $s^2$ ) é quociente similar, obtido da linha apropriada na Tabela 11.

Para obter a razão conhecida como F, dividir o quadrado médio de cada fonte de variação a ser testada por  $s^2$ . Calcular a significância de cada fonte, utilizando as Tabelas 4 e 5, em que se encontram valores de F críticos para probabilidade de erro de 5% ( $p = 0,05$ ) e 1% ( $p = 0,01$ ). Os valores de F críticos são obtidos na coluna correspondente ao número de graus de liberdade associado ao quadrado médio da fonte ensaiada ( $gl_1$ ) e na fila da tabela correspondente ao número de graus de liberdade associado com  $s^2$  ( $gl_2$ ). Se o valor de F calculado for maior que o valor tabulado, a fonte de variação ensaiada é considerada "significativa" para o nível de probabilidade utilizada.

Considerar os ensaios "estatisticamente válidos" se os testes apresentarem os seguintes resultados:

1) **Regressão significativa**, ou seja, F calculado maior que o tabulado para uma probabilidade  $p = 0,01$ . Indica que a inclinação da linha dose-resposta é satisfatória;

2) **Termos quadráticos não significativos**, ou seja, os valores de F calculados devem ser menores que aqueles tabulados para  $p = 0,05$ . Equivale a satisfazer a condição de linearidade da relação entre a transformação da resposta utilizada e o logaritmo da dose;

3) **Paralelismo não significativo**. Caso se estejam ensaiando várias amostras simultaneamente e se obtenha um desvio significativo do paralelismo, isto pode ser devido à utilização de alguma preparação que forneceu linha dose-resposta com uma inclinação diferente em relação às outras amostras. Neste caso, calcular o valor de  $t'$  para cada preparação A...Z, usando a equação

$$t' = \frac{L_p - L_A}{2 s \sqrt{n}} \quad (9)$$

Cada  $t'$  calculado deve ser comparado com o valor da Tabela 12, onde  $gl_1 = h - 1$  e  $gl_2$  é igual ao número de graus de liberdade associado com  $s^2$ . Se encontrar valor de  $t'$  "significativo" para alguma amostra, todos os dados relativos a esta preparação

devem ser eliminados do ensaio e a análise repetida desde o início.

Em ensaios com erro residual muito grande, uma razão F "significativa" para o termo preparações pode indicar que a suposição de potência que serviu de base para a preparação das diluições não foi correta. Isto não é condição de invalidez. Chegando-se a essa conclusão, a potência estimada no ensaio pode ser usada como potência suposta em ensaios posteriores.

Nos testes de paralelismo e quadráticos podem ocorrer por acaso valores de F muito baixos, menores que 1. Se isto acontecer repetidamente, pode ser indicação de que não se cumpriram as condições supostas, o que deve ser investigado mais profundamente.

No caso de *ensaios cruzados*, com esquema de cálculo especial, as fórmulas a utilizar encontram-se nas Tabelas 13 e 14.

Existem três termos de interações devidos às réplicas dentro de cada grupo: fases x preparações, fases x regressão e fases x paralelismo.

Como nos delineamentos anteriormente discutidos, cada soma de quadrados reduzida deve ser dividida pelo número correspondente de graus de liberdade para se obter os quadrados médios. No caso do delineamento duplo cruzado, obtêm-se dois quadrados médios correspondentes aos erros I e II, que se denominam  $s^2_I$  e  $s^2_{II}$ . Dividir o

quadrado médio de cada fonte de variação pelo  $s^2$  apropriado para se obter a razão F.

Para as fontes paralelismo, fases x preparações, fases x regressão, utiliza-se  $s^2_I$ . Para as outras fontes, utiliza-se  $s^2_{II}$ .

Calcular a significância da fonte utilizando as Tabelas 4 e 5. Se o F calculado for maior que o valor tabulado, para os graus de liberdade da fonte ensaiada ( $gl_1$ ) e do  $s^2$  correspondente ( $gl_2$ ), a fonte de variação é considerada "significativa" para o nível de probabilidade utilizada ( $p = 0,05$  ou  $p = 0,01$ ).

Para que o ensaio seja válido, a regressão deve ser significativa e o paralelismo e as três interações não devem ser significativas.

No ensaio cruzado, o teste de paralelismo não é muito sensível, pois depende da variação entre blocos (animais).

Estabelecida a validade estatística dos ensaios feitos com qualquer delineamento, calcular a potência e os limites de confiança pelos métodos descritos a seguir.

## VI.5.4. ESTIMATIVA DA POTÊNCIA E LIMITES DE CONFIANÇA

Calcular primeiro a resposta média para cada preparação ( $\bar{y}_p, \bar{y}_A \dots \bar{y}_Z$ )

$$\bar{y}_p = \frac{P}{N_p} \quad (10)$$

e analogamente para outras preparações.

Chamando I o intervalo entre log dose consecutiva de cada preparação nos ensaios com duas doses de cada preparação obtém-se a inclinação comum (b), a partir da equação

$$b = \frac{L_p + L_A + \dots + L_Z}{Inh} \quad (11)$$

Para ensaios com três doses de cada preparação, o denominador  $Inh$  deve ser substituído por  $2Inh$ .

O logaritmo da razão de potências da amostra A ( $M'_A$ ), antes de corrigir pelo valor de  $S_A$ , é

$$M'_A = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_p}{b} \quad (12)$$

A potência calculada é estimativa da verdadeira potência de cada amostra. Os limites de confiança (com 5% de probabilidade de excluir a verdadeira potência) podem ser calculados como o antilogaritmo da fórmula

$$M'_{A_s} = CM'_A \pm \frac{ts\sqrt{C}}{b} \sqrt{\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_A} + \frac{(\bar{y}_p - \bar{y}_A)^2}{E - s^2 t^2}} \quad (13)$$

em que

$$C = E/(E - s^2 t^2) \quad (14)$$

Obter E da Tabela 10. O  $s^2$  é o erro residual da Tabela 11 dividido por seus graus de liberdade e t se encontra na Tabela 3 de acordo com os graus de liberdade de  $s^2$ .

Para ensaios balanceados de 2 e 3 doses por preparação, a fórmula para os limites da equação 13 pode simplificar-se:

$$M'_{A_s} = CM'_A \pm \sqrt{(C-1)(CM'_A)^2 + c^2 t^2} \quad (15)$$

em que  $c'$  é coeficiente obtido na Tabela 15 e C, medida da significância da regressão. Em ensaio com inclinação bem definida o valor de C estará muito próximo da unidade.

Obter a razão de potência ( $R_A$ ) e os limites de confiança ( $R_s, R_i$ ) tomando os antilogaritmos dos valores obtidos a partir das fórmulas 12 e 15, após somar log  $S_A$  a ambos:

$$M_A = M'_A + \log S_A \quad (16)$$

$$R_A = \text{antilog } M_A \quad (17)$$

$$M_{A_s} = M'_A + \log S_A \quad (18)$$

$$M_{A_i} = M'_{A_i} + \log S_A \quad (19)$$

$$R_{A_s} = \text{antilog } M_{A_s} \quad R_{A_i} = \text{antilog } M_{A_i}$$

Valores perdidos:

Em ensaio balanceado requer-se o mesmo número de observações em cada total. Se alguma resposta for perdida por causa não relacionada com os tratamentos aplicados, com a morte de um animal ou a quebra de algum tubo de ensaio, a análise estatística torna-se muito mais complexa. Pode-se restabelecer o equilíbrio de dois modos:

1) Reduzir o número de observações nos grupos maiores até que o número de respostas seja o mesmo para cada tratamento. Se o delineamento for totalmente ao acaso, pode-se subtrair a média de cada grupo maior, tantas vezes quantas forem necessárias, ou eliminar uma ou mais respostas de cada grupo maior, selecionando-as ao acaso. Para ensaio de blocos ao acaso, conservar somente os blocos completos;

2) Alternativamente, um grupo casualmente menor pode ser recomposto no tamanho original, quando o número de respostas perdidas não for maior que um em qualquer tratamento ou 5% no total do ensaio. Neste caso, calcular a substituição do valor perdido. *Perde-se um grau de liberdade na variância do erro  $s^2$  para cada valor substituído.*

a) Se o delineamento é totalmente ao acaso, substituir o valor perdido pela média das respostas restantes do grupo incompleto;

b) Se o delineamento é de blocos ao acaso, substituir o valor perdido aplicando a fórmula

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)} \quad (20)$$

em que  $B'$  é o total incompleto das respostas no bloco que contém o valor perdido,  $T'$  é o correspondente total incompleto do tratamento que tem o valor perdido,  $G'$  é a soma de todas as respostas registradas no ensaio. Como se definiu anteriormente,  $n$  é o número de blocos e  $k$  é o número de tratamentos ou doses;

c) Se o ensaio estiver baseado em delineamento de quadrado latino, o valor perdido ( $y'$ ) se obtém da equação

$$y' = \frac{k(B' + C' + T') - 2G'}{(k-1)(k-2)} \quad (21)$$

em que  $B'$  e  $C'$  são as somas das respostas nas filas e colunas, respectivamente, que contém o valor perdido. Neste caso,  $k = n$ .

Se houver perda de mais do que um valor, substituir temporariamente, pela média do tratamento respectivo, todos os lugares vazios, exceto um. Completar este lugar com o valor  $y'$ , calculado pela equação 21. Substituir um por um os valores que haviam sido colocados temporariamente; usando o valor calculado com a equação 21. O processo se repete desde o início (2º ciclo) e assim sucessivamente, até se obter, em dois ciclos consecutivos de cálculo, conjunto estável de valores  $y'$  para todas as observações perdidas.

Se o número de valores substituídos for pequeno em relação ao número total de observações do ensaio (menor que 5%), a aproximação decorrente das substituições descritas e da redução dos graus de liberdade, equivalente ao número de valores substituídos, é geralmente satisfatória. Porém, a análise deve ser interpretada com cuidado, sobretudo se existe predominância de valores perdidos em um tratamento ou bloco particular. O mesmo é válido para o caso de valores perdidos nos planejamentos cruzados.

#### Ensaio parcialmente balanceados

Se a potência presumida das amostras (usada para calcular as doses de ensaio) for muito diferente da verdadeira potência, é possível que a dose maior forneça resposta máxima ou que a dose menor forneça resposta muito baixa ou nula. Estas respostas estarão fora da zona linear da curva log dose-resposta e os testes de validade indicarão curvatura e/ou desvio de paralelismo "significativo".

Neste caso, as respostas à dose maior ou menor da amostra podem ser desprezadas, calculando-se um valor de potência relativa a partir dos dados remanescentes. Esta potência pode ser tomada como potência suposta para selecionar doses de amostra para outro ensaio, com o objetivo de se obterem respostas similares ao padrão e, deste

modo, aumentar a precisão do resultado. A equação que se emprega para calcular a potência é:

$$M'_A = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_P}{b} \pm 1/2 \quad (22)$$

Esta fórmula é similar à fórmula 12, porém subtrai-se a metade do intervalo log-dose quando se omitirem as respostas da dose menor e adiciona-se o mesmo intervalo quando se desprezar a dose maior.

As respostas médias  $\bar{y}_A$  e  $\bar{y}_P$  são obtidas da mesma forma que nos ensaios totalmente balanceados (fórmula 10), porém deve-se introduzir modificação no cálculo da inclinação (b) de acordo com o delineamento do ensaio.

Para ensaios múltiplos, que originariamente teriam duas doses de cada preparação, os contrastes lineares ( $L_P \dots L_Z$ ) devem se formar excluindo  $L_A$  (como as respostas para  $a_1$  ou  $a_2$  foram eliminadas, não é possível formar um contraste  $L_A$ ). Calcular a inclinação a partir da média dos valores de L dividida por In:

$$b = \frac{L_P + \dots + L_Z}{\ln(h-1)} \quad (23)$$

Para ensaio simples com uma amostra:

$$b = \frac{L_P}{\ln} \quad (24)$$

Para ensaios múltiplos com três doses de cada preparação, obter  $L_A$  da Tabela 8 e todos os outros contrastes da Tabela 9. A equação para a inclinação é:

$$b = \frac{2(L_P + \dots + L_Z) + L_A}{\ln(4h-3)} \quad (25)$$

Se existir uma única amostra, a equação se reduz a:

$$b = \frac{2L_P + L_A}{5 \ln} \quad (26)$$



## VI.6. MÉDIAS MÓVEIS

No caso particular do *ensaio biológico da heparina*, o intervalo entre a dose que permite a coagulação e aquela que a inibe é tão pequeno que a curva dose-resposta não pode ser determinada explicitamente. Para interpolar o logaritmo da dose correspondente a 50% da coagulação, tanto para o padrão quanto para a amostra, utilizam-se as médias móveis.

### *Cálculo da potência*

Transformar em logaritmo os volumes da preparação padrão usados em 5 ou 6 tubos que constituem a série, de modo que 2 ou 3 tubos apresentem graus de coagulação iguais ou menores que 0,5 e 2 ou 3 tubos tenham graus iguais ou maiores que 0,5.

Confeccionar tabela correlacionando os tubos numerados consecutivamente com o grau de coagulação observado.

Denominar  $x$  os logaritmos dos volumes utilizados e  $y$  os graus de coagulação correspondentes. Calcular as médias emparelhadas  $x_i$  e  $y_i$  dos tubos 1, 2 e 3, dos tubos 2, 3 e 4, dos tubos 3, 4 e 5 e, quando a série consistir de 6 tubos, dos tubos 4, 5 e 6, respectivamente. Se para um destes pares de médias o grau de coagulação médio  $y_i$  é exata-

mente 0,50, o correspondente  $x_i$  é a mediana do logaritmo do volume da preparação padrão  $x_p$ . Caso isto não ocorra, interpolar o  $x_p$  a partir dos valores emparelhados de  $y_i, x_i$  e  $y_{i+1}, x_{i+1}$  que ocorram imediatamente abaixo e acima do grau 0,5, como:

$$x_p = x_i + (y_i - 0,5)(x_{i+1} - x_i)/(y_i - y_{i+1}) \quad (27)$$

A partir dos dados emparelhados obtidos nos tubos da amostra, calcular do mesmo modo a mediana do logaritmo do volume  $x_A$ . O logaritmo da potência da amostra é:

$$M_A = x_p - x_A + \log S_A \quad (28)$$

em que  $S_A$  é a suposição da potência da amostra feita na preparação da solução correspondente dos tubos da amostra.

Repetir o ensaio independentemente e calcular a média de dois ou mais valores de  $M$  para obter  $\bar{M}$ . Caso a segunda determinação de  $M$  difira da primeira mais que 0,05, continuar realizando ensaios até que o logaritmo do intervalo de confiança, calculado conforme final da seção *Combinação de estimativas de potência*, não exceda 0,20.

A potência da heparina sódica é:

$$R = \text{antilog de } \bar{M}$$

## VI.7. ENSAIOS INDIRETOS "TUDO OU NADA"

Em alguns ensaios não é possível nem conveniente medir o efeito em cada unidade experimental (por exemplo, animal) em escala quantitativa. Neste caso, podem-se medir efeitos de tudo ou nada, como morte ou ocorrência de sintoma pré-estabelecido. A proporção de unidades experimentais que apresentam o sintoma constitui o resultado. Esses ensaios são chamados quantais. Neste capítulo será apresentado cálculo aproximado. No caso de dispor de facilidades de computação, pode-se recorrer ao cálculo teórico exato. Deve-se registrar, para cada dose, a porcentagem de animais com efeito positivo. Exemplo: porcentagem de camundongos em convulsão. Transformar as porcentagens em probitos, utilizando a Tabela 16. Cada probito será considerado como o valor da resposta transformada ( $y$ ). O método a seguir é utilizado quando não ocorrem respostas equivalentes a porcentagens zero ou 100. Nesse caso, empregar métodos estatísticos completos de máxima probabilidade (logito ou probito). Para cada valor de  $y$ , deve-se obter um valor de coeficiente de ponderação ( $w$ ) na Tabela 17.

As fórmulas das somas de quadrados para os testes de validade são as mesmas utilizadas nos ensaios indiretos quantitativos (Tabela 10), tomando  $n = 1$ , com exceção do termo erro ( $s^2$ ), que tem graus de liberdade iguais a infinito, e se calcula como:

$$s^2 = \frac{k}{n \sum w} \quad (29)$$

e

em que  $k$  = número de tratamentos,  $n$  = número de animais utilizados em cada tratamento.

Calcular a potência e os limites de confiança usando as fórmulas 12 e 19. Este método aproximado é útil quando o ensaio é delineado de modo que as respostas em porcentagem correspondentes às doses menores e maiores estejam uniformemente espaçadas ao redor de 50%. Se uma das doses testadas fornecer respostas zero ou 100%, estas podem ser desprezadas. Neste caso, obter a estimativa de potência pelos métodos descritos na seção *Ensaio parcialmente balanceados*.

## VI.8. COMBINAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE POTÊNCIA

Quando se realizam  $n'$  ensaios independentes para cada amostra, os resultados podem ser combinados a fim de se obter uma potência estimada com intervalo de confiança reduzido, que cumpra os limites estabelecidos em cada monografia. Existem vários métodos para combinar ensaios repetidos.

Adotar simplificações, levando-se em conta dois aspectos:

a) corrigir estimativas do log da potência ( $M'$ ) pela potência suposta ( $S_A$ ) antes de realizar as combinações ( $M = M' + \log S_A$ );

b) as estimativas devem ser independentes, ou seja, obtidas em ensaios separados.

## VI.8.1. POTÊNCIA MÉDIA PONDERADA E LIMITES DE CONFIANÇA

Supor que foram analisados resultados de  $n'$  ensaios para se fornecerem  $n'$  valores de  $M$  com limites de confiança (em logaritmos) associados a cada valor de  $M$ , obtidos segundo as equações 13 a 19. Para cada ensaio, obter o intervalo de confiança logarítmico ( $L$ ), subtraindo o limite inferior do superior. Calcular também uma ponderação ( $W$ ) para cada valor de  $M$  a partir da equação 30, onde  $t$  é o mesmo valor empregado no cálculo do intervalo de confiança:

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \quad (30)$$

Para cada ensaio, calcular o produto  $WM$  e dividir seu somatório pelo somatório de todas as ponderações a fim de se obter o logaritmo da potência média ponderada ( $\bar{M}$ ), conforme a equação 31:

$$\bar{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \quad (31)$$

O erro padrão da potência média ( $s_{\bar{M}}$ ) é a raiz quadrada da recíproca da ponderação total:

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \quad (32)$$

Calcular os limites de confiança aproximados ( $p = 0,05$ ), a partir do antilogaritmo dos valores obtidos através da fórmula 33:

$$\bar{M} \pm t s_{\bar{M}} \quad (33)$$

Obtém-se o valor de  $t$  na Tabela 3, com graus de liberdade equivalentes à soma dos graus de liberdade da variância do erro dos ensaios individuais.

Este método aproximado de combinação dá resultados satisfatórios quando: a)  $C$  for menor que 1,1 para cada um dos  $n'$  ensaios e b) as estimativas individuais da potência formarem um conjunto homogêneo de acordo com o teste de homogeneidade realizado, aplicando a estatística  $\chi^2$ . Esta é calculada elevando-se ao quadrado a diferença entre cada valor de  $M$  em relação à média ponderada ( $\bar{M}$ ), multiplicando-se este quadrado pela ponderação correspondente ( $W$ ) e somando-se os valores para todos os ensaios:

$$\chi_M^2 = \sum \frac{W(M - \bar{M})^2}{n'} \quad (34)$$

Se o valor de  $\chi_M^2$  calculado for menor que o

correspondente na Tabela 18 para  $(n' - 1)$  graus de liberdade, considera-se que não há elementos para suspeitar da heterogeneidade de potências. Neste caso, a potência média e os limites calculados são corretos.

Se o valor de  $\chi_M^2$  for maior que o da Tabela 18, considera-se que as potências são heterogêneas, ou seja, que a dispersão dos valores individuais de  $M$  é maior que a esperada, de acordo com os respectivos limites de confiança. Neste caso, não aplicar as fórmulas 31 e 33, averiguar a origem desta heterogeneidade e, caso se considerar adequado, calcular  $\bar{M}$  usando semi-ponderações  $W'$ :

$$W' = 1/(V + v) \quad (35)$$

em que

$$V = 1/W = \frac{L^2}{4t^2} \quad (36)$$

e  $v$  é a variância da heterogeneidade entre ensaios e se calcula pela equação:

$$v = \frac{\Sigma M^2 - (\Sigma M)^2/n'}{n' - 1} - \frac{\Sigma V}{n'} \quad (37)$$

Quando  $V$  varia de tal maneira que  $v$  calculado é número negativo, pode-se calcular  $v$  aproximado, omitindo-se o termo após o sinal negativo na equação 37.

Para calcular a média semi-ponderada ( $\bar{M}$ ), substituir na equação 31 os valores de  $W$  e  $\Sigma W$  pelos respectivos valores de  $W'$  e  $\Sigma W'$ :

$$\bar{M} = \frac{\sum (W'M)}{\sum W'} \quad (38)$$

Pode-se considerar este valor de  $\bar{M}$  próximo ao centro de um intervalo de confiança de tamanho aproximado  $L_c^2$ , que é a raiz quadrada de:

$$L_c^2 = 4t^2/\Sigma W' \quad (39)$$

em que  $t$ , da Tabela 3, tem graus de liberdade iguais ao somatório de graus de liberdade da variância do erro dos  $n'$  ensaios individuais.

No caso especial do ensaio de heparina, todos os logaritmos de potência ( $M$ ) têm a mesma ponderação e o intervalo de confiança de logaritmo da estimativa da potência  $\bar{M}$  se determina como segue:

Cálculo da variância do erro com  $n'-1$  graus de liberdade:

$$s^2 = \{\Sigma M^2 - (\Sigma M)^2/n'\}/n'-1 \quad (40)$$

Determinar o intervalo de confiança em logaritmos (L)  $n'$  = número de estimativas individuais da potência.

$$L = 2 st/\sqrt{n'} \quad (41)$$

em que

$s = \sqrt{s^2}$ ,  $t$  (Tabela 3) com  $n'-1$  graus de liberdade,

Calcular os limites de confiança:

$$M_s = \bar{M} + 1/2 L \quad (42)$$

$$M_i = \bar{M} - 1/2 L \quad (43)$$

$$R_s = \text{antilog } M_s \quad (44)$$

$$R_i = \text{antilog } M_i \quad (45)$$

## VI.9. TABELAS ESTATÍSTICAS

Tabela I – Teste de valores aberrantes

Em amostras de uma população normal, valores iguais ou maiores que  $G_1$ ,  $G_2$  e  $G_3$  ocorrem com probabilidade  $p = 0,02$  quando podem existir dados aberrantes só num extremo, ou com  $p = 0,04$ , quando ocorrerem em qualquer extremo.

N	3	4	5	6	7						
$G_1$	,976	,846	,729	,644	,586						
N	8	9	10	11	12	13					
$G_2$	,780	,725	,678	,638	,605	,578					
N	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$G_3$	,602	,579	,559	,542	,527	,514	,502	,491	,481	,472	,464

Tabela 2 – Teste para grupos contendo valores aberrantes

NP de intervalos k	Valores de $R_k$ críticos para intervalos de n observações cada um									
	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	,813	,667	,601	,563	,539	,521	,507	,498	,489	
4	,681	,538	,479	,446	,425	,410	,398	,389	,382	
5	,581	,451	,398	,369	,351	,338	,328	,320	,314	
6	,508	,389	,342	,316	,300	,288	,280	,273	,267	
7	,451	,342	,300	,278	,263	,253	,245	,239	,234	
8	,407	,305	,267	,248	,234	,225	,218	,213	,208	
9	,369	,276	,241	,224	,211	,203	,197	,192	,188	
10	,339	,253	,220	,204	,193	,185	,179	,174	,172	

NP de intervalos k	Valores de $(k + 2) R_k$ críticos para intervalos de n observações cada um									
	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	

Tabela 3 - Distribuição de t

gl	Probabilidade												
	,9	,8	,7	,6	,5	,4	,3	,2	,1	,05	,02	,01	,001
1	,158	,325	,510	,727	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	,142	,289	,445	,617	,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	,137	,277	,424	,584	,765	,978	1,250	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	,134	,271	,414	,569	,741	,941	1,190	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	,132	,267	,408	,559	,727	,920	1,156	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	,131	,265	,404	,553	,718	,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	,130	,263	,402	,549	,711	,896	1,119	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	,130	,262	,399	,546	,706	,889	1,108	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	,129	,261	,398	,543	,703	,883	1,100	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	,129	,260	,397	,542	,700	,879	1,093	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	,129	,260	,396	,540	,697	,876	1,088	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	,128	,259	,395	,539	,695	,873	1,083	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	,128	,259	,394	,538	,694	,870	1,079	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	,128	,258	,393	,537	,692	,868	1,076	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	,128	,258	,393	,536	,691	,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	,128	,258	,392	,535	,690	,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	,128	,257	,392	,534	,689	,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	,127	,257	,392	,534	,688	,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	,127	,257	,391	,533	,688	,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	,127	,257	,391	,533	,687	,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	,127	,257	,391	,532	,686	,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	,127	,256	,390	,532	,686	,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	,127	,256	,390	,532	,685	,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	,127	,256	,390	,531	,685	,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	,127	,256	,390	,531	,684	,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	,127	,256	,390	,531	,684	,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	,127	,256	,389	,531	,684	,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	,127	,256	,389	,530	,683	,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	,127	,256	,389	,530	,683	,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	,127	,256	,389	,530	,683	,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	,126	,255	,388	,529	,681	,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	,126	,254	,387	,527	,679	,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	,126	,254	,386	,526	,677	,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	,126	,253	,385	,524	,674	,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

Tabela 4 - Razão de variâncias (F) - Pontos de  $p = 0,05$ 

$g/1$ $g/2$	1	2	3	4	5	6	8	12	24	$\infty$
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	238,9	243,9	249,0	254,3
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	6,69	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



Tabela 5 - Razão de variâncias (F) - Pontos de  $p = 0,01$ 

$g_1 \backslash g_2$	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	2,57
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	2,55	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

Tabela 6 - Ordem de doses nos ensaios cruzados

Grupo	Duplo cruzado		Triplo cruzado	
	Fase	Fase	Fase	Fase
	I	II	I	II
1	p <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	p <sub>1</sub>	a <sub>3</sub>
2	p <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>
3	a <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>3</sub>	a <sub>1</sub>
4	a <sub>2</sub>	p <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	p <sub>3</sub>
5	-	-	a <sub>2</sub>	p <sub>2</sub>
6	-	-	a <sub>3</sub>	p <sub>1</sub>

Tabela 7 - Exemplo de ordem de doses no quadrado latino

a <sub>2</sub>	p <sub>1</sub>	a <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>
p <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>	p <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>
a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	p <sub>2</sub>	p <sub>1</sub>
p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>1</sub>

Tabela 8 - Fórmulas para ensaios com duas doses de cada preparação

	Padrão (P)	1ª Amostra (A)	Amostra h-1 (Z)
Dose menor (soma de respostas)	$P_1$	$A_1$	$Z_1$
Dose maior (soma de respostas)	$P_2$	$A_2$	$Z_2$
Por preparação (soma de respostas)	$P_1 + P_2 = P$	$A_1 + A_2 = A$	$Z_1 + Z_2 = Z$
Contraste linear	$P_2 - P_1 = L_P$	$A_2 - A_1 = L_A$	$Z_2 - Z_1 = L_Z$

Tabela 9 - Fórmulas para ensaios com três doses de cada preparação

	Padrão (P)	1ª Amostra (A)	Amostra h-1 (Z)
Dose menor (soma de respostas)	$P_1$	$A_1$	$Z_1$
Dose média (soma de respostas)	$P_2$	$A_2$	$Z_2$
Dose maior (soma de respostas)	$P_3$	$A_3$	$Z_3$
Por preparação (soma de respostas)	$P_1 + P_2 + P_3 = P$	$A_1 + A_2 + A_3 = A$	$Z_1 + Z_2 + Z_3 = Z$
Contraste linear	$P_3 - P_1 = L_P$	$A_3 - A_1 = L_A$	$Z_3 - Z_1 = L_Z$
Contraste quadrático	$P_1 - 2P_2 + P_3 = Q_P$	$A_1 - 2A_2 + A_3 = Q_A$	$Z_1 - 2Z_2 + Z_3 = Q_Z$

Tabela 10 - Testes de validade (análise de variância)

Fonte de variação	Graus de liberdade (gl)	Soma de quadrados reduzida	
		Ensaio de duas doses	Ensaio de três doses
Preparações	$h-1$	$\frac{P^2 + A^2 + \dots + Z^2}{2n} - K$	$\frac{P^2 + A^2 + \dots + Z^2}{3n} - K$
Regressão	1	$\frac{(L_P + L_A + \dots + L_Z)^2}{2nh} = E$	$\frac{(L_P + L_A + \dots + L_Z)^2}{2nh} = E$
Paralelismo	$h-1$	$\frac{(L_P^2 + L_A^2 + \dots + L_Z^2)}{2n} - E$	$\frac{(L_P^2 + L_A^2 + \dots + L_Z^2)}{2n} - E$
Quadrático	1	_____	$\frac{(Q_P + Q_A + \dots + Q_Z)^2}{6nh} = Q$
Diferença de Quadráticos	$h-1$	_____	$\frac{Q_P^2 + Q_A^2 + \dots + Q_Z^2}{6n} - Q$

Tabela 11 - Estimativa do erro residual

Fontes de variação	Graus de liberdade (gl)	Soma de quadrados reduzida		
		Delineamento ao acaso	Blocos ao acaso	Quadrado latino
Tratamentos	$k-1$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$	$\frac{P_1^2 + P_2^2 + \dots + Z_d^2}{n} - K$
Blocos (filas)	$n-1$	---	$\frac{F_1^2 + F_2^2 + \dots + F_n^2}{k} - K$	$\frac{F_1^2 + F_2^2 + \dots + F_n^2}{k} - K$
Blocos (colunas)	$n-1$	---	---	$\frac{C_1^2 + C_2^2 + \dots + C_n^2}{k} - K$
Erro residual	Por diferença	*	*	*
TOTAL	$N-1$	$\Sigma Y^2 - K$	$\Sigma Y^2 - K$	$\Sigma Y^2 - K$

\* Obtida subtraindo, da soma de quadrados reduzida total, todas as outras somas de quadrados reduzidas calculadas para o delineamento correspondente.

Tabela 12 - Tabela de  $t'$  para comparação bicaudal entre  $(h-1)$  amostras e um padrão para um coeficiente de confiança conjunto de  $p = 0,95$ 

$gl_2$	$gl_1 = (h-1) = \text{número de amostras (excluindo padrão)}$								
	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

Tabela 13 – Totais e contrastes em ensaio com delineamento duplo cruzado

	<i>Padrão P</i>	<i>Amostra A</i>	<i>Total</i>
<b>FASE I</b>			
Dose menor (soma de respostas)	$P_{1I}$	$A_{1I}$	—
Dose maior (soma de respostas)	$P_{2I}$	$A_{2I}$	—
Total	$P_I$	$A_I$	$P_I + A_I = F_I$
<b>FASE II</b>			
Dose menor (soma de respostas)	$P_{1II}$	$A_{1II}$	—
Dose maior (soma de respostas)	$P_{2II}$	$A_{2II}$	—
Total	$P_{II}$	$A_{II}$	$P_{II} + A_{II} = F_{II}$
Por preparação (soma de respostas)	$p$	$A$	$\Sigma y$
<b>Contraste linear</b>			
FASE I	$P_{2I} - P_{1I} = L_{PI}$	$A_{2I} - A_{1I} = L_{AI}$	$L_{PI} + L_{AI} = L_I$
FASE II	$P_{2II} - P_{1II} = L_{PII}$	$A_{2II} - A_{1II} = L_{AII}$	$L_{PII} + L_{AII} = L_{II}$
TOTAL	$P_2 + P_1 = L_P$	$A_2 + A_1 = L_A$	$L_P + L_A = \Sigma L$

Tabela 14 – Testes de validade em ensaio duplo-cruzado

<i>Fontes de variação</i>	<i>Graus de liberdade (gl)</i>	<i>Soma de quadrados reduzida</i>
Paralelismo	1	$\frac{L_P^2 + L_A^2}{2n} - E$
Fases X preparações	1	$\frac{P_1^2 + P_{II}^2 + A_1^2 + A_{II}^2}{n} - K -$ Fases-Preparações
Fases X regressão	1	$\frac{L_I^2 + L_{II}^2}{2n} - E$
Erro I	Diferença	Blocos - Paralelismo - (Fases X Preparações) - (Fases X Regressão)
Blocos (animais)	$bl - 1$	$\frac{B_1^2 + B_2^2 + \dots + B_{2n}^2}{2} - K$
Preparações	1	$\frac{p^2 + A^2}{2n} - K$
Regressão	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 Regressão)
Erro II	Diferença	Total - Blocos - Preparações - Regressão - Fases - (Fases X Paralelismo)
TOTAL	$N - 1$	$\Sigma(y^2) - K$

$$K = (\Sigma y)^2 / N$$

N = número total de respostas

n = número de réplicas por dose incluídas as duas fases

bl = número de blocos (animais)

B = soma das duas respostas para cada bloco (animal)

Tabela 15 – Constante usada na fórmula para os limites de confiança

Dose de cada preparação (d)	Número de amostras ensaiadas (h - 1)				c'
2	1	2	3	4	1
	2	3	4	5	3/2
	3	4	5		2
	4	5			5/2
	5				3
3	1	2	3	4	8/3
	2	3	4	5	4
	3	4	5		16/3
	4	5			20/3
	5				8

Tabela 16 – Probitos correspondentes à percentagem

%	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

Tabela 17 – Coeficientes de ponderação para probitos (w)

Probitos	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

Tabela 18 – Valores de  $\chi^2$  ( $p = 0,05$ )

g'	$\chi^2$	g'	$\chi^2$
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

## VI.10. EXEMPLOS DE ENSAIOS ESTATÍSTICOS

## VI.10.1. EXEMPLO DE ENSAIO DIRETO

Exemplo 1: Ensaio direto com uma Amostra

Da equação 3:

Ensaio de digital pelo método da parada cardíaca em cobaia

A solução do padrão foi usada na concentração de 0,0658 UI/ml. Uma diluição equivalente de amostra foi preparada a partir da potência suposta de  $S_A = 1,3$  UI/100 mg.

As cobaias foram perfundidas aleatoriamente com solução padrão ou amostra, registrando-se o volume justamente necessário para produzir a parada cardíaca em cada animal.

As respostas encontram-se na Tabela 19.

Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança

Da equação 1:

$$M' = 1,3974 - 1,4089 = -0,0115$$

Da equação 6:

$$M = -0,0115 + \log 1,3 = 0,1024$$

Da equação 5:

$$R = \text{antilog } 0,1024 = 1,27$$

$$\begin{aligned} s_x^2 &= 1/22 [(1,4404^2 + \dots + 1,3304^2 - \frac{19,5641^2}{14}) + \\ &\quad + (1,5317^2 + \dots + 1,4072^2 - \frac{14,0890^2}{10})] \\ &= 1/22 [27,3829 - 27,3396 + 19,8879 - 19,8500] \\ &= 0,003691 \end{aligned}$$

Da equação 2:

$$s_M^2 = 0,003691 \left( \frac{1}{14} + \frac{1}{10} \right) = 0,000632$$

$$S_M = \sqrt{0,000632} = 0,0251$$

Para  $p = 0,05$  com 22 gl,  $t = 2,07$  (Tabela 3)

Da equação 7:

$$R_s = \text{antilog } [0,1024 \pm (2,07 \times 0,0251)]$$

$$R_s = \text{antilog } [0,1024 + (2,07 \times 0,0251)] = 1,43$$

$$R_i = \text{antilog } [0,1024 - (2,07 \times 0,0251)] = 1,12$$

A estimativa média da potência da amostra de digital é 1,27 UI/100 mg. Os limites de confiança ( $p = 0,05$ ) para a verdadeira potência são 1,12 UI/100 mg e 1,43 UI/100 mg.

Tabela 19 - Exemplo 1: Doses eficazes para produzir parada cardíaca

Padrão P		Amostra A	
Dose letal ml/kg	Log dose letal $x_p$	Dose letal ml/kg	Log dose 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

## VI.10.2. EXEMPLOS DE ENSAIOS INDIRETOS QUANTITATIVOS

Exemplo 2: Ensaio com três doses, delineamento completamente ao acaso

*Ensaio de gonadotrofina coriônica humana pelo método do aumento de peso de vesículas seminais*

As doses utilizadas do padrão foram:  $p_1 = 1,0$  UI/ml,  $p_2 = 2,0$  UI/ml e  $p_3 = 4,0$  UI/ml. Doses

equivalentes da amostra foram preparadas a partir da potência suposta  $S_A = 3000$  UI/mg.

Os ratos foram injetados subcutaneamente com 0,20 ml da solução respectiva, durante três dias consecutivos, num total de 0,6 ml/rato.

Os pesos das vesículas seminais encontram-se na Tabela 20.

Tabela 20 – Exemplo 2: Pesos de vesículas seminais (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 substituído pela média do tratamento.

Tabela 21 – Exemplo 2: Totais e contrastes

	Padrão P	Amostra A
Dose menor	$P_1 = 78,40$	$A_1 = 79,10$
Dose média	$P_2 = 93,82$	$A_2 = 111,40$
Dose maior	$P_3 = 115,20$	$A_3 = 128,10$
Preparação	$P = 287,42$	$A = 318,60$
Contraste linear	$L = 36,80$	$L_A = 49,00$
Contraste quadrático	$Q_P = 5,96$	$Q_A = -15,60$

Resultados obtidos com as fórmulas da Tabela 9.

Tabela 22 – Exemplo 2: Análise de variância

Fonte de variação	gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
Preparações	1	20,26	20,26		
Regressão	1	230,05	230,05	79,05	<0,01
Paralelismo	1	4,65	4,65	1,60	>0,05
Quadrático	1	0,97	0,97	0,33	>0,05
Diferença de quadráticos	1	4,84	4,84	1,66	>0,05
Tratamentos	5	260,77	52,15		
Erro	41*	119,18	$s^2 = 2,91$		
TOTAL	47	379,95			

\* Retirado um grau de liberdade por ter sido substituído um valor perdido.

As somas de quadrados foram obtidas empregando-se as fórmulas das Tabelas 9, 10 e 11.

$$N = 48$$

$$n = 8$$

$$K = (\Sigma y)^2 / N = 7,651,25$$

$$\Sigma y^2 = 8\,031,21.$$

Preparações =

$$= \frac{287,42^2 + 318,6^2}{24} - 7\,651,25 = 20,26$$

Regressão =

$$= \frac{(36,8 + 49,0)^2}{32} = 230,05 = E$$

Paralelismo =

$$= \frac{36,8^2 + 49,0^2}{16} - 230,05 = 4,65$$

Quadrático =

$$= \frac{[5,96 + (-15,6)]^2}{96} = 0,97 = Q$$

Diferença de quadráticos =

$$= \frac{5,96^2 + (-15,6)^2}{48} - 0,97 = 4,84$$

Tratamentos =

$$= \frac{78,40^2 + 93,83^2 + \dots + 128,10^2}{8} - 7\,651,25 = 260,77$$

$$\text{Total} = 8\,031,21 - 7\,651,25 = 379,95$$

$$\text{Erro} = 379,95 - 260,77 = 119,18.$$

*Validade do ensaio*

O ensaio cumpre com as condições de validade:

a) regressão significativa, F calculado 79,05 é maior que o valor crítico da Tabela 5 para  $p=0,01$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 41$ ;

b) desvio de paralelismo não significativo, F calculado 1,60 é menor que o valor crítico da Tabela 4 para  $p = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 41$  e

c) desvio de linearidade não significativo, F = 0,33 e 1,66.

*Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança*

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 2,0 = 0,3010$$

$$t = 2,02 \text{ com } 41 \text{ gl da Tabela 3}$$

$$b = \frac{36,8 + 49,0}{2 \times 0,301 \times 8 \times 2} = 8,90$$

$$\bar{y}_A = \frac{318,60}{24} = 13,27$$

$$\bar{y}_P = \frac{287,42}{24} = 11,97$$

$$M' = \frac{13,27 - 11,97}{8,90} = 0,1460$$

$$S_A = 3\,000 \quad \log S_A = 3,4771$$

$$M = 0,1460 + 3,4771 = 3,6231$$

$$R = \text{Antilog } 3,6231 = 4\,198,56 \text{ UI/mg}$$

$$C = \frac{230,05}{230,05 - 2,91(2,02)^2} = 1,05$$

$$C' = 8/3, \text{ da Tabela 15}$$

$$M'_s = 1,05 \times 0,146 \pm$$

$$\pm \sqrt{(1,05-1)[1,05(0,146)^2 + 8/3(0,3010)^2]}$$

$$M'_s = 0,2679$$

$$M'_i = 0,0381$$

*Logaritmo dos limites de confiança da potência*

$$M_s = 0,2679 + 3,4771 = 3,7449$$

$$M_i = 0,0381 + 3,4771 = 3,5151$$

*Limites de confiança da potência*

$$R_s = \text{antilog } 3,7445 = 5552,64 \text{ UI/mg}$$

$$R_i = \text{antilog } 3,5151 = 3274,16 \text{ UI/mg}$$

**Exemplo 3: Ensaio com três doses, delineamento blocos ao acaso**

*Ensaio de antibiótico usando placas de Petri*

As doses utilizadas do padrão foram:

$$p_1 = 0,25 \text{ UI/ml}, p_2 = 0,50 \text{ UI/ml e}$$

$$p_3 = 1,00 \text{ UI/ml.}$$

Doses equivalentes da amostra foram preparadas com base na potência suposta  $S_A = 1650$  UI/mg.

Os diâmetros dos halos de inibição encontram-se na Tabela 23.



Tabela 23 – Exemplo 3: Diâmetro de halos de inibição

Placas (Blocos)	Padrão P			Amostra A			Total Bloco
	$p_1$	$p_2$	$p_3$	$a_1$	$a_2$	$a_3$	
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

Tabela 24 – Exemplo 3: Totais e contrastes

	Padrão P	Amostra A
Dose menor	$P_1 = 105,5$	$A_1 = 106,0$
Dose média	$P_2 = 133,1$	$A_2 = 133,5$
Dose maior	$P_3 = 159,2$	$A_3 = 159,1$
Preparação	$P = 397,8$	$A = 398,6$
Contraste linear	$L_P = 53,7$	$L_A = 53,1$
Contraste quadrático	$Q_P = -1,5$	$Q_A = -1,9$

Resultados obtidos com as fórmulas da Tabela 9.

Tabela 25 – Exemplo 3: Análise de variância

Fonte de variação	gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
Preparações	1	0,0150	0,0150	0,09	> 0,05
Regressão	1	407,3657	407,3657	2396	< 0,01
Paralelismo	1	0,0129	0,0129	0,08	> 0,05
Quadrático	1	0,1376	0,1376	0,81	> 0,05
Diferença de quadráticos	1	0,0019	0,0019	0,01	> 0,05
Tratamentos	5	15101,26	3020,25		
Placas (blocos)	6	22,18	3,70	21,8	< 0,01
Erro	30	4,99	$s^2 = 0,17$		

As somas de quadrados foram obtidas empregando-se as fórmulas das Tabelas 9, 10 e 11.

$$N = 42$$

$$n = 7$$

$$K = (\Sigma y)^2 / N = 15\,101,26$$

$$\Sigma y^2 = 15\,535,96$$

Preparações =

$$= \frac{397,8^2 + 398,6^2}{21} - 15\,101,2610 = 0,0152$$

Regressão =

$$= \frac{(53,7 + 53,1)^2}{28} = 407,3657 = E$$

Paralelismo =

$$= \frac{53,7^2 + 53,1^2}{14} - 407,3657 = 0,0129$$

Quadrático =

$$= \frac{[-1,5 + (-1,9)]^2}{84} = 0,1376 = Q$$

Diferença de quadráticos =

$$= \frac{-1,5^2 + (-1,9)^2}{42} - 0,1376 = 0,0019$$

Tratamentos =

$$= \frac{105,5^2 + 133,1^2 + \dots + 159,2^2}{7} - 15\,101,261 = 407,53$$

Blocos (Placas) =

$$= \frac{123,9^2 + 113,7^2 + \dots + 113,2^2}{6} - 15\,101,261 = 22,18$$

$$\text{Total} = 15\,535,96 - 15\,101,261 = 434,7$$

$$\text{Erro} = 434,7 - 22,18 - 407,53 = 4,99$$

**Validade de ensaio**

O ensaio cumpre com as condições de validade:

a) regressão significativa, F calculado 2390 é maior que o valor crítico da Tabela 5 para  $p = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 30$ ;

b) desvio de paralelismo não significativo, F calculado 0,08 é menor que o valor crítico da Tabela 4 para  $p = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 30$ , e

c) desvio de linearidade não significativo, F calculados = 0,81 e 0,01.

$R = \text{antilog } 3,2206 = 1662$

$C = 407,3657 / [407,3657 - 0,17 (2,04)^2] = 1,0017$

$c' = 8/3$ , da Tabela 15

$M'_s = 1,0017 \times 0,003157 \pm$

$\pm \sqrt{(1,0017-1) [1,0017 \times (0,003157)^2 + 8/3 (0,301)^2]}$

$M'_s = 0,0235$

$M'_i = -0,0171$

*Logaritmo dos limites de confiança da potência*

$M_s = 0,0235 + 3,2175 = 3,2410$

$M_i = -0,0171 + 3,2175 = 3,2004$

*Limites de confiança da potência*

$R_s = \text{antilog } 3,2410 = 1742 \text{ UI/mg}$

$R_i = \text{antilog } 3,2004 = 1586 \text{ UI/mg}$

**Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança**

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$I = \log 1,00 - \log 0,50 = 0,301$

$t = 2,04$  com 30 gl da Tabela 3.

$b = \frac{53,7 + 53,1}{28 \times 0,301} = 12,67$

$\bar{Y}_A = \frac{398,6}{21} = 18,98 \quad \bar{Y}_P = \frac{397,8}{21} = 18,94$

$M' = \frac{18,98 - 18,94}{12,672} = 0,003157$

$S_A = 1650 \text{ UI/mg}$

$M = M' + \log 1650 = 0,003157 + 3,217480 = 3,2206$

**Exemplo 4: Ensaio com duas doses, delineamento quadrado latino**

*Ensaio de oxitocina – método da contração do útero isolado de rata*

As doses administradas do padrão foram:  $p_1 = 0,2 \text{ ml}$  e  $p_2 = 0,25 \text{ ml}$  de solução contendo 0,02 UI/ml.

Doses equivalentes da amostra foram preparadas com base na potência suposta de 10 UI/ml diluída 1:500.

Tabela 26 – Exemplo 4: Ordem de adição das doses

Filas	Colunas			
	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	$a_2$	$a_1$	$p_2$	$p_1$

Tabela 27 – Exemplo 4: Registros de contrações em mm

Filas	Colunas				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 COLUNA	$C_1 = 160$	$C_2 = 156$	$C_3 = 161$	$C_4 = 155$	
TOTAL DAS DOSES	$P_1 = 142$	$P_2 = 166$	$A_1 = 150$	$A_2 = 174$	

Tabela 28 – Exemplo 4: Totais e contrastes

	Padrão	Amostra
Dose menor	$P_1 = 142$	$A_1 = 150$
Dose maior	$P_2 = 166$	$A_2 = 174$
Preparação	$P = 308$	$A = 324$
Contraste linear	$L_P = 24$	$L_A = 24$

Resultados obtidos com as fórmulas da Tabela 8.

Tabela 29 – Exemplo 4: Análise de variância

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Preparações	1	16,0	16,0	1,65	>0,05
Regressão	1	144,0	144,0	14,89	<0,01
Paralelismo	1	0,0	0,0	0,00	>0,05
Tratamento	3	160,0			
Filas	3	31,5	10,5	1,08	>0,05
Colunas	3	6,5	2,2	0,23	>0,05
Erro	6	58,0	$s^2 = 9,67$		
TOTAL	15	256,0			

As somas de quadrados foram obtidas empregando-se as fórmulas das Tabelas 8, 10 e 11.

$$N = 16$$

$$n = 4$$

$$K = (\Sigma y)^2 / N = 632^2 / 16 = 24964$$

Preparações =

$$= \frac{308^2 + 324^2}{8} - 24964,0 = 16,0$$

Regressão =

$$= \frac{(24 + 24)^2}{2 \times 4 \times 2} = 144,0 = E$$

Paralelismo =

$$= \frac{24^2 + 24^2}{2 \times 4} - 144 = 0$$

Tratamentos =

$$= \frac{142^2 + 166^2 + 150^2 + 174^2}{4} - 24964 = 160,0$$

Filas =

$$= \frac{156^2 + 150^2 + 161^2 + 165^2}{4} - 24964 = 31,5$$

Colunas =

$$= \frac{160^2 + 156^2 + 161^2 + 155^2}{4} - 24964 = 6,5$$

$$\text{Total} = 25220 - 24964 = 256,0$$

$$\text{Erro} = 256,0 - 160,0 - 31,5 - 6,5 = 58,0$$

A análise não apresentou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre filas e entre colunas.

Validade do ensaio

O ensaio cumpre com as condições de validade:

a) regressão significativa, F calculado 14,9 é maior que o valor crítico da Tabela 5 para  $p = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 6$ , e

b) desvio de paralelismo não significativo, F calculado 0,0 é menor que o valor crítico da Tabela 4 para  $p = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 6$ .

Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança

Utilizar fórmulas 10 a 15

$$I = \log 0,25 - \log 0,20 = 0,0969$$

$$t = 2,45 \text{ com } 6 \text{ gl da Tabela } 3$$

$$b = \frac{24 + 24}{0,0969 \times 4 \times 2} = 61,91$$

$$\bar{y}_A = \frac{324}{8} = 40,5 \quad \bar{y}_P = \frac{308}{8} = 38,5$$

$$M' = \frac{40,5 - 38,5}{61,91} = 0,0323$$

$$S_A = 10 \quad \log S_A = 1$$

$$M = 0,0323 + 1 = 1,0323$$

$$R = \text{antilog } 1,0323 = 10,8 \text{ UJ/ml} = \text{Potência estimada}$$

$$C = \frac{144,0}{144,0 - 9,67 \times 2,45^2} = 1,67$$

$$c' = 1, \text{ da Tabela 15}$$

$$M'_s = 1,67 \times 0,0323 \pm$$

$$\pm \sqrt{(1,67-1,0) [1,67(0,0323)^2 + 1(0,09691)^2]}$$

$$M'_s = 0,1402$$

$$M'_j = -0,0324$$

*Logaritmo dos limites de confiança da potência*

$$M_s = 0,1402 \pm 1 = 1,1402$$

$$M_j = -0,0324 \pm 1 = 0,9676$$

*Limites de confiança da potência*

$$R_s = \text{antilog } 1,1402 = 13,81 \text{ UI/ml}$$

$$R_j = \text{antilog } 0,9676 = 9,28 \text{ UI/ml}$$

### Exemplo 5: Ensaio duplo cruzado

*Ensaio de insulina em camundongos*

As doses utilizadas do padrão foram  $p_1 = 60$  mUI/ml e  $p_2 = 120$  mUI/ml. Foram preparadas doses equivalentes da amostra,  $a_1 = 60$  mUI/ml e  $a_2 = 120$  mUI/ml a partir da potência suposta  $S_A = 27,4$  UI/ml.

Os camundongos foram injetados com 0,1 ml da solução respectiva para cada 10 g de peso médio, de acordo com a Tabela 6.

As respostas encontram-se na Tabela 30.

Tabela 30 – Exemplo 5: Concentração de glicose sanguínea (mg/100 ml), quarenta minutos após a injeção

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	48,4	80,8	36,8	17,0	53,8	30,9	52,1	83,0
35,2	40,1	75,3	35,2	73,8	109,0	53,2	24,9	78,1	27,8	59,4	87,2
43,1	33,9	77,0	35,3	73,1	108,4	71,2	58,2	129,4	35,4	39,1	74,5
41,3	16,2	57,5	32,9	45,2	78,1	37,1	24,8	61,9	49,8	79,0	128,8
54,2	33,2	87,4	31,9	33,1	65,0	45,9	22,7	68,6	28,2	37,3	65,5
41,4	13,1	54,5	51,2	62,4	113,6	82,2	42,7	124,9	49,9	51,1	101,0
48,6	32,7	81,3	38,2	76,2	114,4	64,8	33,9	98,7	28,3	59,5	87,8
57,8	50,4	108,2	39,7	50,1	89,8	49,1	37,6	86,7	39,6	55,8	95,4
71,1	47,3	118,4	37,0	73,8	110,8	44,1	10,4	54,5	32,2	40,6	72,8
60,8	26,1	86,9	38,9	64,6	103,5	64,7	34,7	99,4	55,1	68,2	123,3
78,2	50,9	129,1	42,6	54,6	97,2	88,0	61,6	149,6	40,6	61,4	102,0
76,1	54,4	130,5	30,4	49,6	80,0	90,1	60,3	150,4	43,5	52,8	96,3

Tabela 31 – Exemplo 5: Totais e contrastes

	Padrão P	Amostra A	Total
<b>Fase I</b>			
Dose menor	$P_{1I} = 644,9$	$A_{1I} = 727,2$	
Dose maior	$P_{2I} = 445,7$	$A_{2I} = 461,3$	
Total	$P_I^{2I} = 1090,6$	$A_I^{2I} = 1188,5$	$F_I = 2279,1$
<b>Fase II</b>			
Dose menor	$P_{1II} = 656,3$	$A_{1II} = 704,9$	
Dose maior	$P_{2II} = 428,8$	$A_{2II} = 414,9$	
Total	$P_{II}^{2II} = 1085,1$	$A_{II}^{2II} = 1119,8$	$F_{II} = 2204,9$
<b>Preparação</b>	$P = 2175,7$	$A = 2308,3$	$\Sigma y = 4484,0$
<b>Contraste linear</b>			
Fase I	$L_{P_I} = -199,2$	$L_{A_I} = -265,9$	$L_I = -465,1$
Fase II	$L_{P_{II}} = -227,5$	$L_{A_{II}} = -290,0$	$L_{II} = -517,5$
Total	$L_P^{2I} = -426,7$	$L_A^{2II} = -555,9$	$\Sigma L = -982,6$

Resultados obtidos com as fórmulas da Tabela 13

Tabela 32 - Exemplo 5: Análise de variância

Fonte de variação	gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
Paralelismo	1	173,88	173,88	0,53	> 0,05
Fases x Preparações	1	41,61	41,61	0,13	> 0,05
Fases x Regressão	1	28,60	28,60	0,09	> 0,05
Erro I	44	14 545,64	330,58		
Blocos (camundongos)	47	14 789,73	314,67		
Preparações	1	183,15	183,15	3,01	> 0,05
Regressão	1	10 057,32	10 057,32	165,52	< 0,01
Fases	1	57,35	57,35	0,94	> 0,05
Fases x Paralelismo	1	0,19	0,19	0,00	> 0,05
Erro II	44	2 673,39	60,76		
TOTAL	95	27 761,13			

As somas de quadrados foram obtidas empregando as fórmulas das Tabelas 13 e 14.

$$N = 96$$

$$n = 24$$

$$b1 = 48$$

$$K = (\Sigma y)^2 / N = 4 484,0^2 / 96 = 209 440,17$$

$$\Sigma y^2 = 237 201,30$$

$$\text{Total} = 237 201,30 - 209 440,17 = 27 761,13$$

$$\text{Blocos} = \frac{448 459,8}{2} - 209 440,17 = 14 789,73$$

$$\text{Preparações} = \frac{2175,7^2 + 2308,3^2}{48} - 209 440,17 = 183,15$$

$$\text{Fases} = \frac{2279,1^2 + 2204,9^2}{48} - 209 440,17 = 57,35$$

$$\text{Regressão} = \frac{[(-426,7) + (-555,9)]^2}{96} = 10 057,32 = E$$

$$\text{Paralelismo} = \frac{(-426,7)^2 + (-555,9)^2}{48} - 10 057,32 = 173,88$$

$$\text{Fases x regressão} = \frac{(-465,1)^2 + (-517,5)^2}{48} - 10 057,32 = 28,60$$

$$\text{Fases x paralelismo} = \frac{(-199,2)^2 + (-227,5)^2 + (-265,9)^2 + (-290,0)^2}{24} - 10 057,32 - 173,88 - 28,60 = 0,19$$

$$\text{Fases x preparações} =$$

$$= \frac{1090,6^2 + 1085,1^2 + 1188,5^2 + 1119,8^2}{24} -$$

$$- 209 440,17 - 57,35 - 183,15 = 41,61$$

$$\text{Erro I} = 14 789,73 - 173,88 - 41,61 - 28,60 = 14 545,64$$

$$\text{Erro II} = 27 761,13 - 14 789,73 - 183,15 - 10 057,32 - 57,35 - 0,19 = 2 673,39$$

#### Validade do ensaio

O ensaio cumpre as condições de validade:

a) regressão significativa, F calculado 165,52 é maior que o valor crítico da Tabela 5, para  $p = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 44$ ; erro  $(9,31)$

b) paralelismo não significativo, F calculado 0,53 é menor que o valor crítico da Tabela 4, para  $p = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 44$ ; e  $(4,08)$

c) nenhuma das três interações foi significativa - os três valores de F calculados: 0,13, 0,09 e 0,00 foram menores que o valor crítico da Tabela 4 para  $p = 0,05$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 = 44$ .

#### Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 120 - \log 60 = 2,0792 - 1,7782 = 0,301$$

$$t = 2,01 \text{ com } 44 \text{ gl da Tabela 3}$$

$$b = \frac{(-426,7) + (-555,9)}{24 \times 2 \times 0,301} = -68,01$$

$$\bar{y}_P = \frac{2175,7}{2 \times 24} = 45,33$$

$$\bar{y}_A = \frac{2308,3}{2 \times 24} = 48,09$$

$$M' = \frac{48,09 - 45,33}{-68,01} = -0,0406$$

$$S_A = 27,4 \quad \log S_A = 1,4377$$

$$M = -0,0406 + 1,4377 = 1,3971$$

Potência estimada : R = antilog 1,3971 = 24,95

UI/ml

$$C = \frac{10\ 057,32}{[10\ 057,32 - 60,76(2,01)^2]} = 1,025$$

c' = 1 da Tabela 15

M'\_s

$$M'_i = 1,025 (-0,0406) \pm$$

$$\pm \sqrt{(1,025-1) [1,025(-0,0406)^2 + 1(0,301)^2]}$$

$$M'_s = 0,0064 \quad M'_i = -0,0896$$

Logaritmo dos limites de confiança

$$M_s = 0,0064 + 1,4377 = 1,4441$$

$$M_i = -0,0896 + 1,4377 = 1,3481$$

Limites de confiança da potência

$$R_s = \text{antilog } 1,4441 = 27,80 \text{ UI/ml}$$

$$R_i = \text{antilog } 1,3481 = 22,29 \text{ UI/ml}$$

**Exemplo 6: médias móveis**

Ensaio de heparina pelo método de inibição da coagulação de plasma ovino citratado

As doses utilizadas do padrão, em ml, foram: p<sub>1</sub> = 0,78; p<sub>2</sub> = 0,76; p<sub>3</sub> = 0,74; p<sub>4</sub> = 0,72; p<sub>5</sub> = 0,70 e p<sub>6</sub> = 0,68. Doses equivalentes (a) da amostra foram preparadas a partir da potência suposta S<sub>A</sub> = 140,6 UI/mg.

O ensaio foi desenvolvido conforme está descrito no método de avaliação de heparina neste volume.

Foram realizados três ensaios. A título de exemplo do cálculo de M<sub>i</sub> somente se desenvolverá o ensaio N<sup>o</sup> 1.

Os graus de coagulação encontram-se na Tabela 33.

Tabela 33 - Exemplo 6: Graus de coagulação = y

Tubo	Padrão P		Amostra 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	0,68	1,00	0,68	1,00

Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança

Utilizar fórmulas 27, 28 e 40 a 45.

$$x_{iP} = 0,8691 \quad y_{iP} = 0,417$$

$$x_{(i+1)P} = 0,8572 \quad y_{(i+1)P} = 0,750$$

$$x_P = 0,8691 + (0,417 - 0,5) \frac{0,8572 - 0,8691}{0,417 - 0,750}$$

$$x_P = 0,8661$$

$$x_{iA} = 0,8807 \quad y_{iA} = 0,333$$

$$x_{(i+1)A} = 0,8691 \quad y_{(i+1)A} = 0,667$$

$$x_A = 0,8807 + (0,333 - 0,5) \frac{0,8691 - 0,8807}{0,333 - 0,667}$$

$$x_A = 0,8749$$

$$S_A = 140,6 \text{ UI/mg}$$

$$M_1 = 0,8661 - 0,8749 + \log 140,6$$

$$M_1 = 2,1392$$

Supondo que outros dois ensaios realizados com a mesma amostra forneceram as estimativas:

$$M_2 = 2,1995 \text{ e } M_3 = 2,1805, \text{ calcular } \bar{M}$$

$$\bar{M} = (2,1392 + 2,1995 + 2,1805)/3 = 2,1731$$

$$R = \text{antilog } \bar{M} = 149,0 \text{ UI/mg}$$

Calcular a variância do erro:

$$s^2 = \{14,1686 - 42,4999/3\}/2$$

$$s^2 = 0,001 \quad s = \sqrt{0,001} = 0,0316$$

$$n' = 3$$

$$t = 4,3 \text{ (Tabela 3 gl = 2)}$$

Calcular o intervalo de confiança:

$$L = \frac{2 \times 0,0316 \times 4,3}{1,7321} = 0,1569$$

$$L/2 = 0,0784$$

$$M_s = 2,1731 + 0,0784 = 2,2515$$

$$M_i = 2,1731 - 0,0784 = 2,0947$$

$$R_s = 178,4$$

$$R_i = 124,4$$

Tabela 34 - Exemplo 6: Médias emparelhadas

Tubo	Padrão P			Amostra A		
	log dose (ml x 10) x <sub>P</sub>	médias log dose x <sub>iP</sub>	médias grau coagulação y <sub>iP</sub>	log dose (ml x 10) x <sub>A</sub>	médias log dose x <sub>iA</sub>	médias grau coagulação y <sub>iA</sub>
1	0,8921	-	-	0,8921	-	-
2	0,8808	0,8807	0,167	0,8808	0,8807	0,333
3	0,8692	0,8691	0,417	0,8692	0,8691	0,667
4	0,8573	0,8572	0,750	0,8573	0,8572	0,917
5	0,8451	0,8450	0,917	0,8451	0,8450	1,000
6	0,8325	-	-	0,8325	-	-

## VI.10.3. EXEMPLO DE ENSAIO INDIRETO "TUDO OU NADA"

Exemplo 7: Ensaio dicotômico de duas doses, método de probitos simplificado

Ensaio de insulina pelo método de convulsão em camundongos

As doses utilizadas do padrão foram  $p_1 = 18$  mUI/camundongo e  $p_2 = 30$  mUI/camundongo.

Doses equivalentes da amostra ( $a_1 = 18$  mUI/camundongo e  $a_2 = 30$  mUI/camundongo) foram preparadas com base na potência suposta  $S_A = 40$  UI/ml.

Os camundongos foram injetados subcutaneamente com 0,25 ml/camundongo da solução respectiva. Previamente foram divididos ao acaso em quatro grupos, que receberam, respectivamente,

cada dose do ensaio conforme está descrito no ensaio de insulina, neste volume.

$$K = \frac{(P + A)^2}{k} = \frac{20,15^2}{4} = 101,5056$$

Preparações =

$$= \frac{9,75^2 + 10,4^2}{2} - 101,5056 = 0,1056$$

Regressão =

$$= \frac{(0,79 + 0,94)^2}{4} = 0,7482 = E$$

Paralelismo =

$$= \frac{0,79^2 + 0,94^2}{2} - 0,748 = 0,0056$$

$$s^2 = \frac{k}{\sum wn} =$$

$$= \frac{4}{30(0,576) + 28(0,619) + 28(0,619) + 24(0,540)} = 0,0616$$

Tabela 35 – Exemplo 7: Respostas (% de camundongos em convulsão)

	Padrão P		Amostra A	
	$p_1$	$p_2$	$a_1$	$a_2$
número de camundongos injetados (n)	30	28	28	24
número de camundongos em convulsão	9	17	11	18
porcentagem de respostas (%)	30,0	60,7	39,3	75,0

Validade do ensaio

O ensaio cumpre as condições de validade:

a) regressão significativa, F calculado 12,15 é maior que o valor crítico da Tabela 5, para  $p = 0,01$ ,  $gl_1 = 1$  e  $gl_2 =$  infinito; e

Tabela 36 – Exemplo 7: Transformação em probitos, totais e contrastes

	Padrão P		Amostra A	
	$p_1$	$p_2$	$a_1$	$a_2$
Probita (Tabela 16)	$P_1 = 4,48$	$P_2 = 5,27$	$A_1 = 4,73$	$A_2 = 5,67$
Ponderação w (Tabela 17)	0,576	0,619	0,619	0,540
Preparação	$P = 9,75$		$A = 10,4$	$\Sigma Y = 20,15$
Contraste linear	$L_P = 0,79$		$L_A = 0,94$	$\Sigma L = 1,73$

Resultados obtidos com as fórmulas da Tabela 8.

Tabela 37 – Exemplo 7: Análise da variância

Fonte da variação	gl	Soma de quadrados	Quadrado médio	F	p
Preparações	1	0,1056	0,1056	1,71	> 0,05
Regressão	1	0,7482	0,7482	12,15	< 0,01
Paralelismo	1	0,0056	0,0056	0,09	> 0,05
Erro	Infinito		$s^2 = 0,0616$		

As somas de quadrados foram obtidas empregando-se as fórmulas da Tabela 10, tomando  $n = 1$ .

b) desvio de paralelismo não significativo, F calculado 0,09 é menor que o valor crítico da Tabela 4, para  $p = 0,05$ ;  $g_1 = 1$  e  $g_2 = \text{infinito}$ .

*Cálculo da estimativa de potência e limites de confiança*

Utilizar fórmulas 10 a 15.

$$I = \log 30 - \log 18 = 1,4771 - 1,2553 = 0,2219$$

$$t = 1,96 \text{ com } g_1 = \text{infinito e } p = 0,05 \text{ (da Tabela 3)}$$

$$b = \frac{0,79 + 0,94}{2(0,2219)} = 3,9318$$

$$\bar{y}_P = \frac{9,75}{2} = 4,87$$

$$\bar{y}_A = \frac{10,4}{2} = 5,20$$

$$M' = \frac{5,20 - 4,87}{3,9318} = 0,0839$$

$$S_A = 40,0 \quad \log S_A = 1,6021$$

$$M = 0,0839 + 1,6021 = 1,6860$$

$$R_A = \text{antilog } 1,6860 = 48,53 \text{ UI/ml} = \text{Potência estimada}$$

$$C = \frac{0,7482}{[0,7482 - 0,0616(1,96)^2]} = 1,4625$$

$$c' = 1 \text{ (da Tabela 15)}$$

$$M'_s$$

$$M'_i = 1,4625 \times 0,0839 \pm$$

$$\pm \sqrt{0,4625 [1,4625 (0,0839)^2 + (0,2219)^2]}$$

$$M'_s$$

$$M'_i = 0,1227 \pm 0,1658$$

$$M'_s = 0,2885 \quad M'_i = -0,0431$$

*Logaritmo dos limites de confiança*

$$M_s = 0,2885 + 1,6021 = 1,8906$$

$$M_i = 0,0431 + 1,6021 = 1,5590$$

*Limites de confiança da potência*

$$R_s = 77,73 \text{ UI/ml}$$

$$R_i = 36,22 \text{ UI/ml}$$

Usando o método completo de análise de probitos, obteve-se uma estimativa de potência de 48,48 com limites de 35,9 e 75,92 UI/ml.



## VI.10.4. EXEMPLO DE COMBINAÇÃO DE ESTIMATIVAS DE POTÊNCIA

Exemplo 8: Combinação de estimativas de potência

*Combinação de ensaios de corticotrofina pelo método de depleção de ácido ascórbico supra-renal em ratas hipofisectomizadas*

Três ensaios independentes da mesma amostra foram realizados conforme procedimento descrito neste volume (VI. 8). Os resultados dos ensaios encontram-se na Tabela 38.

Tabela 38 – Exemplo 8: Dados para combinação de potências

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
M	1,24797	1,25164	1,42193
L	0,29097	0,90082	0,11555
t <sup>2</sup>	4,1209	4,1209	4,2025
gl	34	33	27

*Cálculo da potência média ponderada*

$$\bar{M} = \frac{\sum M W}{\sum W} = \frac{2058,6174}{1474,0148} = 1,3966$$

$$R = \text{antilog } 1,3966 = 24,9$$

*Teste de homogeneidade dos log das estimativas de potência.*

$$\chi_M^2 = \sum W(M-\bar{M})^2 = 5,5$$

$$\chi_{gl}^2 = 2 p = 0,05 \text{ (Tabela 18)} = 5,9$$

Como  $\chi^2$  calculado é menor que o valor crítico, não se tem elementos para suspeitar de heterogeneidade.

*Cálculo dos limites de confiança*

$$s_{\bar{M}} = \sqrt{1/\sum W} = \sqrt{1/1474,0198} = 0,0260$$

$$M_s = \bar{M} \pm 1,98 \times 0,0260$$

$$M_s = 1,4226$$

$$M_i = 1,3700$$

$$R_s = 26,5$$

$$R_i = 23,5$$

## VII. RADIOFÁRMACOS

## VII. RADIOFÁRMACOS

Radiofármacos são preparações contendo um ou mais radionuclídeos. Além de atender às especificações farmacopéicas, os radiofármacos têm a sua produção, suprimento, estocagem, uso e despejo regulamentados por outras normas governamentais pertinentes em vigor.

**Nuclídeo** — Espécie de átomo caracterizado pelo número de prótons e nêutrons contidos em seu núcleo (ou seja, pelo seu número atômico e pela massa atômica).

**Isótopos** — Nuclídeos do mesmo elemento químico, isto é, com o mesmo número atômico e massa atômica diferente.

**Radioisótopos** — Isótopos radiativos.

**Radionuclídeo** — Nuclídeo radiativo.

**Radiatividade (ou atividade)** — propriedade que certos nuclídeos têm de emitirem radiação por transformações espontâneas de seus núcleos. A radiatividade de uma preparação é o número de transformações nucleares por unidade de tempo que ocorrem numa determinada quantidade da preparação. Estas transformações podem envolver a emissão de partículas carregadas, captura de elétrons ou transição isomérica. As partículas carregadas emitidas do núcleo podem ser partículas alfa (núcleos de hélio, de número de massa 4) ou partículas beta (elétrons de carga negativa ou positiva, respectivamente  $\beta^-$ -néutron ou  $\beta^+$ -pósitron). A emissão de partículas carregadas pode ser acompanhada de raios gama, os quais também são emitidos no processo de transição isomérica. Esta emissão de raios gama pode ser parcialmente substituída pela ejeção de elétrons, conhecidos como elétrons de conversão interna. Este fenômeno, assim como o processo de captura de elétrons, causa emissão secundária de raios X, devido à reorganização de elétrons no átomo. Esta emissão secundária pode, por si mesma, ser substituída parcialmente pela ejeção de elétrons conhecidos como elétrons Auger. Raios X, eventualmente acompanhados pelos raios gama, são emitidos no processo de captura de elétrons. Partículas  $\beta^-$  são aniquiladas em contato com a matéria; este processo é acompanhado pela emissão de raios gama com energia de 0,511 MeV.

**Desintegração** — Transformação na qual o núcleo emite uma ou mais partículas.

**Tempo de meia-vida** — Tempo no qual a quantidade de radionuclídeos decai à metade do valor inicial. A meia-vida é relacionada à constante de decaimento ( $\lambda$ ) pela equação:

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda}$$

**Decaimento radiativo** — A radiatividade decai em razão exponencial, que é característica para cada radionuclídeo. A atividade em qualquer tempo pode ser calculada pela expressão

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

em que

A = atividade no tempo t,

$A_0$  = atividade inicial,

$\lambda$  = constante de decaimento — (também denominada de constante de desintegração ou constante de transformação, i.e., a fração de átomos radiativos que sofrem transformações na unidade de tempo, desde que este tempo seja curto em comparação com a meia-vida),

t = tempo decorrido,

e = base de logaritmos neperianos.

**Atividade específica (ou radiatividade específica)** — Radiatividade do radionuclídeo relacionada à massa unitária do elemento ou composto; é comumente referida à atividade de 1 g da substância especificada na monografia:

$$S = \frac{N \times 0,693}{W \text{ ou } M \times T_{1/2}} \text{ desintegrações/s/g}$$

em que

S = radiatividade específica,

N = número de Advogado,

W = peso atômico,

M = peso molecular.

**Concentração radiativa** — A concentração radiativa da solução é a radiatividade do radionuclídeo contida no volume unitário e geralmente referida como atividade por 1 ml.

Como ocorre com todas as especificações envolvendo radionuclídeos, é necessário declarar a data e, no caso de radionuclídeos com meia-vida curta, a hora na qual a concentração radiativa foi determinada.

**Carreador** — Isótopo estável do radionuclídeo em questão adicionado à preparação radiativa na forma química idêntica àquela na qual o radionuclídeo está presente.

**Pureza radiativa** — Razão, expressa em porcentagem, da radiatividade do radionuclídeo relacionada com o total da radiatividade da fonte.

**Pureza radioquímica** — Razão, expressa em

porcentagem, da radiatividade do radionucléido em questão presente na fonte na forma química declarada, relacionada ao total da radiatividade do radionucléido presente na fonte.

**Pureza química** — Razão, em porcentagem, da massa da substância presente na forma química declarada e o total da massa contida na fonte, desprezados excipientes ou solventes.

**Identificação de radionucléidos** — Um radionucléido é identificado pelo tempo de meia-vida, pela natureza e energia da sua radiação, conforme descrito na monografia.

**Medida do tempo de meia-vida** — A meia-vida é medida com auxílio de aparelhos de detecção, tais como câmara de ionização, contador Geiger-Mueller ou contador de cintilações. Os radiofármacos podem ser utilizados diretamente, secos, ou após diluição conveniente. A quantidade de radiatividade, consideradas as condições experimentais, deve ser suficientemente alta para permitir a detecção durante várias meias-vidas presumíveis, porém não alta demais, para evitar o fenômeno de "perda de contagens" devida, por exemplo, ao tempo morto do tubo Geiger-Mueller.

A fonte radiativa é preparada de modo a evitar perdas durante sua manipulação. Amostras líquidas devem ser examinadas e contidas em frascos ou tubos selados. Produtos sólidos devem ser protegidos por capa de folha adesiva de acetato de celulose, ou outro material cuja massa por unidade de área seja suficientemente pequena para não atenuar quantidade significativa da radiação em estudo. A mesma fonte é medida em condições geométricas idênticas e em intervalos que correspondem usualmente à metade da meia-vida e pelo tempo correspondente a, aproximadamente, três meias-vidas. O funcionamento correto do equipamento é verificado através do uso de uma fonte permanente e as variações da contagem são corrigidas, se necessário, conforme descrito em *Medida da radiatividade*. Traça-se uma curva, lançando-se o tempo no eixo das abcissas e, no eixo das ordenadas, o logaritmo do número de impulsos contados por unidade de tempo, ou a corrente elétrica, conforme o tipo do equipamento usado. A meia-vida calculada a partir desta curva não deve diferir por mais de 5% do especificado na respectiva monografia.

**Determinação da natureza e da energia da radiação** — A natureza e a energia da radiação emitida podem ser determinadas por diversos procedimentos, que incluem a elaboração da curva de atenuação e o uso de espectrometria. A curva de atenuação é usada geralmente para a determinação da energia da radiação beta; a espectrometria é usada, principalmente, para determinação da energia da radiação gama.

**Curva de atenuação** — Elaborada para emissores beta puros ou para emissores beta-gama, quando não há disponibilidade de espectrômetro de raios gama. Este método de determinação de energia

máxima da radiação beta fornece apenas valores aproximados.

A fonte, montada convenientemente para proporcionar condições geométricas constantes, é colocada em frente à janela delgada do contador Geiger-Mueller e protegida conforme descrito em *Medida do tempo de meia-vida*. A contagem da fonte é, então, medida. Entre a fonte e o contador são colocados, nesta ordem, pelo menos seis telas de alumínio, de massa crescente por unidade de área, dentro de limites tais que para o absorvedor de maior massa por unidade de área seja obtida velocidade constante de contagem. Com emissores beta puros a velocidade de contagem não é afetada pelo acréscimo de absorvedores adicionais.

Os absorvedores são inseridos de modo tal que as condições geométricas sejam mantidas constantes.

Constrói-se uma curva colocando em abcissas a massa por unidade de área do absorvedor expressa em  $\text{mg}/\text{cm}^2$  e, em ordenadas, o logaritmo do número de impulsos contados por unidade de tempo para cada um dos absorvedores utilizados. Curva idêntica é elaborada utilizando-se o padrão. O resultado é calculado em relação à parte mediana, praticamente retilínea, das curvas.

**Cálculo do coeficiente de atenuação da massa** — O coeficiente de atenuação da massa  $\mu_m$ , expresso em  $\text{cm}^2$  por mg, depende da energia da emissão beta e das propriedades físicas e químicas do absorvedor. Isto permite a identificação de emissão beta e o coeficiente é calculado, a partir de curvas construídas como descrito anteriormente, pela expressão

$$\mu_m = \frac{2,303}{m_2 - m_1} (\log A_1 - \log A_2)$$

em que

$m_1$  = massa, por unidade de área, do absorvedor mais leve,

$m_2$  = massa, por unidade de área, do absorvedor mais pesado (medir  $m_1$  e  $m_2$  dentro da parte retilínea da curva),

$A_1$  = velocidade de contagem para massa por unidade de área  $m_1$ ,

$A_2$  = velocidade de contagem para massa por unidade de área  $m_2$ .

O coeficiente de atenuação assim calculado não deve diferir por mais de 10% do coeficiente obtido em condições idênticas com o padrão do mesmo radionucléido.

**Espectrometria gama** — Baseia-se na propriedade que certas substâncias (cintiladores) têm de emitirem luz quando bombardeadas por raios gama. O número de fótons produzido é proporcional à energia absorvida pelo cintilador. A luz é transformada em impulsos elétricos de amplitude aproximadamente proporcional à energia dissipada pelos fótons gama. A análise dos impulsos de saída for-

nece, com auxílio do analisador de pulsos, o espectro de energia da fonte. Os espectros de cintilação de raios gama mostram um ou mais picos característicos correspondentes às energias da radiação gama na fonte. Estes picos são acompanhados por outros, mais ou menos largos, devidos a efeitos secundários da radiação no cintilador ou ao material em torno do mesmo. A forma do espectro varia de acordo com o equipamento utilizado, tornando-se necessário calibrá-lo com auxílio de padrão do radionuclídeo em questão.

O espectro de raios gama do radionuclídeo que os emite é próprio do mesmo, sendo caracterizado pelo número de raios gama de energia individualizada produzida por transformação. Esta propriedade pode ser utilizada para identificar quais radionuclídeos estão presentes na fonte e as quantidades de cada um deles. Possibilita, também, avaliar o grau de impurezas presentes, pela detecção dos picos estranhos àqueles esperados.

O detector preferido para a espectrometria de raios gama é um detector semiconductor de germânio ativado com lítio. Tais equipamentos podem ter resolução (largura total) do pico à meia altura máxima de 2,0 a 2,5 KeV em 1,3 MeV, possibilitando a identificação dos picos que se distanciam por 5 KeV no espectro de raios gama. Os detectores de cintilação de iodeto de sódio ativados com tálio também podem ser usados, porém, com resolução menor (50 KeV, aproximadamente). A saída de cada um destes detectores ocorre na forma de pulsos elétricos, cuja amplitude é proporcional à energia dos raios gama detectados. Após amplificação, estes pulsos são analisados em analisador multicanal, que fornece o espectro de energia gama da fonte. A relação entre energia gama e o número do canal pode ser facilmente estabelecida utilizando-se fontes de raios gama de energia conhecida. O sistema de detecção deve ser calibrado, pois a eficiência do detector é função da energia da radiação gama, da forma da fonte e da distância da fonte ao detector. A eficiência da detecção pode ser medida com auxílio de fonte calibrada do radionuclídeo em questão ou, para trabalho mais genérico, pode ser construída uma curva de eficiência versus energia gama a partir de uma série de fontes calibradas de vários radionuclídeos.

A utilização de detector de baixa resolução poderá trazer alguma dificuldade em identificar as impurezas, pois os picos no espectro podem não estar bem resolvidos. Neste caso, é recomendável a determinação da meia-vida por medidas repetitivas na amostra.

É possível estabelecer a razão do decaimento da radiatividade no espectro desde que os picos diminuam em amplitude em função da meia-vida. Se, numa fonte, a impureza radiativa de meia-vida mais longa estiver presente, a mesma é facilmente detectável pelo isolamento e identificação de

picos característicos, cujas amplitudes decrescem em velocidades diferentes daquelas do radionuclídeo esperado. A determinação da meia-vida de picos interferentes por medidas repetitivas na amostra ajudará na identificação da impureza.

**Medida da radiatividade** — A medida absoluta da radiatividade de uma amostra somente pode ser efetuada se o esquema de decaimento do nuclídeo é conhecido e está baseado no método de coincidência, no qual a emissão beta e a emissão gama são contadas em separado e em coincidência, com auxílio de equipamento apropriado. Três medidas são suficientes para determinar a eficiência dos contadores e as velocidades absolutas de desintegração. Na prática, muitas correções podem ser necessárias para obter resultados precisos.

É mais comum utilizar medidas comparativas de soluções contra fonte padrão, utilizando contador Geiger-Mueller, contador proporcional, contador de cintilação ou câmara de ionização. O contador Geiger-Mueller é utilizado para medir emissores beta e beta-gama. Contadores de cintilação e semicondutores são utilizados para medir raios gama; emissores beta de baixa energia necessitam de contador de cintilação líquido. Alternativamente, pode ser usado um instrumento calibrado pela referência a uma fonte padrão.

Qualquer que seja o equipamento usado, é essencial que se trabalhe em condições geométricas extremamente bem definidas, de modo que a fonte radiativa esteja sempre na mesma posição no aparelho e, conseqüentemente, sua distância do dispositivo de medição seja constante e permaneça a mesma, enquanto a amostra é substituída pelo padrão.

Soluções de radiofármacos contendo emissores de raios gama podem ser medidas diretamente com auxílio de aparelhos como a câmara de ionização ou detector de cintilação de poço. Entretanto, para emissores beta de energia alta e moderada podem ser empregados o contador Geiger-Mueller e o contador de cintilador de cristal plano, sendo também comum a contagem no resíduo após evaporação. Recomenda-se cobrir o resíduo seco com fita adesiva de acetato de celulose, cuja massa por unidade de área seja inferior a 10 mg por  $\text{cm}^2$ , de modo que a absorção da radiatividade seja desprezível.

O resíduo de evaporação da solução padrão deve ser tanto quanto possível idêntico ao da solução em exame, isto é, as duas soluções devem conter os mesmos sais nas mesmas concentrações e a evaporação deve ser conduzida nas mesmas condições, idênticas dimensões de superfície e de mesmo material. Quando estas precauções são tomadas os resultados obtidos são satisfatórios, qualquer que seja o equipamento. É necessário assegurar que a eficiência do equipamento de medição permaneça constante durante o tempo de medição, verificada pelo uso de fonte secundária, ou seja, radionuclídeo de vida longa.

Emissores beta de baixa energia podem ser medidos por um detector líquido de cintilações. A amostra é dissolvida na solução de uma ou mais (geralmente duas) substâncias orgânicas fluorescentes (cintiladores primários e secundários), que convertem parte da energia de desintegração em fótons de luz, os quais são detectados e convertidos em impulsos elétricos no fotomultiplicador. Quando se utiliza o contador de cintilação líquida, medidas comparativas devem ser corrigidas devido aos efeitos de interferência da luz. Medidas diretas devem ser feitas em condições que assegurem que as condições geométricas sejam constantes (volumes idênticos dos recipientes e soluções).

Todas as medidas de radiatividade devem ser corrigidas pela subtração da atividade da radiação de fundo, devida à radiatividade do meio e aos sinais espúrios gerados no próprio aparelho. Em certos equipamentos, nos quais a contagem é feita em altos níveis de atividade, a correção pode ser necessária, em razão das perdas por coincidências, devidas ao tempo de resolução do detector e do equipamento eletrônico associado.

Para sistema com tempo de paralisação fixo ( $\tau$ ), após cada contagem a correção é dada pela equação

$$N = \frac{N_0}{1 - N_0\tau}$$

em que

$N$  = contagem de velocidade por segundo,

$N_0$  = contagem por segundo medido,

$\tau$  = tempo de paralisação em segundos.

É evidente que esta correção será aceitavelmente pequena somente se o produto  $N_0\tau$  for muito pequeno. Com equipamentos mais modernos a correção é feita automaticamente. Correções da perda por coincidência devem ser feitas antes das correções para radiação de fundo.

Determinações de radiatividade mostram variações estatísticas porque estão relacionadas à probabilidade de desintegração nuclear. Número suficiente de contagens deve ser feito para compensar variações no número de desintegrações por unidade de tempo. Pelo menos 10000 registros são necessários para obter desvio padrão de não mais de 1%.

#### *Teor de radiatividade*

As quantidades de radiatividade no Sistema Internacional (SI) são medidas em unidades becquerel (Bq), que é igual a 1 transformação nuclear por segundo (equivalente a aproximadamente  $2,7 \times 10^{-11}$  curies).

A atividade decai em razão exponencial, que é característica de cada radionuclídeo. A determinação da atividade somente é verdadeira no tempo de referência especificado. A radiatividade em outros tempos pode ser calculada a partir da

equação exponencial ou pela tabela ou, ainda, pode ser obtida graficamente da curva estabelecida para cada radionuclídeo. Todas as determinações do teor de radiatividade devem ser acompanhadas de declaração da data e, se necessário, da hora em que as medidas foram feitas. A medida da radiatividade de amostra em solução é calculada em relação ao volume original da mesma e expressa por unidade de volume — concentração radiativa.

#### *Pureza radionuclídica*

Para estabelecer a pureza radionuclídica da preparação, a radiatividade e a identidade de cada radionuclídeo presente devem ser conhecidas. O método mais comumente utilizado para examinar a pureza radionuclídica é o da espectrometria gama. Não é método totalmente preciso porque as impurezas beta-emissoras geralmente não são detectáveis e, quando são empregados detectores de iodeto de sódio, os picos devidos às impurezas são freqüentemente encobertos pelo espectro do radionuclídeo principal.

A monografia estabelece as exigências gerais para a pureza radionuclídica (por exemplo, o espectro de raios gama não deve diferir significativamente daquele da fonte padrão) e pode estabelecer limites para impurezas radionuclídicas específicas (por exemplo, cobalto - 60 em cobalto - 57). Estas exigências são necessárias, embora elas por si só não sejam suficientes para assegurar que a pureza radionuclídica da preparação é suficiente para uso humano. O fabricante deve examinar seus produtos em pormenores e, especialmente, as preparações de radionuclídeos de vida curta devem ser analisadas quanto à presença de impurezas de vida longa, após período conveniente de decaimento. Desta maneira, podem ser obtidas informações sobre a conveniência dos processos de fabricação e a adequação dos procedimentos de controle.

#### *Pureza radioquímica*

A determinação da pureza radioquímica consiste na separação de substâncias químicas diferentes que o radionuclídeo contém e a medida da radiatividade ligada à substância química declarada.

Conseqüentemente, na determinação da pureza radioquímica podem ser usados todos os métodos de separação analítica. Entretanto, considerações sobre presteza e simplicidade levaram a preferir a cromatografia em papel ou em camada delgada e, em certos casos, a eletroforese em papel ou filme de acetato de celulose. Devido à radiatividade devem ser tomadas precauções adicionais.

Na cromatografia, na linha de partida deve ser depositado volume igual a  $10 \mu\text{l}$  ou menor, como descrito em procedimentos gerais.

É preferível não diluir a preparação em exame, mas é importante evitar depositar quantidade de radiatividade tal que perdas de contagem por

coincidência venham a ocorrer durante a medida da radiatividade.

Considerando as massas muito pequenas do material radiativo aplicado aos cromatogramas, o uso de carregadores é, às vezes, necessário e os mesmos podem ser adicionados quando a monografia assim o prescrever.

Após o desenvolvimento, o suporte é seco e as posições das áreas radiativas são detectadas ou pela auto-radiografia ou pela medida da radiatividade ao longo do cromatograma, com auxílio de contadores devidamente colimados, pelo corte das faixas e contagem de cada uma delas ou por qualquer outro método adequado.

As posições das manchas ou áreas permitem identificação química por comparação com soluções das mesmas substâncias químicas (não radiativas), visualizadas por reação de cor ou exame sob luz ultravioleta. A visualização pela reação de cor direta da amostra radiativa nem sempre é possível ou desejável, já que o borramento com reagente de visualização pode causar difusão da substância radiativa para além das manchas ou áreas identificadas.

Medidas de radiatividade podem ser feitas por integração, utilizando-se equipamento automático ou contador digital. As proporções das áreas abaixo dos picos fornecem as relações das concentrações radiativas das substâncias químicas. Quando as tiras são cortadas em porções, as razões das quantidades de radiatividade medidas fornecem as proporções das concentrações de espécies químicas radiativas.

#### *Atividade específica*

A atividade específica é calculada relacionando-se a concentração radiativa (radiatividade por unidade de volume) com a concentração da substância química em exame, após verificação de que a radiatividade é somente atribuível ao radionúclídeo (pureza radionuclídica) e à espécie química (pureza radioquímica) em questão.

#### *Esterilidade*

Radiofármacos para administração parenteral devem ser preparados com precauções que visem a excluir contaminação bacteriana e assegurar esterilidade, devendo corresponder ao *Teste para Esterilidade* da Farmacopéia. (V.5.1.1) Entretanto, dificuldades especiais podem surgir no caso de radiofármacos que são preparados em pequenos lotes e para os quais a execução do teste de esterilidade apresenta certo grau de risco radiológico; esta consideração especial deve ser levada em conta pelo fabricante na determinação do número de recipientes a serem testados. Por causa das características inerentes das preparações nem sempre é possível aguardar o resultado do teste de esterilidade para liberar o lote para

uso. O teste constitui controle de qualidade da produção.

#### *Pirrogênicos*

Algumas preparações devem corresponder ao teste de pirrogênio, tomando-se as precauções necessárias para evitar irradiação do pessoal envolvido no teste. Entretanto, por causa da meia-vida usualmente curta do radionúclídeo presente na preparação e da radiatividade relativamente alta que estas podem conter, é difícil realizar o teste antes da liberação do lote ao consumo. Para evitar hipertermia, que pode não ser causada pelos pirrogênicos, mas pela radiatividade da preparação, às vezes é necessário esperar até que a radiatividade tenha decaído a níveis previstos na monografia. Conduzido nestas condições, o teste constitui controle de qualidade da produção.

Recomenda-se ao produtor verificar previamente a ausência de pirrogênicos nas soluções que serão utilizadas como matéria-prima na preparação.

O teste oficial pode não ser adequado para alguns radiofármacos; por exemplo, pode não ser suficientemente sensível para aqueles destinados à administração por qualquer via que dá acesso ao fluido cerebrospinal. Neste caso o teste, após liberação ao uso, pode ser inaceitável. Nestas circunstâncias, pode ser utilizado o teste que emprega o lisado de *Limulus* do amebócito.

#### ESTABILIDADE E ARMAZENAGEM

##### *Proteção*

Os radiofármacos devem ser mantidos em recipientes bem vedados e em local suficientemente protegido para evitar irradiação do pessoal por emissões primárias ou secundárias, de acordo com regulamentos nacionais e internacionais sobre manuseio de substâncias radiativas.

O poder penetrante de cada radiação varia consideravelmente de acordo com sua natureza e energia. Partículas alfa são completamente absorvidas por espessuras de sólidos ou líquidos que variam de alguns a dezenas de micrometros; partículas beta são absorvidas completamente na espessura de alguns mm a vários cm. Raios gama não são completamente absorvidos, mas somente atenuados, e uma redução de 10 vezes pode requerer, por exemplo, alguns cm de chumbo. Quanto mais denso é o absorvente, menor é o alcance de partículas alfa e beta e maior a atenuação de raios gama.

Decomposição induzida pela radiação — As preparações de radiofármacos tendem a ser menos estáveis do que os seus correspondentes inativos, ocorrendo a sua decomposição por auto-irradiação e, por isto, devem ser utilizadas dentro de prazo curto. Os efeitos da radiação primária incluem a desintegração do átomo radiativo e a decom-

posição de moléculas quando a fração de energia de partícula emitida ou do raio gama é absorvida por estas mesmas moléculas (efeito externo). Muitos fatores estão envolvidos, incluindo a energia e a natureza da radiação, a atividade específica e o tempo de armazenagem.

Os efeitos de radiação primária podem induzir efeitos secundários devidos à formação de espécies excitadas, que podem degradar outras moléculas presentes; por exemplo, as dos solventes ou conservantes.

Também deve ser considerada a susceptibilidade à oxidação e redução de pequena quantidade de espécies químicas presentes. A exclusão inicial de todos os traços de agentes de oxidação e redução nem sempre é suficiente porque tais agentes podem formar-se continuamente, por efeitos da radiação. Por isto, o tiosulfato de sódio é incluído na solução de iodeto de sódio ( $^{131}\text{I}$ ) para manter o iodeto na forma reduzida.

Durante o armazenamento, recipientes e soluções podem escurecer devido à radiatividade emitida. Tal fato não determina, necessariamente, a deterioração da preparação.

#### Conservantes

Não é obrigatória a adição de conservantes a preparações radiofarmacêuticas apresentadas em recipientes de doses múltiplas, exceto quando especificada na monografia respectiva. Variações nas dosagens, alterações da dose com o tempo, em virtude do decaimento de radiatividade, e a necessidade de reter, dentro de recipiente próprio, qualquer material para uso futuro, requerem recipientes de doses múltiplas para muitas preparações radiofarmacêuticas. Os conservantes antimicrobianos sofrem decomposição pela influência da radiação e isto elimina seu uso para radiofármacos injetáveis. Pode ser necessário distribuir tais preparações em frascos de doses múltiplas, sem incorporação de conservantes antimicrobianos. Nestes casos, a não ser que parte do conteúdo seja usada e a retirada de doses subsequentes seja necessária, o recipiente deverá ser submetido a processo de esterilização posterior, tão logo quanto possível, após o uso inicial e em seguida a cada um dos usos subsequentes. O importante é verificar se as características do material não foram adversamente afetadas.

#### Diluições

No caso em que sejam necessárias diluições é preferível utilizar veículos de mesma composição que os presentes na preparação.

Tais veículos e todo o equipamento usado devem estar isentos de poeiras e traços de matéria orgânica.

A quantidade de material radiativo presente na preparação é, frequentemente, muito pequena para ser medida pelos métodos químicos ou físicos normais. Considerando a fórmula

$$S_{\max} = \frac{1,16 \times 10^{20} \text{ Bq g}^{-1}}{W \times t_{1/2}}$$

em que

$S_{\max}$  = atividade específica máxima,  
 $W$  = peso atômico,  
 $t_{1/2}$  = tempo de meia-vida em horas.

Verifica-se que, por exemplo, para solução de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) com a concentração radiativa de 37 MBq (1 mCi) por ml, a concentração do pertecnetato pode ser tão baixa quanto  $3 \times 10^{-10}$  g/ml.

O comportamento de massas tão pequenas em soluções muito diluídas pode requerer considerações especiais. Às vezes, a adição de carreador inerte pode ser necessária para limitar a absorção das superfícies do recipiente. Por esta razão, a injeção de fosfato de sódio ( $^{32}\text{P}$ ) requer adição de fosfato.

#### Rotulagem

O rótulo de radiofármacos deve conter as seguintes declarações:

- 1) nome sob o qual é descrito na monografia ou sinonímia aprovada;
- 2) indicação de que o produto é radiativo; a radiatividade total existente na data e hora indicadas;
- 3) para preparações líquidas, a radiatividade total do recipiente ou a concentração da radiatividade por ml, na data e hora declaradas e o volume do líquido no recipiente; para sólidos, tais como liofilizados, a radiatividade total; para cápsulas, a radiatividade de cada cápsula e o total de cápsulas por recipiente;
- 4) nome e endereço do fabricante;
- 5) referência que consiste em figuras ou letras ou ainda uma combinação de letras e figuras pela qual pode ser acompanhado o histórico da preparação;
- 6) data limite e o período de utilização do produto;
- 7) referência de que se trata de produto para uso médico;
- 8) via de administração;
- 9) nome e concentração de estabilizadores ou conservantes antimicrobianos e
- 10) condições de armazenamento.



## VIII. PRODUÇÃO DE DISCOS E METODOLOGIA PARA TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS

Os discos de sensibilidade aos antibacterianos são redondos, achatados, de papel absorvente, tendo diâmetro de 6,35 mm e espessura uniforme; contém antibacterianos distribuídos uniformemente e destinam-se a medir o nível de sensibilidade de microrganismos.

Quando outro material ou sistema (por exemplo, multidisco) for utilizado na confecção de

discos, este deverá apresentar as mesmas características e resultados daqueles oferecidos pelos discos de papel.

Para identificar o antibacteriano contido no disco são recomendados vários processos analíticos, tais como: cromatografia, eletroforese, espectrofotometria e inativação enzimática.

## VIII.1. PRODUÇÃO DE DISCOS

### *Papel absorvente*

A espessura do papel deve ser suficiente para assegurar certa rigidez ao disco e permitir completa absorção de volume de água entre 2,5 a 4 vezes o seu peso. O papel deve ser isento de substâncias inibidoras tanto para os microrganismos quanto para os antibacterianos. A codificação dos discos deve ser feita por três letras coincidentes entre os fabricantes e que identifiquem os antibacterianos neles contidos, e a tinta usada não deve interferir com a atividade dos mesmos.

A impressão da concentração do antibacteriano no disco é facultativa.

### *Concentrações dos antibacterianos nos discos*

Para a impregnação dos discos recomendam-se as concentrações especificadas na Tabela I.

A recomendação da concentração do antibacteriano no disco deve ser comprovada por trabalho científico publicado sobre o assunto. No estabelecimento da concentração, os discos impregnados devem apresentar zonas de inibição com microrganismos, inclusive contra os quais se espera que o antibacteriano seja clinicamente eficaz.

A concentração inibitória mínima (C.I.M.) deve ficar dentro de uma faixa de concentração possível de ser obtida nos fluidos e tecidos corporais durante o tratamento.

Com os microrganismos altamente sensíveis encontrados na clínica prática, os diâmetros das zonas de inibição não devem exceder 40 mm, mas de preferência não devem ultrapassar 30 mm.

Os discos devem ter concentração única; contudo, serão permitidas duas concentrações, se comprovada cientificamente sua necessidade. Neste caso, as concentrações deverão vir gravadas nos respectivos discos.

### *Antibacterianos*

A qualidade dos antibacterianos usados no preparo dos discos deve corresponder à qualidade usada na fabricação farmacêutica e deve satisfazer os requisitos da Farmacopéia Brasileira.

### *Solventes*

Os solventes aquosos ou orgânicos usados para dissolver os antibacterianos ou que agem como veículo para impregnar o papel devem estar isentos de componentes de atividade inibidora ou que possam inativar os antibacterianos, bem como afetar suas propriedades de difusão.

### *Preparação dos discos*

Os antibacterianos usados na preparação dos discos devem ser pesados analiticamente, levando em consideração suas potências em unidades internacionais ou microgramas.

As soluções alteráveis por luz e calor devem ser protegidas. A secagem dos discos deve ser feita de maneira a eliminar o solvente sem prejudicar a distribuição uniforme do antibacteriano e sem provocar perda excessiva da potência. Cada fabricante, conforme estudo de estabilidade, deverá especificar seu prazo de validade.

## VIII.2. CONTROLE DOS DISCOS

### DISCOS-PADRÃO

Cada lote de discos produzido deve ser controlado quanto à sua potência, frente a discos-padrão. Os discos-padrão são preparados com discos virgens marcados de P1 a P5, correspondentes às cinco concentrações da reta padrão (Tabela I).

Não precisam ser estéreis, mas sim isentos de contaminação. Os discos-padrão para a impregnação analítica devem ser colocados em tela de alumínio, aço inoxidável ou náilon, separadamente, de modo a facilitar a circulação de ar entre eles. A secagem é feita em ar circulante ou sob pressão reduzida. Após a secagem eles devem ser guardados por até 4 semanas, em dessecador, sob pressão reduzida.

### MEIOS DE CULTURA

Na preparação das placas para a dosagem dos discos, podem ser usados meios de cultura preparados a partir de componentes individuais ou meios desidratados; neste caso, após a suspensão em água destilada, sua composição deve ser a mesma daquele preparado com os componentes individuais.

Nas dosagens são usados os seguintes meios:

#### Meio de cultura A

Peptona	6,0 g
Caseína de digestão pancreática	4,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Extrato de carne	1,5 g
Dextrose	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1.000 ml

pH 6,5 a 6,6 após a esterilização

#### Meio de cultura B

Idêntico ao meio A, porém acrescido de 300 mg por litro de sulfato de manganês hidratado.

#### Meio de cultura C

Idêntico ao meio A, exceto que o pH final deve ser ajustado entre 7,9 e 8,1 após a esterilização.

#### Meio de cultura D

Peptona	5,0 g
Extrato de levedura	1,5 g
Extrato de carne	1,5 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Dextrose	1,0 g
Fosfato de potássio dibásico	3,68 g
Fosfato de potássio monobásico	1,32 g
Água	1.000 ml

pH 7,0 após a esterilização

#### Meio de cultura E

Peptona	6,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Extrato de carne	1,5 g
Ágar	15,0 g
Água	1.000 ml

pH 6,5 a 6,6 após a esterilização

#### Meio de cultura F

Caseína de digestão pancreática	17,0 g
Soja de digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Ágar	20,0 g
Água	1.000 ml

pH 7,3 após a esterilização

#### Meio de cultura G

Idêntico ao meio F, exceto:

Ágar	12,0 g
Polissorbato 80 (estéril)	10,0 g

Adicionar o polissorbato 80 após a fervura

#### Meio de cultura H

Peptona	6,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Extrato de carne	1,5 g
Dextrose	1,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1.000 ml

pH 6,6 após a esterilização

#### Meio de cultura I

Caseína de digestão pancreática	15,0 g
Soja de digestão papaínica	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar	15,0 g
Água	1.000 ml

pH 7,3 após a esterilização

#### Meio de cultura J

Caseína de digestão pancreática	17,0 g
Soja de digestão papaínica	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Água	1.000 ml

pH 7,3 após a esterilização

### SUSPENSÕES DOS MICRORGANISMOS PARA TESTE

Os microrganismos utilizados nas metodologias de dosagem dos discos são aqueles recomendados

pelo ATCC, INCQS, NCTC e NCYC, cujos endereços constam em "Ensaio Microbiológico de Antibióticos". Como referência básica foram listados os microrganismos da ATCC (American Type Culture Collection dos EUA).

#### Suspensão nº 1

*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P)

Manter o microrganismo em meio de cultura *A* inclinado repicando-o, semanalmente. Antes da preparação da suspensão estoque, inocular um tubo com meio de cultura *A* inclinado e incubar a 32-35 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de solução fisiológica estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura *A*, contido em garrafa de Roux. Incubar por 24 horas a 32-35 °C. Colher o crescimento da superfície da garrafa com 50 ml de solução fisiológica e contas de vidro estéreis. Padronizar esta suspensão estoque de modo a obter 20% de transmitância em comprimento de onda de 580 nm. Guardar a suspensão estoque em refrigerador por uma semana.

#### Suspensão nº 2

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 1, exceto que a padronização da suspensão estoque é feita indiretamente, através de diluição de 1:10 com solução fisiológica estéril que venha a fornecer 20% de transmitância em 580 nm. Ajustar a suspensão estoque se for o caso, baseando-se na diluição de 1:10. Como inóculo não usar esta diluição e sim a suspensão estoque ajustada indiretamente.

#### Suspensão nº 3

*Staphylococcus aureus* (ATCC 13150)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 1, exceto que a padronização da suspensão inóculo preparada diariamente a partir de suspensão estoque é feita de modo a obter 80% de transmitância em 580 nm.

#### Suspensão nº 4

*Micrococcus luteus* (ATCC 9341)

Manter o microrganismo em meio de cultura *A* inclinado, repicando-o quinzenalmente. Antes da preparação da suspensão estoque, inocular em tubo com meio de cultura *A* inclinado e incubar a 26 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 a 4 ml de meio de cultura *D*, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura *A*, contido em garrafa de Roux. Incubar a 26 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície da garrafa com 15 ml de meio de cultura *D* e contas de vidro estéreis. Diluir em 1:10 uma alíquota da suspensão estoque com meio de cultura *D* para

fornecer 10% de transmitância em 580 nm. Quando isto ocorrer, a suspensão estoque é considerada satisfatória para o uso; caso contrário, ajustar a suspensão estoque e proceder à nova diluição de 1:10. Obtida a transmitância recomendada, usar como inóculo a suspensão estoque e não a suspensão de 1:10. Renovar a suspensão estoque quinzenalmente, se guardada em refrigerador.

#### Suspensão nº 5

*Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Manter o microrganismo em meio de cultura *A* inclinado, repicando-o semanalmente. Preparar a suspensão de esporos inoculando um tubo com meio inclinado *A* e incubando-o a 37 °C por 16 a 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de solução fisiológica estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura *B*, contido em garrafa de Roux. Incubar por 5 dias a 37 °C. Colher o crescimento de superfície com 50 ml de solução fisiológica e contas de vidro estéreis. Centrifugar e decantar o líquido sobrenadante. Reconstituir o sedimento e aplicar choque térmico na suspensão, aquecendo-a por 30 minutos a 70 °C. Guardar a suspensão de esporos em refrigerador por três meses. Não há necessidade de acerto de transmitância.

#### Suspensão nº 6

*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)

Manter o microrganismo em meio de cultura *A* inclinado, repicando-o semanalmente. Inocular um tubo com meio de cultura *A* inclinado recém-preparado, e incubar a 32-35 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de solução fisiológica estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura *A*, contido em garrafa de Roux. Incubar por 24 horas a 32-35 °C. Colher o crescimento de superfície da garrafa com 50 ml de solução fisiológica e contas de vidro estéreis. Padronizar a suspensão estoque de modo a obter 80% de transmitância em 580 nm e mantê-la em refrigeração por uma semana.

#### Suspensão nº 7

*Bordetella bronchiseptica* (ATCC 4617)

Manter o microrganismo em meio de cultura *F* inclinado, repicando-o quinzenalmente. Inocular um tubo com meio de cultura *F* inclinado, recém-preparado e incubar a 37 °C por 16-24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de água estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura *F*, contido em garrafa de Roux. Incubar por 24 horas a 37 °C. Colher o crescimento de superfície com 50 ml de água e contas de vidro

estéreis. Padronizar a suspensão estoque de modo a fornecer 50% de transmitância em 580 nm e mantê-la em refrigerador por quinze dias.

#### Suspensão nº 8

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 1, exceto que a padronização da suspensão estoque é feita para obter 80% de transmitância em 580 nm.

#### Suspensão nº 9

##### *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031)

Manter o microrganismo não capsulado em meio de cultura A inclinado, repicando-o semanalmente. Inocular um tubo com meio de cultura A inclinado, recém-preparado, e incubar a 32-35 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de solução fisiológica estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura A, contido em garrafa de Roux. Incubar por 24 horas a 32-35 °C. Colher o crescimento de superfície com 50 ml de solução fisiológica e contas de vidro estéreis. Diluir em 1:10, também em solução fisiológica estéril, alíquota da suspensão estoque de modo a fornecer 40% de transmitância em 580 nm. Quando esta transmitância for obtida, usar como inóculo a suspensão estoque ajustada e não a diluição de 1:10. Guardar a suspensão estoque em refrigerador por não mais que uma semana.

#### Suspensão nº 10

##### *Streptococcus faecalis* (ATCC 14506)

Manter o microrganismo em meio de cultura E inclinado, repicando-o semanalmente. Inocular um tubo com meio inclinado, recém-preparado, e incubar a 37 °C durante 24 horas. Colher o crescimento do tubo inclinado com 3 ml de meio J e completar o volume para 10 ml com o mesmo meio J. Incubar o caldo por 16-18 horas a 37 °C e, em seguida, conservar em refrigerador por não mais que uma semana. A suspensão inóculo será obtida acertando a transmitância do caldo para 80% em 650 nm, tendo como controle o próprio meio.

#### Suspensão nº 11

##### *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619)

Manter o microrganismo em meio de cultura I inclinado, repicando-o semanalmente. Inocular um tubo com meio de cultura I inclinado, recém-preparado, e incubar a 37 °C por 24 horas. Colher o crescimento de superfície do meio inclinado com 3 ml de solução fisiológica estéril, espalhando este volume sobre a superfície de 250 ml de meio de cultura I, contido em garrafa de Roux. Incubar por 24 horas a 37 °C. Colher o crescimento de superfície com 30 ml de meio de cultura J e contas de vidro estéreis. Não há necessidade de padronizar

esta suspensão estoque. Guardar em refrigerador por 2 semanas.

#### Suspensão nº 12

##### *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 8.

#### Suspensão nº 13

##### *Staphylococcus aureus* (ATCC 13150)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 3, exceto que a padronização de suspensão estoque é feita para fornecer 20% de transmitância.

#### Suspensão nº 14

##### *Bacillus pumilus* (ATCC 14884)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 1, exceto que a padronização da suspensão estoque é feita para fornecer 40% de transmitância.

#### Suspensão nº 15

##### *Escherichia coli* (ATCC 11105)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 8.

#### Suspensão nº 16

##### *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Seguir o mesmo procedimento da suspensão nº 1.

### PREPARAÇÃO DAS PLACAS

#### a) Camada Base

A cada placa de Petri (20 x 150 mm), adicionar 42 ml de meio de cultura fundido conforme especificado na Tabela 2. Deixar o meio solidificar em superfície plana, mantendo as tampas das placas de um lado, com pequena abertura para a evaporação da água de condensação.

#### b) Camada de Superfície

Fundir, esfriar a 48 °C e inocular o meio de cultura de superfície especificado na Tabela 2. Homogeneizar o meio de cultura inoculado e distribuir 8 ml sobre o meio base, mantendo as placas em superfície plana. Evitar as gotículas de água de condensação sobre a superfície do meio.

#### c) Deposição dos Discos

Depositar sobre a superfície do meio de cultura, com o auxílio de pinça, os discos do padrão e da amostra, fazendo leve pressão sobre eles para melhor aderência. Usar três placas, depositando, alternadamente, em cada uma delas, os cinco discos referentes ao padrão e os dois discos referentes ao lote sob teste.

Incubar as placas por uma noite a 32-37 °C.

Após a incubação, proceder às leituras dos halos de inibição com o auxílio de projetor óptico, régua milimetrada ou paquímetro. O cálculo é feito tirando-se a média das três leituras de cada concentração do padrão e a média das seis leituras da amostra sob teste. Marcam-se os resultados na escala aritmética do papel semilogarítmico, sendo que as concentrações dos antibacterianos são anotadas em escala logarítmica.

Usar a seguinte equação para calcular a melhor reta:

$$B = (3a + 2b + c - e)/5$$

$$A = (3e + 2d + c - a)/5$$

em que

B = Média da mais baixa concentração da "reta" padrão,

A = Média da mais alta concentração da "reta" padrão,

a, b, c, d, e, = Média das zonas de inibição de cada concentração, sendo que a corresponde à menor concentração e e à maior concentração da "reta" padrão, respectivamente.

Marcar os dois pontos B e A no papel semilogarítmico e uni-los com uma reta.

A média das 6 leituras da amostra lida na "reta" padrão corresponderá à concentração do antibacteriano contido nos discos sob teste.

#### LIMITES

Os discos são considerados satisfatórios quando os resultados obtidos se encontrarem dentro dos limites de 75 a 150% da potência assinalada no rótulo. A homogeneidade do lote é considerada satisfatória se em seis discos do primeiro ou segundo teste da amostra a diferença entre a maior e a menor zona de inibição obtida não ultrapassar o limite de 2,5 mm, ou se o mesmo número de zonas fora do limite em três ou mais testes consecutivos não for mais que 10% do total de discos testados.

#### AMOSTRAS

De cada lote fabricado retirar quantidade de amostras, necessárias ao controle de qualidade e ao controle de referência. Estas permanecerão armazenadas durante o período de validade do produto.

#### ROTULAGEM

Todos os produtos devem estar nitidamente identificados por rótulos. Na etiqueta afixada à embalagem dos discos devem constar os seguintes dados: nome do produto, quantidade de discos em cada embalagem, concentração do antibacteriano por disco, nome e endereço do fabricante, responsável técnico, número e validade do lote, condições de armazenagem e os dizeres "para uso exclusivo em laboratório".

Tabela I - Concentração de antibacterianos em discos, solventes utilizados e reta padrão para controle

Antibacterianos	Cod. / Conc. µg ou U.I.	Solventes	Reta Padrão - Conc./Disos
Amicacina, sulfato	AMI-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Amoxicilina	AMO-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 µg
Ampicilina	AMP-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 µg
Becitracina	BAC-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 U.I.
Becanamicina	BEC-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Benzilpenicilina	PEN-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 U.I.
Canamicina, sulfato	CAN-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Carbencilina	CAR-100	álcool metílico	12,8 23,7 43,8 81,1 150,0 µg
Cefaclor	CFC-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefadroxila	CFD-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefalexina	CFE-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefaloridina	CFA-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefalotina	CFL-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefapirina	CFP-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefazolina	CFZ-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefotaxima	CTX-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefoxitina	CFO-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefradina	CFI-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Cefuroxima	CRX-30	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Clindamicina	CLI-2	álcool metílico 50%	1,0 1,41 2,0 2,82 4,0 µg
Cloranfenicol	CLO-30	álcool metílico 50%	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Colistina, sulfato	COL-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 µg
Dicloxacilina	DIC-1	água	0,71 1,0 1,41 2,0 2,82 µg
Doxiciclina	DOX-30	álcool metílico	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Eritromicina	ERI-15	álcool metílico	1,3 2,7 5,4 11,0 22,5 µg
Espiramicina	ESP-100	álcool metílico	12,8 23,7 43,8 81,1 150,0 µg
Estreptomicina, sulfato	EST-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 µg
Fosfomicina*	FOS-50	água	25,0 35,5 50,0 70,7 100,0 µg
Gentamicina, sulfato	GEN-10	água	5,0 7,1 10,0 14,1 20,0 µg
Hetecilina	HET-10	água	1,3 2,4 4,4 8,1 15,0 µg
Lincomicina	LIN-2	álcool metílico 50%	1,0 1,41 2,0 2,82 4,0 µg
Minociclina	MIN-30	álcool metílico	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Nalidíxico, ácido	NAL-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Neomicina, sulfato	NEO-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Netilmicina	NET-30	álcool metílico 50%	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Nitrofurantoina	NIT-300	N,N-dimetilformamida	33,0 63,0 122,0 234,0 450,0 µg
Novobiocina sódica	NOV-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Oxacilina sódica	OXA-1	água	0,71 1,0 1,41 2,0 2,82 µg
Pipemídico, ácido	PIP-20	álcool metílico 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Piromídico, ácido*	PIR-50	álcool metílico 50%	25,0 35,5 50,0 70,7 100,0 µg
Polimixina B, sulfato	POL-300	água	33,0 63,0 122,0 234,0 450,0 U.I.
Ribostamicina	RIB-50	água	25,0 35,5 50,0 70,7 100,0 µg
Rifamicina B	RFM-30	álcool metílico	3,0 6,0 12,0 24,0 48,0 µg
Rifampicina*	RIF-30	álcool metílico	3,0 6,0 12,0 24,0 48,0 µg
Rifampicina	RIF-5	álcool metílico	3,0 6,0 12,0 24,0 48,0 µg
Rifampicina + Trimetoprima*	RIT-35	álcool metílico	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Sisomicina	SIS-10	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Sulfametoxazol + Trimetoprima*	SUT-25	acetona 50%	15,0 21,2 30,3 42,4 60,0 µg
Sulfonamidas	SUL-300	álcool metílico 50%	33,0 63,0 122,0 234,0 450,0 µg
Tetraciclina	TET-30	álcool metílico	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg
Tobramicina	TOB-10	água	5,0 7,1 10,0 14,1 20,0 µg
Trimetoprima	TRI-5	álcool metílico	3,0 6,0 12,0 24,0 48,0 µg
Vancomicina	VAN-30	água	3,3 6,3 12,2 23,4 45,0 µg

- \* FOS-50 : Adicionado de 50 µg de glicose-6-fosfato
- \* PIR-50 : Ácido piromídico 25 µg + ácido beta-hidroxipirromídico 25 µg
- \* RIF-30 : Outros microrganismos que não *N. meningitidis*
- \* RIT-35 : Rifampicina 30 µg + trimetoprima 5 µg
- \* SUT-25 : Sulfametoxazol 23,75 µg + trimetoprima 1,25 µg
- \* SUL-300 : Sulfonamidas - disco preparado com sulfadiazina

Tabela 2 – Meios de cultura, suspensões bacterianas e inóculos recomendados no controle de discos antibacterianos

<i>Antibacterianos</i>	<i>ml da suspensão p/100 ml/meio</i>	<i>Nº da suspensão</i>	<i>Camada base</i>	<i>Camada superfície</i>
Amicacina, sulfato	0,2 – 0,7	13	C	C
Amoxicilina	5,5 – 6,5	13	E	A
Ampicilina	0,5 – 1,5	3	E	A
Bacitracina	0,5 – 1,5	3	E	A
Becanamicina	0,2 – 0,7	1	E	A
Benzilpenicilina	0,5 – 1,5	3	E	A
Canamicina, sulfato	0,5 – 1,5	8	E	A
Carbenicilina	2,5 – 3,5	11	F	G
Cefaclor	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefadroxila	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefalexina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefaloridina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefalotina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefapirina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefazolina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefotaxima	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefoxitina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefradina	0,5 – 1,5	9	E	A
Cefuroxima	0,5 – 1,5	16	E	A
Clindamicina	0,2 – 0,7	3	C	C
Cloranfenicol	3,5 – 4,5	4	E	A
Colistina, sulfato	0,5 – 1,5	7	F	G
Dicloxacilina	2,5 – 3,5	13	E	A
Doxiciclina	1,0 – 2,0	1	E	A
Eritromicina	1,5 – 2,5	10	C	C
Espiramicina	1,5 – 2,5	5	C	C
Estreptomomicina, sulfato	2,5 – 3,5	1	C	C
Fosfomicina	4,5 – 5,5	12	C	C
Gentamicina, sulfato	0,2 – 0,7	13	C	C
Hetacilina	4,5 – 5,5	3	E	A
Lincomicina	0,2 – 0,7	3	C	C
Minociclina	1,0 – 2,0	1	E	A
Nalidíxico, ácido	2,5 – 3,5	12	C	C
Neomicina, sulfato	2,0 – 3,0	6	C	C
Netilmicina	0,2 – 0,7	13	C	C
Nitrofurantoina	0,2 – 0,7	13	C	C
Novobiocina sódica	3,5 – 4,5	5	E	A
Oxacilina sódica	1,5 – 2,5	13	E	A
Pipemídico, ácido	0,2 – 0,7	5	C	C
Piromídico, ácido	2,5 – 3,5	12	C	C
Polimixina B, sulfato	0,5 – 1,5	7	F	G
Ribostamicina	2,5 – 3,5	6	C	C
Rifamicina B	0,5 – 1,5	5	E	A
Rifampicina*	0,5 – 1,5	5	E	A
Rifampicina + Trimetoprima	3,5 – 4,5	5	E	A
Sisomicina	0,2 – 0,7	13	C	C
Sulfametoxazol + Trimetoprima	2,5 – 3,5	14	C	C
Sulfonamidas**	2,5 – 3,5	15	F	G
Tetraciclina	1,0 – 2,0	1	E	A
Tobramicina	0,2 – 0,7	3	C	C
Trimetoprima	2,5 – 3,5	14	C	C
Vancomicina	0,5 – 1,5	6	C	C

\* Rifampicina 30 mcg e 5 mcg

\*\* Teste com sulfadiazina



**IX. RECIPIENTES E MATERIAIS  
EMPREGADOS NA SUA FABRICAÇÃO**

## IX.1. MATERIAIS EMPREGADOS NA FABRICAÇÃO DE RECIPIENTES

Os materiais descritos a seguir são empregados na fabricação de recipientes destinados a uso farmacêutico.

### IX.1.1. MATERIAL PLÁSTICO

#### MÉTODOS GERAIS DE ANÁLISE DE MATERIAL PLÁSTICO

##### LIMPIDEZ E GRAU DE OPALESCÊNCIA DE SOLUÇÕES

Existem dois procedimentos para esta determinação.

##### Método A

Em tubos de ensaio de vidro neutro com diâmetro interno de 12 mm, comparar 2,0 ml do líquido em análise e 2,0 ml de líquido padrão recém-preparado como descrito a seguir. Cinco minutos após a preparação do mesmo, a comparação é efetuada em ambiente escuro sob feixe luminoso lateral, proveniente de lâmpada elétrica que forneça claridade de 1000 luz a 1 m de distância.

##### Método B

Em tubos de ensaio de vidro neutro com diâmetro interno de 16 mm de fundo chato, comparar 10 ml do líquido em análise com 10 ml de solução padrão recém-preparada como descrito a seguir. Cinco minutos após a preparação da mesma efetuar a comparação sobre fundo negro observando na direção do eixo no tubo.

##### Expressão dos resultados

Um líquido é considerado:

**Límpido**, se a limpidez corresponde à da água ou do solvente usado nas condições de operação.

**Muito fracamente opalescente**, se sua opalescência não é mais pronunciada que a da solução A<sub>1</sub> ou B<sub>1</sub>.

**Fracamente opalescente**, se sua opalescência não for mais intensa que a da solução A<sub>2</sub> ou B<sub>2</sub>.

**Opalescente**, se sua opalescência não for mais intensa que a da solução A<sub>3</sub> ou B<sub>3</sub>.

**Muito opalescente**, se sua opalescência não for mais intensa que a da solução A<sub>4</sub> ou B<sub>4</sub>.

##### Reativos

Solução de cloreto de sódio 0,2 M; dissolver 11,7 g de cloreto de sódio em água e completar para 1000 ml.

Diluição I de cloreto: 10 ml de solução 0,2 M de cloreto de sódio e completar para 100 ml com água (7,10 mg de Cl/l).

Diluição II de cloreto: 20 ml de diluição I e completar para 100 ml com água (14,2 mg de Cl/l).

Diluição III de cloreto: 1,0 ml de diluição I e completar para 100 ml com água (0,71 mg de Cl/l).

##### Solução padrão

Preparar as soluções padrão de acordo com o quadro que segue, evitando agitação.

	A <sub>1</sub> ml	B <sub>1</sub> ml	A <sub>2</sub> ml	B <sub>2</sub> ml	A <sub>3</sub> ml	B <sub>3</sub> ml	A <sub>4</sub> ml	B <sub>4</sub> ml
Diluição III	0,05	0,25	0,75	3,75				
Diluição II					0,15	0,75	0,25	1,25
Ácido nítrico diluído (R)	1,0	5,0	1,0	5,0	1,0	5,0	1,0	5,0
Água	0,75	3,75	0,05	0,25	0,65	3,25	0,55	2,75
Solução de nitrato de prata (R <sub>2</sub> )	0,2	1,0	0,2	1,0	0,2	1,0	0,2	1,0

**ENSAIO POR COMBUSTÃO EM  
ATMOSFERA DE OXIGÊNIO (Br, Cl, F, I, S)**

Reduzir a amostra a pequenos fragmentos a partir da tomada de ensaio (p) indicada na monografia. Colocar este material no centro de papel de filtro de 10 a 15 cm<sup>2</sup>, que foi previamente embebido, em sua parte mediana, com solução saturada de carbonato de lítio e seco em estufa. Embalar a amostra e colocar no porta-amostra de platina existente na haste da tampa do balão de Schöniger de 500 ml. Colocar no balão água ou solução absorvente, conforme indicado na monografia. Substituir o ar do frasco por oxigênio e tampá-lo. Acender pequena chama na borda da embalagem da amostra e rapidamente trocar as tampas, ou seja, colocar a tampa com haste e porta-amostra e manter o frasco firmemente fechado durante a combustão. Deixar que a embalagem caia no meio absorvente para que se tenha a totalidade dos produtos de combustão. Resfriar e lavar as paredes do frasco com água. Em se tra-

tando de doseamento de cloro, tomar a amostra indicada na monografia e usar 20 ml de hidróxido de sódio M. Como meio de aborção adicionar 2,5 ml de ácido nítrico SR, 2,5 ml de água, 10 ml de nitrato de prata 0,1 M, 5 ml de solução de sulfato férrico amoniacal 10% (p/V) e 1 ml de nitrobenzeno. Titular pelo tiocianato de amônio 0,05 M até coloração amarelo-avermelhada. Fazer ensaio em branco nas mesmas condições. A porcentagem de cloro presente na amostra é dada pela equação.

$$\% \text{ Cl} = \frac{(n_2 - n_1) \cdot 0,1773}{p}$$

em que

p = massa, em mg, da tomada de ensaio,

0,1773 = equivalente de cloreto.

n<sub>2</sub> = ml gastos na titulação da tomada de ensaio,

n<sub>1</sub> = ml gastos na titulação do branco

## IX. 1.1.1 – MATERIAIS PLÁSTICOS À BASE DE CLORETO DE POLIVINILA (PVC)

Os materiais plastificados à base de cloreto de polivinila são constituídos de polímeros obtidos por policondensação em massa ou polimerização em suspensão do cloreto de vinila em presença de adjuvantes diversos com propriedades plastificantes, estabilizantes, lubrificantes, antioxidantes e assim por diante. Suas características são variáveis, dependendo da composição qualitativa e quantitativa das misturas utilizadas e das condições de fabricação e usinagem.

Os materiais à base de PVC para uso farmacêutico e médico são definidos pela natureza dos seus componentes, dentro de especificações que variam em função de sua utilização. Eles devem encerrar de 35 a 75% de cloreto de polivinila.

Não devem conter outros adjuvantes além de ésteres dos ácidos cítrico, adipico ou ftálico com o álcool até 50%. Contudo, o material usado em recipientes para coleta, conservação, tratamento e administração de sangue e seus derivados deve atender às especificações da monografia.

Pequenas quantidades de octanoato de zinco, fosfito de dinonil-2,4-fenila e de nonil-4-fenila, óleo de vaselina e estearato de zinco e de cálcio (cada um em proporção inferior a 1%) são permitidas, bem como até 6% de óleo de soja epoxidado, correspondendo de 6 a 8% em epóxido e com índice de iodo inferior ou igual a 6.

*Características*

Pó, esferas, grânulos, folhas translúcidas de espessura variável ou objetos manufaturados incolores; por combustão libera vapores negros espessos com odor ácido picante.

*Identificação*

**Preparação das soluções para testes** – As amostras a serem analisadas devem, se necessário, ser divididas em pedaços medindo 1 x 1 cm, aproximadamente.

**Extração pelo tetraidrofurano** – Pesar 5 g de material e transferir para balão com junta esmerilhada, juntar 50 ml de tetraidrofurano e conectar condensador para refrigeração. Manter sob agitação constante até dissolução. A solução pode ficar ligeiramente opalescente. Resfriar com banho de gelo e juntar, sob agitação, 100 ml de etanol. Deixar decantar, filtrar ou centrifugar o líquido sobrenadante. Recolher o precipitado (A) e o filtrado (B).

*Solução A*

Purificar cerca de 0,5 g do precipitado (A) por dissolução em 5 ml de tetraidrofurano e precipitação por adição sucessiva de 20 ml de etanol

sob agitação. Recolher o precipitado (A) por filtração e dissolvê-lo em 5 ml de tetraidrofurano. Evaporar o filtrado (B), cuidadosamente, ou em evaporador rotativo, até consistência xaroposa (1 a 3 ml). Retomar o resíduo com 10 ml de cloreto de metileno.

*Teste*

1) Em cela de cloreto de sódio para espectrofotometria no infravermelho (V. 2.14) colocar algumas gotas da solução A, evaporar até secura em estufa a 105 °C e traçar o espectro infravermelho. O espectro deve corresponder ao do cloreto de polivinila padrão;

2) Com a solução B proceder nas condições do item 1 e traçar o espectro de absorção no infravermelho, comparando o espectro obtido com ftalato, adipato ou citrato de dioctila. O espectro deve corresponder ao do padrão utilizado;

3) Introduzir 5 ml da solução B em coluna cromatográfica de 20 mm de diâmetro contendo 60 g de sílica-gel. Eluir com 750 ml de cloreto de metileno, seguido de 250 ml de acetona. Recolher o eluato acetônico, evaporar até secura e transferir a amostra para cela de cloreto de sódio com o fim de determinar o espectro de absorção no infravermelho. O espectro obtido deve corresponder ao do óleo de soja epoxidado.

**ENSAIO****SOLUÇÃO S<sub>1</sub>**

Aquecer sob refluxo, durante 5 horas, 25 g do material em 500 ml de água. Resfriar e decantar para eliminar a massa residual do material.

*Aspecto da solução*

A solução S<sub>1</sub> deve ser límpida e incolor sem apresentar odor de álcool graxo (IX.1.1-Método B).

*Absorção no ultravioleta*

Evaporar até secura 100 ml da solução S<sub>1</sub> e retomar este resíduo com 5 ml de hexano. Traçar o espectro de absorção entre 250 e 310 nm. A extinção no máximo de absorção não deve ser superior a 0,25.

*Poder tampão*

Utilizar a solução S<sub>1</sub> e proceder como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1.).

**Substâncias redutoras**

Utilizar a solução S<sub>1</sub> e proceder como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade. Deve-se gastar, no máximo, 3 ml de KMnO<sub>4</sub> 0,01 M por g de material.

**SOLUÇÃO S<sub>2</sub>**

Mineralizar 2,5 g do material, utilizando 15 ml de ácido sulfúrico e aquecer até obtenção de massa xaroposa negra. Após resfriamento, adicionar, com cautela, 5 ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio. Aquecer moderadamente e alternar evaporação e adição de peróxido até obtenção de líquido incolor. Concentrar até volume aproximado de 5 ml, resfriar e transferir para balão volumétrico de 25 ml, completando o volume com água.

**Estanho**

A 10 ml da solução S<sub>2</sub> adicionar 0,3 ml de ácido tioglicólico e 30 ml de água. Homogeneizar e adicionar 2 ml de solução de laurilsulfato de sódio SR, 1 ml de reativo de "ditiol" (tolueno-3,4-ditiol) e completar a 50 ml com água. Após 15 minutos a coloração não deve ser mais intensa que a de um padrão preparado a partir de 10 ml de ácido sulfúrico diluído a 1:5 (V/V) adicionado de 10 ml de solução de estanho de 5 ppm (50 ppm).

**Metais pesados**

A 10 ml de solução S<sub>2</sub> adicionar 2 gotas de fenoltalcina SI e solução de hidróxido de sódio concentrado  $\cong$  SR até fraca coloração rósea. Completar o volume para 20 ml com água. Adicionar 2 ml de solução tampão pH 3,5 SR e 1,2 ml de reativo de tioacetamida SR. Agitar e deixar repousar por 2 minutos. A coloração castanha não deve ser mais intensa que a obtida com 5 ml de solução de chumbo de 10 ppm adicionada a 15 ml de água (50 ppm). A coloração amarela da solução não deve ser mais intensa do que a obtida com 2 ml de solução com 5 ppm de cádmio adicionada de 18 ml de água (10 ppm).

**Zinco**

Tomar 10 ml da solução S<sub>2</sub> diluída a 1:200 (V/V) em água e adicionar 5 ml de solução tampão de acetato pH 4,4, 1 ml de solução de tiosulfato de sódio 0,05 M SV e 5,0 ml, exatamente medidos, de solução diluída de ditizona (0,0008%) SR. Agitar e examinar após 2 minutos a coloração da fase orgânica. Simultaneamente, efetuar o ensaio com padrão preparado a partir de 1 ml de solução a 10 ppm de zinco SR e 9 ml de água e outro ensaio em branco com 10 ml de água. Se a fase orgânica tornar-se levemente violeta, a

intensidade da coloração deve ser inferior à do padrão.

**Bário**

Em cadinho de sílcio, calcinar 2 g de material, e retomar o resíduo com 10 ml de ácido clorídrico, evaporando até secura em banho-maria. Por duas vezes este resíduo é retomado cada vez com 1 ml de água. Filtrar e adicionar 3 ml de solução de sulfato de cálcio SR. Preparar um padrão a partir de 1,2 ml de solução de bário com 50 ppm (SP), adicionado de 0,8 ml de água e 3 ml de solução saturada de sulfato de cálcio SR (30 ppm). A turvação obtida na amostra não deve ser superior à do padrão.

**Fósforo total**

Calcinar em cadinho de platina 0,25 g de material em presença de 0,5 g de carbonato de sódio anidro. Deixar resfriar e retomar o resíduo com água. Transferir para balão volumétrico de 50 ml, lavando o cadinho. Acidificar com ácido sulfúrico a 60%, até que não ocorra mais efervescência. Completar o volume para 50 ml com água. A 20 ml desta solução adicionar 25 ml de reativo molibdovanádico SR e completar a 50 ml com água. Preparar padrão a partir de 1 ml de solução de fosfato monopotássico a 0,0219% (p/V) adicionado de 10 ml de água e 25 ml de reativo molibdovanádico. Completar para 50 ml com água. Se a solução em análise tomar coloração amarela, esta não deve ser mais intensa que a obtida com o padrão (500 ppm).

**Cloreto de vinila (monômero)**

Determinar por cromatografia a gás (V.2.17.5), utilizando heptano como padrão interno.

**Preparação das soluções da amostra**

Utilizar 2 frascos de 7 ml e para cada um deles transferir tomada de amostra compreendida entre 0,950 e 1,050 g. Adicionar em um dos frascos 5 ml de solução de heptano a 0,003% (p/V) em acetato de etila e, no segundo frasco, 5 ml de solução de heptano a 0,0003% (p/V) em acetato de etila. Fechar os frascos e deixar em repouso durante 16 horas à temperatura ambiente.

**Preparação das soluções padrão**

a) Solução de cloreto de vinila a 1,200 g/1000 ml (efetuar esta manipulação em capela com exaustão):

Pesar frasco de 50 ml, com tampa, contendo 50 ml de acetato de etila. Encher seringa plás-

tica (polietileno ou polipropileno) com cloreto de vinila e deixar permanecer em contacto durante alguns minutos. Esvaziá-la, colocando a seguir mais 50 ml do mesmo gás. Adaptar agulha hipodérmica e acertar o volume para 25 ml. Injetar lentamente este volume no frasco previamente pesado, agitando para facilitar a dissolução e evitando contacto entre o líquido e a agulha. Pesar o frasco e calcular o teor de cloreto de vinila da solução obtida, expresso em g do monômero cloreto de vinila por ml (p/V) (50 ml da solução obtida contém, aproximadamente, 0,06 g de cloreto de vinila).

b) Solução padrão, diluição nº 1

Utilizar 4 frascos de 7 ml contendo cada um 5 ml de heptano a 0,003% (p/V) em acetato de etila. Tomar três deles e injetar respectivamente 25, 100 e 200  $\mu$  da solução a 1,2 g/1000.

c) Solução padrão, diluição nº 2

Utilizar cinco frascos de 7 ml contendo cada um 5 ml de solução de heptano a 0,0003% (p/V) em acetato de etila. A cada quatro deles injetar, respectivamente, 2, 5, 10 e 25  $\mu$ l da solução a 1,2 g/1000.

Injetar sucessivamente 2 ml de cada uma das soluções padrão de diluições 1 e 2. O teor de cloreto de vinila da amostra examinada deve ser inferior a 1 ppm.

*Condições de operação*

Coluna em aço inoxidável de 3 m de comprimento e 3 mm de diâmetro externa cheia com polietilenoglicol\* 20 M a 10% p/p em suporte de terra de diatomáceas calcinada (80-100 °C).

Temperatura: injetor 200 °C; detector 150 °C; coluna 60 °C durante 2 minutos e subsequente elevação de 15 °C por minuto até 110 °C. Manter a 100 °C durante 4 minutos.

Gás de arraste: nitrogênio (40 ml/min).

Detector de ionização de chama.

*Ensaio*

Pesar exatamente cerca de 0,05 g de material em análise para determinação do cloro total, segundo o método de combustão em atmosfera de oxigênio (V.3.4.3). Cada ml de solução de tiocianato de amônio 0,05 M SV corresponde a 0,003125 g de cloreto de polivinila.

$$\% \text{PVC} = \frac{(n_2 - n_1) 0,3125}{p}$$

p = massa da amostra, ou tomada de ensaio  
 $n_2$  = volume gasto na titulação da amostra  
 $n_1$  = volume gasto na titulação do branco  
 0,3125 = equivalente de cloreto de polivinila

\* macrogol

## IX. 1.1.2. POLIOLEFINAS

## IX.1.1.2.1 - POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE

Obtido a partir de reação de polimerização do etileno com oxigênio ativo como catalisador, o polietileno contém, no máximo, 0,02% (p/p) de hidroxitolueno butilado (BHT) ou, no máximo, 0,05% (p/p) de Irganox 1076 como estabilizante. Este tipo de polietileno é também designado como "polietileno de alta pressão".

*Características*

Pó, esferas, grânulos, folhas translúcidas de espessura variada ou objetos manufaturados. Solúvel em tolueno a quente e insolúvel na água, metanol e etanol. Insolúvel no hexano que, no entanto, dissolve os baixos polímeros residuais. Os materiais à base de polietileno de baixa densidade amolecem a partir de 100 °C e queimam com chama azulada despreendendo odor de vela. Densidade: 0,910 a 0,930.

*Identificação*

Levar a refluxo durante 15 minutos 0,5 g de material em 10 ml de clorobenzeno. Da solução obtida gotejar sobre cela de NaCl para procedimento em espectroscopia na faixa do infravermelho; secar o solvente a 80 °C e traçar o espectro. Caso o material esteja sob forma de folhas, a identificação é procedida diretamente.

**ENSAIO***Preparo da amostra*

As amostras, quando necessário, devem ser cortadas em pedaços de 1 x 1 cm.

**SOLUÇÃO S<sub>1</sub>**

Introduzir em balão 25 g de material e adicionar 500 ml de água. Aquecer sob refluxo durante 5 horas. Deixar resfriar e decantar.

*Aspecto da solução S<sub>1</sub>*

A solução S<sub>1</sub> deve ser incolor e límpida (X. 1.1. Método B), não devendo apresentar odor de álcool graxo.

*Poder tampão*

Tomar 100 ml da solução S<sub>1</sub> e adicionar 0,15 ml de corante BRP SI. A viragem do indicador para azul não deve necessitar mais do que 1,5 ml de hidróxido de sódio 0,01 M SV. A 100 ml da solução S<sub>1</sub> adicionar 0,2 ml de solução de alaranjado de metila SI. O início da viragem do indicador não deve gastar mais do que 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M SV.

*Substâncias redutoras*

A 20 ml de solução S<sub>1</sub> adicionar 2 ml de ácido sulfúrico 0,5 M SV e 20 ml de permanganato de potássio 0,01 M SV. Deixar em ebulição durante 3 minutos. Resfriar à temperatura ambiente e adicionar 1 g de iodeto de potássio. Titular com tiossulfato de sódio 0,005 M SV em presença de goma de amido. Efetuar ensaio em branco a partir de 20 ml de água. Sejam  $n$  e  $n'$  o número de ml de tiossulfato 0,005 M utilizado respectivamente para amostra e branco;  $n - n'$  deve ser inferior a 0,5 ml.

**SOLUÇÃO S<sub>2</sub>**

Introduzir em balão 10 g do material e 50 ml de hexano. Adaptar condensador e aquecer sob refluxo durante 4 horas. Resfriar em água gelada e filtrar rapidamente por cadinho de vidro de porosidade fina (10-16  $\mu$ m). Recolher o filtrado e fechar o recipiente para evitar evaporação.

*Absorção no ultravioleta*

Traçar o espectro de absorção da solução S<sub>2</sub> entre 220 e 340 nm. Utilizar cubetas de 1 cm. Comparar com o espectro obtido com solução de BHT a 0,004% (p/V) em hexano, que apresenta máximos situados a 227 e 283 nm ( $\pm$  3 nm), ou com o espectro de uma solução de Irganox 1076 a 0,01% (p/V) no hexano que apresenta máximo de absorção a 283 nm ( $\pm$  3 nm).

O valor de extinção no máximo de absorção do estabilizante identificado não deve ser superior ao obtido com a solução padrão correspondente.

*Substâncias solúveis no hexano*

Evaporar 10 ml da solução S<sub>2</sub> em banho-maria fazendo uso de cápsula de vidro tarada. Secar em estufa durante uma hora à temperatura de 100-105 °C. O peso do resíduo não deve ser superior a 3%.

*Cromatografia em camada delgada*

Utilizar placa de sílica-gel GF 254. Aplicar solução padrão em hexano contendo 0,002% (p/V) de BHT e 0,005% (p/V) de Irganox 1076. Efetuar uma primeira corrida à altura de 17 cm com o hexano.

Secar a placa naturalmente e então efetuar uma segunda corrida à altura de 15 cm em clorofórmio. Secar a placa ao ar e pulverizar com solução clorofórmica de iodo até aparição das manchas. A solução S<sub>2</sub> pode apresentar manchas correspondentes a um dos padrões e aos polímeros de

baixo peso molecular que tenham migrado com o hexano.

#### *Cinzas sulfatadas*

Proceder como descrito em V.2.10 utilizando amostra de 10 g e 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 M. O teor de cinzas sulfatadas não deve ser superior a 0,02%.

#### IX.1.1.2.2 - POLIETILENO DE ALTA DENSIDADE

Obtido a partir de reação de polimerização de etileno sob baixa pressão e em presença de catalisadores, que conferem ao produto traços de silício e cromo ou alumínio e titânio. Como estabilizante encontra-se o hidroxitolueno butilado, correspondente a 2,6-bis(1,1-dimetil-4-metilfenol) (BHT).

#### *Características*

Pó, esferas, grânulos, folhas translúcidas de espessura variada ou objetos manufaturados. O polietileno de alta densidade é solúvel em tolueno a quente, insolúvel em água, hexano, metanol e etanol. Esses materiais amolecem a partir de 140 °C queimando com chama azulada e desprendendo odor de vela. Densidade: 0,991 a 0,965.

#### *Identificação*

a) Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade.

b) O produto responde, no mínimo, a uma dessas reações:

**Cromo** — À metade do resíduo obtido no ensaio de cinzas sulfatadas, adicionar 0,25 ml de água e 0,3 ml de hidróxido de sódio 2 M. Juntar 10 mg de persulfato de sódio e levar à ebulição por 30 segundos. Resfriar e adicionar, gota a gota, ácido clorídrico 2 M, até viragem em papel tornassol. Resfriar e adicionar 2 gotas de solução alcoólica de difenilcarbazida SR. Obtém-se coloração violeta na presença de cromo.

**Titânio** — À metade de resíduo obtido no ensaio de cinzas sulfatadas acrescentar 5 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido fluorídrico. Homogeneizar e aquecer até que se desprenda fumaça branca. Retomar este resíduo com 30 ml de água e levar à ebulição até dissolver. Resfriar e transferir para balão volumétrico de 50 ml, completar o volume com água. A 10 ml desta solução adicionar 1 ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio. Obtém-se coloração amarela na presença de titânio.

#### ENSAIO

#### *Preparo da amostra*

Quando possível, cortar as amostras em pedaços de aproximadamente 1 x 1 cm.

#### SOLUÇÃO S<sub>1</sub>

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade.

#### *Aspecto da solução S<sub>1</sub>*

A solução deve ser límpida e incolor (IX.1.1 - Método B).

#### *Poder tampão*

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

#### *Substâncias redutoras*

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1.).

#### SOLUÇÃO S<sub>2</sub>

Introduzir em balão munido de agitador 10 g do material e adicionar 40 ml de hexano (R). Adaptar em condensador e aquecer sob refluxo durante 4 horas. Resfriar em água gelada e filtrar através de cadinho de vidro de porosidade fina (10-16 µm). Transferir quantitativamente o filtrado para balão volumétrico de 50 ml. Completar o volume com hexano.

#### *Absorção no ultravioleta*

Traçar o espectro de absorção no UV entre 220 e 340 nm, utilizando a solução S<sub>2</sub> em cubetas de quartzo de 1 cm. Comparar o espectro obtido com o de uma solução de BHT a 0,002% (p/v) em hexano. Os espectros da solução em análise e do padrão devem apresentar máximos a 227 e 283 nm (± 3 nm). Medir a extinção num destes máximos de absorção. O teor em BHT não deve ser superior a 0,02%.

#### *Cromatografia em camada delgada*

Utilizar placa de sílica-gel GF 254 e aplicar 25 µl de solução S<sub>2</sub> e 25 µl de solução padrão de BGT a 0,002% (p/v) em hexano. Utilizar como fase móvel mistura de 95 volumes de hexano e 5 volumes de acetato de etila. Revelar com lâmpada UV a 254 nm e por pulverização de solução de sulfato férrico-ferricianeto de potássio. O cromatograma deve apresentar, após pulverização daquela solução, mancha azul de mesmo R<sub>f</sub> e de mesma superfície e intensidade que a obtida no cromatograma padrão.



**Cinzas sulfatadas**

Determinar como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade, a partir de 5 g de material. O teor de cinzas sulfatadas não deve ser superior a 0,1% (IX.1.1.2.1).

**IX.1.1.2.3 - POLIPROPILENO**

Obtido a partir da polimerização do propileno, este composto contém traços de alumínio e de titânio provenientes dos catalisadores, assim como produtos de estabilização como estearato de cálcio.

**Características**

Pó, esferas, grânulos, folhas translúcidas de espessura variada ou objetos manufaturados não coloridos. É pouco solúvel em tolueno, xileno e etanol de decalina a frio. Insolúvel em água, metanol, etanol e hexano que, no entanto, dissolve baixos polímeros residuais. Os materiais em polipropileno amolecem a partir de 150 °C e queimam com chama azulada, despreendendo odor de vela e de álcool octílico. Densidade: 0,900 a 0,910.

**Identificação**

a) Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

b) Ao resíduo obtido no ensaio de cinzas sulfatadas adicionar 5 ml de ácido sulfúrico e 10 g de sulfato monopotássico. Homogeneizar e aquecer até despreendimento de fumaça branca. Retomar com 30 ml de água e levar até ebulição para solubilizar. Resfriar e transferir para balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com água. A 10 ml desta solução adicionar 1 ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio SR quando então se obtém coloração amarela.

**ENSAIO****Preparo da amostra**

Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**SOLUÇÃO S<sub>1</sub>**

Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**Aspecto da solução**

A solução S<sub>1</sub> deve ser límpida ou, no máximo fracamente opalescente (IX.1.1 - Método B).

**Poder tampão**

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**Substâncias redutoras**

Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**SOLUÇÃO S<sub>2</sub>**

Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**Absorção no ultravioleta**

Diluir a solução S<sub>2</sub> a 1:20 em hexano e traçar o espectro de absorção entre 220 e 340 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. As extinções observadas nos máximos de absorção entre 250 e 300 nm não devem ser superiores a 0,2.

**Substâncias solúveis em hexano**

Evaporar em banho-maria e em cápsula de vidro tarada 10 ml de solução S<sub>2</sub>. Secar em estufa a 100-105 °C. O peso de resíduo não deve ser superior a 3%.

**Cromatografia em camada delgada**

Utilizar placa de sílica-gel GF 254. Fazer aplicações de 50 µl da solução S<sub>2</sub> e 50 µl de uma solução que contenha 0,1% (p/V) em hexano, de cada uma das seguintes substâncias:

- a) Ácido esteárico,
- b) Irganox PS 800,
- c) Irganox 1076,
- d) Irganox 1010.

Desenvolver o cromatograma à altura de 15 cm com hexano, secar a placa naturalmente e então proceder a novo desenvolvimento à altura de 15 cm com clorofórmio lavado com água e filtrado. Secar a placa ao ar. Revelar à luz ultravioleta a 254 nm ou pulverizar solução clorofórmica de iodo até aparecimento das manchas. O cromatograma da amostra deve apresentar quatro manchas com valores de R<sub>f</sub> idênticos aos do cromatograma padrão e, perto da linha do eluente, mancha correspondendo aos polímeros de baixo peso molecular.

**Cloretos**

Efetuar a mineralização do cloro por combustão no oxigênio com amostra de 0,05 g de polipropileno. Os produtos de combustão são absorvidos em 10 ml de hidróxido de sódio 0,1 M SV. Adicionar 0,5 ml de ácido nítrico e completar o volume a 15 ml com água. A solução deve satisfazer ao ensaio-limite de cloretos. Simultaneamente preparar um padrão a partir de 10 ml de hidróxido de sódio 0,1 M SV. Adicionar 0,5 ml de ácido nítrico SR a 5 ml de solução de cloreto a 5 ppm.

**Cinzas sulfatadas**

Como indicado na monografia do Polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1), a partir de 10 g de material. A taxa de cinzas sulfatadas não deve ser superior a 0,1%.

**IX.1.1.2.4 - POLIESTIRENO**

Obtido a partir de reação de polimerização do estireno com peróxidos orgânicos como catalisadores, o poliestireno contém Irganox 1076 como estabilizante, óleo de parafina como plastificante e traços de lubrificantes, que são utilizados durante a elaboração dos objetos, tais como ácido esteárico, estearato de zinco e *N,N*-diestearil-etilenodiamina.

**Características**

Pó, esferas, grânulos, folhas translúcidas de espessura variada ou objetos manufaturados não coloridos. Solúvel em tolueno, xileno, estireno, clorofórmio e cloreto de metileno. Insolúvel em metanol que, no entanto, dissolve os baixos polímeros.

**Identificação**

Colocar algumas gotas da solução S<sub>2</sub> (ver em Poliestireno-Ensaio) sobre cubeta de cloreto de sódio para espectrofotometria no infravermelho e evaporar o solvente a 70 °C. Traçar o espectro e fazer comparação com espectro padrão do poliestireno. Caso o material se encontre sob forma de folhas, a identificação é efetuada diretamente.

**ENSAIO****Preparo da amostra**

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**SOLUÇÃO S<sub>1</sub>**

Como indicado na monografia do polipropileno (IX.1.1.2.3).

**Aspecto da solução**

Como indicado na monografia do polipropileno (IX.1.1.2.3).

**Acidez**

Tomar 100 ml da solução S<sub>1</sub> (IX.1.1.2.3), adicionar 0,15 ml de corante BRP SI. A viragem do indicador para azul não deve necessitar mais do que 1,5 ml de hidróxido de sódio 0,01 M SV.

**Substâncias redutoras**

Como indicado na monografia do polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1).

**SOLUÇÃO S<sub>2</sub>**

Dissolver 5 g de poliestireno em clorofórmio utilizando agitador mecânico. Completar a 50 ml com o mesmo solvente.

**Material solúvel no metanol**

Tomar 5 ml da solução S<sub>2</sub> e adicionar 15 ml de clorofórmio. Adicionar lentamente e sob agitação 50 ml de metanol. Deixar repousar durante 2 horas na geladeira. Filtrar e lavar o precipitado com 10 ml de metanol. Evaporar em banho-maria em cápsula de vidro tarada e seca em estufa (100-105 °C) até peso constante. O peso do resíduo não deve ser superior a 25 mg.

**Estireno**

Cromatografia a gás (V.2.17.5) utilizando o xileno como padrão interno.

A solução *exame* é formada a partir de 10 ml da solução S<sub>2</sub> à qual se adiciona, lentamente e com agitação, 10 ml de solução de xileno a 0,02% (p/V) e etanol. Resfriar por 2 horas e depois filtrar.

**Soluções padrão**

- a) Solução 0,1% de estireno (p/V) em clorofórmio.
- b) Soluções diluídas

Em série de seis frascos introduzir 10 ml de solução de xileno a 0,02% (p/V) em metanol. Em cinco deles adicionar, respectivamente, 1, 2, 3, 4 e 5 ml da solução de estireno em clorofórmio (0,1% (p/V)). Completar os volumes a 20 ml com clorofórmio. Os teores em estireno são, respectivamente, iguais a 0, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20 e 0,25 mg/ml. Injetar, sucessivamente, 2 µl de cada uma das soluções diluídas e 1 a 5 µl da solução em análise. Calcular o teor em estireno da amostra examinada, que não deve ser superior a 0,2%.

**Condições de operação**

Coluna de aço inoxidável de 3 m de comprimento e 3,175 mm de diâmetro cheia de polietilenoglicol\* 20 M a 20% (p/p) em suporte de Chromosorb (malha 30 a 60).

Temperatura: injetor = 200 °C  
 detector = 200 °C  
 coluna = 110 °C

Gás de arraste: nitrogênio (30 ml/min)

Detector de ionização de chama.

**Compostos insaturados**

Transferir para frasco cônico, munido de tampa, quantidade da amostra (p) de aproximadamente 3 mg.

\* macrogol

damente 0,50 g de poliestireno. Adicionar 50 ml de clorofórmio e agitar. Adicionar 10 ml de solução acética de bromo 0,2 M. Molhar a tampa com uma gota de água, tampar e agitar. Deixar em contato durante uma hora, ao abrigo da luz. Adicionar 10 ml de solução de iodeto de potássio 1 M e 100 ml de água. Titular com tiossulfato de sódio 0,05 M SV. Efetuar ensaio em branco. Sejam  $n$  e  $n'$  o número de ml gastos para amostra e para o branco, respectivamente. Cada ml de tiossulfato de sódio 0,05 M SV corresponde a 0,00799 g de bromo.

$$\% \text{ compostos insaturados} = \frac{(n' - n) \times 0,799}{P}$$

O teor deve ser inferior a 0,5%.

#### Peróxidos residuais

Pesar 5 g de material cortado em pedaços de 1 x 1 cm e colocar em balão cônico. Adicionar 150 ml de cloreto de metileno, tampar o frasco e agitar com agitador mecânico até completa dissolução. Borbulhar nitrogênio na solução para eliminar todo o ar, adicionar 1 ml de solução de iodeto de sódio a 20% em ácido acético anidro. Tampar, agitar e deixar repousar durante 30 minutos ao abrigo da luz. Adicionar 50 ml de água e titular com tiossulfato de sódio 0,05 M SV em presença de goma de amido. Efetuar ensaio em branco a partir de 150 ml de cloreto de metileno. Sejam  $n$  e  $n'$  o número de ml de tiossulfato 0,05 M SV empregado, respectivamente, para amostra e para o branco:  $n - n'$  deve ser inferior a 0,2 ml.

#### Cinzas sulfatadas

Como indicado na monografia de polietileno de baixa densidade (IX.1.1.2.1). O teor de cinzas sulfatadas não deve ser superior a 0,1%.

#### Metais pesados e zinco

Retomar o resíduo do ensaio de cinzas sulfatadas com 2 ml de ácido clorídrico, e evaporar lentamente em banho-maria. Adicionar ao resíduo 0,05 ml de ácido clorídrico, 10 ml de água em ebulição e aquecer durante 10 minutos em banho-maria. Resfriar e adicionar hidróxido de amônio, gota a gota, até que a solução se torne fracamente alcalina ao papel de tornassol e ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido nítrico diluído. Filtrar e completar a 1000 ml com água. Utilizar 12 ml desta solução para o ensaio-limite de metais pesados (10 ppm). Preparar o padrão com solução de chumbo a 1 ppm.

O ensaio para zinco é feito a partir de 0,5 ml da solução adicionada de 9,4 ml de água. Adicionar 5 ml de solução tampão de acetato pH 4,4, 1 ml de solução de tiossulfato de sódio e 5 ml exatamente medidos de solução diluída de diti-zona. Agitar. Preparar, paralelamente, nas mesmas condições, ensaio a partir de padrão de 1 ml de solução de zinco a 10 ppm e 9 ml de água. Após 2 minutos, a coloração da fase orgânica não deve ser mais intensa do que a obtida com o padrão (0,2%).

#### IX.1.1.2.5 - POLIESTIRENO OPACO

Certos materiais à base de poliestireno são adicionados de óxido de titânio com a finalidade de torná-los opacos.

#### Características

São as mesmas descritas na monografia de poliestireno (IX.1.1.2.4) com exceção de:

- Coloração - material branco opaco.
- Solubilidade - as soluções obtidas deste solvente são opalescentes ou turvas.

#### Identificação

a) O poliestireno opaco dá as reações de identificação da monografia de poliestireno (IX.1.1.2.4).

b) Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico e 10 g de sulfato monopotássico aos resíduos obtidos no ensaio de cinzas sulfatadas. Homogeneizar e aquecer até que se desprenda fumaça branca. Retomar com 30 ml de água e levar à ebulição para solubilizar. Após resfriamento, transferir para balão volumétrico de 50 ml e completar o volume com água. A 10 ml desta solução, adicionar 1 ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio, quando se evidencia coloração amarela.

#### Ensaio

O poliestireno opaco responde aos ensaios da monografia do poliestireno (IX.1.1.2.4), salvo que:

- A solução ensaio  $S_2$  permanece opalescente mesmo após centrifugação ou filtração. A dissolução do material é lenta.
- O teor obtido no ensaio de cinzas sulfatadas não deve ser superior a 3%.

## IX.2. RECIPIENTES

## IX.2.1. RECIPIENTES DE VIDRO

*Condições de acondicionamento*

Os frascos de vidro devem ser acondicionados pelo fabricante em caixas de papelão, de cabeça para baixo, com divisórias separando as camadas. Podem ser igualmente acondicionados com material adequado, com a finalidade de melhorar o acondicionamento, a proteção contra quebra e o atrito entre os frascos, e de assegurar a limpeza dos mesmos.

O fornecedor deve identificar as caixas, através da gravação, carimbo ou etiqueta com os seguintes itens:

- Nome do fornecedor
- Conteúdo (tipo e capacidade do frasco)
- Quantidade por caixa
- Código do material
- Lote de fabricação
- Data de fabricação
- Sinalização para posicionamento (seta ou símbolo)

*Tipos de vidro*

De acordo com os valores obtidos no teste de resistência hidrolítica, os vidros são classificados em:

**Tipo I** – Vidro de borossilicato de resistência hidrolítica elevada, ou seja, vidro neutro;

**Tipo II** – Vidro sódico-cálcico de resistência hidrolítica elevada, resultante de tratamento apropriado de superfície (pelo  $SO_2$ );

**Tipo III** – Vidro sódico-cálcico de resistência hidrolítica média, porém, com grande resistência mecânica, sem qualquer tratamento de superfície;

**Tipo NP** – Vidro sódico-cálcico de resistência hidrolítica baixa (não parenteral).

O vidro *Tipo I* é o mais indicado para envasamento de todas as preparações para uso parenteral.

O vidro *Tipo II*, convenientemente desalcalinizado, é geralmente usado para soluções parenterais neutras e ácidas. Para preparações parenterais alcalinas, poderá ser utilizado o vidro do tipo II desde que comprovada sua estabilidade em relação à solução envasada.

O vidro *Tipo III* é indicado para preparações contendo veículos não-aquosos. Sua utilização para preparações parenterais aquosas será aprovada apenas mediante o teste de estabilidade em relação à solução a ser envasada.

O *tipo NP* é indicado para qualquer tipo de produtos não parenterais, isto é, para uso tópico ou oral.

*Classificação dos defeitos para fins analíticos*

**Defeitos críticos** – São aqueles capazes de por em risco a saúde ou a vida dos usuários.

**Defeitos maiores** – São os que impedem a utilização funcional do frasco, provocam falta de segurança para as pessoas que os manuseiam e/ou comprometem o processo de envasamento.

**Defeitos menores** – Não impedem a utilização normal dos frascos, mas podem comprometer a boa apresentação do produto.

*Avaliação Visual***A – Plano de amostragem e de qualidade**

Tabela I – Plano de amostragem e de qualidade para avaliação visual

Quantidade do lote	Amostragem (frascos)	Defeitos					
		Críticos LQA = 0,04		Maiores LQA = 1,0		Menores LQA = 2,5	
		Ac.	Re.	Ac.	Re.	Ac.	Re.
501 a 1.200	32	0	1	1	2	2	3
1.201 a 3.200	50	0	1	1	2	3	4
3.201 a 10.000	80	0	1	2	3	5	6
10.001 a 35.000	125	0	1	3	4	7	8
35.001 a 150.000	200	0	1	5	6	10	11
150.001 a 500.000	315	0	1	7	8	14	15
500.001 ou mais	500	0	1	10	11	21	22

LQA = Limite de Qualidade Aceitável

Ac.: Aceitar

Re.: Rejeitar

As amostras deverão ser coletadas segundo os princípios de amostragem ao acaso, ou seja, não deverão ser retiradas em sua totalidade da mesma caixa, do mesmo ponto de pilha, carregamento ou palete.

A determinação do número de caixas aleatórias para a amostragem do número de frascos indicado pela quantidade total do lote (Tabela 1) deverá obedecer ao critério de  $\sqrt{n+1}$ .

### B – Inspeção visual

#### Defeitos críticos

- Mistura de tipos de frascos;
- Texto impresso ou escala volumétrica não correspondente ao padrão ou totalmente ilegível;
- “Fagulha” ou “rebarba” de massa de vidro localizada no interior do frasco ou aderida à parede ou gargalo do mesmo;
- Fio de vidro que se estende internamente de um lado ao outro da parede (“gaiola” ou “telefone”);
- Contaminação por presença de fungos no interior do frasco;
- Mancha ou pinta preta localizada na parede interna, irremovível nas condições normais de limpeza, mas sendo liberada para o produto nas condições do processamento.

#### Defeitos maiores

- “Fagulha” ou “rebarba” na parede externa do frasco;
- Irregularidade de espessura do frasco (má distribuição de massa vítrea na parede ou no fundo do frasco);
- Deformação no corpo ou fundo do frasco (irregularidade na superfície do vidro para dentro – chupado, estufado, dobra ou ruga);
- Inclusão de material não fundido ou contaminação da forma, com rachadura ao seu redor (pedras);
- Estrangulamento da boca (ovalização) ou boca não formada totalmente;
- Fissura na superfície do frasco (trincado atravessando toda a massa de vidro, podendo ser no corpo, no fundo, na junção do corpo com pescoço ou no ombro do frasco);
- Rosca, anel ou planura do gargalo incompleto ou deformado, comprometendo a vedação;
- Inclusão de pequena bolha de ar (acima de 2 mm) na parede do frasco;
- Gargalo torto (falta de perpendicularidade em relação ao corpo), deformado ou incompleto (má distribuição ou falta de massa vítrea);
- Superfície do gargalo não plana comprometendo a vedação;

- Texto impresso ou escala volumétrica comprometidos por falha ou erro de impressão.

#### Defeitos menores

- Mancha ou pinta preta localizada na parede externa ou interna do frasco, sem possibilidade de trocas com o produto;
- Risco ou estria na superfície do frasco;
- Sulco na parede externa do frasco;
- Inclusão de pequenas bolhas de ar na parede do frasco (até 2 mm);
- Falta de perpendicularidade da parede em relação ao fundo.

### Avaliação física e química

#### A – Plano de amostragem e qualidade

Tabela 2 – Plano de amostragem e de qualidade para avaliação física e química

Qualidade de frascos*	Amostragem**	Defeitos	
		Maiores LQA = 1,0	Menores LQA = 6,5
32	5	0 1	1 2
50	5	0 1	1 2
80	5	0 1	1 2
125	8	0 1	1 2
200	13	0 1	2 3
315	20	0 1	3 4
500	20	0 1	3 4

\* Obtido no Plano de Amostragem para Inspeção Visual

\*\* Para cada teste

#### B – Testes físicos

#### Defeitos maiores

**Dimensões:** fora das especificações do desenho padrão;

**Volume:** fora da tolerância, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Limite de volume

Volume solução (ml)	Líquido	Líquido viscoso
0,5	0,10 ml	0,12 ml
1,0	0,10 ml	0,15 ml
2,0	0,15 ml	0,25 ml
5,0	0,30 ml	0,50 ml
10,0	0,50 ml	0,70 ml
20,0	0,60 ml	0,90 ml
30,0	0,80 ml	1,20 ml
50,0 ou mais	2%	3%

**Choque térmico** — quando não suportar a temperatura diferencial mínima de 42 °C, segundo o procedimento que segue:

Imergir completamente os frascos em banho de água a 21 °C, mantendo-os imersos até que a temperatura se estabilize (21 + 1,1 °C). Transferi-los, imediatamente, para banho com temperatura mais alta, conforme o diferencial estabelecido, deixando-os completamente imersos por 5 minutos. Retorná-los imediatamente ao banho mais frio, imergindo-os por 30 segundos.

A capacidade de cada tanque deverá ser, no mínimo, de 4,2 litros para cada 500 g do vidro a ser testado.

#### *Defeitos menores*

**Peso:** Fora das tolerâncias estabelecidas.

#### **C — Teste de resistência química ou hidrolítica**

Determina a resistência do frasco de vidro novo ao ataque pela água. O grau de ataque é determinado pela alcalinidade liberada do frasco para o meio nas condições especificadas; é extremamente pequeno nos frascos de maior resistência. O teste deve ser realizado em ambiente isento de fumaças e poeiras.

A amostragem para teste deve seguir o Plano de Amostragem e Qualidade do item Avaliação física e química.

#### **Teste no vidro pulverizado**

**Preparação da amostra:** Lavar, com água quimicamente pura (condutividade não maior que 0,15  $\mu\text{mho/cm}$  a 25 °C), os frascos selecionados, aleatoriamente, em número correspondente ao estabelecido pelo Plano de Amostragem. Secá-los em corrente de ar seco. Quebrar os frascos em fragmentos de, aproximadamente, 25 mm e dividi-los em três porções de cerca de 100 g.

Em almofariz especial, de aço inoxidável duro ou de bronze, triturar cada porção, separadamente, e passá-la por peneiras nºs 20, 40 e 50. Espalhar a porção retida na peneira nº 50 em folha de papel e, com ajuda de imã, remover as partículas de ferro eventualmente introduzidas durante a pulverização. Transferir o pó para erlenmeyer de 250 ml de vidro resistente com seis porções sucessivas de 30 ml de acetona, agitando cada

vez durante 30 segundos e decantando cuidadosamente. Secar o frasco e o conteúdo por 20 minutos a 140 °C e resfriar em dessecador. O pó deverá ser usado para teste, no máximo; até 48 horas após a secagem.

#### *Procedimento*

Transferir 10 g de pó de vidro, cuidadosamente pesado, para erlenmeyer com tampa e que tenha sido previamente submetido à digestão com água quimicamente pura a 90 °C, por 24 horas, ou a 121 °C, por 1 hora.

Adicionar 50 ml de água quimicamente pura e preparar um frasco para teste em branco. Autoclavar os frascos a 121 °C  $\pm$  2 °C durante 30 minutos.

Resfriar em água corrente e decantar o sobrenadante para erlenmeyer, lavando o resíduo com quatro porções de 15 ml cada de água quimicamente pura. Estas serão adicionadas ao extrato principal. Acrescentar 5 gotas de solução de vermelho de metila SI e titular, imediatamente, com solução de ácido sulfúrico 0,01 *M SV*. O volume de ácido gasto na titulação não deve exceder ao indicado na tabela de Tipos de Vidros e Limites de Testes (Tabela 4).

#### *Teste no extrato aquoso*

Lavar, com água quimicamente pura (condutividade não maior que 0,15  $\mu\text{mho/cm}$  a 25 °C), os frascos selecionados, aleatoriamente, em número correspondente ao estabelecido pelo Plano de Amostragem.

Encher os frascos com água quimicamente pura até 90% de sua capacidade e tampá-los com papel de alumínio. Proceder à autoclavagem a 121 °C  $\pm$  2 °C por 60 minutos. Retirar uma alíquota de cada frasco, transferindo-as para proveta graduada, de modo a se obter 100 ml do extrato aquoso. Transferir tal extrato para erlenmeyer de 250 ml, adicionar 5 gotas de solução de alaranjado de metila e titular, ainda aquecido, com solução de ácido sulfúrico 0,01 *M*. O tempo entre a retirada do material da autoclave e a titulação não deve ultrapassar 60 minutos. Proceder paralelamente a ensaio em branco.

O volume de ácido gasto na titulação não deve ultrapassar ao indicado na tabela de Tipos de Vidros e Limites de Testes (Tabela 4).

Tabela 4 – Tipos de vidros e limites de testes

Tipo de vidro	Descrição	Tipo de teste	Limites	
			Capacidade (ml)	Volume (ml) de ácido sulfúrico 0,01 M
I	Vidro borossilicato	Vidro pulverizado	todos	1,0
II	Vidro sódico-cálcico (tratado)	Extrato Aquoso	< 100	0,7
			> 100	0,2
III	Vidro sódico-cálcico (sem tratamento)	Vidro pulverizado	todos	8,5
NP	Vidro sódico-cálcico (uso geral)	Vidro pulverizado	todos	15,0

## IX.2.2. RECIPIENTES DE MATERIAL PLÁSTICO

Os materiais constituintes dos recipientes plásticos para uso farmacêutico são constituídos principalmente de um ou mais polímeros e, eventualmente, de certos aditivos. Esses materiais não devem apresentar, em sua composição, substâncias que podem ser extraídas pelo conteúdo do recipiente em proporções que levem à alteração de sua eficácia ou da sua estabilidade, ou ao aumento de sua toxicidade.

Quando os recipientes apresentam partes constituídas de diferentes materiais, estes devem atender às especificações das respectivas monografias.

A natureza e quantidade dos aditivos são função do tipo de polímero utilizado, da tecnologia de transformação do polímero em recipiente e do uso a que se destina. Os aditivos aceitáveis são indicados nos tipos de formulação de cada material descrito na Farmacopeia.

Poderão ser utilizados outros materiais, não descritos na Farmacopeia, desde que a composição destes seja previamente aprovada pelas autoridades competentes do Ministério da Saúde e os recipientes fabricados com tais materiais atendam, também, às especificações desta monografia de acordo com o fim a que se destinam.



## IX.2.2.1 – RECIPIENTES DE MATERIAL PLÁSTICO PARA SOLUÇÕES INJETÁVEIS AQUOSAS

Apresentam-se sob forma de bolsas plásticas flexíveis ou ampolas plásticas, constituídos geralmente de polietileno ou de materiais à base de cloreto de polivinila. São transparentes, de forma a possibilitar a verificação do aspecto e limpidez das soluções neles contidas.

**ENSAIO**

O ensaio deve ser efetuado com recipientes tratados de maneira usual para sua utilização, ou seja, nas mesmas condições de lavagem e esterilização. Em se tratando de recipientes cuja fabricação, envasamento e fechamento são efetuados em processo contínuo, abrir, esvaziar e lavar os recipientes com duas porções de água para injetáveis, usando volume equivalente a um quarto de sua capacidade total, antes de proceder ao ensaio.

*Preparação da solução S*

Encher o recipiente com volume de água para injetáveis correspondente à sua capacidade nominal; fechá-lo cuidadosamente. Em se tratando de recipientes fabricados, envasados e fechados em processo contínuo fazer o fechamento com folha revestida de alumínio. Aquecer o material em autoclave a 110 °C durante 30 minutos. No caso de recipientes à base de cloreto de polivinila, aquecer em autoclave a 110 °C durante 1 hora. Utilizar número suficiente para obter volume total de solução S de 750 ml. Recolher, assepticamente, fração de solução S necessária para o ensaio de tolerância em coelhos.

*Aspecto da solução S*

A solução é límpida e incolor.

*Acidez ou Alcalinidade*

A 100 ml de solução S adicionar 0,15 ml de corante BRP SI. O indicador vira para azul, não necessitando mais que 1,5 ml de hidróxido de sódio 0,01 M SV. A 100 ml de solução S adicionar 0,2 ml de solução de alaranjado de metila. O início da viragem não necessita mais que 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M (SV).

*Absorção no ultravioleta*

Evaporar à secura 100 ml de solução S e retomar o resíduo com 5 ml de hexano. Traçar o espectro de absorção no ultravioleta entre 250 e 320 nm. A absorvância no máximo de absorção não deve superar a 0,25.

*Substâncias redutoras*

A 20 ml de solução S adicionar 2 ml de ácido

sulfúrico 0,5 M SV e 20 ml de permanganato de potássio 0,01 M SV. Deixar em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente. Adicionar 1 g de iodeto de potássio e titular com tiossulfato de sódio 0,005 M SV, em presença de solução de amido. Efetuar ensaio em branco em 10 ml de água. A diferença entre as duas titulações não deve ultrapassar 3 ml.

*Transmissão da luz*

Cortar seções circulares de duas ou mais áreas do recipiente em análise. Lavar e secar as peças cuidadosamente, de modo a não arranhar suas superfícies. Fazer a montagem da peça no suporte para leitura no espectrofotômetro. Medir a transmitância, em relação ao ar, na região espectral entre 290 e 450 nm, com intervalos de 2 nm. No comprimento de onda de transmitância máxima, tirar a média dos valores obtidos para as duas ou três amostras. A transmissão de luz média observada não deve exceder aos percentuais máximos de 15% no caso de recipientes fechados com chama e 10% para os demais casos.

*Tolerância em coelhos*

Preparar três coelhos como indicado no ensaio de pirogênio (V.5.1.2). Isotonizar assepticamente a solução S com adição de cloreto de sódio estéril e apirogênico e aquecê-la a 37 ± 2 °C. Injetar na veia marginal de cada coelho volume de solução S isotônica na proporção de 20 ml/kg de massa corporal. Medir as temperaturas retais a cada 30 minutos, durante 3 horas. A soma das elevações térmicas deve ser inferior a 1,15 °C. Observar as reações e comportamento dos animais durante a injeção, 15 minutos após estas e durante as 48 horas seguintes. Os coelhos não devem apresentar sinal algum de intolerância local ou geral.

*Esterilidade*

Os recipientes devem atender ao teste de esterilidade. Introduzir, assepticamente, no recipiente 100 ml de solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Agitar o recipiente para garantir o contacto da solução com toda a parede interna. Filtrar o conteúdo em membrana de 0,45 µm e colocá-la no meio de cultura adequado, como descrito no teste de esterilidade (V.5.1.1).

## IX.2.2.1.1. RECIPIENTE À BASE DE CLORETO DE POLIVINILA

Estes materiais seguem a monografia para Recipientes de Material Plástico para Soluções Injetáveis Aquosas (IX.2.2.1), satisfazendo ainda aos ensaios descritos a seguir.

*Resistência à tração*

Encher o recipiente com água acidificada com 1 ml de ácido clorídrico diluído SR. Suspender o recipiente pela alça existente na sua parte inferior e aplicar força de 20 N (2,05 kgf) no bico do mesmo. Manter a tração durante 5 segundos. Repetir o ensaio aplicando a força a cada uma das linhas de solda. Não deve ocorrer ruptura, nem estiramento.

*Impermeabilidade*

Colocar o recipiente utilizado no ensaio de resistência à tração entre duas placas recobertas com papel absorvente impregnado de solução de azul de bromofenol diluído (1:5) SI e seco. Exercer, progressivamente, força sobre as placas a fim de comprimir o recipiente de modo a que a pressão interna (diferença entre a pressão aplicada e a pressão atmosférica) atinja 67 kPa (50 mmHg) em um minuto. Manter esta pressão durante 10 minutos. O papel indicador não deve revelar escape do líquido do interior do recipiente.

*Impermeabilidade ao vapor*

Envasar um recipiente com solução de cloreto de sódio a 0,9%. Fechar e pesar o recipiente, conservando-o em estufa a 37 °C durante 7 dias, após o que deixar esfriar à temperatura ambiente e pesar. Calcular a perda sofrida referente a 365 dias. O valor encontrado não deve ser superior a 2,5%.

*Cloreto*

Proceder ao ensaio-limite para cloreto com 15 ml de solução S (IX.1.1.2.2). Preparar um padrão com 1,2 ml de solução a 5 ppm de cloreto e completar a 15 ml com água (0,4 ppm).

*Amônia*

A 5 ml de solução S adicionar água até perfazer volume de 14 ml. A solução deve satisfazer ao ensaio-limite para amônia. (V.3.2.6.)

*Estanho*

Em cápsula de vidro de borossilicato colocar 25 ml de solução S e 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Evaporar até volume próximo de 3 ml. Resfriar e adicionar com precaução 1 ml de solução concentrada de peróxido de hidrogênio. Aquecer moderadamente até descoramento da solução. Caso não ocorra descoramento, alternar adição de peróxido de hidrogênio e aquecimento. Resfriar e transferir para tubo graduado de 50 ml. Lavar a cápsula com água e completar o volume para 20 ml. Adicionar 0,3 ml de ácido tioglicólico e 20 ml de água. Misturar e adicionar 2 ml de solução de laurilsulfato de sódio SR, 1 ml de reativo de "ditiol" (tolueno-3,4-ditiol) SR e completar a 50 ml com água. Após 15 minutos a coloração não deve ser mais intensa que a do padrão preparado nas mesmas condições a partir de mistura de 10 ml de ácido sulfúrico diluído a um quinto e de 10 ml de solução a 5 ppm de estanho (2 ppm).

### IX.2.2.2. RECIPIENTES DE MATERIAL PLÁSTICO PARA SANGUE E PRODUTOS DO SANGUE

Os recipientes (ou bolsas) em material plástico para a coleta, a conservação, o tratamento e a administração do sangue e dos seus componentes são fabricados a partir de um ou vários polímeros com certos aditivos.

A composição, bem como as condições de fabricação dos recipientes, devem ser registradas no órgão competente do Ministério da Saúde, segundo a legislação nacional e os acordos internacionais que regem a matéria.

Além de obedecer às exigências normais para recipientes de material plástico para solução injetável aquosa (IX.2.2.1.), os materiais, nas condições normais de utilização, não devem ceder monômeros ou outras substâncias em quantidade nociva, ou que acarretem modificações do sangue.

Os recipientes, fornecidos em condições estéreis, podem conter soluções anticoagulantes segundo o uso previsto. Devem ser suficientemente transparentes para permitir a inspeção visual do seu conteúdo, antes do enchimento com o sangue e após esta operação e suficientemente elásticos para oferecer o mínimo de resistência ao enchimento e esvaziamento nas condições normais de utilização. Os recipientes não devem conter mais que 5 ml de ar.

Cada recipiente é munido de dispositivo de acordo com o uso previsto. Pode apresentar um ou mais compartimentos; neste último caso, o recipiente de coleta é ligado por um ou mais tubos a uma ou mais bolsas secundárias, para permitir a separação dos componentes do sangue em sistema fechado.

As peças são de forma e tamanho apropriados para permitir a adaptação conveniente dos dispositivos de transferência.

Os protetores das agulhas e dos conectores devem assegurar a esterilidade interna do material e devem ser de fácil remoção.

A capacidade dos recipientes é expressa por sua capacidade nominal, que se entende pelo volume de sangue a ser envasado no recipiente, e de acordo com o volume envasado de solução anticoagulante. Sua forma deve permitir a centrifugação, quando cheios.

Os recipientes devem possuir dispositivos adequados para sustentação em posição que não prejudique o enchimento, a conservação, a manipulação ou a administração de sangue.

#### *Ensaio*

O ensaio deve ser efetuado com recipientes nas mesmas condições de lavagem e esterilização. Em se tratando de recipiente contendo solução anticoagulante, desprezar a solução, lavar o recipiente com 250 ml de água para injetáveis a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e desprezar a água de lavagem.

#### *Preparação da solução S<sub>1</sub>*

Encher o recipiente com 100 ml de solução estéril e aprotogênica de cloreto de sódio a 0,9%. Fechá-lo e aquecê-lo em autoclave de modo que a temperatura do líquido seja mantida a  $110^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

#### *Preparação da solução S<sub>2</sub>*

Introduzir no recipiente um volume de água para injetáveis correspondente à sua capacidade nominal. Fechar o recipiente e aquecê-lo em autoclave de modo que a temperatura do líquido seja mantida a  $110^\circ\text{C}$  durante 30 minutos.

#### *Resistência às variações de temperatura*

Colocar o recipiente em local apropriado à temperatura inicial de  $20$  a  $23^\circ\text{C}$ . Resfriá-lo rapidamente no congelador, mantendo-o ali durante 24 h. Elevar a temperatura a  $50^\circ\text{C}$ , mantendo-o assim durante 12 h. Deixar resfriar à temperatura ambiente.

O recipiente deve satisfazer aos seguintes testes: resistência à centrifugação, resistência à tração, impermeabilidade, impermeabilidade ao vapor, esvaziamento sob pressão e enchimento.

#### *Resistência à centrifugação*

Encher o recipiente com água acidificada por adição de 1 ml de ácido clorídico diluído SR. Envolver o recipiente em papel absorvente impregnado de azul de bromofenol diluído (1:5) SI ou de outro indicador apropriado e seco. Centrifugar a 5000 rpm por 10 minutos. Não deve ocorrer qualquer fuga sobre o papel indicador, nem qualquer distorção permanente.

#### *Resistência à tração*

Proceder como indicado na monografia para Recipientes de Material Plástico para Solução Injetável Aquosa (IX.2.2.1).

**Impermeabilidade**

Proceder como indicado na monografia para Recipientes de Material Plástico para Solução Injetável Aquosa (IX.2.2.1).

**Impermeabilidade ao vapor**

Proceder como indicado na monografia para Recipientes de Material Plástico para Solução Injetável Aquosa (IX.2.2.1).

**Esvaziamento sob pressão**

Encher o recipiente com quantidade de água igual à capacidade nominal, a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , e fixar a uma das conexões do tubo para transfusão sem agulha. Comprimir o recipiente de modo a manter durante todo o esvaziamento pressão interna (diferença entre a pressão aplicada e a pressão atmosférica) de 4,0 kPa (30 mmHg). O recipiente deve esvaziar-se em menos de 2 minutos.

**Velocidade de enchimento**

Ligar o recipiente, por meio de tubo previamente munido de agulha de punção, a reservatório contendo solução de mesma viscosidade que o sangue, tal como, solução de sacarose a 33,5% p/V a  $37^\circ\text{C}$ , mantendo diferença de 9,6 kPa (70 mmHg) entre pressão atmosférica e pressão interna, com a base do recipiente e a parte superior da bolsa no mesmo nível. O volume do líquido que flui para a bolsa em 8 minutos não deve ser menor que a capacidade nominal da bolsa.

**Esterilidade**

Proceder como indicado na monografia para Recipientes de Material Plástico para Solução Injetável Aquosa (IX.2.2.1).

**Pirogênio**

A solução  $S_1$  deve satisfazer ao teste de pirogênio (V.5.1.2). Injetar em cada animal 10 ml da solução por quilograma de peso corporal.

**Toxicidade**

A solução  $S_1$  satisfaz ao teste de toxicidade. Injetar em cada rato 0,5 ml da solução.

**Efeito hemolítico no sistema tamponado  
Solução tampão concentrada**

Dissolver 90,0 g de cloreto de sódio, 34,6 g de fosfato dissódico e 2,43 g de fosfato monossódico em água e completar a 1000 ml.

**Solução tampão  $A_0$** 

A 30,0 ml da solução tampão concentrada juntar 10,0 ml de água.

**Solução tampão  $B_0$** 

A 30,0 ml da solução tampão concentrada juntar 20,0 ml de água.

**Solução tampão  $C_0$** 

A 15 ml da solução tampão concentrada juntar 85,0 ml de água.

A cada um de três tubos de centrífuga introduzir 1,4 ml de solução  $S_2$ . No tubo I juntar 0,1 ml de solução tampão  $A_0$ ; no tubo II, 0,1 ml de solução tampão  $B_0$  e, no tubo III, 0,1 ml da solução tampão  $C_0$ .

A cada tubo juntar 0,02 ml de sangue humano, fresco e heparinizado, misturar bem e aquecer em banho maria a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 40 minutos.

Preparar 3 soluções contendo, respectivamente: 1) 3,0 ml de solução tampão  $A_0$  e 12,0 ml de água (Solução  $A_1$ ), 2) 4,0 ml de solução tampão  $B_0$  e 11 ml de água (Solução  $B_1$ ); 3) 4,75 ml de solução tampão  $B_0$  e 10,25 ml de água (Solução  $C_1$ ).

Nos tubos I, II e III juntar, respectivamente, 1,5 ml das soluções  $A_1$ ,  $B_1$  e  $C_1$ . Preparar simultaneamente três outros tubos de modo análogo, substituindo a solução  $S_2$  pela água.

Centrifugar simultaneamente os tubos a serem examinados e os tubos de referência (padrão) a, exatamente, 2500 rpm durante 5 minutos.

Após a centrifugação, medir as absorvâncias dos líquidos a 540 nm, utilizando a solução tampão concentrada como líquido de compensação e calcular a porcentagem do índice hemolítico:

$$\frac{A_{\text{exp}}}{A_{100}} \times 100$$

em que:  $A_{100}$  = absorvância de tubo III,  
 $A_{\text{exp}}$  = absorvância do tubo I e II, respectivamente, e dos tubos de referência.

A solução do tubo I fornece índice hemolítico que não deve ultrapassar 10% e o índice hemolítico da solução do tubo II não deve desviar mais de 10% do tubo de referência.

Utilizar 10,0 ml de sangue fresco com 0,1 ml de heparina 5.000 UI por ml sem agente conservante.

**IX.2.2.2.1. RECIPIENTE À BASE DE CLORETO DE POLIVINILA PARA SANGUE E PRODUTOS DO SANGUE, CONTENDO OU NÃO SOLUÇÃO ANTI-COAGULANTE.**

Estes recipientes (bolsas) seguem as monografias de Recipiente Plástico para Sangue e Produtos do Sangue (IX.2.2.2) satisfazendo ainda os ensaios descritos a seguir.

**Solução de referência**

Utilizar como solução de referência a água para preparação de injetáveis contida em vidro de borossilicato e esterilizada em autoclave a 110 °C por 30 minutos.

**Substâncias redutoras**

Imediatamente após a preparação da solução S<sub>2</sub> (IX.2.2.2.), transferir para o frasco de vidro borossilicato volume correspondente a 8% da capacidade nominal do recipiente (bolsa). Juntar 20 ml de permanganato de potássio 0,002M e 1,0 ml de ácido sulfúrico diluído SR e deixar em repouso ao abrigo da luz durante 15 minutos. Simultaneamente, tomar volume igual da solução de referência, recém-preparada, em outro frasco de vidro borossilicato.

Juntar em cada uma das duas soluções 0,1 g de iodeto de potássio. Deixar repousar ao abrigo da luz durante 5 minutos e titular, imediatamente, com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M em presença de 0,25 ml de solução de goma de amido. A diferença entre as duas titulações não deve exceder 2 ml.

**Acidez ou alcalinidade**

Tomar volume da solução S<sub>2</sub> correspondente a 4% do volume nominal do recipiente (bolsa). Adicionar 0,1 ml de solução de fenolftaleína SI: a solução permanece incolor. Adicionar 0,4 ml de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e 0,1 ml de vermelho de metila SI: a solução fica corada em vermelho alaranjado ou vermelho.

**Cloretos**

Quinze ml da solução S<sub>2</sub> devem satisfazer ao ensaio limite de cloretos (0,4 ppm) (V.3.2.1.). Preparar padrão com mistura de 1,2 ml de solução a 5 ppm e de 13,8 ml de água.

**Amônia**

Tomar 5,0 ml da solução S<sub>2</sub> e completar 14 ml com água. A solução deve satisfazer ao ensaio-limite de amônia (2 ppm) (V.3.2.6).

**Resíduo por evaporação**

Em bquer de vidro de borossilicato de capacidade apropriada, previamente aquecido a 105 °C, evaporar 100 ml da solução S<sub>2</sub>. Nas mesmas condições, evaporar 100 ml da solução de referência (ensaio em branco). Secar os resíduos em estufa a 100-105 °C até peso constante. O resíduo da solução S<sub>2</sub> não deve ser superior a 3 mg do ensaio em branco.

**Absorção no ultravioleta**

Medir a absorvância da solução S<sub>2</sub> em 230 a 360 nm, utilizando como líquido de compensação a solução de referência. Entre 230 e 250 nm não deve ocorrer absorvância superior a 0,30; entre 251 e 360 nm ela não deve ser superior a 0,10.

**Ftalato extraível**

**Solução padrão:** Dissolver 1,0 g de ftalato de dioctila (DEHP) em etanol com densidade relativa entre 0,9373 e 0,9378 (solvente de extração).

**Soluções padrão diluídas:** A partir da solução padrão, preparar diluições correspondentes a 20, 10, 5, 2, 1 mg do DEHP/100 ml usando o mesmo solvente de extração.

**Preparação da amostra:** Por intermédio de tubo, agulha ou adaptadores, introduzir o solvente de extração previamente aquecido a 37 °C, em balão de vidro bem fechado, no recipiente (bolsa) em quantidade correspondente à metade de sua capacidade nominal. Eliminar todo o ar do recipiente e fechar o tubo. Imergir o recipiente, em posição horizontal, no banho de água mantido a 37 ± 1 °C durante 60 minutos sem agitar. Retirar do banho, agitar suavemente cerca de 10 vezes e transferir o conteúdo para frasco de vidro.

**Determinação espectrofotométrica:** Determinar a absorção das soluções padrão diluída e da amostra a 272 nm, usando como branco o solvente de extração. Determinar a concentração de ftalato em DEHP, em mg por 100 ml de extrato. A concentração não deve ser superior a 10 mg por 100 ml.

## **X. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO**

## X.1. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

Um método de esterilização tem por finalidade remover ou destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópicas ou microscópicas, saprófitas ou não, presentes no produto considerado, sem garantir a inativação completa de toxinas ou enzimas celulares. O procedimento selecionado para atingir o nível de esterilização estabelecido depende sobremaneira da natureza do material e das dificuldades impostas por grande diversidade de produtos. O conhecimento do tipo, do teor e da fonte dos contaminantes nos produtos, antes da esterilização, e a aplicação de métodos para minimizar tal contaminação e preveni-la pós-processamento contribuem para assegurar o êxito da esterilização.

### MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO

#### MÉTODOS FÍSICOS:

- *Calor*: úmido  
seco
- *Radiação*: ionizante  
não ionizante
- *Filtração*

#### MÉTODOS QUÍMICOS

- Óxido de etileno

## X.1.1. MÉTODOS FÍSICOS

### X.1.1.1 – ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR

Proporção constante de população microbiana é inativada por unidade de tempo considerado. O valor D, ou tempo de redução decimal do microrganismo, é o intervalo de tempo, à temperatura constante de tratamento, necessário para reduzir de 90% a população microbiana.

O valor z do microrganismo é definido como o incremento de temperatura necessário para reduzir de 90%, ou variar de fator 10, por exemplo, o valor D. Admitem-se valores de z genéricos; para o calor úmido  $z = 10^{\circ}\text{C}$  e para o calor seco  $z = 20^{\circ}\text{C}$ . O valor F do tratamento térmico é o intervalo de tempo de aquecimento necessário, à temperatura de referência constante, para se obter o nível de destruição pré-estabelecido. Para calor úmido em produtos termolábeis, o valor F total, que depende do número e da resistência dos microrganismos existentes no produto, deve assegurar probabilidade menor que  $10^{-6}$  sobreviventes microbianos. Para materiais termoestáveis, o valor F é calculado para promover probabilidade de falha de pelo menos  $10^{-6}$  sobreviventes, independentemente do número inicial e da resistência dos microrganismos no produto, e garantir redução de, no mínimo, 12 ciclos logarítmicos de microrganismos, apresentando valor  $D_{121^{\circ}\text{C}} \geq 1$  minuto. O calor é o agente esterilizante mais simples, econômico e seguro de que se dispõe. A sensibilidade dos diversos microrganismos à ação do calor é bem variada, sendo as formas esporuladas as mais resistentes. A esterilização pelo calor úmido causa a coagulação da proteína celular dos microrganismos, enquanto a esterilização pelo calor seco é, principalmente, processo de oxidação.

#### CALOR ÚMIDO

Os processos de esterilização pelo calor úmido podem ser conduzidos à pressão normal, à temperatura de 90 a  $100^{\circ}\text{C}$ ; ou sob pressão elevada, sempre acima de  $100^{\circ}\text{C}$ .

#### ESTERILIZAÇÃO PELO VAPOR FLUENTE

Esta técnica consiste em expor por 30 minutos, no mínimo, o material à ação do vapor fluente, no interior de autoclave fechada, com torneira de purga aberta, de modo que a temperatura não ultrapasse  $100^{\circ}\text{C}$ .

#### ESTERILIZAÇÃO POR AQUECIMENTO A $100^{\circ}\text{C}$ COM ADIÇÃO DE BACTERICIDA

Esta técnica é indicada para preparações medicamentosas instáveis a temperaturas superiores.

Apresenta menor margem de segurança do que a esterilização em autoclaves, sob pressões elevadas. Para atingir as concentrações limites do produto final, dissolve-se ou suspende-se o medicamento em solução adequada de um dos seguintes bactericidas:

#### Para injetáveis

Clorocresol . . . . . 0,2% (p/V)  
Acetato ou nitrato de fenilmercúrio . . . . . 0,002% (p/V)

#### Para colírios

Solução de cloreto de benzalcônio, suficiente para fornecer concentração final de 0,1% (p/V) de cloreto de benzalcônio.

Acetato ou nitrato de fenilmercúrio . . . . . 0,002% (p/V)  
Acetato de clorexidina . . . . . 0,1% (p/V)  
Tiomersal . . . . . 0,01% (p/V)

A preparação farmacêutica é então distribuída em recipientes adequados e mantida em temperatura entre 98 e  $100^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. Bactericidas não devem ser adicionados a certas preparações injetáveis como:

- soluções de medicamentos administrados por vias que permitam acesso ao líquido cefalorraquidiano;
- preparações injetáveis administradas por via intracardíaca ou intraocular;
- preparações injetáveis administradas em doses únicas, superiores a 15 ml, a menos que a monografia específica permita a presença do bactericida.

#### ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR ÚMIDO SOB PRESSÃO

De todos os métodos de esterilização utilizados, o calor úmido, na forma de vapor saturado sob pressão, é considerado o melhor e mais eficiente. Neste método, o agente responsável pelo aquecimento é o vapor de água saturado, ao qual corresponde um valor de temperatura e pressão de vapor definida, muitas vezes utilizada para controlar a temperatura nas autoclaves após completa remoção do ar. O intervalo de tempo necessário para que se estabeleça o equilíbrio térmico entre o produto e o vapor circulante depende da natureza do material, dos recipientes, embalagens e respectivos volumes e dimensões, e do momento em que a esterilização, propriamente dita, se inicia. O superaquecimento e redução do teor de umidade da câmara devem ser evitados, pois são prejudiciais à esterilização. Indica-se esta técnica principal-



mente para preparações aquosas, vestuário e material cirúrgico.

#### *Esterilizador contínuo por vapor sob pressão*

De aplicação prática na esterilização de soluções injetáveis de grandes volumes, apresenta algumas vantagens sobre a autoclave clássica: (a) frascos cheios podem ser esterilizados à medida que vão sendo envasados, diminuindo o risco da formação de pirogênicos; (b) todos os frascos são submetidos às mesmas condições de esterilização.

#### *Condições a respeitar na esterilização pelo vapor*

A programação de um ciclo de esterilização deve ser validada com o auxílio de termopares bem localizados e de indicadores biológicos que conduzam à escolha da temperatura mais elevada compatível com o produto e do tempo de exposição deste ao vapor, necessário para garantir o nível de destruição estabelecido e assegurar o êxito da esterilização. Este tempo depende da natureza, distribuição e volume da carga. São propostas combinações temperatura-tempo apropriadas para tal finalidade, combinações estas que devem ser avaliadas para cada caso.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo mínimo (minuto)</i>
115 a 118	30
121 a 124	15
126 a 129	10
134 a 138	3

Quaisquer outros pares temperatura-tempo podem ser empregados desde que sua eficiência seja estabelecida através da avaliação do ciclo de esterilização. A distribuição da carga na câmara é de suma importância, devendo todas as embalagens ou unidades dos produtos ser espaçadas suficientemente umas das outras, permitindo a penetração do vapor até as regiões mais profundas. Para pequenos volumes e frascos de paredes relativamente finas, de até 250 ml, o tempo necessário para atingir o equilíbrio térmico é curto e o processamento a 121 °C por um mínimo de 15 minutos será satisfatório. Para volumes maiores de líquido por recipiente, a duração total do aquecimento a 121 °C será certamente maior e deverá ser programada através de validação do ciclo. Para a maioria das roupas e vestimentas, o vapor usado na esterilização não deve conter mais do que 5% de umidade relativa e o processo deve ser conduzido à temperatura de 134-138 °C, por período mínimo de 3 minutos.

#### **ESTERILIZAÇÃO PELO CALOR SECO**

A esterilização pelo calor seco é aplicada a objetos de vidro e de metal, pós, vaselinas, gorduras, ceras, soluções e suspensões oleosas e tecidos especiais.

#### *Esterilização em estufa de ar quente*

O processo pelo calor seco em estufas é aplicado, principalmente, para materiais cujo contacto direto com o vapor sob pressão é danoso ou indesejável. Tem igualmente o objetivo de despirogenar. Nas estufas de convecção forçada, o tempo necessário para que seja atingido o equilíbrio térmico entre o produto e o ambiente é reduzido; e as diferenças de temperatura em vários pontos das prateleiras podem limitar-se a  $\pm 1$  °C; em estufas de convecção normal, tais diferenças podem atingir até + 20 °C.

#### *Condições a respeitar na esterilização pelo calor seco.*

A esterilização pelo calor seco é geralmente realizada no intervalo de temperatura de 200 °C a 220 °C, por período de tempo não inferior a duas horas objetivando inclusive a despirogenação. Pares de temperaturas mais elevadas e por tempos menores podem ser aplicados a produtos termoestáveis, enquanto pares de temperaturas menores e por períodos mais longos são usados para materiais termolábeis. O binário tempo-temperatura é determinado por estudos de validação física e biológica do ciclo de esterilização. Por exemplo: os pós devem ser esterilizados a 160 °C durante duas horas ou a 170 °C por uma hora, em embalagens contendo, no máximo, 30 g, espalhados em camada delgada. Substâncias que não suportam aquecimento a 160 °C, como as sulfonamidas, são esterilizadas em porções de 4 a 5 g, acondicionadas em invólucro duplo de papel, no intervalo de 140 °C a 150 °C durante duas horas, no mínimo. A esterilização de glicerol, parafina e diversos óleos é realizada à temperatura de 160 °C durante duas horas ou de 170 °C por uma hora, em frações de 30 ml, acondicionadas em frascos de 200 ml.

#### **VALIDAÇÃO DE PROCESSOS DE ESTERILIZAÇÃO POR CALOR**

Validar é assegurar que um processo cumpra os fins para os quais foi programado. Com esta finalidade são definidos os parâmetros do ciclo de esterilização e das cargas-padrão, e a natureza do material, termolábil ou termoestável.

Sempre que possível, a escolha da temperatura é feita em função da estabilidade térmica do produto e do tempo de esterilização, de acordo com as características de penetração de calor na carga. A carga deve ser bastante homogênea, não devendo ser misturados materiais termolábeis com termoestáveis, ou de diversos volumes. Devem também ser definidas e respeitadas as condições de entrada do material na carga, como temperatura, umidade e distribuição. Para produtos termoestáveis define-se apenas a carga máxima, enquanto

a carga mínima tem grande importância para material termolábil, pois se a carga for muito pequena haverá maior degradação do material. Inicia-se a fase de validação determinando-se o número e a resistência térmica dos microrganismos associados ao produto e calibrando-se os indicadores biológicos no laboratório. Os estudos de resistência térmica objetivam a determinação dos valores D e z. O tempo de redução decimal pode ser calculado; diretamente da curva de sobreviventes, construída colocando-se em ordenadas o logaritmo dos esporos viáveis sobreviventes e em abscissas, os tempos correspondentes de exposição à temperatura do processo: indiretamente, pelo método do Número Mais Provável, através da equação

$$D_{T_r} = \frac{\theta}{\log \frac{N_0}{N_i}} \quad (1)$$

em que

$D_{T_r}$  = tempo de redução decimal à temperatura de referência,  
 $\theta$  = tempo de exposição das amostras inoculadas à temperatura de referência,  
 $N_0$  = população microbiana inicial,  
 $N_i$  = número de sobreviventes nas amostras, calculado pela equação de Halvorson e Ziegler:

$$N_i = \frac{2,303}{a} \log \frac{n}{q} \quad (2)$$

em que

$N_i$  = número mais provável de esporos sobreviventes por ml de material aquecido,  
 $a$  = volume em ml de cada amostra aquecida,  
 $n$  = número total de amostras aquecidas àquela combinação temperatura ( $T_r$ ) - tempo ( $\theta$ ),  
 $q$  = número de amostras aquecidas a esta combinação, em que não se presencia crescimento positivo em subcultura.

Em seguida, inicia-se a fase de validação do ciclo de esterilização, a nível dos equipamentos: autoclaves e estufas. A validação física utiliza termopares para estudar a distribuição de calor na câmara de esterilização vazia, a distribuição do calor na câmara carregada, a penetração do calor nos componentes individuais da carga (pontos frios) e a penetração de calor na carga (ponto frio da carga). Os termopares são acoplados ao potenciômetro, que deve ter precisão de  $\pm 1^\circ\text{C}$ . Para a calibração dos termopares, os terminais dos sensores e o bulbo do termômetro de referência são amarrados e imersos em banho de óleo para esterilização em autoclaves (calor úmido) e de areia para esterilização em estufas (calor seco). Os

termopares devem registrar temperaturas que, quando comparadas àquelas do termômetro padrão, apresentem variação máxima de  $\pm 1^\circ\text{C}$  para esterilização em autoclaves e  $\pm 2^\circ\text{C}$  para esterilização em estufas. As leituras indicadas pelo potenciômetro são ajustadas àquelas do termômetro de referência para intervalo de  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ . Por norma, a diferença de temperatura entre o ponto mais frio e o mais quente, para autoclaves, não deve superar a  $2,5^\circ\text{C}$ . A validação biológica utiliza os indicadores biológicos para verificar se o valor F mínimo obtido, por medidas físicas, garante o nível de letalidade pré-estabelecido. Para isto, são desenvolvidos estudos de distribuição e penetração de calor, com um mínimo de 10 unidades, contendo o indicador biológico, colocadas nas áreas mais frias, previamente determinadas por medidas físicas. E, finalmente, avalia-se a reprodutibilidade do processo. As temperaturas obtidas durante o ciclo de esterilização podem ser convertidas em velocidades letais, a intervalos de tempo específicos, pela equação

$$L = 10^{(T-T_r)/z} \quad (3)$$

em que

$L$  = velocidade letal,  
 $T$  = temperatura do produto ou ponto estudado,  
 $T_r$  = temperatura do processo,  
 $z$  = incremento de temperatura necessário para variar o valor D de fator 10.

O tempo letal de esterilização de cada ponto, onde foi inserido o termopar, é calculado pela integração das velocidades letais do processo de aquecimento:

$$F = \int_0^\theta 10^{(T - T_r)/z} d\theta \quad (4)$$

em que  $\theta$  é o intervalo de tempo entre medidas sucessivas de temperaturas. Há vários métodos pelos quais as velocidades letais podem ser integradas, sendo o método trapezoidal de Patashnik o mais simples:

$$F = \Delta\theta (L_1 + L_2 + L_3 \dots + L_{n-1}) \quad (5)$$

A validação na estufa (calor seco) deve ser realizada objetivando destruir todos os microrganismos viáveis, assim como despirogenar. Com respeito à validação de despirogenação, não foram fixados limites de inativação das toxinas. O procedimento aconselhável é impregnar elementos com concentrações crescentes de endotoxinas, com a finalidade de conhecer a concentração máxima destruída no processo de esterilização, em condições operacionais definidas. Os termopares, os indicadores biológicos e as endotoxinas devem ser colocados muito próximos uns dos outros, no mesmo ponto frio escolhido para ser avaliado.

### X.1.1.2 – ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÃO

As radiações podem ser classificadas em dois grandes grupos: radiações ionizantes e radiações não-ionizantes. As radiações ionizantes eletromagnéticas são: raios X, raios  $\gamma$  e radiações corpusculares, representadas pelos raios  $\beta$  (elétrons), prótons, nêutrons e raios  $\alpha$ . Os raios ultravioletas são considerados radiações eletromagnéticas, porém não ionizantes. Na prática, as radiações utilizadas como agentes esterilizantes limitam-se aos raios  $\gamma$  e raios  $\beta$ .

As radiações ionizantes são aplicadas a produtos altamente alteráveis pelo calor seco ou úmido, produtos estes que podem ou não ser acondicionados na embalagem final.

As preparações farmacêuticas apresentam maior estabilidade à radiação no estado sólido que na forma líquida. A radiação causa a destruição de certas substâncias, como insulina, heparina, tetraciclina e vitamina C. A esterilização por radiação aplica-se a vários produtos, tais como os seguintes: vitaminas, pós, antibióticos, esteróides, hormônios, vacinas, pomadas, ossos, transplantados de tecidos, seringas descartáveis, agulhas, bandagens, tubos de plástico, sondas, placas de Petri, suturas e equipamento cirúrgico, oftálmico e farmacêutico. Os raios  $\gamma$  são radiações de elevada energia, emitidas por isótopos radiativos: cobalto 60, cério 137 e tântalo 182. O cobalto é o mais utilizado na indústria farmacêutica. O elevado poder de penetração dos raios  $\gamma$  torna difícil centrá-los sobre o objeto e evitar a irradiação do ambiente circunvizinho. Os locais de trabalho devem ser protegidos com vidro contendo chumbo. As radiações não podem ser interrompidas e as operações de exposição são controladas à distância. Para evitar o escurecimento do vidro pelos raios  $\gamma$ , incorpora-se-lhe cério.

Os raios  $\beta$ , ou raios catódicos, são elétrons acelerados, originados ao se estabelecer elevada diferença de potencial entre o cátodo e um ou mais ânodos, em tubo de vácuo elevado. Devido à carga das radiações corpusculares, os raios  $\beta$  apresentam menor penetrabilidade, comparativamente, aos raios  $\alpha$ , de energias equivalentes. Na prática a esterilização é realizada com raios  $\beta$  acelerados a 7 MeV, nunca excedendo a 15 MeV. Quando a energia equivalente a 7 MeV não é suficiente para que a penetração se dê em certas embalagens, recorre-se à técnica de fogo cruzado, bombardeando o material, simultaneamente, em sentidos opostos. O tempo de exposição é de 1 segundo, no máximo, em locais protegidos com paredes de 2,5 m de espessura. As radiações catódicas, orientadas por campo elétrico, sobre determinado ponto, não são dissipadas para o ambiente circunvizinho, apresentando maior segurança na operação e são menos onerosas que as radiações  $\alpha$ .

#### Escolha da dose esterilizante

As unidades utilizadas para medir as radiações ionizantes são o Röentgen, o rad, o rep e o gray.

- “RÖENTGEN” quantidade de radiação X ou  $\gamma$  aplicada a um material, acima de 3 MeV, que, atravessando 1 g de ar, libera energia de 86 ergs ( $8,6 \times 10^{-6}$  J), que corresponde a 97 ergs ( $9,7 \times 10^{-6}$  J)/g de água.
- “REP” quantidade de radiação de qualquer tipo que produz os mesmos efeitos que 1 “Röntgen” de raios X ou  $\gamma$ .
- “RAD” dose absorvida de qualquer radiação equivalente a 100 erg/g ou  $10^{-2}$  J/kg de material absorvente.
- “GRAY” ou “GY” dose absorvida de qualquer radiação equivalente a  $10^4$  erg/g ou 1 J/kg de material absorvente (1 GY = 100 rad).

A unidade de radiação mais empregada é o rad, expresso em kilorad (krad) ou Megarad (Mrad).

Cada espécie microbiana apresenta sensibilidade diferente para as radiações, sendo que a resistência cresce na seguinte ordem: formas vegetativas bacterianas, fungos, leveduras, esporos e vírus. Dose de radiação ou dose de inativação de cerca de 2,5 Mrad é suficiente para garantir redução do número inicial de esporos viáveis termoresistentes de 6 a 10 ciclos logarítmicos e de 15 ciclos logarítmicos para as formas vegetativas bacterianas mais resistentes. Os esporos de *Bacillus pumilus* são geralmente os mais resistentes às radiações ionizantes e considerados como indicadores biológicos. A dose letal da radiação depende dos seguintes fatores: número inicial de microrganismos, natureza do material a esterilizar, pré-tratamento à irradiação, tensão de oxigênio no meio, valor de pH, temperatura, umidade relativa intrínseca e composição do meio. A eficiência do ciclo de radiação deve ser avaliada, periodicamente, por série de estudos experimentais, pela determinação do número inicial e final de microrganismos presentes no material, pelo emprego paralelo de indicador biológico e pelo uso de dosímetros adequados.

#### ESTERILIZAÇÃO POR RADIAÇÕES NÃO-IONIZANTES

A luz ultravioleta apresenta intervalo de comprimento de onda entre 210 e 328 nm (2100 e 3280 Å). As radiações compreendidas entre 2400

e 2800 Å são as mais eficazes do ponto de vista microbicida. As radiações ultravioletas mais utilizadas são as produzidas em lâmpadas de quartzo com vapor de mercúrio de comprimento de onda de 2537 Å. Estas radiações têm poder penetrante muito pequeno e, praticamente, a aplicação fica limitada à esterilização de superfícies, em laboratórios farmacêuticos, na manutenção de ambientes assépticos, na fabricação e acondicionamento de produtos medicamentosos (como antibióticos), em áreas destinadas ao enchimento e capsulagem, câmaras assépticas e ar de circulação. O pessoal que trabalha em áreas em que foram instaladas lâmpadas de luz ultravioleta deve estar protegido da ação dos raios diretos ou refletidos. Bastonetes de bactérias gram-negativas são os microrganismos mais facilmente destruídos por luz ultravioleta, enquanto

estafilococos e estreptococos exigem cerca de 5 a 10 vezes a dose de energia radiante; esporos bacterianos, 10 vezes; e esporos de fungos, 50 vezes ou mais para garantir o mesmo nível de destruição estabelecido. Câlibrar, periodicamente, o rendimento da transformação de energia elétrica em luminosa, emitida pelas lâmpadas UV de baixa pressão de vapor de mercúrio, que apresenta o comprimento de onda de 2537 Å. O rendimento da transformação de energia elétrica em luminosa é da ordem de 60%, sendo que 90% do total da emitida têm o comprimento de onda de 2537 Å. A energia radiante é inversamente proporcional à distância entre a fonte geradora e a superfície irradiada, quando esta distância é menor que três vezes o comprimento da fonte UV; quando for maior, a energia radiante será inversamente proporcional ao quadrado da distância.

## X.1.1.3 – ESTERILIZAÇÃO POR FILTRAÇÃO

A técnica de esterilização por filtração tem por objetivo eliminar, mecanicamente, microrganismos de líquidos termolábeis ao calor em autoclave ou ao aquecimento com bactericida. Embora existam filtros capazes de reter alguns vírus, a esterilização por filtração é considerada técnica falível, sendo recomendável apenas quando não é possível aplicar métodos mais eficazes. O êxito da esterilização por filtração depende do emprego de elementos filtrantes com poros de dimensões adequadas e das condições de assepsia observadas durante o procedimento. O filtro, incluindo o elemento filtrante propriamente dito, o respectivo suporte e todo o material que venha a entrar em contacto com o líquido filtrado devem ser previamente esterilizados. A natureza do elemento filtrante, responsável pela remoção física das bactérias do líquido que o atravessa, pode ser: derivado de celulose, plástico, cerâmica porosa, estrutura sintética apropriada, ou combinações adequadas destes. Fibras de amianto não podem pertencer à estrutura do elemento filtrante, pois se comprovou que elas são cancerígenas e afetam indesejavelmente o produto filtrado, quando arrastadas com ele. Para acelerar a filtração pode-se aplicar pressão positiva do lado não estéril do sistema, ou pressão reduzida do

lado estéril, desde que não provoque a ruptura do elemento filtrante; este procedimento não se deve aplicar, porém, aos filtros de vidro poroso. Filtração prolongada é, igualmente, danosa e deve ser evitada, pois pode permitir o crescimento de contaminante, através do meio filtrante, que recontamina o líquido já esterilizado. A dimensão efetiva dos poros dos filtros esterilizantes deve ser conferida antes do uso e a integridade dos mesmos, confirmada ao findar a filtração. O procedimento de ponto de bolha, ou o teste de velocidade de difusão, deve ser realizado de acordo com as recomendações do fabricante para filtros tipo membrana. O número inicial de microrganismos das soluções deve ser determinado como parte da validação do procedimento, uma vez que o êxito do método de filtração depende, sobremaneira, da carga microbiana na solução a ser filtrada. A eficiência da operação é avaliada, experimentalmente, utilizando-se suspensões de determinadas espécies microbianas, como *Serratia marcescens* ou *Chromobacterium prodigiosum*, que depois de filtradas, através do elemento filtrante em ensaio, são incubadas a 37 °C por sete dias ou mais, para certificar se estão isentas de microrganismos.

## X.1.2. MÉTODO QUÍMICO

### X.1.2.1 - ESTERILIZAÇÃO PELO ÓXIDO DE ETILENO

O emprego de substâncias químicas em estado gasoso, na esterilização de material sólido, é processo em que se torna necessário estabelecer condições bem determinadas de temperatura, concentração, umidade, tempo de atuação e número inicial de microrganismos. O gás esterilizante ideal deve apresentar atividade intensa e rápida contra bactérias, esporos e vírus, se possível à pressão atmosférica; ter inércia total quanto ao material a esterilizar; possuir bom coeficiente de difusão, que confira penetração fácil e completa eliminação após a esterilização; ser inócuo ao homem e aos animais; não ser inflamável; ser facilmente armazenado e manipulado; ser ativo na ausência de umidade; ser econômico e de fácil obtenção. Apenas o óxido de etileno aproxima-se das condições ideais: facilmente obtido, liberado em estado puro; não se polimeriza sobre as superfícies de contacto e é rapidamente eliminado por simples aeração.

A aplicação de vapores de óxido de etileno é procedimento alternativo ao uso de agentes físicos que, comparativamente, são microbicidas mais eficientes. O óxido de etileno é utilizado na esterilização de material oftálmico (material anestésico), marcapassos e máquinas de coração e pulmão, seringas descartáveis, vestuário hospitalar, material plástico, borrachas, equipamento de aço inoxidável e material de papel. Os vapores de óxido de etileno no ar ao atingirem aproximadamente 3% entram em combustão, seguida de explosão caso o ar esteja confinado. Utilizam-se misturas de óxido de etileno com gases inertes, dióxido de carbono ou hidrocarbonetos fluorados, de tensões superficiais muito próximas, sem o risco de alterações das propriedades dos respectivos componentes, ou de explosão. A toxicidade do óxido de etileno, quando inalado, assemelha-se àquela produzida pelo amoníaco, é irritante aos olhos e causa dores de cabeça, náuseas e vômitos. Efeitos tóxicos imediatos ocorrem à exposição de 12500 ppm. As soluções aquosas e produtos apresentando teores residuais de óxido de etileno produzem queimaduras na pele e nas mucosas. Na presença de íons cloro, o óxido de etileno pode formar produtos tóxicos. Apresenta penetração fácil e rápida em materiais de diferentes naturezas: papel, papelão, celofane, artigos de couro, alguns plásticos (cloreto de polivinila), fibras sintéticas e tecidos em geral. O óxido de etileno não penetra em substâncias cristalizadas. Tem ação bactericida, esporocida, virucida e fungicida, agindo por alquilação não específica de grupos como -OH,

-NH<sub>2</sub> e -SH, com perda do H e formação do grupo alquil-hidroxiila. O efeito da umidade, durante a esterilização com vapores de óxido de etileno, é crítico e complexo. Umidade em excesso (>60%) provoca a hidrólise do agente químico a etilenoglicol e, em quantidade insuficiente (<30%), impede a ação de alquilação. A esterilização de produtos farmacêuticos é limitada quase que exclusivamente a pós de substâncias que são estáveis à exposição de óxido de etileno. A penicilina não reage com o gás, mas a estreptomomicina perde parte da atividade; a tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido fólico e vitaminas em geral são destruídas. Há necessidade de se determinar a estabilidade dos produtos farmacêuticos, antes de submetê-los à esterilização gasosa por óxido de etileno. Para se efetuar o ciclo de esterilização, a autoclave adaptada é previamente aquecida a 55 °C. Coloca-se a amostra. Reduz-se a pressão na câmara de aproximadamente 2,3 a 7,3 kPa (20 a 55 mm Hg). A umidade na câmara de esterilização é equilibrada entre 50 a 60%, em 60 minutos. Introduce-se a mistura gasosa, que pode atingir a pressão da ordem de 100, 200 ou 300 kPa (1, 2 ou 3 atmosferas). A exposição do material é realizada em período de 3 a 8 horas, dependendo do gás, do número inicial de microrganismos presentes no material e da penetrabilidade do produto ao agente químico. Finda a operação a autoclave é evacuada; em seguida, é introduzido ar filtrado, até que se atinja a pressão atmosférica, proporcionando a dissipação do óxido de etileno dos materiais. Certos plásticos, borrachas e couros apresentam forte afinidade pelo óxido de etileno, necessitando de período de 12 a 24 horas de aeração, antes do emprego.

O óxido de etileno líquido, que pode substituir a mistura gasosa na esterilização de produtos, é vaporizado na câmara de esterilização colocada sob pressão de 5,3 kPa (40 mm Hg); a temperatura do processo é mantida ao redor de 25 °C, durante 4 horas a 200 kPa (2 atmosferas de pressão) ou 1 hora a 600 kPa (6 atmosferas de pressão). Após a esterilização, deve ser respeitado intervalo de tempo para que haja dissipação completa do óxido de etileno e de resíduos voláteis do produto.

A comprovação do processo é feita avaliando-se o efeito letal que provoca no indicador biológico. Dez tiras de papel de alumínio, no mínimo, impregnadas com cerca de 1 milhão de esporos viáveis secos de *Bacillus subtilis*, devem ser distribuídas por toda a carga.

## X.2. INDICADORES BIOLÓGICOS

A eficácia de um ciclo de esterilização é descrita em termos de valor F, que é determinado utilizando-se termopares; e a certeza da esterilidade do processo, conferida por esse intervalo de tempo de esterilização, é validada, biologicamente, pelo emprego de indicadores biológicos. O indicador biológico, suspensão de esporos resistentes ao processo de esterilização específico, é adicionado diretamente às unidades representativas da carga a ser esterilizada; ou embebido por tiras de papel de filtro, de alumínio ou metal, pérolas de vidro ou plástico, que são secas à temperatura ambiente.

O tipo de veículo do indicador biológico deve ser tão semelhante quanto possível às embalagens ou aos itens sob esterilização e não interferir na resistência do microrganismo. Por isso, é empregado nas determinações dos valores D e z do indicador biológico, nos estudos preliminares à validação do ciclo de esterilização. Esporos viáveis de microrganismos — considerados indicadores adequados à validação do sistema em autoclaves — devem sobreviver ao tratamento de 100 °C durante 10 horas, processo este em que se eliminam os esporos formadores de mesófilos.

Um indicador biológico satisfatório deve apresentar maior termoresistência ao processo de esterilização do que os microrganismos originalmente existentes no material a esterilizar. Após a operação de esterilização, os indicadores biológicos são semeados e incubados, durante vários dias, em meios de cultura apropriados para se determinar sua sobrevivência. O número de esporos para avaliar o ciclo de esterilização depende da letalidade esperada, conferida pelo valor F, e da resistência térmica do microrganismo. Esta relação é descrita pela equação

$$F = D (\log A - \log B) \quad (6)$$

em que

( $\log A - \log B$ ) é a redução logarítmica de esporos.

Indicadores biológicos podem ser designados para avaliar se o valor F do ciclo de esterilização é suficiente para garantir probabilidade de falha de  $10^{-6}$  microrganismos sobreviventes no produto. Para atender a este objetivo, o número inicial de organismos no indicador biológico é determinado pela equação

$$D_s (\log N_i + 6) = D_{bi} (\log N_o + 1) \quad (7)$$

em que

- $N_i$  = carga de microrganismos no produto a ser esterilizado,
- $D_s$  = valor do tempo de redução decimal do microrganismo mais resistente,
- $N_o$  = número de organismos no indicador biológico,
- $D_{bi}$  = valor do tempo de redução decimal do indicador biológico.

Para produtos termoestáveis, quando o valor F deve ser suficiente para assegurar redução de 12 ciclos logarítmicos e há probabilidade de falha de pelo menos  $10^{-6}$  sobreviventes, independentemente do número inicial e da resistência térmica dos microrganismos que ocorrem naturalmente no produto, o número de esporos, no indicador biológico, é da ordem de  $10^6$  por tira de papel ou qualquer outro veículo.

As preparações comerciais de indicadores devem incluir:

- número de esporos por veículo,
- número do lote,
- data da expiração,
- condições adequadas de armazenagem,
- valores de D e de z característicos e as condições da determinação dos parâmetros da resistência térmica,
- indicações de uso, incluindo o meio de subcultura e condições de incubação.

Resistência térmica de esporos de microrganismos empregados como indicadores biológicos em diferentes processos de esterilização.

Cultura	Processo de esterilização	Valor D aproximado
Esporos de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Vapor saturado a 121 °C	1,5 minutos
Esporos de <i>Clostridium sporogenes</i>	Vapor saturado a 112 °C 121 °C	3,2 minutos 0,7 minutos
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	Calor seco a 121 °C 170 °C	60 minutos 1 minuto
Esporos de <i>Bacillus pumilus</i>	Radiação gama: — preparações úmidas — preparações secas	0,2 Mrad 0,15 Mrad
Esporos de <i>Bacillus subtilis</i>	Óxido de etileno (umidade relativa de 50%; temperatura de 54 °C) — 600 mg/l — 1200 mg/l	3 minutos 1,7 minutos

## XI. SUBSTÂNCIAS CORANTES



## XI. SUBSTÂNCIAS CORANTES

Substância corante é qualquer composto orgânico ou inorgânico, natural, sintético ou idêntico ao natural reproduzido por síntese que, independente de possuir ou não atividade farmacológica, é adicionado às formas farmacêuticas com a finalidade única de corá-las ou de alterar a sua cor original.

Aos medicamentos destinados à aplicação por

via oral, retal, vaginal ou cutânea podem ser adicionadas substâncias corantes constantes da relação abaixo ou da mistura destas substâncias nos casos e em quantidades compatíveis com as boas práticas de fabricação farmacêutica. As substâncias corantes empregadas devem satisfazer as exigências descritas nas respectivas monografias.

Relação de corantes permitidos

Cor	Nome Oficial	N.º C.I.	Descrição
Branca	Carbonato de cálcio	72.220	Carbonato de cálcio $\text{CaCO}_3$
Branca	Dióxido de titânio	77.891	Dióxido de titânio $\text{TiO}_2$ , obtido por síntese
Amarela	Curcumina	75.300	1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona
Amarela	Riboflavina	—	7,8-Dimetil-10-(D-ribo-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)isalo-xazina
Amarela	Fosfato de riboflavina	—	Riboflavina-5'-fosfato
Amarela	Amarelo crepúsculo	15.985	Sal dissódico do ácido 1-p-sulfofenilazo-2-naftol-6-sulfônico
Laranja	Beta-caroteno	40.800	$\beta$ -Caroteno obtido por síntese ou extraído de fontes naturais
Laranja	Apo-8-carotenal	40.820	$\beta$ -Apo-8'-carotenal obtido por síntese ou extraído de fontes naturais
Laranja	Cantaxantina	40.850	$\beta,\beta$ -Caroteno-4,4'-diona obtida por síntese ou extraída de fontes naturais
Laranja	Urucum	75.120	Extrato obtido pelo tratamento de <i>Bixa orellana</i> L. por solventes orgânicos, óleos e gorduras vegetais comestíveis, mono e diglicérides obtidos por hidrólise destes óleos ou por soluções aquosas, alcoólicas ou propilenoglicólicas de álcalis, ou seus componentes principais, bixina (éster monometílico do ácido 6,6'-diapo- $\Psi,\Psi$ -carotenodibóico) e norbixina (ácido 6,6'-diapo- $\Psi,\Psi$ -carotenodibóico) isolados ou reproduzidos por síntese e seus sais sódicos ou potássicos
Vermelho		77.491	Óxidos de ferro obtidos por síntese, inclusive suas formas hidratadas ou combinações de mais de um destes óxidos
Amarelo	Óxidos de ferro	77.492	
Preto		77.499	
Vermelha	Cochonilha	75.470	Extrato aquoso ou aquoso-alcoólico concentrado até eliminação do álcool de cochonilha, <i>Dactylopsis cacti</i> Costa ( <i>Coccus cacti</i> L.). O componente corante principal do extrato de cochonilha é o ácido carmínico

## Relação de corantes permitidos (continuação)

Cor	Nome Oficial	N.º C.I.	Descrição
Vermelha	Carmim da cochonilha	75.470	Laca de alumínio ou de cálcio e alumínio, em substrato de hidróxido de alumínio, de ácido carmínico e outros componentes obtidos pela extração aquosa da cochonilha, <i>Dactylopus cacti</i> Costa ( <i>Coccus cacti</i> L.)
Vermelha	Eritrosina	45.430	Sal dissódico monoidratado de 3',6'-diidroxí-2',4',5',7'-tetraiodospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-19 H]xantenil-3-ona
Verde	Clorofila	75.810	Mistura de clorofilas a e b. Clorofila a: $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$ , éster fitílico do complexo magnésiano de [(1,3,5,8-tetrametil-4-etil-2-vinil-9-oxo-10-metoxicarbonil)forbinil]-7-propionato. Clorofila b: $C_{55}H_{70}MgN_4O_5$ , éster fitílico do complexo magnésiano de [(1,5,8-trimetil-3-formil-4-etil-2-vinil-9-oxo-10-metoxicarbonil)forbinil]-7-propionato
Verde	Clorofilina cupro-sódica	75.810	Sal sódico do complexo cúprico da clorofila
Azul	Azul brilhante	42.090	Sal dissódico do sal interno de hidróxido de <i>N</i> -etil- <i>N</i> -(4-[[4-(etil[(3-sulfopenil)metil]amino)fenil](2-sulfopenil)metileno]-2,5-cicloexadien-1-ilideno]-3-sulfobenzenometanamínio
Marrom	Caramelo	—	Produto obtido pelo aquecimento de sacarose ou outros açúcares de uso alimentar ou por tratamento controlado de glicídeos de qualidade alimentar com um ou mais de um dos seguintes reagentes: ácidos acético, cítrico, fosfórico, sulfúrico e sulfuroso, dióxido de enxofre, hidróxidos de sódio e de potássio, carbonatos, fosfatos, sulfatos e sulfitos de sódio e de potássio
Preta	Carvão ativo	—	Carvão vegetal farmacopeico

*Observação:* Além dos corantes referidos na relação, permanecem em uso os seguintes:

## Relação de corantes permitidos (continuação)

Cor	Nome Oficial	N.º C.I.	Descrição
Amarela	Amarelo ácido	13.015	Sal dissódico do ácido 5-(4-sulfopenilazo)-2-naftolsulfônico
Amarela	Tartrazina	19.140	Sal trissódico do ácido 1- <i>p</i> -sulfopenil-4- <i>p</i> -sulfopenilazo-5-hidroxipirazol-3-carboxílico
Azul	Azul de indantreno	69.800	<i>N,N</i> -diidro-1',2'-antraquinonazina
Azul	Índigotina	73.015	Sal dissódico do ácido indigotin-5,5-dissulfônico
Laranja	Laranja GGN	15.980	Sal dissódico do ácido 1-(3-sulfopenilazo)-2-naftolsulfônico
Marrom	Cacau		Extraído das cascas pulverizadas do fruto de <i>Theobroma cacao</i> L.
Vermelha	Azorubina	14.720	Sal dissódico do ácido 2-(4'-sulfo-1'-naftilazo)-1-naftol-4-sulfônico
Vermelha	Escarlate GN	14.815	Sal dissódico do ácido 2-(6'-sulfo-2'-4'-dimetilfenilazo)-1-naftol-5'-sulfônico
Vermelha	Ponceau 4R	16.255	Sal trissódico do ácido 1-(4'-sulfo-1'-naftilazo)-2-naftol-6,8-dissulfônico
Vermelha	Vermelho 40	16.035	Sal dissódico do ácido 6-hidroxi-5-(2-metoxi-5-metil-4-sulfopenilazo)-2-naftalenossulfônico
Vermelha	Vermelho sólido E	16.045	Sal dissódico do ácido 1-(4-sulfonaftilazo)-2-naftol-6-sulfônico

## XII. REAGENTES

## XII.1. INDICADORES

São corantes empregados para indicar o ponto final de uma análise volumétrica ou para avaliar o pH de soluções não coradas.

Os indicadores de uso mais freqüente estão listados no quadro a seguir, em ordem crescente do limite inferior de sua faixa de ação de pH:

INDICADORES	FAIXAS DE pH
Vermelho cresol	0,2-1,8 e 7,2-8,8
Púrpura de metacresol	0,5-2,5 e 7,5-9,2
Tropeolina 00	1,0 - 2,8
Azul de timol	1,2-2,8 e 8,0-9,6
Amarelo naftol	2,0 - 3,2
Amarelo de dimetila	2,8 - 4,6
Azul de bromofenol	2,8 - 4,6
Alaranjado de metila	2,9 - 4,0
Vermelho de metila	3,0 - 4,4
Vermelho de congo	3,0 - 5,0
Verde de bromocresol	3,6 - 5,2
Resazurina	5,0 - 7,0
Tornassol	5,0 - 8,0
Púrpura de bromocresol	5,2 - 6,8
Vermelho de fenol	6,8 - 8,4
Azul de bromotimol	6,0 - 7,0
Fenolftaleína	8,3 -10,0
Azul do Nilo A	9,0 -13,0
Timolftaleína	9,3 -10,5
Amarelo de alizarina GG	10,0 -12,0
Tropeolina 0	11,0 -12,7
Amarelo titan	12,0 -13,0

### ALARANJADO DE METILA (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S) (CI 13025)

Fornecer coloração vermelha em meio moderadamente ácido (faixa de pH: 2,9-4,0) e coloração amarela em meio fracamente ácido e alcalino.

- *Solução de alaranjado de metila a 0,1%.*  
Solução a 0,1% (p/V) em etanol a 20%.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,1 ml de solução indicadora com 100 ml de água isenta de dióxido de carbono apresenta cor amarela. São necessários não mais que 0,1 ml de ácido clorídrico 0,1 M para determinar a mudança de cor para vermelho.
- *Solução de alaranjado de metila*  
Dissolver 20 mg de alaranjado de metila e 0,1 g de verde de bromocresol em 1 ml de hidróxido de sódio 0,2 M e água até o volume de 100 ml. Esta solução fornece coloração laranja em soluções moderadamente ácidas (faixa de pH: 3,0-4,0) e coloração verde-oliva em soluções fracamente ácidas e alcalinas.

### ALARANJADO DE XILENOL (C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>12</sub>S)

Em meio ácido apresenta cor amarela-pálida. Reagindo com certos metais (tais como chumbo e zinco), forma complexo de cor vermelha intensa. Em presença de excesso de EDTA dissódico adquire cor amarela.

- *Solução de alaranjado de xilenol*  
Solução a 0,1% (p/V) em etanol.

### ALIZARINA (C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>7</sub>.S.H<sub>2</sub>O)

Pó amarelo-laranja, facilmente solúvel em água e álcool.

- *Solução de alizarina*  
Solução aquosa a 0,1% (p/V).

### AMARELO DE ALIZARINA GG (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>) (CI 14025)

Fornecer coloração amarelo-pálida em soluções fracamente alcalinas e coloração marrom em soluções fortemente alcalinas (faixa de pH: 10,0-12,0).

- *Solução de amarelo de alizarina GG*  
Solução aquosa na concentração de 0,1% (p/V).

### AMARELO DE DIMETILA (C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>) (CI 11020)

Fornecer coloração vermelha em soluções moderadamente ácidas e coloração amarela em soluções fracamente ácidas (faixa de pH: 2,8-4,6) e alcalinas.

- *Solução de amarelo de dimetila*  
Solução a 0,2% (p/V) em etanol a 90%.
- *Ensaio de homogeneidade*  
Preparar solução a 0,01% (p/V) em diclorometano e aplicar 0,01 ml desta solução em cromatoplaça de sílica-gel G. Usar como eluente o diclorometano. O cromatograma deve mostrar uma única mancha.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Preparar solução de 2 g de cloreto de amônio em 25 ml de água isenta de dióxido de carbono. Esta solução, adicionada de 0,1 ml da solução de amarelo de dimetila, deve apresentar cor amarela. A coloração passa a vermelha pela adição de não mais que 0,1 ml de ácido clorídrico 0,1 M.

### AMARELO DE METANILA (C<sub>14</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S) (CI 13065)

Em titulações desenvolvidas em meio não-aquoso muda a coloração de amarela (meio básico) para carmim (meio ácido).

- *Solução de amarelo de metanila*  
Solução a 0,1% (p/V) em metanol.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Dissolver 0,1 ml da solução de amarelo de metanila em 50 ml de ácido acético glacial anidro. Esta solução deve apresentar coloração vermelho-rosada. Adicionar 0,05 ml de ácido perclórico 0,1 M. A coloração deve mudar para violeta.

**AMARELO NAFTOL** ( $C_{10}H_7NaO_2$ )  
(CI 10315)

Fornece solução incolor em meio fortemente ácido e coloração amarela em soluções menos ácidas (faixa de pH: 2,0-3,2).

**AMARELO TITAN** ( $C_{22}H_{19}N_2Na_2O_8S_4$ )  
(CI 19540)

Em soluções ácidas e moderadamente alcalinas fornece coloração amarela. Em soluções fortemente alcalinas (faixa de pH: 12,0-13,0) apresenta cor vermelha.

- *Solução de amarelo titan*  
Solução aquosa a 0,05% (p/V).
- *Papel de amarelo titan*  
Impregnar papel de filtro comum com solução de amarelo titan. Secar ao ar à temperatura ambiente.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Preparar mistura de 10 ml de água, 0,2 ml de solução padrão de sulfato de magnésio (10 ppm de Mg) e 10 ml de hidróxido de sódio 1 M. Adicionar 0,1 ml de solução de amarelo titan. Preparar prova em branco de maneira análoga, porém omitindo o padrão de magnésio. Comparar as duas soluções: coloração rosa intensa desenvolve-se em comparação à prova em branco.

**AMIDO** (Amido solúvel)

Pó branco.

- *Solução de amido:*  
Preparar solução a 2% (p/V) em água quente. A solução pode apresentar pequena opalescência.
- *Solução de amido iodetado*  
Misturar 1,0 g de amido em 5 ml de água, verter sobre 100 ml de água fervente, agitando constantemente. Adicionar 10 mg de iodeto mercúrico.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Juntar 1 ml de solução de amido, 20 ml de água, aproximadamente 50 mg de iodeto de potássio e, finalmente, 0,05 ml de iodo 0,01 M. Há desenvolvimento de cor azul.
- *Papel de amido iodetado*  
Usar a solução de amido, recém-preparada, acrescida de 0,5 g de iodeto de potássio.

**AZUL DE BROMOFENOL** ( $C_{19}H_{11}Br_4O_3$ )

Fornece cor amarela em soluções moderadamente ácidas e cor violeta-azulada em soluções fracamente ácidas (faixa de pH: 2,8-4,6) e alcalinas.

- *Solução de azul de bromofenol*  
Dissolver, aquecendo brandamente, 0,2 g de azul de bromofenol em 3 ml de hidróxido de sódio 0,1 M e 10 ml de etanol a 96%. Deixar esfriar e completar o volume de 10 ml com etanol a 96%.

**AZUL DE BROMOTIMOL** ( $C_{27}H_{28}Br_2O_2S$ )

Fornece coloração amarela em soluções fracamente ácidas e coloração azul em soluções fracamente alcalinas. Em meio neutro (faixa de pH: 6,0-7,0) fornece coloração verde.

- *Solução de azul de bromotimol*  
Aquecer 1 g de indicador com 3,2 ml de solução 0,05 M de hidróxido de sódio e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução completar o volume a 250 ml com etanol a 90%.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,3 ml de solução de azul de bromotimol e 100 ml de água isenta de dióxido de carbono apresenta coloração amarela. A coloração muda para azul pela adição de não mais que 0,1 ml de solução de hidróxido de sódio 0,02 M.

**AZUL DE HIDROXINAFTOL** ( $C_{20}H_{14}N_2O_{11}S_2$ )

Na faixa de pH entre 12 e 13, sua solução possui cor rosa-avermelhada em presença de íons cálcio. Diante de excessos de EDTA dissódico, apresenta cor azul intensa.

- *Solução de azul de hidroxinaftol*  
Solução a 0,1% (p/V) em etanol.

**AZUL DO NILO A** ( $C_{20}H_{21}N_3O_2S$ )  
(CI 51180)

Confere coloração azul a soluções fracamente alcalinas e coloração vermelha a soluções fortemente alcalinas (faixa de pH: 9,0-13,0).

- *Solução de azul do Nilo A*  
Solução a 1% em ácido acético glacial anidro.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,25 ml da solução de azul do Nilo A em 50 ml de ácido acético glacial anidro apresenta cor azul. A coloração passa a azul-esverdeada pela adição de não mais que 0,1 ml de ácido perclórico 0,1 M.
- *Ensaio de identificação*  
A solução a 0,0005% (p/V) em etanol a 50% mostra máximo de absorção em 640 nm.

**AZUL DE ORACET B**

Constitui-se em mistura de 1-metilamino-4-anilina-traquinona e 1-amino-4-anilina-traquinona. Quando utilizado em titulações em meio não-aquoso muda de coloração azul (meio básico) para púrpura (meio neutro) e para rosa (meio ácido).

- *Solução de azul de oracet B*  
Solução a 0,5% (p/V) em ácido acético glacial anidro.

**AZUL DE TIMOL** ( $C_{27}H_{30}O_2S$ )

Apresenta coloração vermelha em soluções fortemente ácidas (faixa de pH: 1,2-2,8), coloração amarela em soluções fracamente ácidas e alcalinas e coloração azul em soluções mais alcalinas (faixa de pH: 8,0-9,6).

- *Solução de azul de timol*  
Aquecer 0,1 g do indicador com 4,3 ml de hidróxido de sódio a 0,05% e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução completar o volume a 250 ml com etanol a 20%.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,1 ml da solução de azul de timol,

100 ml de água isenta de dióxido de carbono e 0,2 ml de hidróxido de sódio 0,02 M apresenta cor azul. A coloração altera para amarela pela adição de não mais que 0,1 ml de ácido clorídrico 0,2 M.

#### CALCONA (C<sub>20</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>)

Pó pardo-negro com nuances violáceas. Bastante solúvel em água e facilmente solúvel em etanol e acetona. Fornece cor vermelho-púrpura com íons cálcio em meio alcalino. Em presença de excesso de edetato dissódico, a solução adquire cor azul.

- *Solução de calcona*  
Solução a 0,1% (p/V) em metanol anidro.
- *Mistura composta de calcona*  
Misturar uma parte de calcona com 99 partes de sulfato de sódio.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Dissolver 0,2 g de mistura composta de calcona em 5 ml de água. Juntar 1 ml da solução do corante, 50 ml de água, 10 ml de hidróxido de sódio M e 1 ml de sulfato de magnésio 1% (p/V). A solução é azul, tornando-se violeta pela adição de 0,1 ml de cloreto de cálcio 0,15% (p/V). A adição de 0,1 ml de EDTA dissódico 0,01 M fornece cor azul intensa.

#### CLORETO FÉRRICO (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)

Massa cristalizada amarelo-laranja, deliçescente, muito solúvel em água e solúvel em etanol e éter etílico. O sal e suas soluções, expostos à luz, sofrem redução parcial.

- *Solução de cloreto férrico*  
Solução aquosa a 10,5% (p/V).

#### CLORETO DE METILROSANILÍNIO (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>ClN<sub>3</sub>) (CI 42555)

Em titulações em meio não-aquoso a coloração muda de violeta (meio básico) para azul-esverdeada (meio neutro) e para verde-amarelada (meio ácido).

- *Solução de cloreto de metilrosanilínio*  
Solução a 0,5% (p/V) em ácido acético glacial anidro.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,1 ml de solução indicadora com 50 ml de ácido acético glacial anidro mostra coloração púrpura-azulada. A adição de 0,1 ml de uma solução de ácido perclórico 0,1 M altera a coloração para verde.

#### CORANTE BVF

Constitui-se de indicador misto, obedecendo à formulação:

azul de bromotimol. . . . .	0,10 g
vermelho de metila . . . . .	0,02 g
fenolftaleína. . . . .	0,20 g
etanol q.s.p. . . . .	100,0 ml

Filtrar.

#### DIFENILCARBAZIDA (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O)

Pó branco cristalino, adquirindo coloração rósea. Muito pouco solúvel em água; solúvel em etanol quente, acetona e ácido acético glacial.

#### - *Solução de difenilcarbazona*

Dissolver 1 g de difenilcarbazona em 100 ml de etanol a quente. Armazenar ao abrigo da luz.

#### DIFENILCARBAZONA (C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O)

Cristais de coloração laranja-avermelhada. Insolúvel em água e solúvel em etanol, clorofórmio e benzeno.

#### - *Solução de difenilcarbazona*

Dissolver 0,1 g do indicador em etanol. Armazenar ao abrigo da luz.

#### EOSINA Y (C<sub>20</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (CI 45.380)

A solução a 1,0% (p/V) acidificada com ácidos minerais forma precipitado laranja a laranja avermelhado de tetrabromofluoresceína.

A adição de 20 ml de hidróxido de sódio a 40,0% (p/V) sobre 10,0 ml da solução de eosina Y a 1,0% (p/V) forma precipitado vermelho.

#### - *Solução de eosina Y*

Solução aquosa a 1,0% (p/V).

#### FENOLFTALEÍNA (C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)

Fornecer soluções incolores em meio ácido e fracamente alcalino. Apresenta coloração vermelha em soluções alcalinas mais fortes (faixa de pH: 8,3-10,0).

#### - *Solução de fenolftaleína*

Solução a 0,1% (p/V) em etanol a 80%.

#### - *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,1 ml de solução de fenolftaleína e 1000 ml de água isenta de dióxido de carbono é incolor. São necessários não mais que 0,2 ml de uma solução de hidróxido de sódio 0,02 M para o aparecimento de coloração rósea.

#### - *Papel de fenolftaleína*

Imergir tiras de papel de filtro comum em solução de fenolftaleína por alguns minutos e secar ao ar à temperatura ambiente.

#### MAGNESON (C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

Em titulações de meio não-aquoso muda a coloração laranja (meio ácido) para azul (meio básico), passando pela coloração rosa.

#### - *Solução de magneson*

Solução a 0,2% (p/V) em tolueno.

#### - *Reagente de magneson*

Solução de magneson a 0,1% (p/V) em hidróxido de sódio a 1% (p/V).

#### 1-NAFTOLBENZEIFINA (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>)

Quando utilizado em titulações não-aquosas, muda a coloração azul ou verde-azulada (meio básico) para laranja (meio neutro) e para verde-escura (meio ácido).

- *Solução de 1-naftolbenzeína*  
Solução a 0,2% (p/V) em ácido acético glacial anidro.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Adicionar 0,25 ml de solução de 1-naftolbenzeína a 50 ml de ácido acético glacial anidro. São necessários não mais que 0,05 ml de ácido perclórico 0,1 M para efetuar a mudança da coloração amarelo-marrom para verde.

**1-NAFTOLFTEALÉINA (C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O)**

Fornecer solução incolor ou vermelha pálida nos meios ácido e neutro e coloração azul em soluções moderadamente alcalinas.

- *Solução de 1-naftolftealéina*  
Solução a 0,5% (p/V) em etanol a 96%.

**NEGRO DE ERIOCROMO T (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>S) (CI 14.645)**

Em meio ácido clorídrico produz precipitado violeta-marrom; tratado com ácido sulfúrico forma precipitado azul-escuro que, diluído, muda para cor marrom. Em solução aquosa de hidróxido de sódio apresenta cor violeta.

- *Solução de negro de eriocromo T*  
Dissolver 0,5 g de negro de eriocromo e 4,5 g de cloridrato de hidroxilamina em metanol a 100 ml.  
Preparar no momento do uso.

**OXALATO DE AMÔNIO (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)**

Cristais ou grânulos incolores solúveis em água.

- *Solução de oxalato de amônio*  
Solução aquosa a 4% (p/V).

**PÚRPURA DE BROMOCRESOL (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S)**

Fornecer coloração amarela em soluções fracamente ácidas e coloração azul-violeta em soluções alcalinas, neutras e ácidas muito próximas à neutralidade (faixa de pH: 5,2-6,8).

- *Solução de púrpura de bromocresol*  
Aquecer 0,1 g de púrpura de bromocresol com 5 ml de etanol a 90% até dissolução. Adicionar 3,7 ml de hidróxido de sódio 0,05 M e etanol a 20% para completar o volume de 250 ml.
- *Ensaio de sensibilidade*  
Misturar 0,2 ml da solução de púrpura de bromocresol e 100 ml de água isenta de dióxido de carbono. Adicionar 0,05 ml de hidróxido de sódio 0,02 M. Esta solução possui a coloração azul violácea. Para alterar a coloração para amarela são necessários não mais que 0,2 ml de ácido clorídrico 0,02 M.
- *Reagente de púrpura de bromocresol*  
Solução "A": dissolver 38 g de fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 2 g de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em água e completar o volume a 1000 ml. Ajustar o pH a 5,3.  
Solução "B": dissolver 0,4 g de púrpura de bromo-

cresol em 30 ml de água, adicionar 6,3 ml de hidróxido de sódio 0,1 M e completar o volume a 500 ml com água.

Reagente: misturar volumes iguais da solução "A", solução "B" e clorofórmio. Agitar durante 5 minutos, deixar decantar e desprezar a camada clorofórmica.

**PÚRPURA DE METACRESOL (C<sub>21</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>S)**

Apresenta coloração vermelha em soluções fortemente ácidas (faixa de pH: 0,5-2,5), coloração amarela em soluções menos ácidas e neutras e coloração violeta em soluções moderadamente alcalinas (faixa de pH: 7,5-9,2).

- *Solução de púrpura de metacresol*  
Solução a 0,1% (p/V) em hidróxido de sódio 0,001 M.

**RESAZURINA (C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>4</sub>)**

Fornecer coloração rósea em soluções fracamente ácidas (faixa de pH: 5,0-7,0) e coloração violeta em soluções fracamente alcalinas.

- *Solução de resazurina*  
Solução a 0,1% (p/V) em hidróxido de sódio 0,02 M. Esta solução indicadora deve ser de preparação recente.

**RESORCINOL (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>)**

Pó ou cristais incolores ou ligeiramente rosados. Solúvel em água e álcool.

- *Solução de resorcinol*  
Colocar 0,2 g de resorcinol em 100 ml de benzeno. Deixar decantar.

**TIMOLFTEALÉINA (C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>)**

É incolor em meio ácido e fracamente alcalino. Fornece coloração azul em soluções alcalinas mais intensas (faixa de pH: 9,3-10,5).

- *Solução de timolftealéina*  
Solução a 0,1% (p/V) em etanol a 96%.
- *Ensaio de sensibilidade*  
A mistura de 0,05 ml de solução de timolftealéina com 100 ml de água isenta de dióxido de carbono é incolor. São necessários não mais que 0,05 ml de hidróxido de sódio 0,1 M para mudar a coloração para azul.

**TIOCIANATO DE AMÔNIO (NH<sub>4</sub>SCN)**

Cristais incolores e deliçescentes. Muito solúvel em água e solúvel em etanol.

- *Solução de tiocianato de amônio*  
Solução a 7,6% (p/V) em água (aproximadamente 1 M).

**TORNASSOL**

É constituído de pigmento índigo azul preparado a partir de várias espécies de *Rocella*, *Lecanosa* ou outros líquens. O pigmento possui odor característico.

Fornece coloração vermelha com os ácidos e azul com os álcalis (faixa de pH: 5,0-8,0).

– *Solução de tornassol*

Ferver sob refluxo, durante uma hora, 25 g de tornassol, finamente pulverizado, com 100 ml de etanol a 90%. Desprezar o etanol e repetir a operação por duas vezes, utilizando em cada extração 75 ml de etanol a 90%. Tratar o tornassol extraído com 250 ml de água. Filtrar.

– *Papel de tornassol azul*

Ferver 10 partes de tornassol, finamente pulverizado, com 100 partes de etanol a 96%, sob refluxo, por uma hora. Decantar e desprezar o etanol, adicionar ao resíduo mistura de 45 partes de etanol e 15 partes de água. Deixar macerando por dois dias. Decantar o sobrenadante e impregnar tiras de papel de filtro comum com o extrato. Secar à temperatura ambiente.

– *Ensaio de sensibilidade*

Mergulhar tira de papel de tornassol azul, medindo 10 mm x 60 mm, em 100 ml de mistura de 10 ml de ácido clorídrico 0,02 M e 90 ml de água. Agitar. O papel adquire cor vermelha ao fim de 45 segundos.

– *Papel de tornassol vermelho*

Adicionar ácido clorídrico 2 M ao extrato obtido no processo de preparação do papel azul, gota a gota, até que a solução apresente coloração vermelha. Impregnar tiras de papel de filtro com esta solução e deixar secar à temperatura ambiente.

– *Ensaio de sensibilidade*

Mergulhar tira de papel de tornassol vermelho em 100 ml de solução de hidróxido de sódio 0,002 M. Agitar. O papel deve ficar azul ao final de 45 segundos.

TROPEOLINA O  
(CI 14270)

Fornece soluções de coloração amarela em meio moderadamente alcalino e coloração laranja em soluções fortemente alcalinas (faixa de pH: 11,0-12,7).

– *Solução de tropeolina O*

Solução a 0,025% (p/V) em 50 ml de metanol e água para completar 100 ml.

– *Ensaio de homogeneidade*

Aplicar 0,01 ml da solução a 0,025% em cromatoplaça de celulose G. Desenvolver o cromatograma com a mistura 1-propanol, acetato de etila e água (5:1:4). O cromatograma deve mostrar uma única mancha com Rf aproximadamente 0,9.

TROPEOLINA OO (C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>S)  
(CI 13080)

Fornece coloração vermelha em soluções fortemente ácidas (faixa de pH: 1,0-2,8) e coloração amarela em soluções menos ácidas.

VERDE DE BROMOCRESOL (C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S)

Fornece coloração amarela em soluções moderadamente ácidas (faixa de pH: 3,6-5,2) e azul em soluções fracamente ácidas e alcalinas.

– *Solução de verde de bromocresol*

Aquecer 0,1 g do corante com 2,9 ml de hidróxido de sódio 0,05 M e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução, adicionar etanol a 20% até o volume de 250 ml.

– *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,2 ml da solução de verde de bromocresol e 100 ml de água isenta de dióxido de carbono apresenta cor azul. São necessários não mais que 0,2 ml de ácido clorídrico 0,02 M para alterar a coloração para amarela.

VERDE DE METILA (C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>BrClN<sub>9</sub>)  
(CI 42.590)

Em solução de ácido sulfúrico apresenta cor amarela. Pela diluição retorna à coloração verde.

– *Solução de verde de metila*

Solução a 0,1% (p/V).

VERMELHO DE CONGO (C<sub>33</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>)  
(CI 22120)

Apresenta coloração azul em soluções moderadamente ácidas (faixa de pH: 3,0-5,0) e coloração vermelha em soluções fracamente ácidas e alcalinas.

– *Solução de vermelho de Congo*

Dissolver 0,25 g de vermelho de Congo em 50 ml de etanol a 90% e água até completar 250 ml.

– *Papel de vermelho de Congo*

Mergulhar tiras de papel de filtro comum em solução de vermelho de Congo e deixar secar à temperatura ambiente.

– *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,2 ml de solução indicadora. 100 ml de água isenta de dióxido de carbono e 0,3 ml de ácido clorídrico 0,1 M possui coloração azul. São necessários não mais que 0,3 ml de hidróxido de sódio 0,1 M para alterar a coloração para rósea.

VERMELHO CRESOL (C<sub>21</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub>S)

Fornece coloração vermelha em soluções fortemente ácidas (faixa de pH: 0,2-1,8), coloração amarela em soluções menos ácidas e neutras; em soluções moderadamente alcalinas apresenta cor vermelha (faixa de pH: 7,2-8,8).

– *Solução de vermelho cresol*

Aquecer 50 mg de vermelho cresol com 2,65 ml de hidróxido de sódio 0,05 M e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução, adicionar etanol a 20% até completar 250 ml.

– *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,1 ml da solução de vermelho cresol e 1000 ml de água, isenta de dióxido de carbono, adicionada de 0,15 ml de hidróxido de sódio 0,02 M apresenta coloração vermelho-púrpura. A coloração muda para amarela pela adição de não mais que 0,15 ml de ácido clorídrico 0,02 M.



VERMELHO DE FENOL ( $C_{19}H_{14}O_3S$ )

Fornece coloração amarela em meio neutro e vermelha em solução fracamente alcalina (faixa de pH: 6,8-8,4).

– *Solução de vermelho de fenol*

Aquecer 0,1 g de vermelho de fenol com 1,42 ml de hidróxido de sódio 0,2 M e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução, adicionar etanol a 20% para completar 250 ml.

– *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,1 ml de vermelho de fenol e 100 ml de água isenta de dióxido de carbono apresenta cor amarela. São necessários não mais que 0,1 ml de hidróxido de sódio 0,02 M para alterar a coloração para violeta-avermelhada.

VERMELHO DE METILA ( $C_{15}H_{11}N_3O_2$ )  
(CI 13020)

Fornece coloração vermelha em soluções fracamente ácidas (faixa de pH: 3,0-4,4) e coloração amarela em soluções muito fracamente ácidas e alcalinas.

*Solução de vermelho de metila*

Aquecer 0,1 g de vermelho de metila com 1,85 ml de hidróxido de sódio 0,2 M e 5 ml de etanol a 90%. Após dissolução, completar o volume de 250 ml com etanol a 50%.

– *Ensaio de sensibilidade*

A mistura de 0,1 ml da solução indicadora, 100 ml de água isenta de dióxido de carbono e 0,05 ml de ácido clorídrico 0,02 M apresenta cor vermelha. São necessários não mais que 0,1 ml de hidróxido de sódio 0,02 M para mudar a coloração para amarela.

VERMELHO DE QUINALDINA ( $C_{21}H_{23}IN_3$ )

Utilizado em titulações de bases com ácido perclórico, ocorrendo mudança de coloração carmim para quase incolor.

– *Solução de vermelho de quinaldina*

Solução a 0,1% (p/V) em metanol.

## XII.2. REAGENTES E SOLUÇÕES REAGENTES

Reagentes são substâncias utilizadas, quer como tais quer como constituintes de soluções, na realização dos ensaios farmacopéicos.

### Acetato de amônio

*Fórmula e massa molecular* –  $C_2H_7NO_2$  – 77,08

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais incoloros, muito deliqüescentes, de fraco odor acético.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

### Acetato de amônio 2 M

Usar acetato de amônio SR.

### Acetato de amônio SR

*Especificação* – Contém 15,0 g de acetato de amônio em água a 100 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* – Preparar para uso imediato.

### Acetato de celulose

*Especificação* – Celulose parcialmente acetilada, com graus de acetilação variados.

*Descrição* – Sólido amorfo branco.

*Características físicas* – Não apresenta pontos de fusão definidos.

*Categoria* – Adsorvente em cromatografia em camada delgada.

### Acetato de chumbo(II), trídrico

*Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_4PbO_4 \cdot 3H_2O$  – 379,33

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais incoloros, transparentes ou pó cristalino branco, de odor acético fraco. Eflorescente.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 75 °C (aquecimento rápido); decompõe-se completamente a 200 °C.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Segurança* – Tóxico. Poluente.

### Acetato de chumbo, papel

*Preparação* – Impregnar papel adequado (geralmente no tamanho 6x80 mm) com a solução de acetato de chumbo SR. Secar o papel reagente a 100 °C, evitando contato com metal.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz e da umidade.

### Acetato de chumbo(II) SR (aproximadamente 0,25 M)

*Especificação* – Contém 9,5 g em água isenta de dióxido de carbono a 100,0 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Tóxico. Poluente.

### Acetato de chumbo(II), solução saturada

*Especificação* – Contém aproximadamente 35 g em água isenta de dióxido de carbono a 50,0 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Tóxico. Poluente.

### Acetato de clorexidina

*Fórmula e massa molecular* –  $C_{26}H_{38}Cl_2N_{10}O_4$  – 625,58

*Descrição* – Cristais ou pó cristalino branco a creme pálido; inodoro.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 154-155 °C.

*Conservação* – Em recipientes bem fechados. Proteger da luz.

*Segurança* – Iritante.

*Categoria* – Antimicrobiano.

### Acetato de clorexidina 0,1 por cento (p/V).

*Especificação* – Contém 0,1 g em água a 100 ml

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Tóxico.

*Categoria* – Antimicrobiano.

### Acetato de cortisona

*Fórmula e massa molecular* –  $C_{23}H_{36}O_4$  – 402,49

*Especificação* – Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* – Cristais incoloros fracamente amarelados ou pó cristalino branco ou quase branco. Inodoro; inicialmente insípido, depois amargo.

*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 240 °C. Rotação óptica: +209° a +219° (1,0 por cento (p/V) em dioxana).

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Categoria* – Corticosteróide.

### Acetato de cortisona, injetável

*Descrição* – Consiste de suspensão em meio aquoso adequado, em pH entre 5,0 e 7,0.

*Especificação* – Contém, no mínimo, 90,0 por cento (p/p).

*Conservação* – Em ampolas de dose única.

### Acetato de desoxicortona

*Sinonímia* – Acetato de desoxicorticosterona.

*Fórmula e massa molecular* –  $C_{23}H_{32}O_4$  – 372,50

*Especificação* – Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* – Cristais incoloros ou pó cristalino branco. Inodoro.

*Características físicas* – Faixa de fusão: 157-161 °C. Rotação óptica: +171° a +179° (1,0 por cento (p/V) em dioxana).

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Categoria* – Corticosteróide.

**Acetato de etila**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_4H_8O_2$  - 88,11

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,9 por cento (p/V).

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico.

*Características físicas* - Densidade: aproximadamente 0,90. Ponto de ebulição: aproximadamente 77 °C. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,371 a 1,373.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger do calor.

*Segurança* - Inflamável.

**Acetato de fenilmercúrio**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_6H_5HgO_2$  - 336,74

*Especificação* - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Cristais pequenos ou pó cristalino, branco a branco-creme, brilhante.

*Características físicas* - Faixa de fusão: 149-153 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

*Segurança* - Tóxico. Poluente.

**Acetato de indofenol SR**

*Sinonímia* - 2,6-Diclorofenolindofenol em tampão acetato.

*Preparação* - Dissolver 12,0 ml da solução padrão de 2,6-diclorofenolindofenol em água a 100 ml. A esta solução juntar 100 ml de tampão acetato pH 7,0.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* - Limitada a duas semanas.

*Armazenagem* - Sob refrigeração.

**Acetato de potássio**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_3KO_2$  - 98,14

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* - Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro ou de odor acético fraco, de sabor salino, fracamente alcalino. Deliquescente.

*Características físicas* - Ponto de fusão: 292 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Acetato de prednisolona**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_{22}H_{30}O_6$  - 402,49

*Especificação* - Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p) calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* - Pó cristalino branco ou quase branco. Inodoro. Amargo.

*Características físicas* - Rotação óptica: +112° a +119° (1,0 por cento (p/V) em dioxana).

*Ponto de fusão* - Aproximadamente 247 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Categoria* - Corticosteróide.

**Acetato de sódio**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  - 136,08; anidro - 82,03

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro ou de odor acético fraco, de sabor salino, fracamente amargo. Eflorescente.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Acetato de Sódio SR (aproximadamente 0,02 M)**

*Especificação* - Contém 0,272 g de acetato de sódio triidratado em água a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Acetato de uranila**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_4H_4O_6U \cdot 2H_2O$  - 424,15.

*Descrição* - Pó cristalino amarelo, de odor acético fraco.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Substância radioativa.

**Acetato de uranila e zinco SR**

*Preparação* - Misturar 10 g de acetato de uranila em 50 ml de água quente e 5 ml de ácido acético 30 por cento (p/V). Misturar 30 g de acetato de zinco em 30 ml de água quente e 3 ml de ácido acético 30 por cento (p/V). Juntar as preparações anteriores. Deixar esfriar. Filtrar.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

*Segurança* - Substância radioativa.

**Acetato de zinco**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_4H_6O_4Zn \cdot 2H_2O$  - 219,50

*Especificação* - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Cristais incolores ou brancos, ou escamas cristalinas ou grânulos, de odor acético fraco, de sabor metálico adstringente. Eflorescente.

*Características físicas* - Ponto de fusão: 237 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Irritante.

**Acetilacetona**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_5H_8O_2$  - 100,11

*Descrição* - Líquido límpido, incolor ou amarelado, de odor aromático.

*Características físicas* - Ponto de ebulição: aproximadamente 139 °C. Densidade: aproximadamente 0,97.

Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,451 a 1,453.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Irritante. Inflamável.

**Acetona**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_3H_6O$  - 58,08

*Especificação* - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/V).

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico.

*Características físicas* - Densidade: 0,790 a 0,793.

Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,358 a 1,360. Ponto de ebulição: aproximadamente 56 °C.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

*Segurança* - Inflamável. Irritante e tóxico.

**Acetona desidratada**

*Especificação* - Acetona, desidratada sobre sulfato de sódio anidro.

*Conservação* - Preparar no momento de uso.

**Ácido acético diluído**

*Especificação* - Contém 12 g de ácido acético glacial em água a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

**Ácido acético 5 M**

*Especificação* - Contém 300 g de ácido acético glacial em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

**Ácido acético 2 M**

*Especificação* - Contém 116 ml de ácido acético glacial em água a 1000 ml. Ajustar o volume, quando a solução estiver à temperatura ambiente.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

**Ácido acético M**

*Especificação* - Contém 60 g de ácido acético glacial em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

*Informação adicional* - Ao usar, confirmar o título.

**Ácido acético 0,045 M**

*Especificação* - Contém 2,7 g de ácido acético glacial em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Ácido acético SR**

*Especificação* - Contém 30 g de ácido acético glacial em água a 100 ml. Corresponde ao ácido acético 5 M.

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, de odor irritante.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

**Ácido acético glacial**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_4O_2$  - 60,05

*Especificação* - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor irritante e característico. Apresenta sabor ácido mesmo em grande diluição; cristalizável a baixas temperaturas.

*Características físicas* - Densidade: aproximadamente 1,05. Ebulição: aproximadamente 118 °C. Temperatura de congelamento: aproximadamente 14 °C.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

*Segurança* - Corrosivo. Inflamável. Proteger olhos, pele e mucosas.

**Ácido ascórbico**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_6H_8O_6$  - 176,13

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Pó cristalino branco ou cristais incolores. Inodoro e de sabor ácido.

*Características físicas* - pH da solução a 5,0 por cento (p/V): 2,2 a 2,5. Ponto de fusão: aproximadamente 190 °C, com decomposição. Rotação óptica específica (solução a 1,0%): entre +20,5 e +21,5°.

*Conservação* - Recipientes bem fechados, não metálicos.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

**Ácido benzoico**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_7H_6O_2$  - 122,12

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* - Cristais incolores ou pó cristalino branco, de odor característico e de sabor ácido adocicado a irritante.

*Características físicas* - Ponto de fusão: aproximadamente 122 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Categoria* - Conservante.

**Ácido bórico**

*Fórmula e massa molecular* -  $H_3BO_3$  - 61,83

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/p).

*Descrição* - Cristais incolores brilhantes ou pó fino cristalino branco, untuoso ao tato, de sabor fracamente ácido e amargo.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Ácido bórico, solução saturada**

*Preparação* - Dissolver 5,0 g em volume final de água a 100,0 ml.

*Características físicas* - Solubilidade em água 1:20 (20 °C).

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Ácido bromídrico**

*Fórmula e massa molecular* -  $HBr$  - 80,91

*Especificação* - Contém 48,0 por cento (p/V).

*Descrição* - Líquido incolor ou fracamente amarelo, de odor forte e irritante. Escurece lentamente pela exposição ao ar e à luz.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger do ar e da luz.

*Segurança* - Irritante, corrosivo.

**Ácido calconcarboxílico**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_{21}H_{14}N_2O_7S$  - 438,40

*Descrição* - Pó marrom-preto.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Ácido clorídrico**

*Sinonímia* - cloreto de hidrogênio.

*Fórmula e massa molecular* -  $HCl$  - 36,46

*Especificação* - Contém, no mínimo 35,0 por cento (p/p) constituído de solução de  $HCl$  gasoso em água.

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, fumegante, de odor irritante.

*Características físicas* - Densidade: aproximadamente 1,18. Ebulição: azeótropo com 20,2 por cento de  $HCl$  em água (6,1 M): 109 °C.

*Conservação* - Recipientes herméticos, de material inerte ao reagente.

*Segurança* - Proteger do calor (<20 °C). Corrosivo. Evitar contato externo, olhos e pele, inalção e ingestão.

**Ácido clorídrico diluído**

*Especificação* - Usar ácido clorídrico SR.

**Ácido clorídrico 2 M**

*Especificação* - Contém 206,0 g de ácido clorídrico em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger do calor.

*Segurança* - Corrosivo.

**Ácido clorídrico M**

*Especificação* - Contém 103 g de ácido clorídrico em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* - Proteger do calor.

*Segurança* - Corrosivo.

*Informação adicional* - Ao usar, confirme o título.

**Ácido clorídrico 0,5 M**

*Especificação* - Contém 43 ml de ácido clorídrico em água a 1000 ml.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

*Armazenagem* - Proteger do calor.

**Ácido clorídrico SR**

*Sinonímia* – Ácido clorídrico 10 por cento (p/V).

*Especificação* – Contém 27,4 g de ácido clorídrico em água a 100 ml.

*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,05.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* – Proteger do calor.

*Segurança* – Corrosivo.

**Ácido crômico**

Onde constar, usar trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>).

**Ácido edético**

*Sinonímia* – Ácido etilendiaminotetracético.

*Fórmula e massa molecular* – C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> – 292,24

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais incolores.

*Características físicas* – Decompõe-se ao redor de 220 °C, podendo descarboxilar a 150 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Ácido fenoldissulfônico SR**

*Descrição* – Líquido límpido a marrom claro.

*Preparação* – Dissolver 2,5 g de fenol em 15,0 ml de ácido sulfúrico. Juntar 7,5 ml de ácido sulfúrico fumegante. Aquecer a 100 °C por duas horas. Transferir o produto líquido para recipiente adequado. Para uso, liquefazer em banho de água.

*Conservação* – Recipiente de vidro com tampa esmerilhada.

*Segurança* – Irritante e corrosivo.

**Ácido fórmico**

*Sinonímia* – Ácido metanóico.

*Fórmula e massa molecular* – CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 46,03

*Especificação* – A forma anidra contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p). O comercial contém em torno de 90,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Líquido incolor, muito cáustico, de odor picante.

*Características físicas* – Ponto de ebulição: 100,5 °C. Densidade: aproximadamente 1,22. Índice de refração (n<sub>D</sub><sup>20</sup>): 1,3714. Solidifica a 70 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Cáustico.

**Ácido fosfomolibdico**

*Sinonímia* – Ácido molibdofosfórico.

*Fórmula e massa molecular* – Aproximadamente 20 MoO<sub>3</sub> · P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> · 51H<sub>2</sub>O – 3.939,48

*Descrição* – Cristais fracamente amarelados.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Ácido fosfomolibdico 3,5 por cento (p/V) em n-propílico.**

*Especificação* – Contém 3,5 g de ácido fosfomolibdico em 1-propanol a 100 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Inflamável.

**Ácido fosfórico**

*Sinonímia* – Ácido ortofosfórico

*Fórmula e massa molecular* – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – 98,00

*Especificação* – Contém, no mínimo, 85,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Líquido límpido, incolor, inodoro. Higroscópico; consistência xaroposa.

*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,7.

*Conservação* – Em recipientes herméticos. Armazenar cuidadosamente.

*Segurança* – Corrosivo! Evitar contato com pele, mucosas, membranas.

**Ácido fosfórico 6 M**

*Preparação* – Misturar quantidade correspondente a 588,0 g de ácido fosfórico concentrado com água até completar 1000 ml.

**Ácido fosfórico SR**

*Preparação* – Misturar quantidade correspondente a 15,0 g de ácido fosfórico concentrado com água até perfazer 100 ml.

*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,15.

**Ácido p-hidroxibenzoico**

*Fórmula e massa molecular* – C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> – 138,13

*Descrição* – Cristais incolores.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 213-214 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Ácido metafosfórico**

*Fórmula e massa molecular* – (HPO<sub>3</sub>)<sub>n</sub>; monômero-79,98.

*Especificação* – Contém certa proporção de metafosfato de sódio.

*Descrição* – Sólido ou massa vítrea, incolor. Higroscópico. Em solução aquosa, transforma-se lentamente em ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

*Características físicas* – Volatiliza sob aquecimento intenso.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

**Ácido metafosfórico-acético SR**

*Especificação* – Contém 3,0 g de ácido metafosfórico e 8,0 ml de ácido acético glacial em água a 100 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* – Limitada.

*Armazenagem* – Manter sob refrigeração.

**Ácido nítrico**

*Fórmula e massa molecular* – HNO<sub>3</sub> – 63,01

*Especificação* – Contém, no mínimo, 63,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Solução límpida, praticamente incolor, de odor característico.

*Características físicas* – Densidade: 1,384 a 1,416

*Conservação* – Recipientes herméticos, ao abrigo da luz.

*Segurança* – Corrosivo.

**Ácido nítrico fumegante**

*Especificação* – Contém, no mínimo, 95,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Líquido límpido, levemente amarelado, fumegante no ar.

**Ácido nítrico M**

*Preparação* – Diluir 9,66 g de ácido nítrico em água até 100 ml.

**Ácido nítrico SR**

*Especificação* – Contém 12,6 por cento (p/V) de HNO<sub>3</sub>.

**Características físicas** — Densidade : aproximadamente 1,5.

#### Ácido oxálico

**Sinonímia** — Ácido etanodióico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$  — 126,07

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais incolores ou pó cristalino branco.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 101 °C.

**Segurança** — Veneno!

#### Ácido oxálico SR

**Especificação** — Solução a 6,3 por cento (p/V) (aproximadamente 0,5 M).

#### Ácido perclórico

**Fórmula e massa molecular** —  $HClO_4$  — 100,46

**Especificação** — Contém, no mínimo, 70,0 por cento (p/p) e, no máximo, 72,0 por cento de  $HClO_4$ .

**Descrição** — Líquido límpido, incolor, volátil e de odor picante. Higroscópico.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 1,7.

**Conservação** — decompõe-se espontaneamente, podendo explodir especialmente em contato com substâncias oxidáveis.

**Segurança** — Irritante. Corrosivo!

#### Ácido perclórico M

**Especificação** — Contém 8,5 ml de  $HClO_4$  em água, perfazendo 100 ml.

**Estabilidade** — Usar solução recém-preparada.

#### Ácido perclórico SR

Usar ácido perclórico M.

#### Ácido perfórmico

**Sinonímia** — Ácido peroxifórmico.

**Fórmula e massa molecular** —  $CH_2O_3$  — 62,03

**Preparação** — Misturar 1,0 ml de peróxido de hidrogênio 30,0 por cento (V/V), ou 9,0 por cento (p/p), com 90 ml de ácido fórmico.

**Conservação** — Preparar no momento de uso. Proteger do calor.

**Segurança** — Irritante. Pode explodir em contato com metais, seus óxidos, substâncias redutoras, ou na destilação.

#### Ácido salicílico

**Sinonímia** — Ácido 2-hidroxibenzoico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_7H_6O_3$  — 138,12

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre base seca.

**Descrição** — Pó cristalino branco ou agulhas cristalinas incolores. Inodoro e sabor ácido adocicado e irritante.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 156-160 °C.

**Conservação** — Em frascos bem fechados.

#### Ácido sulfanílico

**Sinonímia** — Ácido 4-aminobenzenossulfônico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_6H_7NO_2S \cdot H_2O$  — 191,20; anidro — 173,84.

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais incolores ou pó branco.

**Características físicas** — O ácido monoidratado decompõe-se sem fundir a aproximadamente 288 °C.

#### Ácido sulfanílico SR

**Especificação** — Contém 0,50 g de ácido sulfanílico finamente pulverizado, adicionados de 6,0 ml de ácido clorídrico 6 M. Completar com água até 100 ml.

#### Ácido sulfúrico

**Fórmula e massa molecular** —  $H_2SO_4$  — 98,07

**Especificação** — Contém, no mínimo 95,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Líquido incolor, cáustico, de consistência oleosa, muito higroscópico.

**Características físicas** — Densidade: 1,834 a 1,839.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Irritante. Corrosivo.

#### Ácido sulfúrico M

**Especificação** — Contém 110,4 g de ácido sulfúrico em água a 1000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Ácido sulfuroso

**Fórmula e massa molecular** —  $H_2SO_3$  — 82,07

**Especificação** — Contém 5,0 a 6,0 por cento (p/p) de dióxido de enxofre puro. Preparar de acordo com o consumo.

**Descrição** — Líquido ácido, límpido, incolor, de odor sufocante de dióxido de enxofre. Ao ar oxida-se paulatinamente a ácido sulfúrico.

**Conservação** — Recipientes quase cheios, bem fechados, em local frio.

#### Ácido tioglicólico

**Sinonímia** — Ácido mercaptoacético.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_4O_2S$  — 92,11

**Especificação** — Contém, no mínimo, 79,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Líquido incolor ou próximo a incolor, de odor forte desagradável.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 1,33.

**Conservação** — Proteger do ar.

**Segurança** — Pode causar graves queimaduras na pele.

**Informação adicional** — Sua decomposição libera gás sulfídrico.

#### Ácido tricloroacético

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2HCl_3O_2$  — 163,39

**Especificação** — Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais incolores ou massa cristalina, deliquescente, de odor característico fracamente pungente, irritante.

**Característica física** — Faixa de fusão: 55 a 61 °C.

**Conservação** — Em recipientes herméticos. Proteger do calor e da umidade.

**Segurança** — Ácido muito corrosivo.

**Ágar**

*Sinonímia* – Ágar-agar, gelose.

*Especificação* – Polissacarídeo extraído de *Gelidium cartilagineum* (L.) Gaillon (*Gelidiaceae*), *Gracilaria confervoides* (L.) Greville (*Sphaerococcaceae*) e algas vermelhas afins (*Rhodophyceae*).

*Descrição* – Pó fino, incolor ou levemente amarelado, seco, hidrofílico.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

**Água de bromo SR**

*Preparação* – Misturar 3,0 ml de bromo com 100 ml de água até saturação. Agitar antes do uso. Após decantação, usar a solução sobrenadante límpida.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Armazenagem* – Conservar com excesso de bromo e ao abrigo da luz.

*Segurança* – Tóxico.

**Água isenta de dióxido de carbono**

*Especificação* – Água fervida vigorosamente por 5 minutos ou mais e protegida da atmosfera, durante resfriamento e conservação.

*Conservação* – Proteger do ar (da absorção de  $\text{CO}_2$ ).

**Álcool isopropílico**

*Sinonímia* – Isopropanol, 2-propanol.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$  – 60,10

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento.

*Descrição* – Líquido incolor, de odor característico.

*Características físicas* – Ebulição: aproximadamente 82 °C. Densidade: aproximadamente 0,785.

Índice de refração ( $n_D^{25}$ ): 1,376 a 1,378.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Inflamável.

**Álcool n-propílico**

*Sinonímia* – 1-Propanol.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$  – 60,10

*Descrição* – Líquido límpido, incolor, de fraco odor alcoólico.

*Características físicas* – Ebulição: aproximadamente 97 °C. Densidade: 0,803 a 0,805.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Inflamável.

**Amaranto – C.I. 16.185**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_{20}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{Na}_3\text{O}_{10}\text{S}_3$  – 604,06

*Descrição* – Pó fino, facilmente solúvel em água, praticamente insolúvel em álcool, acetona, éter e clorofórmio.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Amido SR**

*Preparação* – Dissolver 2,0 g em água quente. Completar a 100 ml com água. Se necessário, filtrar.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* – Limitada: três dias.

*Armazenagem* – Sob refrigeração.

**Amido solúvel**

*Sinonímia* – Amilodextrina, amilogênio.

*Descrição* – Pó branco, fino, inodoro, insípido.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

**Amidos**

*Descrição* – Extraídos de cariopses maduras de *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. ou *Oryza sativa* L. (fam. *Graminaceae*). Pó branco, fino, inodoro, insípido e que produz ligeira crepitação quando comprimido.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

*Informação adicional* – A rotulagem deve indicar a origem botânica.

**Aminofenazona**

*Sinonímia* – Aminoantipirina.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$  – 203,24

*Descrição* – Cristais ou pó cristalino, amarelo-claro.

*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 109 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Amônia SR**

*Descrição* – Contém 37,5 ml da solução concentrada de amônia em 100 ml de solução aquosa. Esta contém, no mínimo, 10,0 por cento (p/V) de hidróxido de amônio (aproximadamente 6 M).

**Amônia 6 M**

Usar amônia SR.

**Amônia, solução concentrada**

*Sinonímia* – Hidróxido de amônio.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{NH}_3$  – 17,03

*Especificação* – Contém, no mínimo, 28,0 por cento (p/p) e, no máximo, 30,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Líquido límpido, incolor, de odor característico e asfixiante.

*Armazenagem* – Em recipientes herméticos, não completamente cheios. Proteger do ar e da luz.

*Segurança* – Cáustico.

**Anidrido acético**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$  – 102,09

*Especificação* – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Líquido móvel, incolor, odor acético intenso e irritante.

*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,075. Faixa de ebulição: 136 a 142 °C.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Segurança* – Facilmente combustível. Irritante forte.

**Anidrido acético-piridina SR**

*Descrição* – 25 g (ou 23 ml) de anidrido acético em 50 ml de piridina anidra.

*Armazenagem* – Proteger do ar e da luz.

*Segurança* – Tóxico.

**Anisaldeído**

*Sinonímia* – Aldeído anísico.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$  – 136,14

*Descrição* – Líquido oleoso, incolor e amarelado, de odor aromático.

*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,12. Ponto de ebulição: aproximadamente 248 °C.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

#### Anisaldeído, solução

**Preparação** – Misturar, na ordem, 0,5 ml de anisaldeído, 10,0 ml de ácido acético glacial, 85,0 ml de metanol e 5,0 ml de ácido sulfúrico.

#### Asparagina

**Fórmula e massa molecular** –  $C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$  – 150,13

**Descrição** – Cristais incolores, inodoros.

**Características físicas** – Isômero L: Ponto de fusão: 234-235 °C. Isômero D: Ponto de fusão: 215 °C.

#### Barbital

**Fórmula e massa molecular** –  $C_8H_{11}N_2O_3$  – 184,19

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor fracamente amargo.

**Característica físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente 190 °C.

#### Barbital sódico

**Fórmula e massa molecular** –  $C_8H_{11}N_2NaO_3$  – 206,18

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalizado branco, inodoro, de sabor amargo e fracamente cáustico.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Bário SRA – 1 mg/ml

**Especificação** – Contém 1,775 g de cloreto de bário em água a 1000 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

#### Benzeno

**Sinonímia** – Benzol.

**Fórmula e massa molecular** –  $C_6H_6$  – 78,11

**Descrição** – Líquido límpido, incolor, refrativo, volátil, de odor característico.

**Características físicas** – Faixa de ebulição: 79-81 °C. Densidade: 0,878 a 0,880. Índice de refração: 1,5016.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

**Segurança** – Altamente inflamável. Cancerígeno.

**Informação adicional** – Sempre que possível usar tolueno.

#### Bicarbonato de sódio

**Sinonímia** – Carbonato ácido de sódio, hidrogenocarbonato de sódio.

**Fórmula e massa molecular** –  $NaHCO_3$  – 84,01

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento e, no máximo 101,0 por cento (p/p), calculado em base seca.

**Descrição** – Pó cristalino branco, inodoro, de sabor salgado e fracamente alcalino. Pelo aquecimento, transforma-se em carbonato de sódio.

#### Biftalato de potássio

**Sinonímia** – Ftalato ácido de potássio, hidrogenoftalato de potássio, diftalato de potássio.

**Fórmula e massa molecular** –  $C_8H_4KO_4$  – 204,22

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,9 por cento e, no máximo, 100,3 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada a 120 °C durante duas horas.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Biftalato de potássio 0,05 M

**Preparação** – Dissolver 10,21 g em água a 1000 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Bissulfato de potássio

**Sinonímia**: Hidrogenossulfato de potássio; sulfato ácido de potássio.

**Fórmula e massa molecular** –  $KHSO_4$  – 136,16.

**Especificação**: Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição**: Cristais incolores ou massa branca; higroscópico.

**Características físicas**: Solução aquosa com caráter fortemente ácido. Ponto de fusão: 197 °C.

**Conservação**: Recipientes bem fechados.

#### Bissulfito de sódio

**Sinonímia** – Hidrogenossulfito de sódio, sulfito ácido de sódio.

**Fórmula e massa molecular** –  $NaHSO_3$  – 104,06

**Especificação** – Usar metabissulfito sódico  $Na_2S_2O_3$  (PM 190,10), onde for indicado o emprego de bissulfito sódico.

#### Brometo de iodo SR

**Preparação** – Dissolver 13,2 g de iodo em ácido acético glacial a 1000 ml. Determinar o teor de iodo em 20,0 ml desta solução, mediante titulação com tiossulfato de sódio 0,1 M SV. Ao restante da solução de iodo (980 ml), adicionar quantidade de bromo equivalente ao iodo determinado.

**Conservação** – Recipientes de vidro bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

#### Brometo de potássio

**Fórmula e massa molecular** –  $KBr$  – 119,00

**Especificação** – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco, de sabor acentuadamente salgado.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Bromo

**Fórmula e massa molecular** –  $Br_2$  – 159,80

**Descrição** – Líquido vermelho-marrom, irritante, sufocante e fumegante.

**Características físicas** – Densidade: aproximadamente 3,1.

**Conservação** – Recipientes herméticos ou ampolas.

**Segurança** – Tóxico.

#### Bromo 0,2 M em ácido acético glacial

**Preparação** – Juntar 15,0 g de brometo de potássio e 5,5 ml de bromo em ácido acético glacial a 1000 ml. Agitar e deixar em repouso por 24 horas. Titular antes do uso.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

**Segurança** – Tóxico.



**1-Butanol**

*Sinonímia* – Álcool butílico normal ou primário, *n*-butanol, álcool *n*-butílico.

*Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_{10}O$  – 74,12

*Descrição* – Líquido límpido, incolor, refrativo, de odor característico.

*Características físicas* – Ponto de ebulição: 117-118 °C. Densidade: 0,810. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,3993.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Irritante. Inflamável.

**Calciferol**

*Sinonímia* – Ergocalciferol, vitamina  $D_2$ .

*Fórmula e massa molecular* –  $C_{28}H_{44}O$  – 396,65

*Especificação* – Um grama corresponde em atividade anti-raquítica a 40 milhões de U.I.

*Descrição* – Cristais incolores ou pó cristalino branco.

*Conservação* – Recipientes herméticos, sob gás inerte.

*Armazenagem* – Proteger do calor e da luz.

**Cálcio SRA – 400 µg/ml**

*Especificação* – Contém 1,001 g de carbonato de cálcio R em 25 ml de ácido clorídrico *M*. Ferver. Completar com água a 1000,0 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Carbonato de amônio**

*Fórmula e massa molecular* –  $(NH_4)_2CO_3$  – 96,09

*Especificação* – Mistura em proporções variáveis de bicarbonato de amônio ( $NH_4HCO_3$  – 79,06) e carbamato de amônio ( $H_2NCOONH_2$  – 78,07). Contém, no mínimo, 30,0 por cento de  $NH_3$  (MM – 17,3) (p/p).

*Descrição* – Massas cristalinas brancas, translúcidas, de odor amoniacal forte.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz e do calor.

**Carbonato de amônio SR**

*Especificação* – Contém 15,8 g de carbonato de amônio (p/V) em água a 100 ml (aproximadamente 2 *M*).

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz e do calor.

**Carbonato de cálcio**

*Fórmula e massa molecular* –  $CaCO_3$  – 100,09

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,5 por cento (p/p), calculado em substância seca.

*Descrição* – Pó branco, inodoro e insípido.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Carbonato de estrôncio**

*Fórmula e massa molecular* –  $SrCO_3$  – 147,64

*Descrição* – Pó branco, inodoro e sem sabor.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Carbonato de lítio**

*Fórmula e massa molecular* –  $Li_2CO_3$  – 73,89

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,5 por cento, calculado em base seca.

*Descrição* – Pó branco, leve, inodoro.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Carbonato de sódio anidro**

*Fórmula e massa molecular* –  $Na_2CO_3$  – 105,99

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado em base seca.

*Descrição* – Pó branco, higroscópico.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

**Carbonato de sódio decaidratado**

*Fórmula e massa molecular* –  $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$  – 286,09

*Especificação* – Contém, no mínimo, 36,7 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais transparentes, incolores, eflorescentes, ou pó cristalino branco; inodoro, de sabor alcalino e salgado.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Carbonato de sódio monohidratado**

*Fórmula e massa molecular* –  $Na_2CO_3 \cdot H_2O$  – 124,00

*Especificação* – Contém, no mínimo, 83,0 por cento (p/p)

*Descrição* – Cristais incolores ou pó cristalino branco; inodoro, de sabor alcalino e salgado.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Informação adicional* – Quando prescrito carbonato de sódio para mistura em pó, usar  $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ .

**Cefalinas**

*Especificação* – Consiste em ésteres de ácido glicerosfórico com ácidos graxos de cadeia longa, sendo o grupo fosfato esterificado com etanolamina.

*Descrição* – Substância amorfa amarelada, de odor e sabor característicos.

*Categoria* – Hemostático local e reagente laboratorial em testes de função hepática.

**Chumbo SRA – 100 µg/ml**

*Especificação* – Contém 0,160 g de nitrato de chumbo(II) em 5,0 ml de ácido nítrico. Completar com água a 1000 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Cianeto de potássio**

*Fórmula e massa molecular* – KCN – 65,12

*Especificação* – Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância desidratada.

*Descrição* – Pó cristalino, massas ou grânulos brancos; deliquescente.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 634 °C.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Estabilidade* – Decompõe-se gradualmente por exposição ao ar, dióxido de carbono e umidade.

*Segurança* – Veneno violento!

**Cicloexano**

*Fórmula e massa molecular* –  $C_6H_{12}$  – 84,16

*Descrição* – Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico (semelhante ao da gasolina).

*Características físicas* – Ponto de ebulição: aproximadamente 80 °C. Densidade: aproximadamente 0,78. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,426 a 1,427.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Segurança* – Inflamável.

**Citrato de sódio**

*Sinonímia* – Citrato trissódico.

**Fórmula e massa molecular** -  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$  - 294,10

**Especificação** - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** - Cristais ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salgado, refrescante. Deliquescente.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto cobaltoso

**Fórmula e massa molecular** -  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  - 237,93

**Especificação** - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** - Pó cristalino ou cristais vermelho-violetáceos.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto cobaltoso SR

**Especificação** - Contém 6,5 g, adicionados de 70 ml de ácido clorídrico SR, em água a 100 ml.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de amônio

**Fórmula e massa molecular** -  $NH_4Cl$  - 53,49

**Especificação** - Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** - Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salgado. Higroscópico.

**Características físicas** - Sublima sem fundir a 338 °C.

**Conservação** - Recipientes herméticos.

**Armazenagem** - Proteger da umidade.

#### Cloreto de amônio SR (aproximadamente 2 M)

**Especificação** - Contém 10,7 g em água a 100 ml.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de bário

**Fórmula e massa molecular** -  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  - 244,27.

**Especificação** - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** - Cristais incolores ou pó cristalino branco.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Segurança** - Tóxico.

#### Cloreto de bário SR

**Especificação** - Contém 10,0 g em água a 100 ml.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de benzalcônio

**Fórmula e massa molecular** -

$[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2R]^+Cl^-$  - 360 (média)

**Composição química** - Mistura de cloretos de alquildimetilbenzilamônio, em que R representa alquila, a partir de  $n-C_4H_9$ , e homólogos superiores:  $n-C_{12}H_{25}$ ,  $n-C_{14}H_{29}$ , e  $n-C_{18}H_{39}$ , em maior proporção.

**Especificação** - Contém, no mínimo, 95,0 por cento em relação à mistura dessecada. Conteúdo dos homólogos alquilados presentes, em relação ao total calculado sobre base seca:  $n-C_{12}H_{25}$ : no mínimo 40,0 por cento (p/p);  $n-C_{14}H_{29}$ : no mínimo 10,0 por cento (p/p); a soma dos dois homólogos acima: no mínimo 70,0 por cento (p/p).

**Descrição** - Pó amorfo ou massa gelatinosa branca ou branco-amarelada, de odor aromático e de sabor amargo.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** - Proteger da luz e do ar.

**Categoria** - Desinfetante. Detergente. Conservante.

#### Cloreto de cálcio

**Fórmula e massa molecular** -  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  - 147,02

**Especificação** - Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p).

**Descrição** - Pó cristalino ou grânulos brancos, inodoro, de sabor salgado e fortemente amargo. Higroscópico.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** - Proteger da umidade.

#### Cloreto de cálcio, anidro

**Fórmula e massa molecular** -  $CaCl_2$  - 110,99

**Especificação** - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** - Grânulos brancos, secos. Deliquescente.

**Conservação** - Recipientes herméticos.

**Armazenagem** - Proteger da umidade.

**Categoria** - Deseccante.

#### Cloreto de cálcio SR (aproximadamente 0,5 M)

**Especificação** - Contém 7,35 g de cloreto de cálcio em água a 100,0 ml.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de cálcio, solução 0,025 M

**Especificação** - Contém 0,367 g de cloreto de cálcio em água a 100 ml.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de magnésio

**Fórmula e massa molecular** -  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  - 203,30

**Especificação** - Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

**Descrição** - Cristais incolores, de sabor amargo. Higroscópico.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** - Proteger da umidade.

#### Cloreto de mercúrio(II)

**Sinonímia** - Cloreto mercúrico.

**Fórmula e massa molecular** -  $HgCl_2$  - 271,50

**Especificação** - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** - Cristais incolores ou pó cristalino branco ou quase branco, ou massa cristalizada; inodoro.

**Características físicas** - Ponto de fusão: 277 °C (volatiliza como tal a aproximadamente 300 °C).

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** - Proteger da luz.

**Segurança** - Irritante. Cáustico. Tóxico. Poluente.

**Informação adicional** - Antídoto: dimercaprol.

#### Cloreto de metileno

**Sinonímia** - Diclorometano.

**Fórmula e massa molecular** -  $CH_2Cl_2$  - 84,94

**Descrição** - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor semelhante ao do clorofórmio.

**Características físicas** - Ponto de ebulição: aproximadamente 40 °C. Densidade: aproximadamente 1,32. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,424.

**Conservação** - Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** - Proteger da luz.

**Segurança** - Irritante. Tóxico.

#### Cloreto de paládio

**Fórmula e massa molecular** -  $PdCl_2$  - 177,31

**Especificação** - Contém, no mínimo, 59,0 por cento (p/p) em paládio.

**Descrição** – Pó cristalino marrom.

**Características físicas** – A altas temperaturas decompõe-se em paládio e cloro.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Segurança** – Tóxico.

#### Cloreto de potássio

**Fórmula e massa molecular** – KCl – 74,55

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salino, fracamente amargo.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de potássio, solução saturada

**Especificação** – Contém 17,0 g em água a 50 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Cloreto de sódio

**Fórmula e massa molecular** – NaCl – 58,44

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p) calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salino.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Informação adicional** – Sal isento de aditivo.

#### Cloreto de sódio 0,9 por cento (p/V)

**Sinonímia** – Cloreto de sódio aproximadamente 0,15 M, solução de cloreto de sódio isotônica, solução fisiológica, solução salina.

**Descrição** – Contém 9,0 g de cloreto de sódio em água a 1000 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Cloreto estanoso

**Fórmula e massa molecular** – SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O – 225,63

**Especificação** – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p).

**Descrição** – Cristais incolores ou quase incolores.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do ar e do calor.

#### Cloreto estanoso SR (fortemente ácido)

**Especificação** – Contém 10,0 g em ácido clorídrico a 100 ml.

**Conservação** – Preparar no momento de uso.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

#### Cloreto férrico

**Fórmula e massa molecular** – FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O – 270,30

**Especificação** – Contém 99,0 por cento (p/p) calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Massa cristalizada, amarelo-alaranjada ou marrom. Deliquescente.

**Características físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente 37 °C.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

#### Cloreto férrico SR (aproximadamente 0,4 M)

**Especificação** – Contém 10,5 g em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

#### Cloreto mercúrico SR (aproximadamente 0,2 M)

**Especificação** – Contém 5,4 g em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Segurança** – Tóxico. Poluente.

#### Cloridrato de hidroxilamina

**Fórmula e massa molecular** – NH<sub>4</sub>ClO – 69,49

**Especificação** – Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p).

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco.

**Características físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente 151 °C.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da umidade.

#### Cloridrato de hidroxilamina SR

**Preparação** – Dissolver 5,0 g em 5,0 ml de água quente. Completar a 100 ml com etanol.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Segurança** – Inflamável.

#### Clorobenzeno

**Fórmula e massa molecular** – C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Cl – 112,56

**Descrição** – Líquido incolor, refringente, de odor característico.

**Características físicas** – Ponto de ebulição: aproximadamente 132 °C. Densidade: aproximadamente 1,11.

Índice de refração (n<sub>D</sub><sup>20</sup>): 1,5251.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Segurança** – Tóxico. Inflamável.

#### Cobaltinitrito de sódio

**Fórmula e massa molecular** – Na<sub>3</sub>CoN<sub>3</sub>O<sub>12</sub> – 403,94

**Descrição** – Pó cristalino amarelo-alaranjado.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Cobre

**Fórmula e massa atômica** – Cu – 63,546.

**Descrição** – Lâmina, fio, pó ou fragmento, de cor avermelhada e lustro metálico.

**Conservação** – Recipientes não metálicos.

#### Cobre SRA – 1 mg/ml

**Especificação** – Contém 1,000 g de cobre dissolvido no menor volume possível de ácido nítrico a 50,0 por cento (V/V). Completar com ácido nítrico a 1,0 por cento (V/V) a 1000 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

#### o-Cresol

**Sinonímia** – 2-Metilfenol.

**Fórmula e massa molecular** – C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O – 108,14.

**Descrição** – Líquido ou sólido, incolor a amarelo-marrom, que se cora pela luz e na presença de oxigênio; de odor fenólico. Deliquescente.

**Características físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente 30 °C. Ponto de ebulição: aproximadamente 191 °C. Densidade: aproximadamente 1,03. Índice de refração (n<sub>D</sub><sup>20</sup>): 1,540-1,550.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Armazenagem** – Proteger da luz, umidade e oxigênio.

**Segurança** – Irritante. Cástico. Tóxico.

**Categoria** – Desinfetante.

**Cromato de potássio**

*Fórmula e massa molecular* -  $K_2CrO_4$  - 194,19

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* - Cristais ou pó cristalino amarelo.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Oxidante. Poluente.

**Cromato de potássio SR**

*Especificação* - Contém 10,0 g em água a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Oxidante. Poluente.

Dextrose - ver Glicose

Dextrose 0,1% (p/V) - ver Glicose 0,1% (p/V).

**Diacetato de clorexidina**

Usar acetato de clorexidina.

**Dicloreto de etileno**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_4Cl_2$  - 98,96

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor semelhante ao do clorofórmio.

*Características físicas* - Ponto de ebulição: aproximadamente 83 °C. Densidade: aproximadamente 1,25. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,444.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Irritante. Tóxico. Inflamável.

**2,6-Dicloroindo fenol sódico**

*Sinonímia* - 2,6-Diclorofenolindofenol sódico.

*Fórmula e massa molecular* -  $C_{12}H_8Cl_2NNaO_2$  - 290,08.

*Descrição* - Pó verde escuro. A solução aquosa apresenta cor azul intensa; a acidificação altera a cor para vermelho.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Informação adicional* - Dessecar sobre a mistura cal/hidróxido de sódio.

**Dicromato de potássio**

*Fórmula e massa molecular* -  $K_2Cr_2O_7$  - 294,18

*Especificação* - Contém, no mínimo, 99,8 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* - Cristais vermelho-alaranjados, inodoro.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Cáustico. Oxidante. Poluente.

**Dicromato de potássio SR**

*Especificação* - Contém 5,0 g em água a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Cáustico. Oxidante. Poluente.

**Dietilamina**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_4H_{11}N$  - 73,14

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, volátil, de odor amoniacal. Reação fortemente alcalina.

*Características físicas* - Faixa de ebulição: 55-58 °C. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,386. Densidade: aproximadamente 0,702.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Irritante. Inflamável.

**Dietilditiocarbamato de prata**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_4H_{10}AgNS_2$  - 256,13

*Descrição* - Pó amarelo claro a amarelo acinzentado.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**Dietilditiocarbamato de prata SR**

*Especificação* - Contém 0,25 g em piridina a 50 ml.

*Conservação* - Preparar para uso imediato.

*Segurança* - Tóxico.

**Difenilcarbazida**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_{13}H_{11}N_4O$  - 242,28

*Descrição* - Pó cristalino branco; torna-se róseo pela exposição ao ar.

*Características físicas* - Faixa de fusão: 168-171 °C.

*Conservação* - Recipientes herméticos.

*Armazenagem* - Proteger da luz e do ar.

**Difenilcarbazida SR**

*Especificação* - Contém 1,0 g de difenilcarbazida em etanol a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

*Segurança* - Inflamável.

**Difenilcarbazona**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_{13}H_{12}N_4O$  - 240,26

*Descrição* - Cristais de cor aranjado-avermelhada.

*Características físicas* - Ponto de fusão: aproximadamente 157 °C (decomposição).

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

**p-Dimetilaminobenzaldeído**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_9H_{11}NO$  - 149,19

*Descrição* - Pó cristalino, branco a fracamente amarelado.

*Características físicas* - Ponto de fusão: aproximadamente 74 °C.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

*Informação adicional* - Reagente de Ehrlich.

**p-Dimetilaminobenzaldeído 5 por cento (p/p) em ácido clorídrico**

*Especificação* - Contém 1,6 g em ácido clorídrico a 30 ml.

*Conservação* - Preparar no momento de uso.

*Segurança* - Corrosivo.

**p-Dimetilaminobenzaldeído 0,1 por cento (p/V) em etanol**

*Especificação* - Contém 0,05 g em etanol a 50 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da luz.

*Segurança* - Inflamável.

**Dimetilformamida**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_7NO$  - 73,09

*Descrição* - Líquido límpido, incolor, com odor semelhante ao de aminas.

*Características físicas* - Ponto de ebulição: aproximadamente 153 °C. Densidade: aproximadamente 0,95. Índice de refração ( $n_D^{25}$ ): 1,428.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Segurança* - Irritante. Tóxico.

**Dimetilsulfóxido (DMSO)**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_2H_6OS$  - 78,13

*Descrição* - Líquido incolor e inodoro. Higroscópico.

*Características físicas* - Ponto de ebulição: aproximadamente 189 °C. Densidade: aproximadamente 1,10. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,479.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* - Proteger da umidade.

*Segurança* - Irritante.

**Dioxana**

*Fórmula e massa molecular* -  $C_8H_{16}O_2$  - 88,11

**Descrição** — Líquido límpido, incolor, com odor semelhante ao de éter.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: aproximadamente 101 °C. Densidade: aproximadamente 1,03. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,421-1,424.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Irritante. Tóxico. Inflamável.

#### Dióxido de enxofre

**Sinonímia** — Anidrido sulfuroso.

**Fórmula e massa molecular** —  $SO_2$  — 64,06

**Especificação** — Contém, no mínimo, 97,0 por cento (V/V)

**Descrição** — Gás incolor, de odor característico, sufocante.

**Conservação** — Em cilindros pressurizados.

**Segurança** — Irritante. Tóxico.

#### Dióxido de manganês

**Fórmula e massa molecular** —  $MnO_2$  — 86,94

**Descrição** — Pó fino preto ou marrom escuro.

**Conservação** — Em recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger do calor.

**Segurança** — Oxidante enérgico.

#### Ditiol

**Sinonímia** — 1,2-Dimercapto-4-metilbenzeno; tolueno-3,4-ditiol.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_7H_8S_2$  — 156,27

**Descrição** — Cristais.

**Características físicas** — Ponto de fusão: 31 °C.

#### Ditiol SR

**Especificação** — Contém 0,5 por cento (p/V) em etanol.

**Estabilidade** — Preparar no momento de uso.

**Segurança** — Inflamável.

#### Ditizona

**Sinonímia** — Difeniltiocarbazona.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{13}H_{12}N_4S$  — 256,32

**Especificação** — Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Pó cristalino marrom escuro.

**Características físicas** — Ponto de fusão: 168 °C (decomposição).

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Ditizona SR

**Especificação** — Contém 0,05 por cento (p/V) em tetracloreto de carbono.

**Descrição** — Para uso, diluir com tetracloreto de carbono na proporção 1:30.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger do calor.

**Segurança** — Veneno!

#### Ditizona 0,025 por cento (p/V) em etanol

**Especificação** — Contém 25,0 mg em etanol a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Estabilidade** — Preparar no momento de uso.

**Segurança** — Inflamável.

#### Ditizona 0,002 por cento (p/V) em tetracloreto de carbono

**Especificação** — Contém 2,0 mg em tetracloreto de carbono a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Estabilidade** — Preparar no momento de uso.

**Segurança** — Tóxico.

#### Edetato dissódico

**Sinonímia** — EDTA dissódico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$  — 372,24

**Especificação** — Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** — Pó cristalino branco, de sabor salino fraco.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Quelante.

#### Edetato dissódico, solução 0,05 M

**Especificação** — Contém 1,861 g, adicionados de 10 ml de hidróxido de sódio M, em água a 100,0 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Estearato de metila

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{18}H_{34}O_2$  — 298,50

**Descrição** — Cristais brancos ou massa cristalina branca ou amarelo-pálida.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 38 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Estolato de eritromicina

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{12}H_{17}NO_{13}S$  — 1056,43.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 135-138 °C.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger da luz e calor.

**Categoria** — Antibiótico.

#### Estrôncio SRA — 1 mg/ml

**Especificação** — Contém 1,685 g de carbonato de estrôncio em 10,0 ml de ácido clorídrico a 50,0 por cento (V/V). Completar com água a 1 000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

#### Etanol

**Sinonímia** — Álcool etílico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_6O$  — 46,07

**Especificação** — Contém, no mínimo 96,0 por cento (V/V).

**Descrição** — Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: aproximadamente 78 °C. Densidade: 0,803 a 0,808.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger do calor.

**Segurança** — Tóxico. Inflamável.

#### Etanol absoluto

**Sinonímia** — Álcool anidro.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_6O$  — 46,07

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,5 por cento (V/V).

**Descrição** — Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico. Higroscópico.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: 78-79 °C. Densidade: 0,790 a 0,794. Índice de refração: ( $n_D^{20}$ ): 1,361.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger do calor e da umidade.

**Segurança** — Tóxico. Inflamável.

**Éter etílico***Sinonímia* – Éter sulfúrico.*Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_{10}O$  – 74,12*Especificação* – Contém, no mínimo, 96,0 por cento (V/V).*Descrição* – Líquido límpido, incolor, muito volátil, de odor característico, pungente. Higroscópico.*Características físicas* – Ponto de ebulição: aproximadamente 35 °C. Densidade: aproximadamente 0,715.Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,355.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz e do calor. (não exceder a 15 °C).*Categoria* – Anestésico.*Segurança* – Inflamável. Risco de explosão.**Éter de petróleo***Sinonímia* – Benzina.*Descrição* – Líquido límpido, incolor, volátil, de odor característico. Não fluorescente.*Características físicas* – Faixa de ebulição: 40-60 °C. Densidade: 0,630 a 0,656.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger do calor.*Segurança* – Inflamável.**Fenol***Fórmula e massa molecular* –  $C_6H_6O$  – 94,11*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p).*Descrição* – Massa cristalina ou cristais incolores ou fracamente róseos ou amarelados, de odor característico. Deliquescente.*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 43 °C. Ponto de ebulição: aproximadamente 180 °C.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da luz e do calor.*Rotulagem* – Deve indicar o nome e a quantidade do estabilizante.*Segurança* – Cáustico. Tóxico.*Categoria* – Desinfetante.**Fenoltaleína***Fórmula e massa molecular* –  $C_{20}H_{14}O_4$  – 318,33*Especificação* – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.*Descrição* – Pó cristalino ou amorfo, branco ou levemente amarelado. Inodoro.*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 258 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Indicador ácido-base.**Fenoltaleína 0,1 por cento (p/V)***Especificação* – Contém 0,1 g em etanol 80 por cento (V/V) a 100 ml.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Segurança* – Inflamável.*Informação adicional* – Para preparação de papel indicador.**2-Fenoxietanol***Fórmula e massa molecular* –  $C_8H_{10}O_2$  – 138,17*Descrição* – Líquido incolor, fracamente viscoso, de odor aromático fraco e de sabor ardente.*Características físicas* – Densidade: aproximadamente

1,11. Ponto de ebulição: aproximadamente 245 °C.

Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,534.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Conservante.**Ferricianeto de potássio***Fórmula e massa molecular* –  $K_3Fe(CN)_6$  – 329,25*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,9 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.*Descrição* – Cristais vermelhos.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Ferricianeto de potássio SR***Especificação* – Contém 5,0 g em água a 100 ml.*Conservação* – Preparar no momento de uso.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Ferrocianeto de potássio***Fórmula e massa molecular* –  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  – 422,39*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.*Descrição* – Cristais transparentes ou pó cristalino, amarelo. Efluorescente. Torna-se anidro a 100 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Ferrocianeto de potássio SR (aproximadamente 0,125 M)***Especificação* – Contém 5,3 g em água a 100 ml.*Conservação* – Preparar no momento de uso.**Fluoreto de cálcio***Fórmula e massa molecular* –  $CaF_2$  – 78,08.*Descrição* – Cristais ou pó branco.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Formaldeído, solução***Sinonímia* – Formol, formalina.*Fórmula e massa molecular* –  $CH_2O$  – 30,03.*Especificação* – Contém, no mínimo, 34,0 por cento (p/V) e, no máximo, 37,0 por cento (p/V).*Descrição* – Líquido incolor, límpido; vapores irritantes.*Características físicas* – Densidade: aproximadamente 1,08. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,374.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz, do ar e de temperatura abaixo de 9 °C.*Estabilidade* – Pode conter metanol como estabilizante.*Segurança* – Irritante. Tóxico.*Categoria* – Desinfetante.**Formamida***Fórmula e massa molecular* –  $CH_3NO$  – 45,04*Descrição* – Líquido límpido, incolor, viscoso, de odor amoniacal fraco.*Características físicas* – Ponto de ebulição: aproximadamente 210 °C. Densidade: aproximadamente 1,13.Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,447.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da umidade.*Segurança* – Irritante.**Fosfato de potássio monobásico***Sinonímia* – Bifosfato de potássio, diidrogenofosfato de potássio, fosfato ácido de potássio, fosfato monopotássico, fosfato potássico de Sörensen.*Fórmula e massa molecular* –  $KH_2PO_4$  – 136,09

**Especificação** – Contém, no mínimo, 98,0 por cento, calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores ou pó cristalino branco.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Fosfato equimolar 0,05 M

**Especificação** – Contém 3,53 g de fosfato de sódio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) e 3,39 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em água a 1 000 ml.

**Conservação** – Recipientes fechados.

#### Fosfato de sódio dibásico diidratado

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 178,00

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor e da umidade.

#### Fosfato de sódio dibásico dodecaidratado

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  358,08

**Especificação** – Contém, no mínimo, 98,5 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais ou grânulos incolores, transparentes, inodoros, de sabor salino, fracamente alcalino. Eflorescente.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

#### Fosfato de sódio dibásico dodecaidratado SR

**Especificação** – Contém 9,0 g em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Fosfato de sódio tribásico dodecaidratado

**Sinonímia** – Fosfato tribásico sódico, fosfato trissódico.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 380,12

**Descrição** – Cristais incolores ou brancos. Eflorescente.

**Características físicas** – Funde a 75 °C por aquecimento rápido.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

#### Frutose

**Sinonímia** –  $\beta$ -D-Frutose, levulose.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  – 180,16

**Especificação** – Contém, no mínimo, 98,0 por cento, calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Pó cristalino branco, inodoro, de forte sabor adocicado.

**Características físicas** – Poder rotatório específico  $[\alpha]_D^{20}$  10%: -91,0° a -93,5° (após uma hora de preparo da solução). Ponto de fusão com decomposição: aproximadamente 103 °C.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Frutose 0,1 por cento (p/V)

**Especificação** – Contém 0,1 g em piridina a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Segurança** – Tóxico.

#### Galactose

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  – 180,16

**Descrição** – Pó branco cristalino.

**Características físicas** – Ponto de fusão: 167 °C. Poder rotatório específico  $[\alpha]_D^{20}$  10%: +80,2°.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Galactose 0,1 por cento (p/V)

**Especificação** – Contém 0,1 g em piridina a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

**Segurança** – Tóxico.

#### Gelatina

**Especificação** – É mistura de proteínas hidrossolúveis obtidas por extração de material contendo colágeno.

**Descrição** – Pó, grânulos, escamas ou folhas transparentes, brilhantes, incolores ou levemente amarelados. Higroscópico, de odor característico e sabor pouco pronunciado.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor e umidade.

#### Glicerol

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$  – 92,09

**Especificação** – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p).

**Descrição** – Líquido viscoso, límpido, incolor, inodoro, higroscópico, de sabor adocicado.

**Características físicas** – Densidade: 1,255-1,263. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,470-1,474.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Armazenagem** – Proteger de oxidantes.

#### Glicose

**Sinonímia** – Dextrose.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  – 180,16

**Descrição** – Pó cristalino branco, inodoro, sabor adocicado.

**Características físicas** – Poder rotatório específico  $[\alpha]_D^{20}$  10%: +52,5° a +53,0°.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Glicose 0,1% (p/V)

**Especificação** – Contém 0,1 g em piridina a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

**Segurança** – Tóxico.

#### Heparina sódica

**Descrição** – Consiste em mistura de princípios ativos, possuindo a propriedade de prolongar o tempo de coagulação do sangue. Obtida, normalmente, de mucosa intestinal, pulmões ou outro tecido adequado de mamíferos domésticos usados para alimento do homem.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Rotulagem** – A rotulagem deve indicar o órgão e a espécie de origem. A potência deve ser indicada em U.I.

**Categoria** – Anticoagulante.

#### Heptano

**Especificação** – Contém usualmente mistura de hidrocarbonetos – fração de petróleo – com predomínio de n-heptano.

**Descrição** – Líquido límpido, incolor, volátil, altamente inflamável, de odor característico.

**Características físicas** – Faixa de ebulição: 95° a 99°C.

Densidade: aproximadamente 0,69.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Armazenagem** – Proteger do calor. Manter distante de chama/centelha.

**Segurança** – Irritante do trato respiratório. Inflamável.

**n-Heptano**

*Fórmula e massa molecular* —  $C_7H_{16}$  — 100,20

*Especificação* — Principal componente de heptano.

*Características físicas* — Ponto de ebulição: 98,4 °C. Densidade: 0,684. Índice de refração ( $n_D^{25}$ ): 1,3855.

**Hexano**

*Especificação* — Contém usualmente mistura de isômeros de  $C_6H_{14}$ , predominantemente n-hexano e metilciclo-pentano ( $C_6H_{12}$ ).

*Descrição* — Líquido límpido, incolor, volátil, altamente inflamável, de odor característico.

*Características físicas* — Faixa de ebulição: 67 a 70 °C. Densidade: 0,66.

*Conservação* — Recipientes herméticos.

*Armazenagem* — Proteger do calor. Manter distante de chama/centelha.

*Segurança* — Irritante do trato respiratório. Inflamável.

**n-Hexano**

*Fórmula e massa molecular* —  $C_6H_{14}$  — 86,18

*Especificação* — Principal componente de éter de petróleo e de hexano.

*Descrição* — Líquido límpido, volátil, de odor semelhante ao do petróleo.

*Características físicas* — Ponto de ebulição: 69 °C. Densidade: 0,66. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,375.

*Conservação* — Recipientes herméticos.

*Armazenagem* — Proteger do calor. Manter distante de chama/centelha.

*Segurança* — Inflamável.

**Hidrato de cloral**

*Sinonímia* — Cloral hidratado.

*Fórmula e massa molecular* —  $C_2H_3Cl_3O_2$  — 165,40

*Especificação* — Contém, no mínimo, 98,5 por cento (p/p).

*Descrição* — Cristais transparentes, incolores, de odor pungente característico e de sabor picante e fracamente amargo. Delíquescente.

*Características físicas* — Ponto de fusão: 57 °C.

*Conservação* — Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* — Proteger da luz e do calor.

*Segurança* — Irritante à pele.

*Categoria* — Sedativo, hipnótico.

**Hidróxido de amônio**

Usar amônia, solução concentrada.

**Hidróxido de amônio 6 M**

*Especificação* — Contém 400 ml de solução concentrada de amônia em água a 1000 ml.

*Conservação* — Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* — Proteger do calor.

**Hidróxido de cálcio**

*Fórmula e massa molecular* —  $Ca(OH)_2$  — 74,09

*Especificação* — Contém, no mínimo, 93,0 por cento (p/p).

*Descrição* — Pó ou grânulos brancos moles, inodoros.

*Conservação* — Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* — Proteger do dióxido de carbono.

**Hidróxido de cálcio — solução saturada**

Usar hidróxido de cálcio SR.

**Hidróxido de cálcio SR**

*Especificação* — Contém 0,15 g em água isenta de dióxido de carbono a 100 ml (solução saturada).

*Conservação* — Recipientes bem fechados.

*Estabilidade* — Preparar no momento de uso.

*Armazenagem* — Proteger do dióxido de carbono.

*Categoria* — Adstringente.

**Hidróxido de cálcio, saturado a 25 °C**

*Preparação* — Adicionar cerca de 1 g de hidróxido de cálcio a 50 ml de água. Agitar e deixar decantar a 25 °C. Usar o sobrenadante.

*Conservação* — Recipientes bem fechados e apropriados.

*Segurança* — Cáustico.

*Informação adicional* — Calibração de medidor de pH.

**Hidróxido de potássio**

*Fórmula e massa molecular* — KOH — 56,11

*Especificação* — Contém, no mínimo, 85,0 por cento (p/p), calculado como KOH, e, no máximo, 3,5 por cento de  $K_2CO_3$ .

*Descrição* — Massa branca, dura, seca, de estrutura cristalina, inodora, muito higroscópica e ávida por  $CO_2$ . Liquefaz-se ao ar. Apresentado nas formas de lentilhas, cilindros ou escamas.

*Conservação* — Recipientes herméticos, inertes.

*Armazenagem* — Proteger da umidade e do dióxido de carbono.

*Segurança* — Muito cáustico.

**Hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M**

*Preparação* — Dissolver 34,04 g de hidróxido de potássio em 20 ml de água; completar a 1000 ml com álcool (isento de aldeído). Repouso de 24 horas em recipientes herméticos. Decantar. Usar o sobrenadante límpido.

*Conservação* — Recipientes herméticos.

*Armazenagem* — Proteger da luz.

**Hidróxido de potássio aproximadamente 0,5 M**

*Preparação* — Dissolver 3,0 g em 5 ml de água e completar a 100 ml com etanol, isento de aldeídos.

*Conservação* — Preparar para consumo imediato.

**Hidróxido de sódio**

*Sinonímia* — Soda cáustica.

*Fórmula e massa molecular* — NaOH — 40,00

*Especificação* — Contém, no mínimo, 95,0 por cento (p/p) de álcali total, calculado como NaOH, e, no máximo, 3,0 por cento (p/p) de  $Na_2CO_3$ .

*Descrição* — Massa dura, de estrutura cristalina, branca, sob a forma de pedaços, lentilhas e bastonetes. Delíquescente e absorve dióxido de carbono.

*Conservação* — Recipientes herméticos.

*Armazenagem* — Proteger da umidade e do dióxido de carbono.

*Segurança* — Cáustico, corrosivo.

**Hidróxido de sódio SR**

*Especificação* — Contém 8,0 por cento (p/V) de NaOH em água.

*Conservação* — Vide hidróxido de sódio M.

**Hidróxido de sódio M**

*Especificação* — Contém 40,0 g em água isenta de dióxido de carbono a 1000 ml.

*Conservação* — Recipientes de vidro álcali-resistentes ou de polietileno.



**Armazenagem** – Proteger da umidade e do dióxido de carbono.

**Hidróxido de sódio, solução concentrada SR**  
(aproximadamente 10 M)

**Especificação** – Contém 20,0 g de hidróxido de sódio em água a 50 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do dióxido de carbono.

**Segurança** – Cáustico.

**Hidróxido de tetrabutilamônio**

**Fórmula e massa molecular** –  $(C_4H_9)_4NOH$  – 259,47

Usar grau pró-análise ou grau adequado.

**Hidroxitolueno butilado**

**Sinonímia** – BHT.

**Fórmula e massa molecular** –  $C_{15}H_{14}O$  – 220,34

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** – Cristais.

**Características físicas** – Temperatura de congelamento: não menos do que 69,2 °C; temperatura de ebulição: 265 °C; densidade: 1,048.

**Segurança** – Pode causar dermatite por sensibilização.

**Hipofosfito de sódio**

**Fórmula e massa molecular** –  $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$  – 105,99

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Pó granulado ou cristalino branco ou cristais incolores, inodoros, de sabor salino. Higroscópico.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

**Hipofosfito de sódio SR**

**Especificação** – Contém 5,0 g em 10 ml de água, acrescidos a 50 ml com ácido clorídrico. Separar eventuais cristais formados. A solução deve ser límpida e incolor.

**Imidazol**

**Sinonímia** – Glioxalina.

**Fórmula e massa molecular** –  $C_4H_4N_2$  – 68,08

**Descrição** – Pó cristalino branco.

**Características físicas** – Ponto de fusão: 90-91 °C.

**Iodeto de mercúrio(II)**

**Sinonímia** – Bi-iodeto de mercúrio, iodeto de mercúrio vermelho.

**Fórmula e massa molecular** –  $HgI_2$  – 454,40

**Descrição** – Pó cristalino, vermelho escarlate, denso, inodoro e quase insípido.

**Características físicas** – Ponto de fusão: 259 °C.

**Conservação** – Em recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Categoria** – Veneno!

**Iodeto de potássio**

**Fórmula e massa molecular** –  $KI$  – 166,00

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores, ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salgado e amargo. Fracamente deliquescente.

**Características físicas** – Ponto de fusão: 680 °C.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz e umidade.

**Iodeto de potássio SR**

**Especificação** – Contém 16,5 g de iodeto de potássio em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes opacos bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Iodeto de potássio aproximadamente M**

Usar Iodeto de potássio SR.

**Iodeto de potássio mercúrico, alcalino**

**Sinonímia** – Reagente de Nessler.

**Preparação** – Dissolver 10 g de iodeto de potássio em 10 ml de água e adicionar lentamente, sob agitação, solução saturada de cloreto mercúrico até pequeno precipitado vermelho. A esta mistura, adicionar a solução gelada de 30 g de hidróxido de potássio em 60 ml de água. Juntar mais 1 ml da solução saturada de cloreto mercúrico. Diluir com água a 200 ml.

**Iodeto de sódio**

**Fórmula e massa molecular** –  $NaI$  – 149,89

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** – Pó cristalino branco ou cristais incolores, higroscópicos, inodoros, de sabor salgado e amargo.

**Conservação** – Recipientes herméticos.

**Iodeto de sódio em ácido acético**

**Especificação** – Contém 10,0 g em ácido acético glacial a 50 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Iodo**

**Fórmula e massa molecular** –  $I_2$  – 253,80

**Descrição** – Escamas, placas ou cristais pequenos, preto-azulados ou violeta-acinzentados; brilho metálico, de odor irritante.

**Características físicas** – Sublima lentamente à temperatura ambiente; aquecido, libera vapores violeta. Ponto de fusão: 113,6 °C.

**Conservação** – Em recipientes de vidro herméticos.

**Segurança** – Vapores corrosivos.

**Iodo SR**

**Sinonímia** – Solução aquosa de iodo-iodetada.

**Especificação** – Contém 1,0 g de iodo e 2,0 g de iodeto de potássio em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes de vidro bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Iodo 0,5 por cento SR**

**Especificação** – Contém 0,5 g de iodo em clorofórmio a 100,0 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Segurança** – Tóxico.

**Iodo 1 por cento em etanol**

**Sinonímia** – Solução alcoólica de iodo, solução etanólica de iodo.

**Especificação** – Contém 1,0 por cento (p/V) de iodo em etanol.

**Conservação** – Recipientes de vidro bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz.

**Segurança** – Inflamável.

**Iodobismutato de potássio**

Usar iodobismutato de potássio aquo-acético.

**Iodobismutato de potássio aquo-acético**

**Especificação** — Contém 58 ml de água, 1,21 g de subnitrato de bismuto, 14 ml de ácido acético glacial e 28 ml de solução de iodeto de potássio 40 por cento (p/V).

**Iodobismutato de potássio SR**

**Preparação** — Dissolver 16,6 g de ácido tartárico em 67 ml de água e juntar 1,41 g de subnitrato de bismuto. Agitar durante uma hora, adicionar 33 ml de solução de iodeto de potássio 40 por cento (p/V). Agitar durante mais uma hora. Deixar em repouso por 24 horas. Filtrar.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

**Irganox 1010**

**Sinonímia** — Éster 3-propionílico do ácido pentaeritritil-tetrakis(3,5-di-*tert*-butil)-4-hidroxibenzoico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{73}H_{108}O_{12}$  — 1177,81

**Descrição** — Pó branco a ligeiramente amarelado. Inodoro, insípido.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 110-125 °C. Cristaliza em duas formas: forma  $\alpha$ , faixa de fusão 120-125 °C; forma  $\beta$ , faixa de fusão 110-115 °C. A faixa de fusão varia de acordo com a proporção das formas cristalinas na mistura; esta proporção não influi na eficiência do produto.

**Informação adicional** — Estabilizador para substâncias orgânicas, tais como polietileno e polipropileno, protegendo-as contra degradação termo-oxidativa.

**Irganox 1076**

**Sinonímia** — Propionato de 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxifenil)-3-octadecila.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{33}H_{42}O_3$  — 530,97

**Descrição** — Pó branco a ligeiramente amarelado. Inodoro, estável à luz.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 49-54 °C.

**Informação adicional** — Antioxidante para substratos orgânicos, tais como polietileno e polipropileno, protegendo-os de degradação termo-oxidativa.

**Irganox PS 800**

**Sinonímia** — Éster didodecílico do ácido 3,3',-tiobispropânico; éster dilaurílico do ácido  $\beta$ ,  $\beta'$ -tiobispropânico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{30}H_{48}O_4$  S — 514,94

**Descrição** — Cristais brancos.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 38-40 °C.

**Informação adicional** — Estabilizador de poliolefinas, especialmente polipropileno e polietileno de alta densidade.

**Lactose**

**Sinonímia** — Lactose monoidratada.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$  — 360,31

**Descrição** — Pó cristalino ou grânulos brancos. Inodoro, de fraco sabor adocicado.

**Características físicas** — Rotação óptica específica  $[\alpha]_D^{20}$  10%: +52,2° a +52,8°. Ponto de fusão: 202 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Informação adicional** — Adsorve odores estranhos.

**Lactose 0,1%**

**Especificação** — Contém 0,1 por cento (p/V) em piridina.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Tóxico.

**Laurato de metila**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{13}H_{26}O_2$  — 214,40

**Especificação** — Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/V).

**Descrição** — Líquido incolor ou amarelado.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 0,870. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): aproximadamente 1,431.

Ponto de fusão: aproximadamente 5° C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Laurilsulfato de sódio**

**Sinonímia** — Sulfato dodecil sódico.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{12}H_{25}NaO_4S$  — 288,38

**Especificação** — Mistura de, no mínimo, 85,0 por cento (p/p), de alquilsulfatos de sódio, consistindo principalmente de laurilsulfato de sódio [ $CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$ ]. O conteúdo combinado de NaCl e  $Na_2SO_4$  é, no máximo, de 8,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Pó, escamas ou cristais brancos ou amarelo-pálidos; odor fraco e característico.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Laurilsulfato de sódio SR**

**Descrição** — Contém 1 g em 100 ml de água.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Lecitina**

**Especificação** — Mistura de diglicerídeos, principalmente dos ácidos esteárico, palmítico e oléico, ligados ao éster fosfórico da colina. Estrutura e composição variáveis de acordo com a fonte de obtenção.

**Descrição** — Massa gordurosa amarelo-marrom a marrom, de odor fraco característico.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Rotulagem** — Especificar origem.

**Lítio SRA — 2 mg/ml**

**Especificação** — Contém 1,064 g de carbonato de lítio em 5,0 ml de ácido clorídrico. Completar com água a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Macrogol 300**

**Sinonímia** — PEG 300, polietilenoglicol 300.

**Fórmula e massa molecular** —  $H(OCH_2CH_2)_nOH$

Massa molecular não inferior a 95 por cento do valor nominal rotulado. Apresenta o número médio de grupos oxietileno:  $n = 6$  ou  $7$ .

**Especificação** — Mistura de produtos de policondensação de óxido de etileno e água.

**Descrição** — Líquido viscoso, límpido, incolor ou quase, de odor fraco e característico, higroscópico.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 1,125. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): aproximadamente 1,465. Viscosidade: aproximadamente 80 cP.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Rotulagem** — Deve conter a massa molecular média.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

**Magnésio SRA — 1 mg/ml**

**Especificação** — Contém 9,0 g de cloreto de magnésio

em água a 500 ml. Esta solução contém 4,595 mg/ml. **Padronização** — a 25,0 ml desta solução, adicionar 25,0 ml de água, 10,0 ml de tampão amônia pH 10,9 e 0,1 g do indicador, mistura de negro de eriocromo T. Titular com edetato dissódico 0,05 M SV. Cada ml do titulante corresponde a 0,001215 g de Mg. Para uso diluir à concentração de 1 mg/ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

#### Magnésio

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{12}H_{19}N_3O_4$  — 259,22

**Descrição** — Pó castanho-avermelhado.

**Categoria** — Indicador para magnésio e molibdênio.

#### Mercurio

**Fórmula e massa atômica** — Hg — 200,59

**Número atômico** — 80

**Especificação** — Metal líquido, móvel, denso, prateado, de superfície espelhada.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 13,5. Ponto de ebulição: aproximadamente 357 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Veneno! Volátil à temperatura ambiente.

#### Mercurio SRA — 1 mg/ml

**Especificação** — Contém 1,080 g de óxido de mercúrio (II) dissolvido no menor volume possível de ácido clorídrico 2 M. Completar com água a 1000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

#### Metabissulfito sódico

**Sinonímia** — Dissulfito de sódio, pirossulfito de sódio.

**Fórmula e massa molecular** —  $Na_2S_2O_5$  — 190,10

**Especificação** — Contém, no mínimo, 95 por cento (p/p). Contém quantidade de metabissulfito sódico equivalente a, no mínimo, 65,0 por cento e, no máximo, 67,4 por cento de  $SO_2$ .

**Descrição** — Cristais incolores ou pó cristalino branco ou branco-creme, de odor sulfuroso e de sabor ácido e salino.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, bem cheios.

**Armazenagem** — Proteger do calor excessivo, do ar e da umidade.

**Estabilidade** — Oxida lentamente a sulfato, por exposição ao ar e à umidade, com desintegração dos cristais.

#### Metanol

**Sinonímia** — Álcool metílico.

**Fórmula e massa molecular** —  $CH_4O$  — 32,04

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/V).

**Descrição** — Líquido límpido, incolor, inflamável, de odor característico.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: 64-65 °C. Densidade: 0,790 a 0,793. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,328 a 1,330.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Segurança** — Tóxico. Inflamável.

#### Metenamina

**Sinonímia** — Hexametilenotetramina.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_6H_{12}N_4$  — 140,19

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), após dessecação sob pentóxido de fósforo durante 4 horas.

**Descrição** — Pó cristalino incolor.

**Características físicas** — Sublima sem fundir e com parcial decomposição a aproximadamente 263 °C; pH da solução 0,2 M: 8,4.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Anti-séptico urinário.

#### Metoxiazobenzeno

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{13}H_{14}N_2O$  — 212,3

**Descrição** — Lâminas alaranjadas, praticamente insolúveis em água, solúveis em álcool, em éter de petróleo e outros solventes orgânicos.

**Cromatografia em camada delgada** — Aplicar, em placa de sílica-gel G, solução de 5 mg de metoxiazobenzeno em benzeno e desenvolver cromatograma com o mesmo solvente. Aparece uma única mancha com Rf em torno de 0,6.

#### Metoxiazobenzeno SR

**Especificação** — Solução a 0,2 por cento (p/V) em mistura de 1 volume de benzeno e 4 volumes de éter de petróleo.

#### Metóxido de potássio

**Fórmula e massa molecular** —  $CH_3OK$  — 70,13

**Preparação extemporânea.**

#### Metóxido de sódio

**Fórmula e massa molecular** —  $CH_3ONa$  — 54,02

**Descrição** — Pó branco fino. Reage violentamente com a água com evolução de calor. Sensível ao ar. Pode apresentar-se na forma de solvato:  $CH_3ONa \cdot 2CH_3OH$ , pó branco. Em solução pode ser preparado *in situ*.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

#### Miristato de metila

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{13}H_{26}O_2$  — 242,40

**Especificação** — Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/V).

**Descrição** — Líquido incolor ou fracamente amarelado.

**Características físicas** — Densidade: aproximadamente 0,868. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): aproximadamente 1,437. Ponto de fusão: aproximadamente 20 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Mistura anidrido acético-piridina SR

**Preparação** — Misturar cuidadosamente, e sob refrigeração, 10 ml de anidrido acético e 30 ml de piridina.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Estabilidade** — Preparar no momento de uso.

#### Mistura de negro de eriocromo T

**Preparação** — Misturar 0,2 partes de negro de eriocromo T com 100 partes de cloreto de sódio.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Indicador para cálcio e magnésio.

#### Molibdato de amônio

**Fórmula e massa molecular** —  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  — 1 235,86

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais incolores até levemente amarelos ou verde-azulados, brilhantes.

**Características físicas** — Pelo aquecimento perde água e amônia.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Molibdato de amônio SR

**Especificação** — Contém 10,0 g de molibdato de amônio em água a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Molibdovanádio SR

**Sinonímia** — Reagente molibdatovanadato, reagente molibdovanádio.

**Preparação** — Usando substâncias finamente pulverizadas, preparar suspensão de 4,0 g de molibdato de amônio e 0,1 g de vanadato de amônio em 70 ml de água. Juntar 20 ml de ácido nítrico. Completar o volume de 100 ml com água.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### 1-Naftilamina

**Sinonímia** —  $\alpha$ -Naftilamina.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{10}H_9N$  — 143,12

**Descrição** — Cristais incolores ou pó cristalino branco. Pela exposição ao ar e à luz, torna-se avermelhado. Odor desagradável.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 49 — 51 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz e do ar.

**Segurança** — Vapor e pó nocivos.

#### 2-Naftol

**Sinonímia** — Betanaftol,  $\beta$ -naftol

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{10}H_8O$  — 144,17

**Descrição** — Pó cristalino branco a levemente róseo, de odor fenólico fraco.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 122 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### 2-Naftol SR

**Sinonímia** — Betanaftol SR,  $\beta$ -naftol SR.

**Especificação** — Contém 1,0 g em hidróxido de sódio a 1,0 por cento (p/V) a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Estabilidade** — Preparar para uso imediato.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### Ninidrina

**Sinonímia** — Ninhidrina.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_8H_6O_3 \cdot H_2O$  — 178,14

**Especificação** — Contém, no mínimo, 96,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Pó cristalino branco a amarelo fracamente pálido.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### Ninidrina SR

**Sinonímia** — Ninhidrina SR.

**Especificação** — Contém 0,2 g por cento (p/V) em mistura de *n*-butanol e ácido acético a 12 por cento (p/V) (95 + 5; V/V).

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

**Segurança** — Inflamável.

#### Nitrato de amônio

**Fórmula e massa molecular** —  $NH_4NO_3$  — 80,04

**Descrição** — Cristais incolores, deliáveiscentes, ou pó branco, de sabor salgado.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 155 °C; decompõe-se ao redor de 210 °C em água e óxidos de nitrogênio.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Nitrato de amônio, solução saturada

**Especificação** — Contém 20,1 g em 10 ml de água.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Nitrato de amônio SR

**Especificação** — Contém 5,0 g de nitrato de amônio em água a 100 ml.

#### Nitrato de bário

**Fórmula e massa molecular** —  $BaNO_3$  — 261,34

**Descrição** — Cristais ou pó cristalino.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 590 °C.

**Conservação** — Em recipientes bem fechados.

**Segurança** — Veneno!

#### Nitrato de bário 0,05 M

**Especificação** — Contém 13,067 g em água a 1000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Veneno!

#### Nitrato de cobalto(II)

**Sinonímia** — Nitrato cobaltoso.

**Fórmula e massa molecular** —  $CoNO_3 \cdot 6H_2O$  — 291,03

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais pequenos, vermelhos, higroscópicos.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 55 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger do calor.

**Informação adicional** — Identificação do cloridrato de lidocaína. Identificação de barbituratos, fenitoína e sacarose.

#### Nitrato de cobalto(II) SR

**Descrição** — Contém 1,0 g por cento (p/V) em metanol.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Inflamável. Tóxico.

#### Nitrato de chumbo

**Sinonímia** — Nitrato de chumbo(II).

**Fórmula e massa molecular** —  $Pb(NO_3)_2$  — 331,21

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Cristais incolores, translúcidos ou pó cristalino branco.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Veneno!

#### Nitrato de lantânio

**Fórmula e massa molecular** —  $LaNO_3 \cdot 6H_2O$  — 433,05

**Descrição** — Cristais incolores, deliáveiscentes.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Nitrato de lantânio SR

**Especificação** — Contém 5,0 por cento (p/V).

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Nitrato de mercúrio(I)***Sinonímia* – Nitrato mercurioso.*Fórmula e massa molecular* –  $\text{Hg}_2\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 561,22*Descrição* – Cristais incolores, normalmente com fraco odor de ácido nítrico.*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 70 °C, com decomposição.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz.*Segurança* – Veneno!**Nitrato de mercúrio(II) SR***Sinonímia* – Nitrato mercurioso SR.*Especificação* – Contém 15,0 g em mistura de 90 ml de água e 10 ml de ácido nítrico a 10 por cento (V/V)*Conservação* – Recipientes de vidro âmbar.*Estabilidade* – Adicionar um pequeno glóbulo de mercúrio metálico.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Nitrato de mercúrio(II)***Sinonímia* – Nitrato mercúrico.*Fórmula e massa molecular* –  $\text{HgN}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 342,62*Descrição* – Cristais incolores ou fracamente corados. Higroscópico.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da luz e da umidade.*Segurança* – Veneno!**Nitrato de prata***Fórmula e massa molecular* –  $\text{AgNO}_3$  – 169,87*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0% (p/p).*Descrição* – Cristais incolores transparentes ou pó cristalino branco. Inodoro*Características físicas* – Ponto de fusão: 212 °C.*Conservação* – Proteger da luz.*Segurança* – Cáustico. Veneno!**Nitrato de prata 0,1 M***Especificação* – Contém 17,0 g em água a 1000 ml.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Nitrato de prata SR (aproximadamente 0,25 M)***Especificação* – Contém 4,25 g por cento (p/V).*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Nitrato de tório***Fórmula e massa molecular* –  $\text{ThN}_2\text{O}_{12} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 553,12*Descrição* – Cristais ou pó cristalino branco, levemente deliçescente.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da umidade.*Informação adicional* – Determinação de flúor.**Nitrato de sódio***Fórmula e massa molecular* –  $\text{NaNO}_3$  – 69,00*Especificação* – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p).*Descrição* – Cristais incolores, ou pó granulado branco, levemente amarelados. Higroscópico.*Características físicas* – Ponto de fusão: 271 °C. Decompõe-se acima de 320 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Estabilidade* – Oxida-se ao ar muito lentamente a nitrato.**Nitrato de Sódio SR***Especificação* – Contém 10,0 g (p/V) em água a 100 ml.*Conservação* – Preparar para consumo imediato.**Nitrobenzeno***Sinonímia* – Nitrobenzol.*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$  – 123,11*Descrição* – Líquido incolor a amarelo pálido, de odor semelhante ao de óleo de amêndoas.*Características físicas* – Ponto de ebulição: aproximadamente 211 °C. Densidade: aproximadamente 1,20.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Segurança* – Veneno!**Nitrato fenilmercúrico***Sinonímia* – Nitrato básico de fenilmercúrio.*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOH} \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{HgNO}_3$  – 634,45*Especificação* – Consiste em mistura de nitrato e hidróxido de ion fenilmercúrio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ ). Contém, no mínimo, 87,9 por cento de ion fenilmercúrico (p/p) e, não menos, de 62,75 por cento de mercúrio (Hg) (p/p).*Descrição* – Pó cristalino branco ou escamas brancas lustrosas. Inodoro.*Características físicas* – Faixa de fusão: entre 175 e 190 °C (decomposição).*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da luz.**Oxalato de amônio***Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 142,11*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).*Descrição* – Cristais incolores transparentes ou pó cristalino branco. Inodoro.*Características físicas* – Ponto de fusão: 212 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Segurança* – Cáustico. Corrosivo. Veneno!**Oxalato de amônio SR***Especificação* – Contém 4,0 g de oxalato de amônio em água a 100 ml.**Oxalato de potássio***Fórmula e massa molecular* –  $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 184,23  
anidro 166,22*Descrição* – Cristais incolores, inodoros, eflorescentes ao ar seco e quente.*Características físicas* – Perde sua água a aproximadamente 160 °C.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da umidade.*Segurança* – Veneno!**Óxido de alumínio***Sinonímia* – Alumina.*Fórmula e massa molecular* –  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 101,96*Descrição* – Pó granulado fino, branco.*Características físicas* – pH da suspensão a 10,0 por cento (p/V): entre 9 e 10.*Conservação* – Recipientes herméticos.

**Óxido de hólmio**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{Ho}_2\text{O}_3$  – 377,85

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,9 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó amarelado.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Óxido de magnésio**

*Sinonímia* – Óxido de magnésio leve ou pesado.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{MgO}$  – 40,30

*Especificação* – Contém, no mínimo, 95,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó amorfo fino, branco, inodoro, de sabor alcalino fraco.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger do ar e da umidade.

**Óxido mercúrio**

*Sinonímia* – Óxido amarelo de mercúrio, óxido de mercúrio(II).

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{HgO}$  – 216,59

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó amarelo-alaranjado, denso, inodoro.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Segurança* – Veneno!

**Paládio SRA – 1 mg/ml**

*Especificação* – Contém 1,670 g de cloreto de paládio em 200 ml de ácido clorídrico a 50,0 por cento (V/V). Aquecer até dissolução completa. Resfriar e completar com água a 1000 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Palmitato de metila**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$  – 270,50

*Descrição* – Cera sólida, incolor.

*Características físicas* – Densidade (30 °C): aproximadamente 0,86.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Papel de prata-manganês**

*Preparação* – À mistura de volumes iguais de nitrato de prata 0,1 M SV e de sulfato de manganês (15 g/l) SR adicionar, gota a gota, hidróxido de sódio 0,1 M SV até que se forme precipitado persistente. Filtrar. A seguir, mergulhar tiras de papel de filtro (por exemplo, Whatman Nº 1) na solução, durante 15 minutos. Secar à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e de vapores ácidos ou alcalinos. O papel de prata-manganês deve ser incolor.

*Ensaio de sensibilidade* – Em proveta de aproximadamente 40 ml de capacidade introduzir 1,0 ml de cloreto de amônio (10 µg/ml  $\text{NH}_4^+$ ) SR. Adicionar 9 ml de água e 1 g de óxido de magnésio. Fechar imediatamente o recipiente com tampa de polietileno, sob a qual se coloca o papel de prata-manganês. Agitar a solução, tomando-se o cuidado para que as partículas de magnésio não entrem em contato com o papel. Manter a proveta a 50-60 °C durante 1 hora. Aparece cor cinza no papel reagente.

**Pentóxido de fósforo**

*Sinonímia* – Anidrido fosfórico.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{P}_2\text{O}_5$  – 141,94

*Descrição* – Pó branco, amorfo, muito deliçescente.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 340 °C. Temperatura de sublimação: 360 °C.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

*Segurança* – Irritante. Corrosivo à pele, mucosa e olhos.

**Pentóxido de vanádio**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{V}_2\text{O}_5$  – 181,88.

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,5 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó fino amarelo a amarelo-laranja.

*Características físicas* – Ponto de fusão: 690 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Peptona**

*Especificação* – Mistura de produtos de natureza polipeptídica oriundos de proteínas animais (carne, caseína). A origem determina as características físicas, composição e processo de produção.

*Descrição* – Pó de cor amarelo-clara a marrom. Odor e sabor característicos. Teor em nitrogênio mínimo: 12,0 por cento (p/p) de caseína e 14,2 por cento (p/p) de carne.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Rotulagem* – Deve expressar origem e teor em nitrogênio.

*Armazenagem* – Proteger da umidade.

**Permanganato de potássio**

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{KMnO}_4$  – 158,03

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* – Cristais violeta escuros, com brilho metálico, inodoros, de sabor adocicado, adstringente.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Segurança* – A substância e suas soluções apresentam risco de explosão, quando em contato com materiais oxidáveis.

*Categoria* – Oxidante energético.

**Permanganato de potássio SR (aproximadamente 0,2 M)**

*Especificação* – Contém 3,0 por cento (p/V) em água.

*Estabilidade* – Preparar para consumo imediato.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Segurança* – Irritante. Cáustico.

**Peroxidissulfato de amônio**

*Sinonímia* – Persulfato de amônio.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$  – 228,10

*Especificação* – Contém, no mínimo, 95,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais ou pó granulado branco. Inodoro. Estável durante meses quando puro e seco; decompõe-se em presença de umidade.

*Conservação* – Recipientes herméticos.

*Armazenagem* – Proteger da umidade, do calor e de matéria orgânica.

*Informação adicional* – Agente fortemente oxidante.

**Peróxido de hidrogênio, concentrado**

*Sinonímia* – Peridrol.

*Fórmula e massa molecular* –  $\text{H}_2\text{O}_2$  – 34,01.

*Especificação* – Contém, no mínimo, 29,0 por cento (p/p) de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Corresponde a aproximadamente 100 partes em volume. Pode conter estabilizante.

*Descrição* – Líquido incolor, irritante, de fraco odor.

*Características físicas* – Densidade: 1,11.

**Conservação** — Recipientes preenchidos parcialmente, providos de fecho de alívio.

**Armazenagem** — Proteger da luz e do calor.

**Segurança** — Oxidante forte.

**Peróxido de hidrogênio, 30 volumes, SR**

**Fórmula e massa molecular** —  $H_2O_2$  — 34,01.

**Especificação** — Contém, no mínimo, 9,7 por cento (p/V) e, no máximo, 10,7 por cento (p/V) de  $H_2O_2$ , correspondendo a aproximadamente 30 partes em volume. Pode conter estabilizante.

**Descrição** — Líquido o peróxido de hidrogênio, concentrado.

**Conservação** — Recipientes fechados.

**Estabilidade** — Evitar períodos longos de armazenagem.

**Armazenagem** — Proteger da luz e do calor.

**Peróxido de hidrogênio 3 por cento (p/V) SR**

**Fórmula e massa molecular** —  $H_2O_2$  — 34,01

**Especificação** — Contém, no mínimo, 2,5 por cento (p/V) e, no máximo, 3,5 por cento (p/V) de  $H_2O_2$ , correspondendo a aproximadamente 10 partes em volume. Pode conter estabilizante.

**Descrição** — Líquido límpido, incolor.

**Conservação** — Recipientes fechados. Evitar períodos longos de armazenamento.

**Armazenagem** — Proteger da luz e do calor.

**Persulfato de sódio**

**Fórmula e massa molecular** —  $Na_2O_8S_2$  — 238,13

**Descrição** — Pó cristalino branco. Decompõe-se lentamente com umidade e pelo calor.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger da umidade e do calor.

**Segurança** — Irritante.

**Piridina**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_5H_5N$  — 79,10

**Descrição** — Líquido incolor, de odor característico e desagradável.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: 115-116 °C.

**Densidade** (25 °C): aproximadamente 0,980. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,5092.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

**Segurança** — Inflamável. Tóxico.

**Poliacrilamida**

**Sinonímia** — Acrilamida.

**Fórmula e massa molecular** —  $(C_3H_5NO)_n$ ; monômero — 71,08.

**Especificação** — Polímero de várias formas, solúveis e insolúveis em água, obtidos pelo aquecimento com vários catalisadores de polimerização.

**Descrição** — Pó cristalino branco ou escamas incolores ou brancas.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 84 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Altamente tóxico e irritante. Causa paralisia do sistema nervoso central. Pode ser absorvido pela pele íntegra.

**Polissorbató 80**

**Especificação** — É mistura de oleatos do sorbitol e seus anidridos oopolimerizados com aproximadamente vinte

moles de óxido de etileno para cada mol de sorbitol e anidrido.

**Descrição** — Líquido claro, amarelado ou amarelo escuro. Oleoso. Fraco odor característico.

**Características físicas** — Densidade: em torno de 1,08.

**Viscosidade** (25 °C): aproximadamente 400 cP.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Tensioativo.

**Potássio SRA — 600 µg/ml**

**Especificação** — Contém 1.144 g de cloreto de potássio em água a 1000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Prednisolona**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{21}H_{28}O_5$  — 360,45

**Especificação** — Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p),  $C_{21}H_{28}O_5$ , calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** — Pó cristalino branco ou quase branco. Higroscópico. Apresentado na forma anidra ou contendo uma ou meia molécula de água de hidratação.

**Características físicas** — Ponto de fusão: 240-241 °C, com decomposição.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Corticoide.

**Prednisona**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{21}H_{26}O_5$  — 358,43.

**Especificação** — Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p),  $C_{21}H_{26}O_5$ , calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** — Pó cristalino branco ou quase branco.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 233 °C, com decomposição.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Categoria** — Corticoide.

**Preto brilhante BN**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_4S_4$  — 868,00

**Descrição** — Cristais finos, pó azul violáceo ou preto acinzentado. Indicador de óxido-redução: forma oxidada: ra azul violácea; forma reduzida: amarelo-marrom.

**Características físicas** — Absorvância da solução a 1,0 por cento (espessura 1,0 cm) a 570 nm  $\geq 0,390$ .

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Propilenoglicol**

**Sinonímia** — 1,2-Propanodiol.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_3H_8O_2$  — 76,09

**Descrição** — Líquido incolor, viscoso, higroscópico.

**Características físicas** — Densidade (25 °C): 1,035 a 1,037. Faixa de ebulição: 187-189 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

**Quinalizarina — C.I. 58500**

**Sinonímia** — Mordente violeta 26

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{14}H_8O_6$  — 272,20.

**Descrição** — Pó vermelho escuro.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Resazurina**

**Sinonímia** — Diazorresorcinol.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{12}H_7NO_4$  — 229,18.

**Descrição** — Cristais ou pó cristalino vermelho escuro.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Resorcinol***Sinonímia* – Resorcina.*Fórmula e massa molecular* –  $C_6H_6O_2$  – 110,11*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).*Descrição* – Cristais ou pó cristalino incolor ou amarelo pálido; exposto à luz e ao ar, adquire coloração rósea.*Características físicas* – Faixa de fusão: 109-111 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz e do ar.**Sacarose***Fórmula e massa molecular* –  $C_{12}H_{22}O_{11}$  – 342,30*Especificação* – É obtida da *Saccharum officinarum* Linné (Família *Gramineae*), *Beta vulgares* Linné (Família *Chenopodiaceae*) e outras fontes.*Descrição* – Cristais brancos ou incolores; pó cristalino ou massa cristalina ou blocos brancos. Inodoro. Sabor adocicado. Estável ao ar. Finalemente dividido é higroscópico e absorve até 1 por cento de umidade. Não contém aditivos.*Características físicas* – Decomposição: entre 160 e 186 °C.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Sacarose 0,1 por cento (p/V) em piridina***Especificação* – Contém 0,1 g de sacarose em piridina a 100 ml.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Segurança* – Tóxico.**Safranina O***Descrição* – Pó vermelho escuro. Consiste de mistura de cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5-fenilfenazínio ( $C_{20}H_{19}ClN_4$  – 350,85) e cloreto de 3,7-diamino-2,8-dimetil-5,8-tolilfenazínio ( $C_{21}H_{21}ClN_4$  – 364,88). Indicador de óxido-redução – forma oxidada: pH ácido, violeta-azulado; pH alcalino, parda; forma reduzida: incolor tanto na acidez quanto na alcalinidade.*Características físicas* – Absorção máxima: 530-533 nm.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Sílica-gel, dessecada***Fórmula e massa molecular* –  $SiO_2$  – 60,08*Especificação* – Ácido silíceo coloidal, polimerizado, previamente desidratado; contém cloreto de cobalto como indicador.*Descrição* – Grânulos vítreos, amorfos, de granulometria variável, com grânulos impregnados com indicador de capacidade de adsorção pela cor azul a rósea.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da umidade.*Categoria* – Dessecante.**Sílica-gel "G"***Sinonímia* – Gel de sílica "G".*Especificação* – Contém aproximadamente 13,0 por cento (p/p) de sulfato de cálcio hemiidratado.*Descrição* – Pó fino branco de granulometria variável entre 10 e 40  $\mu$ m, homogêneo.*Características físicas* – pH: suspensão a 10,0 por cento (p/V) em água isenta de dióxido de carbono, obtida por agitação durante 15 minutos; determinação potenciométrica aproximadamente 7.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Suporte para cromatografia.**Sílica-gel "GF-254"***Sinonímia* – Gel de sílica GF-254.*Especificação* – Contém aproximadamente 13,0 por cento (p/p) de sulfato de cálcio hemiidratado e aproximadamente 1,5 por cento (p/p) de indicador de fluorescência de intensidade máxima a 254 nm.*Descrição* – Pó fino branco de granulometria variável entre 10 e 40  $\mu$ m, homogêneo.*Características físicas* – pH: ver sílica-gel "G".*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Suporte para cromatografia.**Sílica-gel "H"***Sinonímia* – Gel de sílica "H".*Descrição* – Pó fino branco, de granulometria variável entre 10 e 40  $\mu$ m, homogêneo.*Características físicas* – Ver sílica-gel "G".*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Suporte para cromatografia.**Sílica-gel "HF 254"***Sinonímia* – Gel de sílica "HF 254".*Especificação* – Contém aproximadamente 1,5 por cento (p/V) de indicador de fluorescência de intensidade máxima a 254 nm.*Descrição* – Pó fino branco de granulometria variável entre 10 e 40  $\mu$ m, homogêneo.*Características físicas* – pH: ver sílica-gel "G".*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Categoria* – Suporte para cromatografia.**Sódio SRA - 200  $\mu$ g/ml***Especificação* – Contém 0,5084 g de cloreto de sódio em água a 1000 ml.*Conservação* – Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).**Solução de bário 10 ppm***Especificação* – Contém 1,779 g de  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  em água a 1000 ml. Para uso, diluir 1:100.*Conservação* – Recipientes bem fechados e inertes (tipo polietileno).*Informação adicional* – Solução padrão para ensaio-limite.**Solução de cádmio 5 ppm***Especificação* – Contém 0,229 g de sulfato de cádmio em água a 100 ml, corresponde a 1000  $\mu$ g/ml de cádmio. Para uso, diluir 1:200.*Conservação* – Recipientes bem fechados e inertes (tipo polietileno).*Informação adicional* – Solução padrão para ensaio-limite.**Solução de cloreto 5 ppm***Especificação* – Contém 0,824 g de cloreto de sódio em água a 1000 ml. Para uso diluir 1:100.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Informação adicional* – Solução padrão para ensaio-limite.**Solução de estanho 5 ppm***Especificação* – Contém 1,2253 g de acetato de estanho.  $1/2 H_2O$  em 25,0 ml de ácido clorídrico em água a 1000 ml. Para uso, diluir 1:100 em ácido clorídrico 2,5 por cento (p/V).*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Informação adicional* – Solução padrão para ensaio-limite.



**Solução de Karl-Fischer**

*Sinonímia* – Reagente iodo-sulfurado.

*Especificação* – Constituído de duas soluções: Solução 1: a mistura de 70 ml de metanol e 35 ml de piridina, isenta de água, adicionar, sob refrigeração e ausência de umidade, dióxido de enxofre seco até obter acréscimo em peso de 9 g. Misturar; Solução 2: Contém 12,6 g de iodo em metanol a 100 ml.

*Conservação* – Em recipientes de vidro herméticos.

*Estabilidade* – Decompõe-se continuamente.

*Armazenagem* – Proteger da umidade e da luz. Manter sob refrigeração.

*Segurança* – Tóxico. Inflamável.

*Informação adicional* – Para determinação do teor de água.

**Solução de zinco 10 ppm**

*Especificação* – Contém, 4,398 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  em ácido acético a 1,0 por cento (V/V) a 100 ml. Para uso, diluir 1:100.

*Conservação* – Recipientes bem fechados e inertes (tipo polietileno).

*Informação adicional* – Solução padrão para ensaio-limite.

**Subnitrato de bismuto**

*Sinonímia* – Oxinitrato de bismuto.

*Fórmula e massa molecular* –  $Bi_2O(OH)_2(NO_2)_4$  – 1461,99.

*Especificação* – É sal básico que contém, no mínimo, o equivalente a 79,0 por cento de trióxido de bismuto ( $Bi_2O_3$ ) (p/p).

*Descrição* – Pó branco, denso, higroscópico, inodoro e sem gosto. Apresenta reação alcalina diante do papel de tornassol.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger da luz.

*Categoria* – Antiácido.

**Sudan III**

*Fórmula e massa molecular* –  $C_{12}H_{16}N_4O$  – 352,40

*Descrição* – Pó vermelho-marrom

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfanilamida**

*Fórmula e massa molecular* –  $C_6H_5N_2O_2S$  – 172,20

*Descrição* – Pó cristalino branco ou quase branco.

*Características físicas*: Ponto de fusão: aproximadamente 165 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Categoria* – Antibacteriano.

**Sulfato de amônio**

*Fórmula e massa molecular* –  $(NH_4)_2SO_4$  – 132,13

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Cristais incolores, inodoros.

*Características físicas* – Decompõe-se acima de 280 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfato de bário**

*Fórmula e massa molecular* –  $BaSO_4$  – 233,39

*Especificação* – Contém, no mínimo, 97,5 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó branco, fino e denso. Inodoro e insípido.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Categoria* – Contraste radiológico para o trato gastrointestinal.

**Sulfato de cádmio**

*Fórmula e massa molecular* –  $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$  – 769,49

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

*Descrição* – Pó cristalino, incolor e inodoro.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfato de cálcio, hemidratado**

*Fórmula e massa molecular* –  $CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$  – 145,14

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p), calculado sobre base seca.

*Descrição* – Pó branco, fino; contém aproximadamente 7,0 por cento de água.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfato de cálcio, solução saturada, SR**

*Preparação* – Agitar 5,0 g de sulfato de cálcio hemidratado com 100 ml de água, durante uma hora. Filtrar antes do uso.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfato cúprico, pentaidratado**

*Fórmula e massa molecular* –  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  – 249,68

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,5 por cento (p/p) calculado sobre a substância dessecada a 250 °C.

*Descrição* – Cristais, pó ou grânulos azuis. Em contato com o ar efloresce lentamente.

*Características físicas* – Aquecido a 250 °C, até peso constante, perde entre 33,0 a 36,5 por cento de seu peso.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Armazenagem* – Proteger do ar.

*Segurança* – Irritante.

**Sulfato cúprico SR**

*Especificação* – Contém 10,0 g sulfato cúprico pentaidratado em água a 100 ml.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

**Sulfato de manganês**

*Fórmula e massa molecular* –  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  – 223,14

*Especificação* – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p) de  $MnSO_4$ , calculado sobre a substância dessecada a 450-500 °C.

*Descrição* – Cristais ou pó cristalino de cor rósea. Inodoro. Efloresce lentamente.

*Características físicas* – Perde água a aproximadamente 450 °C.

*Conservação* – Recipientes bem fechados.

*Informação adicional* – O produto comercial normalmente é mistura de sulfato de manganês tetra e pentaidratado.

**Sulfato de potássio**

*Fórmula e massa molecular* –  $K_2SO_4$  – 174,25

*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

*Descrição* – Cristais incolores ou pó cristalino branco, de sabor amargo.

*Características físicas* – Solução aquosa com caráter neutro. Ponto de fusão: 1.067 °C.

*Conservação* – Recipientes fechados.

**Sulfato de protamina**

*Especificação* – Consiste em mistura de proteínas simples, obtidas de esperma e testículos de espécies adequadas de peixes. Possui a propriedade de neutralizar a heparina.

**Descrição** – Pó cristalino fino, branco ou amorfo fracamente corado.

**Conservação** – Recipientes bem fechados, sob refrigeração.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

#### Sulfato de sódio anidro

**Fórmula e massa molecular** – Preparado a partir do  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  por aquecimento a aproximadamente  $100^\circ\text{C}$ . Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** – Pó fino, branco, "solto", inodoro, de sabor salgado fracamente amargo. Higroscópico.

**Características físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente  $800^\circ\text{C}$ .

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da umidade.

#### Sulfato de sódio decaidratado

**Sinonímia** – Sal de Glauber.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  – 322,19

**Especificação** – Contém no mínimo 99,0 por cento (p/p) de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** – Cristais incolores transparentes ou pó cristalino branco, eflorescente, inodoro, de sabor salgado fracamente amargo.

**Características físicas** – Ponto de fusão:  $32,5^\circ\text{C}$ . (Dissolve-se a aproximadamente  $33^\circ\text{C}$  em sua água de cristalização)

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do calor.

#### Sulfato de zinco, heptaidratado

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 287,58

**Especificação** – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p) de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou, no mínimo, 55,6 por cento (p/p) de  $\text{ZnSO}_4$ .

**Descrição** – Pó cristalino branco ou cristais incolores transparentes. Inodoro, de gosto adstringente. Eflorescente.

**Características físicas** – À temperatura de  $280^\circ\text{C}$  torna-se anidro.

**Conservação** – Recipientes não-metálicos bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da umidade.

#### Sulfato de zinco 0,1 M

**Descrição** – Contém 28,75 g de sulfato de zinco heptaidratado em água a 1000 ml.

**Conservação** – Recipientes não-metálicos bem fechados.

#### Sulfato férrico

**Sinonímia** – Persulfato férrico.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

**Especificação** – O produto comercial contém normalmente cerca de 20 por cento de água (p/p).

**Descrição** – Pó branco a amarelo, muito higroscópico; decompõe-se em presença do ar.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz e do ar.

#### Sulfato férrico amoniacal

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  – 482,18.

**Descrição** – Cristais transparentes incolores a violeta-pálido. Inodoro. Eflorescente.

**Características físicas** – Ponto de fusão: aproximadamente  $37^\circ\text{C}$ .

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Sulfato férrico amoniacal SR

**Especificação** – Contém 10,0 g em água a 100 ml.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

#### Sulfato férrico-ferricianeto de potássio SR

**Preparação** – Misturar volumes iguais da solução 0,5 por cento (p/V) de sulfato férrico em ácido sulfúrico 0,5 M e da solução a 0,2 por cento (p/V) de ferricianeto de potássio.

**Estabilidade** – Preparar no momento de uso.

#### Sulfato ferroso, heptaidratado

**Sinonímia** – Sulfato de ferro, heptaidratado.

**Fórmula e massa molecular** –  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 278,01

**Especificação** – Contém, no mínimo, 98,0 por cento (p/p) de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

**Descrição** – Cristais azul-esverdeados; grânulos ou pó cristalino verde. Inodoro. Eflorescente. Oxida-se pela umidade e luminosidade a sulfato básico de ferro(III) de cor marrom.

**Características físicas** – A  $65^\circ\text{C}$  transforma-se em monodratado.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger do ar e da umidade.

**Informação adicional** – Não usar quando tiver cor marrom [sulfato básico de ferro(III)].

#### Sulfato ferroso SR

**Especificação** – Contém 8,0 g de sulfato ferroso heptaidratado em água fria, recentemente fervida, a 100 ml. Preparar no momento de uso.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz, do ar e do calor.

#### Sulfato ferroso 0,5 M

**Especificação** – Contém 139,0 g de sulfato ferroso heptaidratado em água a 1000 ml. Preparar 100 ml, no momento de uso.

**Conservação** – Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** – Proteger da luz, do ar e do calor.

#### Sulfeto de amônio, em solução

**Fórmula e massa molecular** –  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  – 68,14

**Especificação** – Contém usualmente entre 16 a 20 por cento equivalente em sulfeto de enxofre expresso em  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ .

**Descrição** – Líquido de coloração amarela até vermelha, com odor amoniacal e de sulfeto de hidrogênio. Cristaliza a temperaturas inferiores a  $0^\circ\text{C}$ .

**Informações adicionais** – Para rotina analítica, use sulfeto de amônio SR.

#### Sulfeto de amônio SR

**Preparação** – Saturar 60 ml de amônia SR com sulfeto de hidrogênio e juntar 40 ml de amônia SR. Usar solução de preparo recente.

**Conservação** – Recipiente pequeno, bem cheio.

**Armazenagem** – Proteger da luz e do calor.

**Estabilidade** – Diante de precipitação abundante de enxofre, desprezar a solução.

**Sulfeto de hidrogênio***Sinonímia* – Ácido sulfídrico*Fórmula e massa molecular* –  $H_2S$  – 34,08*Especificação* – Produzido pelo tratamento de sulfeto ferroso (ou outros sulfetos) com ácidos sulfúrico ou clorídrico diluídos.*Descrição* – Gás incolor de odor característico e sabor adocicado; mais denso do que o ar.*Características físicas* – Densidade relativa ao ar: 1,19. Temperatura de ebulição: 260 °C.*Conservação* – Disponível também em cilindros pressurizados.*Segurança* – Tóxico. Veneno. Inflamável.**Sulfeto de hidrogênio SR***Especificação* – A solução aquosa saturada a 20 °C contém em torno de 0,4 a 0,5 por cento (p/V). Preparada pela passagem de  $H_2S$  em água fria.*Características físicas* – pH da solução aquosa recém-preparada: 4,5.*Estabilidade* – Preparar para uso imediato.*Segurança* – Tóxico. Veneno! Inflamável.**Sulfeto de sódio***Fórmula e massa molecular* –  $Na_2S \cdot 9H_2O$  – 240,18*Descrição* – Cristais incolores delíquescetes que se amarelam pelo ar e pela ação da luz; de odor semelhante ao do sulfeto de hidrogênio.*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 50 °C.*Conservação* – Recipiente bem fechado, no frio.*Armazenagem* – Proteger do ar, da luz e do calor.**Sulfeto de sódio SR***Especificação* – Contém 1,0 g (p/V) em água a 10 ml.*Estabilidade* – Preparar para consumo imediato.**Tanino***Sinonímia* – Ácido tânico.*Especificação* – Obtido de cascas de diversas plantas, consistindo, especialmente, de mistura de substâncias polifenólicas.*Descrição* – Pó amarelo a marrom. Odor fracamente característico e sabor adstringente.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger da luz.*Rotulagem* – A rotulagem deve indicar a fonte botânica.**Tartarato ácido de epinefrina***Sinonímia* – Bitartarato de epinefrina.*Fórmula e massa molecular* –  $C_{13}H_{19}NO_9$  – 333,29*Especificação* – Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.*Descrição* – Cristais ou pó cristalino branco a branco-cinza. Inodoro.*Características físicas* – Ponto de fusão: aproximadamente 150 °C, com decomposição.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Estabilidade* – Escurece lentamente pela exposição ao ar e à luz.*Armazenagem* – Proteger do ar e da luz.*Categoria* – Adrenérgico.**Tartarato de sódio***Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_4O_6Na_2 \cdot 2H_2O$  – 230,08*Especificação* – Contém 84,34 por cento de  $C_4H_4O_6Na_2$  e 15,66 por cento de  $H_2O$ . Aquecido a 150 °C, perde, no mínimo, 15,6 e, no máximo, 15,7 por cento de seu peso.*Descrição* – Cristais transparentes.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Tartarato de sódio e potássio***Sinonímia* – Sal de Rochelle ou de Seignette, tartarato duplo de potássio e sódio, tártaro emético.*Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$  – 282,22; anidro – 210,16*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado em base seca de  $C_4H_4KNaO_6$ .*Descrição* – Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor salgado. Eflorescente ao ar quente.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger do calor.**Tartarato de sódio e potássio SR***Especificação* – Contém 20,0 por cento (p/V).*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Tetraborato sódico***Sinonímia* – Borato sódico, bórax.*Fórmula e massa molecular* –  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  – 381,37; anidro – 201,22*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).*Descrição* – Cristais incolores ou pó cristalino branco, inodoro, de sabor cáustico. Eflorescente.*Conservação* – Recipientes bem fechados; efloresce ao ar seco.*Armazenagem* – Proteger do ar.**Tetraborato sódico 0,01 M***Preparação* – Dissolver 3,80 g de  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$  em água a 1000 ml.*Conservação* – Recipientes bem fechados.*Armazenagem* – Proteger do dióxido de carbono.*Informação adicional* – Calibração de medidor de pH.**Tetracloreto de carbono***Fórmula e massa molecular* –  $CCl_4$  – 153,82.*Especificação* – Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).*Descrição* – Líquido incolor, límpido, denso e de odor característico.*Características físicas* – Ponto de ebulição: 76-77 °C. Densidade: 1,588 a 1,590. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,4607.*Conservação* – Recipientes herméticos.*Armazenagem* – Proteger da luz e do calor.*Segurança* – Veneno (nas formas líquida e gasosa)!*Informação adicional* – Não é inflamável, porém libera fósforo (tóxico) em presença de chama.**Tetrafenilborato de sódio***Fórmula e massa molecular* –  $C_{24}H_{20}BNa$  – 342,22*Descrição* – Pó ou cristais brancos ou quase brancos.*Conservação* – Recipientes bem fechados.**Tetraidrofurano***Fórmula e massa molecular* –  $C_4H_8O$  – 72,11.*Especificação* – O produto é adicionado de estabilizantes (p-cresol, hidroquinona) na proporção 0,05-0,1 por cento para evitar a formação excessiva de peróxidos.

**Descrição** — Líquido incolor. Odor intenso e semelhante ao do éter.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: 65-66 °C. Densidade: aproximadamente 0,889. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,4070.

**Conservação** — Recipientes bem fechados: pequenos e repletos.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

**Segurança** — Irritante à pele, olhos e mucosas.

#### Tetraoxalato de potássio

**Fórmula e massa molecular** —  $C_4H_2KO_8 \cdot 2H_2O$  — 254,20

**Descrição** — Pó cristalino branco ou cristais incolores ou brancos.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tetraoxalato de potássio 0,05 M

**Preparação** — Dissolver 12,71 g de tetraoxalato de potássio diidratado em água a 1000 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Informação adicional** — Calibração de medidor de pH.

#### Tioacetamida

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_5NS$  — 75,13.

**Descrição** — Cristais ou pó cristalino branco. Fraco odor de mercaptana.

**Características físicas** — Ponto de fusão: 113-114 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tioacetamida SR

**Preparação** — Misturar 0,2 ml da solução de tioacetamida a 4,0 por cento (p/V) e 1,0 ml da seguinte mistura: 1,5 ml de hidróxido de sódio 1 M, 0,5 ml de água e 2,0 ml de glicerol. Aquecer em banho-maria durante 20 segundos

**Estabilidade** — Preparar no momento de uso.

#### Tiocianato de amônio

**Sinonímia** — Sulfocianato de amônio.

**Fórmula e massa molecular** —  $NH_4SCN$  — 76,12

**Descrição** — Cristais delíquescetes.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 149 °C.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

#### Tiocianato de amônio SR

**Especificação** — Contém 8,0 g em água a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tiocianato de amônio 0,5 M

**Especificação** — Contém 3,806 g em água a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tiocianato de potássio

**Sinonímia** — Sulfocianato de potássio.

**Fórmula e massa molecular** —  $KSCN$  — 97,18

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p).

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 173 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Pode causar erupções cutâneas, psicose!

#### Tiocianato de potássio aproximadamente M

**Especificação** — Contém 9,7 por cento em água (p/V).

#### Tioglicolato de sódio

**Fórmula e massa molecular** —  $C_2H_3NaO_2S$  — 114,09

**Especificação** — Contém, no mínimo, 95,0 por cento (p/p).

**Descrição** — Pó cristalino branco, higroscópico, de odor fraco característico.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger da luz e do ar.

#### Tiosulfato de sódio

**Sinonímia** — Hipossulfito de sódio R.

**Fórmula e massa molecular** —  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  — 248,17

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento (p/p), calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** — Cristais incolores, ou pó cristalino branco, facilmente eflorescentes, de sabor fracamente amargo.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 48 °C (aquecimento rápido). Dissolve em sua água de cristalização a aproximadamente 49 °C.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tiosulfato de sódio 0,1 M

**Preparação** — Dissolver 2,5 g de tiosulfato de sódio e 0,02 g de carbonato de sódio em água isenta de dióxido de carbono a 100 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Tolueno

**Sinonímia** — Metilbenzeno, toluol.

**Fórmula e massa molecular** —  $C_7H_8$  — 92,14

**Descrição** — Líquido incolor de odor característico. Inflamável.

**Características físicas** — Ponto de ebulição: 110-111 °C. Densidade: aproximadamente 0,87. Índice de refração ( $n_D^{20}$ ): 1,4967.

**Segurança** — Tóxico! Inflamável!

#### Torina

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{14}H_{11}AsN_2Na_2O_{10}S_2$  — 530,19

#### Trióxido de arsênio

**Sinonímia** — Óxido arsenioso.

**Fórmula e massa molecular** —  $As_2O_3$  — 197,84

**Descrição** — Pó cristalino branco ou transparente, ou massa amorfa.

**Características físicas** — Aquecimento rápido determina fusão ou sublimação.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Segurança** — Veneno!

#### Trióxido de cromo

**Sinonímia** — Anidrido crômico.

**Fórmula e massa molecular** —  $CrO_3$  — 99,99

**Descrição** — Cristais ou pó granulado ou escamas marrom-avermelhadas, delíquescetes.

**Características físicas** — Ponto de fusão: aproximadamente 197 °C.

**Conservação** — Recipientes de vidro herméticos.

**Armazenagem** — Evitar proximidade com inflamáveis.

**Segurança** — Oxidante energético. Irritante.

#### Trombina

**Especificação** — Preparado biológico obtido de plasma humano, por técnicas de fracionamento apropriadas.

**Descrição** — Pó amarelo de cor creme.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, sob refrigeração, especificando data de preparação e potência.

**Armazenagem** — Proteger da luz, da umidade e do oxigênio.

**Categoria** — Enzima. Hemostático local.

#### **Tromboplastina**

**Sinonímia** — Fator III (coagulação sanguínea).

**Especificação** — Preparado biológico de origem animal, obtido por extração de determinados órgãos: cérebro, pulmão.

**Descrição** — Pó ou suspensão de cor amarelada, de odor característico.

**Características físicas** — Na presença de concentrações apropriadas de íons cálcio, apresenta atividade tromboquinase na coagulação sanguínea.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Rotulagem** — Especificar na composição: íons e agentes antimicrobianos, suas concentrações, bem como origem, data de preparação, atividade.

**Armazenagem** — Proteger do calor e umidade. Manter sob refrigeração.

**Categoria** — Preparação com atividade enzimática. Hemostático local.

#### **Trometamina**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_4H_{11}NO_3$  — 121,14

**Especificação** — Contém, no mínimo, 99,0 por cento, calculado sobre a substância dessecada.

**Descrição** — Cristais brancos.

**Características físicas** — Faixa de fusão: 168-172 °C. pH da solução 0,1 M: 10,4.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### **Varfarina sódica**

**Fórmula e massa molecular** —  $C_{19}H_{15}NaO_4$  — 330,31

**Especificação** — Contém, no mínimo, 97,0 por cento (p/p), calculado em relação à substância dessecada.

**Descrição** — Pó cristalino ou amorfo, de sabor fracamente amargo.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

**Categoria** — Anticoagulante.

#### **Zinco, ativado**

**Preparação** — Cobrir uma quantidade de zinco granulado com solução de ácido cloroplátinico(IV) contendo 50 µg/ml. Deixar em repouso durante 10 minutos. Após lavar, escorrer e secar imediatamente.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### **Zinco, granulado**

**Símbolo e massa atômica** — Zn — 65,38

**Descrição** — Metal lustroso branco-azulado. Estável ao ar seco. Converte-se em carbonato básico quando exposto à umidade.

**Características físicas** — Toma-se maleável a 100-150 °C. Queima em presença do ar com chama verde-azulada.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da umidade.

**Segurança** — Tóxico!

#### **Zinco SRA — 5 mg/ml**

**Especificação** — Contém 2,50 g de zinco granulado em 20 ml de ácido clorídrico 5 M. Completar com água a 500 ml.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

## XII.3. SOLUÇÕES VOLUMÉTRICAS

As soluções volumétricas (SV) estão acompanhadas de método de padronização, embora possam existir outros que conduzam ao mesmo grau de exatidão.

Os valores obtidos na padronização são válidos para todos os usos farmacopéicos.

Os reagentes empregados devem possuir grau quimicamente puro e, quando necessário, ser submetidos à dessecação.

As soluções volumétricas são padronizadas e usadas a temperaturas ao redor de 25 °C. Diante de variações significativas de temperatura, a solução volumétrica deve ter título confirmado na mesma temperatura ou ser aferida mediante fator de correção.

### Ácido clorídrico *M* SV

**Especificação** — Contém 85,0 ml de ácido clorídrico em água a 1000,0 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 1,5 g de carbonato de sódio anidro. Juntar 100 ml de água e duas gotas de vermelho de metila SI. Adicionar o ácido lentamente, a partir de bureta, até coloração rósea fraca. Aquecer a solução até ebulição; esfriar e continuar a titulação. Repetir esta seqüência de operações até que o aquecimento não afete a coloração rósea. Calcular a molaridade. Cada 52,99 mg de carbonato de sódio anidro equivale a 1 ml de ácido clorídrico *M*.

**Conservação** — Recipientes herméticos.

**Armazenagem** — Proteger do calor.

### Ácido perclórico 0,1 *M* em ácido acético

**Especificação** — Contém 10,0 g em ácido acético a 1000 ml.

**Padronização** — Dissolver, sob agitação, 8,5 ml de ácido perclórico em 200 a 300 ml de ácido acético glacial. Acrescentar 20 ml de anidrido acético, diluir a mistura a 1000,0 ml com ácido acético glacial e deixar em repouso por 24 horas. Determinar o teor de água, que deve situar-se entre 0,02 e 0,05%. Pesar exatamente cerca de 700 mg de bifalato de potássio previamente pulverizado e dessecado a 120 °C por 2 horas e dissolvê-lo em 50 ml de ácido acético glacial em frasco de erlenmeyer de 250 ml de capacidade. Adicionar 2 gotas de cloreto de metilrosanilínio e titular com a solução de ácido perclórico até que a coloração violeta mude para verde-esmeralda. Cada 20,42 mg de bifalato de potássio equivale a 1 ml de ácido perclórico 0,1 *M*.

### Ácido sulfúrico *M* SV

**Especificação** — Contém 98,07 g de ácido sulfúrico em água a 1000,0 ml.

**Padronização** — Adicionar lentamente, sob agitação, 60,0 ml de ácido sulfúrico sobre 1020 ml de água. Esfriar à temperatura ambiente. Determinar a molaridade por titulação com carbonato de sódio, conforme descrito para ácido clorídrico *M*, porém pesando exatamente cerca de 3,0 g de carbonato de sódio anidro. Cada 105,98 mg de carbonato de sódio anidro equivale a 1 ml de ácido sulfúrico *M*.

### Bromato de potássio 0,1 *M* SV

**Especificação** — Contém 16,704 g de bromato de potássio em água a 1000 ml.

**Padronização** — Medir exatamente volume em torno de 40 ml da solução de bromato de potássio. Juntar 3,0 g de iodeto de potássio e 3,0 ml de ácido clorídrico SR.

Aguardar 5 minutos e titular o iodo liberado com tioussulfato de sódio 0,1 *M*, usando 3,0 ml de amido SR como indicador. Preparar um branco. Corrigir e calcular a molaridade. Cada ml de bromato de potássio corresponde a 6 ml de tioussulfato de sódio 0,1 *M*.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

### Diclorofenol-indofenol, solução padrão

**Preparação** — Dissolver 0,05 g de 2,6-diclorofenol-indofenol sódico em 50 ml de água com 0,042 mg de bicarbonato de sódio. Agitar vigorosamente. Após dissolução, completar com água a 200 ml. Filtrar.

**Padronização** — Pesar exatamente 50 mg de ácido ascórbico e diluir com ácido metafosfórico-acético SR a 50 ml. Para balão de 50 ml, transferir imediatamente 2 ml da solução de ácido ascórbico e adicionar 5 ml de ácido metafosfórico-acético SR. Titular rapidamente com a solução de diclorofenol-indofenol até persistir cor rósea por, pelo menos, 5 segundos. Fazer determinação em branco, titulando 7 ml de ácido metafosfórico-acético SR, adicionada de quantidade de água igual à da solução de diclorofenol-indofenol usada na titulação do ácido ascórbico. Expressar a concentração da solução padrão em termos de seu equivalente em mg de ácido ascórbico.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

### Edetato dissódico 0,05 *M* SV

**Sinonímia** — EDTA dissódico 0,05 *M*, etilenodiaminotetraacetato dissódico 0,05 *M*.

**Especificação** — Contém 18,6 g de edetato dissódico diidratado em água a 1000 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 200 mg de carbonato de cálcio. Transferir para copo de bquer de 400 ml e adicionar 10 ml de água. Agitar e cobrir o copo com vidro de relógio. Juntar 2 ml de ácido clorídrico diluído e agitar até dissolução do carbonato de cálcio. Lavar as paredes do copo de bquer e o vidro de relógio com água até cerca de 100 ml. Continuar agitando, magneticamente. Adicionar 30 ml da solução de edetato dissódico a partir de bureta de 50,0 ml. Juntar 15 ml de hidróxido de sódio SR e 300 mg do indicador azul de hidroxinaftol. Continuar a titulação da solução de edetato dissódico até cor azul. Calcular a molaridade.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

### Hidróxido de potássio *M* SV

**Preparação** — Dissolver 60 g de hidróxido de potássio em água a 1000 ml. Adicionar solução saturada de hidróxido de bário, recentemente preparada, até que não se forme mais precipitado. Agitar e deixar em repouso durante aproximadamente 12 horas. Decantar o líquido

límpido, ou filtrar, e transferir para recipientes de material inerte (tipo polietileno).

**Padronização** — Usar o mesmo procedimento adotado para o hidróxido de sódio *M*.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno).

**Segurança** — Cáustico.

#### Hidróxido de sódio *M* SV

**Preparação** — Preparar solução de hidróxido de sódio 50% (p/V) com água isenta de dióxido de carbono. Esfriar à temperatura ambiente e deixar sedimentar. Retirar 82 ml do sobrenadante e diluir com água a 1000 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 5 g de biftalato de potássio dessecado e dissolver em 75 ml de água isenta de dióxido de carbono. Juntar duas gotas de fenolftaleína SI e titular com a solução de hidróxido de sódio até formação permanente de cor rósea. Cada ml de hidróxido de sódio *M* SV equivale a 204,22 mg de biftalato de potássio.

**Conservação** — Recipientes bem fechados, inertes (tipo polietileno). Rolhas providas de tubo contendo a mistura hidróxido de sódio e óxido de cálcio.

**Armazenagem** — Proteger do dióxido de carbono.

**Segurança** — Cáustico.

**Informação adicional** — Conferir o título com frequência.

#### Hidróxido de tetrabutilamônio 0,1 *M*

**Especificação** — Contém 25,95 g em metanol-tolueno a 1000 ml.

**Preparação** — Dissolver 40 g de iodeto de tetrabutilamônio em 90 ml de metanol anidro, em frasco de erlenmeyer provido de rolha esmerilhada. Colocar em banho de gelo, adicionar 20 g de óxido de prata pulverizado, tampar o frasco e agitar vigorosamente por 60 minutos. Retirar alguns ml e centrifugar. Verificar presença de iodeto no líquido sobrenadante. Se o teste é positivo, adicionar mais 2 g de óxido de prata e deixar em repouso por 30 minutos, agitando ocasionalmente. Filtrar através de funil de placa porosa, lavar o erlenmeyer e o funil com 3 porções de 50 ml de tolueno e juntar o tolueno de lavagem ao filtrado. Completar o volume a 1000 ml com a mistura de três volumes de tolueno anidro e um volume de metanol anidro. Passar sobre a solução, por 10 minutos, corrente de nitrogênio isento de dióxido de carbono. Guardar em recipiente protegido do dióxido de carbono e da umidade. Consumir em 60 dias. Determinar a molaridade no dia de uso, dissolvendo cerca de 400 mg de ácido benzóico exatamente pesados, em 80 ml de dimetilformamida. Adicionar a esta solução 3 gotas de solução de azul de timol em dimetilformamida a 1% (p/V) e titular com solução de hidróxido de tetrabutilamônio até coloração azul. Utilizar bureta provida de tubo de absorção de dióxido de carbono. Efetuar ensaio em branco. Cada ml de hidróxido de tetrabutilamônio equivale a 12,21 mg de ácido benzóico.

#### Iodo 0,1 *M* SV

**Preparação** — Dissolver cerca de 13 g de iodo em 100 ml de iodeto de potássio 3,6 por cento (p/V). Juntar três gotas de ácido clorídrico e completar com água a 1000 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 150 mg de trióxido de arsênio. Dissolver em 20 ml de hidróxido de sódio *M*, aquecendo se necessário. Adicionar 40 ml de água, duas gotas de alaranjado de metila SI e ácido clorídrico diluído até cor rósea. Juntar 50 ml de carbonato de sódio a 4,0 por cento (p/V) e 3,0 ml de amido SI. Titular com a solução de iodo, a partir de bureta, até

cor azul permanente. Calcular a molaridade. Cada 4,946 mg de trióxido de arsênio equivale a 1,0 ml de iodo 0,1 *M*.

**Conservação** — Recipientes de vidro bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### Metóxido de sódio 0,1 *M* SV

**Especificação** — Contém 5,402 g em solução tolueno-metanol a 1000 ml.

**Padronização** — Esfriar em banho de gelo 150 ml de metanol, contidos em balão volumétrico de 1000 ml. Adicionar, em pequenas porções, cerca de 2,5 g de sódio metálico recém-cortado. Após a dissolução do metal, adicionar tolueno até completar 1000 ml e misturar. Manter esta solução em recipiente ao abrigo do dióxido de carbono. Pesar exatamente cerca de 400 mg de ácido benzóico, dissolver em 80 ml de dimetilformamida, adicionar 3 gotas de solução de azul de timol em dimetilformamida a 1% (p/V) e titular pela solução de metóxido de sódio até o aparecimento de coloração azul. Cada 12,21 mg de ácido benzóico equivale a 1 ml de metóxido de sódio 0,1 *M*.

#### Nitrato de mercúrio(II) 0,1 *M* SV

**Sinonímia** — Nitrato mercúrico 0,1 *M*.

**Preparação** — Dissolver cerca de 35 g de nitrato de mercúrio(II) em 5,0 ml de ácido nítrico e 500 ml de água. Completar com água a 1000 ml.

**Padronização** — A 20,0 ml desta solução, adicionar 2 ml de ácido nítrico SR e 2 ml de sulfato férrico amoniacal SR. Resfriar à temperatura inferior a 20 °C e titular com tiocianato de amônio 0,1 *M* até aparecimento permanente da coloração marrom. Calcular a molaridade.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

#### Nitrato de prata 0,1 *M* SV

**Preparação** — Dissolver cerca de 17,5 g de nitrato de prata em água a 1000 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 100 mg de cloreto de sódio, dessecado; transferir para copo de bquer de 150 ml e dissolver em 5 ml de água. Juntar 5 ml de ácido acético SR, 50 ml de metanol e três gotas de eosina Y SI. Agitar, de preferência com agitador magnético, e titular com a solução de nitrato de prata. Calcular a molaridade. Cada ml de nitrato de prata 0,1 *M* SV corresponde a 5,844 mg de cloreto de sódio.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Armazenagem** — Proteger da luz.

#### Nitrito de sódio 0,1 *M* SV

**Especificação** — Contém 6,900 g de nitrito de sódio em água a 1000 ml.

**Padronização** — Dissolver 7,5 g de nitrito de sódio em água e completar o volume a 1000 ml. Pesar exatamente cerca de 500 mg de sulfanilamida previamente dessecada por 3 horas a 105 °C. Transferir para bquer, adicionar 20 ml de ácido clorídrico e 50 ml de água. Agitar até dissolução e esfriar a 15 °C. Mantendo a temperatura em torno de 15 °C, titular lentamente com solução de nitrito de sódio usando como indicador externo amido iodetado, até viragem. Cada 17,22 mg de sulfanilamida equivalem a 1 ml de nitrito de sódio 0,1 *M*.

#### Sulfato de zinco 0,1 *M* SV

**Especificação** — Contém 16,144 g de sulfato de zinco heptaidratado em água a 1000 ml.

**Preparação** — Dissolver 28,8 g de sulfato de zinco em

água e completar o volume a 1 000 ml. Pipetar 20 ml da solução de edetato dissódico 0,05 M para um frasco de Erlenmeyer de 250 ml e adicionar, nesta ordem, 20 ml de solução tampão ácido acético-acetato de amônio. 100 ml de álcool e 2 ml de ditizona SR. Titular pela solução de sulfato de zinco até a coloração rosa claro. Calcular a molaridade.

**Tetrafenilborato de sódio 0,02 M SV**

**Preparação** — Dissolver 6,845 g de tetrafenilborato de sódio em água a 1 000 ml.

**Padronização** — Pipetar duas porções de 75 ml em dois copos de béquer. A cada um deles, adicionar 1,0 ml de ácido acético SR, 25 ml de água c, lentamente, sob agitação, 25 ml de biftalato de potássio a 5,0 por cento (p/V). Deixar em repouso por duas horas. Filtrar uma das misturas em cadinho filtrante, de vidro sinterizado (porosidade 100-160 micrômetros) e lavar o precipitado com água fria. Transferir o precipitado com 50 ml de água e agitar intermitentemente por 30 minutos. Filtrar e usar o filtrado como solução saturada de tetrafenilborato de potássio no seguinte procedimento de padronização. Filtrar a segunda mistura em cadinho filtrante, de vidro sinterizado, tarado, e lavar com três porções de 5 ml da solução saturada de tetrafenilborato de potássio. Secar o precipitado a 105 °C durante uma hora. Cada g de tetrafenilborato de potássio equivale a 955,1 mg de tetrafenilborato de sódio. A partir do peso do tetrafenilborato de sódio obtido, calcular a molaridade da solução.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Estabilidade** — Usar soluções recentes.

**Tiocianato de amônio 0,1 M SV**

**Preparação** — Dissolver cerca de 8,0 g de tiocianato de amônio em água a 1 000 ml.

**Padronização** — Misturar exatamente 30  $\mu$ l de nitrato de prata 0,1 M com 50,0 ml de água, 2,0 ml de ácido nítrico SR e 2,0 ml de sulfato férrico amoniacal SR. Titular com a solução de tiocianato de amônio até aparecimento da cor castanho-avermelhada. Calcular a molaridade.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Tiosulfato de sódio, 0,1 M SV**

**Preparação** — Dissolver cerca de 25 g de tiosulfato de sódio pentahidratado e 200 mg de carbonato de sódio em água, recentemente fervida e resfriada, a 1000 ml.

**Padronização** — Pesar exatamente cerca de 210 mg de dicromato de potássio, pulverizado e dessecado, e dissolver em 100 ml de água. Transferir para balão de 500 ml e adicionar 3,0 g de iodeto de potássio, 2,0 g de bicarbonato de sódio e 5,0 ml de ácido clorídrico SR. Agitar e deixar em repouso por 10 minutos no escuro. Titular o iodo liberado com a solução de tiosulfato de sódio até cor verde-amarelada. Adicionar 3,0 ml de amido SR e continuar a titulação até desaparecimento da cor azul. Calcular a molaridade. Cada ml de tiosulfato de sódio 0,1 M SV corresponde a 4,903 mg de dicromato de potássio.

**Conservação** — Recipientes bem fechados.

**Informação adicional** — Conferir o título com frequência.



## XII.4. TAMPÕES

Certos ensaios farmacopéicos exigem o ajuste ou a manutenção de pH. Para tal, empregam-se soluções denominadas tampões, capazes de suportar variações na atividade de íons hidrogênio. Os componentes requeridos estão descritos no item Reagentes. Os de natureza cristalina devem ser previamente dessecados a 110-120 °C por uma hora; utilizar água isenta de dióxido de carbono. A armazenagem deve ser feita em recipientes herméticos e apropriados. Considerar a estabilidade no preparo das quantidades para consumo. A seguir, relacionam-se as soluções em ordem crescente de valores de pH. Outros tampões com características particulares são descritos nos textos dos respectivos ensaios.

### **Tampão acetato - ácido clorídrico - pH 3,5**

*Preparação* - Dissolver 25,0 g de acetato de amônio em 35,0 ml de água. Adicionar 38,0 ml de ácido clorídrico 7 M. Ajustar o pH com ácido clorídrico 2 M ou com hidróxido de amônio 5 M e diluir a 100 ml com água.

### **Tampão acetato - pH 4,4**

*Preparação* - Dissolver 136,0 g de acetato de sódio e 77 g de acetato de amônio em água e diluir a 1 000 ml. Adicionar 250 ml de ácido acético glacial e homogeneizar.

### **Tampão ácido acético - acetato de amônio**

*Preparação* - Dissolver 77,1 g de acetato de amônio em água, adicionar 57,0 ml de ácido acético glacial e completar com água a 1 000,0 ml.

### **Tampão fosfato - pH 6,0**

*Preparação* - Misturar 50,0 ml de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 5,70 ml de hidróxido de sódio 0,2 M. Completar o volume a 200 ml com água.

### **Tampão fosfato - pH 6,8**

*Preparação* - Dissolver 28,80 g de fosfato de sódio dibásico e 11,45 g de fosfato de potássio tribásico em água e completar o volume a 1 000 ml.

### **Tampão fosfato equimolar 0,025 - pH 6,86**

*Preparação* - Dissolver 3,53 g de fosfato de sódio dibásico e 3,39 g de fosfato de potássio monobásico em água a completar o volume a 1 000 ml.

### **Tampão acetato pH 7,0**

*Preparação* - Dissolver 2,73 g de acetato de sódio em aproximadamente 70 ml de água. Ajustar o pH a 7,0 com ácido acético 0,5 M. Completar com água a 100 ml.

*Conservação* - Recipientes bem fechados.

### **Tampão fosfato M/15 - pH 7,0**

*Preparação* - Dissolver 0,908 g de fosfato de potássio monobásico em água e diluir a 100 ml. Separadamente,

dissolver 2,38 g de fosfato de sódio dibásico em água e diluir a 100 ml. Misturar 38,9 ml da solução de fosfato de potássio monobásico com 61,1 ml de solução de fosfato de sódio dibásico.

### **Tampão fosfato - pH 7,2**

*Preparação* - Juntar 250,0 ml de fosfato de potássio monobásico 0,2 M e 175,0 ml de hidróxido de sódio 0,2 M. Completar o volume a 1 000 ml.

### **Tampão albumina-fosfato - pH 7,2**

*Preparação* - Dissolver 4,26 g de fosfato de sódio dibásico anidro, 7,6 g de cloreto de sódio e 10 g de albumina sérica bovina em água. Completar o volume a 1 000 ml e antes de usar ajustar o pH com hidróxido de sódio 2 M ou com ácido fosfórico a 100,0 por cento (p/V).

### **Tampão imidazol - pH 7,4**

*Preparação* - Dissolver 3,40 g de imidazol e 5,84 g de cloreto de sódio R em água. Adicionar 18,6 ml de ácido clorídrico 1 M e completar com água a 1 000 ml.

### **Tampão tris-cloreto de sódio - pH 7,5**

*Preparação* - Dissolver 7,27 g de trometamina e 4,97 g de cloreto de sódio em 950 ml de água. Ajustar o pH em 7,5 com ácido clorídrico 2 M e completar com água a 1 000 ml.

### **Tampão barbital - pH 8,6**

*Preparação* - A 129,0 ml de ácido clorídrico 0,1 M adicionar volume suficiente de barbital sódico 0,1 M para completar 1 000 ml.

### **Tampão cloreto de amônio - pH 10,0**

*Preparação* - Dissolver 5,4 g de cloreto de amônio em 70 ml de hidróxido de amônio 5 M e diluir com água a 100 ml.

### **Tampão amônia - pH 10,9**

*Preparação* - Dissolver 67,5 g de cloreto de amônio em 650 ml de amônia 13,5 M e diluir com água a 1 000 ml.

## XIII. ANEXOS

O conteúdo das monografias constantes dos anexos não se constitui em exigência farmacopéica, destinando-se tão-somente à orientação dos usuários.

# XIII.1. METODOLOGIA PARA O TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS (ANTIBIOGRAMA)

Utilizar os discos de sensibilidade aos antibacterianos que satisfaçam às exigências descritas na seção VIII.

O armazenamento dos discos em seu recipiente original deve ser feito entre as temperaturas de -20 a 10 °C. Antes de usar os discos, o recipiente deve ser mantido em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos para descongelamento. Discos que contêm penicilinas ou cefalosporinas, quando em recipientes que já foram abertos, não devem ser usados além de uma semana.

O meio de cultura recomendado para o teste do antibiograma é o meio de *Agar Mueller-Hinton*, contendo 20 a 35 mg de  $Mg^{2+}$ /litro e 50 a 100 mg de  $Ca^{2+}$ /litro cuja composição por litro é a seguinte: infusão de carne, 300 g; hidrolisado de caseína, 17,5 g; amido solúvel, 1,5 g; e ágar, 10,0 g; pH 7,2-7,4 após a esterilização. Na preparação do inóculo é recomendado o meio de caldo *Mueller-Hinton*.

## METODOLOGIA

1.1 - Preparar e esterilizar 60 ml de *Agar Mueller-Hinton* e passar para placa de Petri de 150 mm de diâmetro, ou 25 ml, se a placa de Petri for de 90 mm de diâmetro. Aguardar 30 minutos para completa solidificação. Esta solidificação pode ser feita em incubadora a 37 °C, para total evaporação das gotas de água de condensação formadas sobre a superfície do meio de cultura.

1.2 - Para microrganismos de difícil crescimento, como estreptococos, gonococos e *Haemophilus*, podem ser adicionados ao meio 5% de sangue desfibrinado de cavalo, carneiro ou humano (se isento de substâncias inibidoras), "achocolatando-o", se for o caso.

1.3 - Repicar, com auxílio de alça, quantidade não inferior a três colônias idênticas do microrganismo a ser testado, para 5 ml de meio de cultura em caldo (*Caldo Mueller-Hinton*). Incubar o caldo inoculado por 2 a 8 horas à temperatura de 35-37 °C. Não usar mistura de microrganismos na preparação do antibiograma nem inóculos obtidos por crescimento microbiano de 16-18 horas, a não ser para microrganismos de difícil crescimento. Contudo, deve ser observada a turbidez padrão.

1.4 - Ajustar a turbidez do crescimento em caldo, comparando-a à turbidez de solução de sulfato de bário, assim preparada: 0,5 ml de cloreto de bário diidratado ( $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) a 1,175% (p/V) e 99,5 ml de solução de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 1% (0,18 M).

1.5 - Umedecer zaragatoa de algodão estéril (50-100 mg/algodão) no caldo inóculo ajustado, pressionando-o contra as paredes do tubo para remover o excesso de caldo, e, em seguida, esfregá-lo nas várias direções sobre a superfície do meio contido na placa. Entrebair a tampa desta por 3 a 5 minutos para a secagem do esfregão.

1.6 - Depositar os discos sobre a superfície inoculada com o auxílio de pinça flambada e fria. Pressionar os discos para melhor aderência ao meio, mantendo-os à distância suficiente para evitar a superposição de zonas de

inibição. Recomenda-se colocar apenas um disco de antibacteriano de cada grupo.

1.7 - Incubar a placa em posição invertida por uma noite (16-18 horas) à temperatura de 35-37 °C. Incubações em anaerobiose e  $CO_2$  devem ser padronizadas.

Em caso de emergência, poderão ser consideradas leituras feitas antes do tempo estipulado, mas as leituras definitivas só o serão após o tempo estabelecido.

1.8 - Proceder às leituras dos halos de inibição com o auxílio de régua comum, paquímetro ou aparelho óptico, visualizando os referidos halos sempre da mesma posição. Interpretar os halos de acordo com as Tabelas 1 e 2.

1.9 Expressar os resultados das leituras dos halos de inibição usando os seguintes códigos: S, MS, I e R.

### "S" - Sensível:

Esta categoria infere que a cepa testada pode ser apropriadamente tratada com dose do agente antibacteriano recomendada para esse tipo de infecção e espécies infecciosas, a menos que seja contra-indicado.

### "MS" - Moderadamente Sensível:

Esta categoria inclui cepas que podem ser inibidas por concentrações de certos agentes antibacterianos (ex.: beta-lactâmicos), os quais podem ser usados em altas doses ou ainda em sítios corporais onde os antibacterianos se concentram mais. No caso de enterococos moderadamente sensíveis sugere-se o uso de altas doses de penicilina associada a aminoglicosídeo, se proveniente de infecção sistêmica grave.

### "I" - Intermediária:

Esta categoria interpretativa estabelece limites dentro dos quais são incluídos erros incontroláveis de técnica. Zonas de inibição que caem dentro destes limites são consideradas equivocadas. Se outros antibacterianos não puderem ser usados, recomenda-se o teste de sensibilidade por diluição seriada.

### "R" - Resistente:

Nesta categoria enquadram-se as cepas que não são inibidas pelos antibacterianos que, administrados em doses normais, não alcançam níveis séricos e teciduais satisfatórios.

### Notas:

a) Na leitura dos halos de inibição poderão ser observados alguns fatos, como, por exemplo, o aparecimento do véu do *Proteus* dentro do halo, quando este microrganismo é testado, fato este que deve ser desconsiderado.

b) No caso de várias colônias se desenvolverem dentro do halo de inibição, deverá ser investigada a pureza da cepa sob teste. Se a cepa for realmente pura, comunicar o fato ao clínico.

c) Certos antibacterianos produzem halos duplos, sendo um claro interno e outro turvo logo a seguir; considerar o halo turvo.

d) Modificações na preparação do inóculo, bem como

Tabela 1 - Padrão para interpretação de halos de inibição

Antibacterianos	Quantidade no disco	Código	Zona de inibição em mm			
			Resistência	(a) Intermediária	(a) Moderadamente sensível	Sensível
Amicacina (b)	30 µg	AMI	< 14	15 - 16	-	> 17
Ampicilina (c)						
p/ Gram-negativos entéricos	10 µg	AMP	< 11	12 - 13	-	> 14
p/ <i>Staphylococcus</i> (d)	10 µg	AMP	< 28	-	-	> 29
p/ <i>Haemophilus sp</i> (e)	10 µg	AMP	< 19	-	-	> 20
p/ Enterococos (f, g)	10 µg	AMP	< 16	-	> 17	-
p/ Estreptococos não enterococos (f, g)	10 µg	AMP	< 21	-	22 - 29	> 30
Benzilpenicilina						
p/ <i>Staphylococcus</i> (d)	10 U.	PEN	< 28	-	-	> 29
p/ <i>N. gonorrhoeae</i>	10 U.	PEN	< 19	-	-	> 20
p/ Enterococos (f, g)	10 U.	PEN	< 14	-	> 15	-
p/ outros cocos Gram-positivos (f, g)	10 U.	PEN	< 19	20 - 27	-	> 28
Canamicina	30 µg	CAN	< 13	14 - 17	-	> 18
Carbencilina						
p/ Enterobactérias (d)	100 µg	CAR	< 17	18 - 22	-	> 23
p/ <i>Pseudomonas</i>	100 µg	CAR	< 13	14 - 16	-	> 17
Cefalotina (h)	30 µg	CFL	< 14	15 - 17	-	> 18
Cefazolina (h)	30 µg	CFZ	< 14	15 - 17	-	> 18
Cefotaxima (h)	30 µg	CTX	< 14	-	15 - 22	> 23
Cefoxitina (h)	30 µg	CFO	< 14	15 - 17	-	> 18
Cefuroxima (h)	30 µg	CRX	< 14	15 - 17	-	> 18
Cilindamicina (f)	2 µg	CLI	< 14	15 - 16	-	> 17
Cloranfenicol	30 µg	CLO	< 12	13 - 17	-	> 18
Doxiciclina (i)	30 µg	DOX	< 12	13 - 15	-	> 16
Eritromicina	15 µg	ERI	< 13	14 - 17	-	> 18
Estreptomina	10 µg	EST	< 11	12 - 14	-	> 15
Gentamicina (b)	10 µg	GEN	< 12	13 - 14	-	> 15
Minociclina (i)	30 µg	MIN	< 14	15 - 18	-	> 19
Nalidixico, ácido (i)	30 µg	NAL	< 13	14 - 18	-	> 19
Netilmicina (b)	30 µg	NET	< 12	13 - 14	-	> 15
Nitrofurantoína (i)	300 µg	NIT	< 14	15 - 16	-	> 17
Oxacilina						
p/ <i>Staphylococcus</i> (m)	1 µg	OXA	< 10	11 - 12	-	> 13
p/ <i>Pneumococos-penicilina sensíveis</i> (e)	1 µg	OXA	< 19	-	-	> 20
Sulfametoxazol + Trimetoprima (*)	25 µg	SUT	< 10	11 - 15	-	> 16
Sulfonamidas (i, n)	300 µg	SUL	< 12	13 - 16	-	> 17
Tetraciclina (i)	30 µg	TET	< 14	15 - 18	-	> 19
Tobramicina (b)	10 µg	TOB	< 12	13 - 14	-	> 15
Trimetoprima (i, n)	5 µg	TRI	< 10	11 - 15	-	> 16
Vancomicina	30 µg	VAN	< 9	10 - 11	-	> 12

(\*) Sulfametoxazol/Trimetoprima 23,75/1,25 µg

Tabela 2 – Padrão para interpretação de halos de inibição – outros agentes antibacterianos

Antibacterianos	Quantidade no disco	Código	Zona de inibição em mm			
			Resistência	(a) Intermediária	(a) Moderadamente sensível	Sensível
Bacitracina	10 U.I.	BAC	< 8	9 – 12	–	> 13
Becanamicina	30 µg	BEC	< 13	14 – 17	–	> 18
Colistina	10 µg	COL	< 8	9 – 10	–	> 11
Dibecacina	30 µg	DIB	< 13	14 – 17	–	> 18
Espiramicina	100 µg	ESP	< 15	16 – 21	–	> 22
Fosfomicina	50 µg	FOS	< 11	12 – 17	–	> 18
Neomicina	30 µg	NEO	< 12	13 – 16	–	> 17
Novobiocina	30 µg	NOV	< 17	18 – 21	–	> 22
Pipemídico, ácido	20 µg	PIP	< 13	14 – 18	–	> 19
Piromídico, ácido	50 µg	PIR	< 8	9 – 14	–	> 15
Polimixina B	300 µg	POL	< 8	9 – 11	–	> 12
Ribostamicina	50 µg	RIB	< 9	10 – 14	–	> 15
Rifamicina B	30 µg	RFM	< 33	–	–	> 34
Rifampicina						
<i>p/ N. meningitidis</i>	5 µg	RIF	< 24	–	–	> 25
outros organismos	30 µg	RIF	< 11	12 – 18	–	19
Rifampicina + Trimetoprima	35 µg	RIT	< 11	12 – 14	–	> 15
Sisomicina	10 µg	SIS	< 14	15 – 19	–	> 20

Tabela 3 – Limites para o controle laboratorial dos discos em meio de Ágar Mueller-Hinton sem sangue ou suplementos

Antibacterianos	Quantidade no disco	<i>E. coli</i> ATCC 25.922 (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 25.923 (mm)
Amicacina	30 µg	19 – 26	20 – 26
Ampicilina	10 µg	16 – 22	27 – 35
Benzilpenicilina	10 U.I.	–	26 – 37
Canamicina	30 µg	17 – 25	19 – 26
Carbenicilina	100 µg	23 – 29	–
Cefalotina	30 µg	17 – 22	29 – 37
Cefazolina	30 µg	23 – 29	29 – 35
Cefotaxima	30 µg	29 – 35	25 – 31
Cefoxitina	30 µg	23 – 29	23 – 29
Cefuroxima	30 µg	20 – 26	27 – 35
Clindamicina	2 µg	–	24 – 30
Cloranfenicol	30 µg	21 – 27	19 – 26
Colistina	10 µg	11 – 15	–
Doxiciclina	30 µg	18 – 24	23 – 29
Eritromicina	15 µg	–	22 – 30
Estreptomicina	10 µg	12 – 20	14 – 22
Gentamicina	10 µg	19 – 26	19 – 27
Minociclina	30 µg	19 – 25	25 – 30

Tabela 3 (Continuação)

<i>Antibacterianos</i>	<i>Quantidade no disco</i>	<i>E. coli ATCC 25.922 (mm)</i>	<i>S. aureus ATCC 25.923 (mm)</i>
Nalidixico, ácido	30 µg	22 – 28	–
Neomicina	30 µg	17 – 23	18 – 26
Netilmicina	30 µg	22 – 30	22 – 31
Nitrofurantoina	300 µg	20 – 25	18 – 22
Oxacilina	1 µg	–	18 – 24
Polimixina B	300 U.I.	12 – 16	7 – 13
Sulfametoxazol + Trimetoprima	25 µg	24 – 32	24 – 32
Sulfonamidas	300 µg	18 – 26	24 – 34
Tetraciclina	30 µg	18 – 25	19 – 28
Tobramicina	10 µg	18 – 26	19 – 29
Trimetoprima	5 µg	21 – 28	21 – 28
Vancomicina	30 µg	–	15 – 19

Tabela 4 – Limites para controle laboratorial de discos em meio de Ágar Mueller-Hinton sem sangue ou suplementos – outros agentes antibacterianos

<i>Antibacterianos</i>	<i>Quantidade no disco</i>	<i>P. aeruginosa ATCC 27.853 (mm)</i>	<i>S. faecalis ATCC 29.212 ou ATCC 33.186 (mm)</i>
Amicacina	30 µg	18 – 26	–
Carbenicilina	100 µg	18 – 24	–
Cefotaxima	30 µg	18 – 22	–
Gentamicina	10 µg	16 – 21	–
Netilmicina	30 µg	17 – 23	–
Polimixina B	300 UI	11 – 16	–
* Sulfametoxazol + Trimetoprima	25 µg	–	–
Tobramicina	10 µg	19 – 25	–

(\*) Para determinar se o meio de Mueller-Hinton possui nível de timina ou timidina, testar os discos de sulfametoxazol + trimetoprima frente à cepa de *Streptococcus faecalis*. ATCC 29.212 ou ATCC 33.186.

Zona de inibição entre 24 e 32 mm, essencialmente isenta de tênues colônias bacterianas, indica nível suficientemente baixo dos referidos compostos químicos.

o uso de camada de superfície em placas com base, podem ser empregadas se estes procedimentos forem padronizados com culturas de controle de modo que os resultados obtidos possam ser considerados equivalentes àqueles obtidos com a-zaragatoa de algodão.

#### 1.10 - Controle laboratorial dos discos.

Controlar a validade do antibiograma através de testes dos discos, utilizando as seguintes cepas bacterianas: *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 ou 33186. Os halos ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 ou 33186. Os halos de inibição deverão estar dentro dos limites estabelecidos para os principais antibacterianos constantes das Tabelas 3 e 4.

a) A categoria "intermediária" deve ser informada, pois ela indica geralmente resultado equívoco. A categoria "moderadamente sensível" deve ser informada para indicar sensibilidade sob certas condições. Outros beta-lactâmicos estão sendo considerados, por definição, como enquadrados na categoria de "moderadamente sensível".

b) O tamanho das zonas obtidas com os aminoglicosídeos, particularmente no teste para *Pseudomonas*, depende muito da variação do conteúdo de cátions divalentes contidos no meio de cultura. Este padrão interpretativo deve ser usado somente com o meio de Mueller-Hinton, o qual no teste de controle produz zonas de inibição que caem dentro dos limites recomendados na Tabela 3 quando se usa a *P. aeruginosa* ATCC 27853. Organismos enquadrados na categoria "Intermediária" podem ser sensíveis ou resistentes quando testados pelo método de diluição seriada e neste caso devem ser classificados como indeterminados quanto à sua sensibilidade.

c) Disco referência para ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, epicilina, hetacilina, metampicilina.

d) Cepas de *S. aureus* resistentes produzem beta-lactamase, sendo preferido o disco de 10 UI de penicilina. A benzilpenicilina deve ser usada para testar a sensibilidade de todas as penicilinas penicilinase-sensíveis, tais como ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, hetacilina, carbenicilina, epicilina e metampicilina. Os resultados podem ser aplicados também à fenoximetilpenicilina e à feneticilina.

e) Ao testar *Haemophilus* usar o meio de Ágar Mueller-Hinton suplementado com 1% de hemoglobina (ou 5% de sangue de cavalo) e 1% de suplemento de enriquecimento sintético ajustando o pH para 7,2. Parar o inóculo suspendendo com caldo de Mueller Hinton o crescimento bacteriano contido em placa de ágar chocolate de modo a obter a turbidez padrão do sulfato de bário (1-4). Grande maioria de *Haemophilus* ampicilina-resistente produz quantidade detectável de beta-lactamase.

f) Para enterococos, outros *Streptococcus sp* e organismos sensíveis a penicilinas não produtores de penicilinase, a interpretação "intermediária" deve ser informada como sendo "moderadamente sensível".

Resultados dentro desta categoria incluem enterococos contidos no sangue ou em tecidos gravemente infectados para os quais são exigidas altas doses de penicilinas ou ampicilina, geralmente combinada com um aminoglicosídeo, para melhorar a resposta terapêutica e ação bactericida.

g) Para estreptococos, estafilococos e outros organismos sensíveis a penicilinas o resultado "sensível" deve ser informado como sendo "muito sensível". Cepas de enterococos (*S. taecium*, *S. faecalis*, e *S. durans*) que produzem zonas de inibição > 30 mm para a ampicilina ou > 28 mm para a benzilpenicilina são bastante incomuns e neste caso deve ser reexaminada a especificação do procedimento para os estreptococos.

h) Cefazolina, cefotaxima e cefoxitina são beta-lactâmicos com largo espectro de atividade contra bacilos Gram-negativos em relação a outras cefalosporinas previamente aprovadas. Portanto, o disco de cefalotina não pode ser usado como disco referência para estes antibacterianos.

O disco de cefalotina é usado para testar sensibilidade à cefalotina, cefaclor, cefadroxila, cefalexina, cefaloridina, cefapirina e cefradina.

Cefazolina, cefotaxima e cefoxitina devem ser testadas separadamente. Estafilococos que mostram resistência à oxacilina devem ser informados como resistentes a antibacterianos tipo cefalosporina, independente do diâmetro da zona, uma vez que na maioria dos casos infecções causadas por estes organismos são clinicamente resistentes às cefalosporinas.

i) Dados de sensibilidade ao ácido nalidíxico, nitrofurantoina, sulfonamidas e trimetoprima são aplicáveis somente a organismos isolados de infecções do trato urinário.

j) O disco de clindamicina é usado para testar a sensibilidade de ambas, clindamicina e lincomicina.

l) Tetraciclina é o disco referência para todas as tetraciclinas e os resultados podem ser aplicados à clortetraciclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, rolitetraciclina. Todavia, certos organismos podem ser mais sensíveis à doxiciclina e minociclina do que à tetraciclina.

m) Os resultados obtidos com a oxacilina, penicilina resistente à beta-lactamase, podem ser aplicados à cloxacilina e à dicloxacilina. Oxacilina é o disco preferido devido à maior resistência à degradação na armazenagem na sua aplicação nos testes com pneumococos e ainda detecta cepas heterorresistentes mais facilmente. Quando resultados intermediários forem obtidos com estafilococos estas cepas deverão ser posteriormente investigadas para determinar se elas são heterorresistentes.

n) Em lugar de qualquer outra sulfonamida pode-se usar o disco de sulfadiazina. Meio de cultura contendo sangue, exceto meio contendo sangue lisado de cavalo, não é recomendado para testar sulfonamidas. O meio de Ágar Mueller-Hinton deve ser tão isento de timidina quanto possível para testar as sulfonamidas e/ou trimetoprima.

## XIII.2. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Os animais de laboratório são empregados em ensaios farmacopéicos com a finalidade de avaliar limites de contaminantes indesejáveis ou como reagentes para análises quantitativas de princípios ativos.

Entre os fatores que alteram as respostas dos sistemas biológicos, podem ser mencionados: condições sanitárias,

ambientes, nutricionais e genéticas. Estes fatores devem ser controlados durante a criação e a experimentação para a obtenção de animais padronizados. Todas as características mencionadas devem ser descritas perfeitamente nos protocolos dos ensaios.



## XIII.2.1. CONDIÇÕES SANITÁRIAS

Os animais de laboratório são classificados em diversas categorias sanitárias, de acordo com sua carga parasitológica, bacteriológica, micológica e viral. Adota-se classificação de cinco categorias, sendo descritos os microrganismos que devem estar ausentes em cada categoria (Tabela I).

Recomenda-se o emprego das categorias I e II no ensino e em experimentos de curta duração. As categorias III e IV devem se constituir no animal padrão a ser usado em toda atividade biomédica e é imprescindível seu emprego em investigações de longa duração, como, por exemplo, em estudos farmacotoxicológicos pré-clínicos. A categoria V é de difícil obtenção, não sendo empregada em ensaios farmacopéuticos de rotina.

Descrevem-se a seguir recomendações para obtenção de animais em condições aceitáveis de saúde para os ensaios biológicos farmacopéuticos, de modo a assegurar eficiência, reprodutibilidade e até validade.

### Localização

Os biotérios de criação e experimentação devem estar isolados da circulação geral e de perigos potenciais como animais selvagens ou animais infestados.

Tabela I - Classificação sanitária de roedores e lagomorfos

Categoria	Microrganismos que devem estar ausentes
I	<i>Salmonella sp</i> <i>Shigella sp</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> Dermatofitos patogênicos <i>Sarcoptes scabiei</i>
II	Todos os da categoria I Estágios intermediários de <i>Cestode</i> Artrópodes (parasitas obrigatórios) Vírus de ectromielia (camundongos) Mixomatose (coelhos)
III	Todos os da categoria II <i>Bordetella bronchiseptica</i> Pesturelias <i>Mycoplasma</i> (excluindo criceto e cobaia) Coccídios Helmintos patogênicos <i>Streptobacillus moniliformes</i> (ratos e camundongos) <i>Corynebacterium muris</i> (camundongos) Pneumococos (cobaia/coelhos) <i>Treponema pallidum</i> (coelho)
IV	Todos os da categoria III Pneumococos <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> Helmintos Protozoários patogênicos <i>Mycoplasma</i> (criceto e cobaia) <i>Fusiformes necrophorus</i> (coelho)
V	Todos os organismos demonstráveis

**Corredores:** Os corredores devem possuir pelo menos dois metros de largura para facilitar o movimento de pessoas e o transporte de cargas e animais. A junção dos pisos com as paredes deve ser abaulada. As saliências expostas devem estar recobertas com barras de metal para proteger as paredes. Sempre que possível, encanamentos de água, extintores de incêndio, instalações elétricas e drenos devem estar situados nos corredores e não no interior das salas dos animais. Os ralos devem ser sifonados para evitar refluxo de líquidos.

**Pisos:** Os pisos devem ser resistentes, lisos, impermeáveis, não absorventes, não escorregadios e resistentes a ácidos e solventes.

A união dos pisos com as paredes deve ser com acabamento abaulado. Devem ser laváveis com escova, detergente e desinfetantes. Os materiais empregados devem ser do tipo monolítico ou possuir o mínimo de juntas.

**Paredes:** Devem ser lisas, impermeáveis, sem fendas ou buracos e sem imperfeições nas junções com o piso ou o teto. Todos os ângulos devem ser abaulados. Devem ser laváveis com água e detergentes e suportarem esterilização com formol, ácido peracético, parabenos ou outros agentes químicos providos de igual eficácia. A instalação elétrica deve ser vedada à entrada de insetos e possuir tampa à prova de água.

**Sala de animais:** A sala deve ser dotada de vestíbulo, ou as portas devem abrir-se para o interior. As dimensões mínimas das portas devem ser 1 m de largura por 2 m de altura. Os marcos devem ser confeccionados em metal e bem ajustados às paredes, com acabamento perfeito, de modo a evitar o acúmulo de insetos e pó. As portas providas de visores devem ajustar-se aos marcos e ao piso com adequada vedação. É conveniente que as portas sejam de metal ou recobertas com metal na superfície inferior até a metade e que se fechem automaticamente. É recomendável a adoção de fechaduras embutidas. As salas não devem possuir janelas para o exterior.

**Tetos:** Devem ser lisos, impermeáveis e isentos de juntas imperfeitas. O material de acabamento deve resistir a escovagens com detergentes e desinfetantes. Sendo empregados canos aparentes, estes devem estar separados do teto para permitir limpeza manual ou com aspirador.

**Circulação:** O planejamento das edificações deverá ser feito de modo que as áreas em contato imediato com os animais (áreas limpas) estejam isoladas de outras com ruídos ou contaminadas (áreas sujas). Ao admitir pessoal, equipamento, instrumentos, animais, rapões, água e ar em área limpa, esses devem atravessar barreiras que minimizem a possibilidade de contaminação cruzada ou de introdução de enfermidade e que impeçam a entrada de insetos, roedores selvagens etc.

**Barreiras:** As salas dos animais devem ser desinfetadas antes de cada experiência ou rotineiramente nos setores de criação e manutenção. Recomenda-se utilizar 5 g de formalina (40% de formaldeído) por m<sup>3</sup> e umidade relativa de 70%, durante 6 a 24 horas. Pode-se conseguir a evaporação misturando-se 30 ml de formalina com 20 g de permanganato de potássio por m<sup>3</sup> de área a desinfetar. Este processo deve ser realizado com as salas vazias e com precauções cabíveis para proteger a saúde do pessoal. Também as salas de experiência e criação de animais devem ser lavadas pelo menos uma vez por semana, ou com maior frequência, e desinfetadas com aplicação nas

paredes, tetos e pisos, de germicida como formalina a 0,5-1%, parabens\* a 1%, compostos de amônio quaternário em concentrações de 1:5000 e 1:2000, hipocloritos em concentrações de 100 a 1000 ppm etc. As entradas externas devem possuir barreiras contra roedores com não menos de 40 cm de altura. As entradas e saídas do edifício também devem possuir barreiras contra insetos, sendo mais recomendáveis as constituídas por lâmpadas ultravioleta para atração de insetos, acompanhadas de mecanismo para eletrocussão. Não é recomendável o uso de inseticidas químicos, pois seus resíduos podem afetar os animais ou suas respostas às drogas ensaiadas. A entrada de pessoas nas áreas limpas deve restringir-se ao mínimo compatível com os trabalhos experimentais e o cuidado dos animais. Para o pessoal deve ser estabelecida rotina, consistindo no uso de: botas, galochas, uniforme incluindo gorro, máscara e luvas. Ao pessoal que terá contato direto com os animais é recomendável realizar minuciosa higiene através de ducha, antes de iniciar as tarefas, ou realizar, pelo menos, adequada lavagem das mãos e escovagem das unhas, preferentemente com detergente esterilizante como parabens\* a 1%, ou outro de atividade semelhante. A lavagem das mãos é obrigatória após a utilização de banheiro e operações de limpeza, a manipulação de animais de diferentes espécies ou categorias sanitárias, ou depois das refeições. Os uniformes devem ser confeccionados em cor clara e lavados frequentemente, para melhor controle da higiene. Dentro do possível, devem ser submetidos a processo rotineiro de desinfecção ou esterilização. As luvas devem ser adequadamente desinfetadas.

As rações comercializadas para animais de laboratório podem apresentar contaminações microbianas excessivas, pelo que se faz necessário tratamento prévio que pode consistir em: a) pasteurização, como, por exemplo, submetê-las a autoclave durante 5 minutos a 121 °C, ou b) esterilização realizada por irradiação com raios gama, usando cobalto 60 como fonte e uma dose de 2,5 Mrads, ou por autoclavagem de 132 °C durante 5 a 10 minutos. Pode-se também empregar fumigação com óxido de etileno (6-12 horas de exposição, 20 °C, umidade relativa 33%). Devem-se tomar precauções em razão das características tóxicas, explosivas e inflamáveis do gás. As rações submetidas a este tratamento necessitam ser suficientemente ventiladas para remover todo o gás

\* Tegu.

absorvido. Chama-se atenção especial para a necessidade de remoção total do gás absorvido, dada a possibilidade cancerígena de qualquer presença residual na ração.

A água destinada ao consumo dos animais deve ser, pelo menos, potável. Procedimento recomendado é a autoclavagem das garrafas com água. No caso deste tratamento não ser possível, as garrafas e os bicos devem ser lavados e fervidos pelo menos uma vez por semana e a água trocada diariamente.

É recomendável adição de cloro para alcançar níveis de cloro livre de 1 a 10 ppm e a adição de ácido clorídrico para obter pH 2,5-3,0 e assim reduzir o desenvolvimento bacteriano durante a permanência da água nas gaiolas.

Quando se julgar conveniente, pode-se empregar a esterilização da água por filtração, o que requer adequada combinação de filtros e complexo sistema de manutenção.

As maravalhas devem ser esterilizadas por autoclavagem, recomendando-se o emprego de 132 °C durante 20 minutos. Todos os demais materiais, incluindo gaiolas, estantes, artigos de limpeza e aparelhos devem ser desinfetados, se possível por autoclavagem. Os materiais que não resistem ao calor podem ser tratados com germicidas, tais como ácido peracético, óxido de etileno, formalina, ou colocados em recipientes com germicidas líquidos que devem permanecer em contato com o material o tempo suficiente para que a esterilização seja realizada. Neste último caso empregar produtos que não deixem resíduos tóxicos. Podem igualmente ser utilizados produtos indicados para o tratamento de paredes, pisos e tetos. Não usar, simultaneamente, produtos para lavagem e desinfecção que sejam antagonistas, como por exemplo, substâncias orgânicas e cloro.

É recomendável a filtração do ar para livrá-lo de microrganismos que, em geral, são transportados sob a forma de agregados ou em associação com partículas de 4 a 20 µm de diâmetro. Os procedimentos de limpeza e desinfecção devem obedecer a rígida rotina, determinada conforme o tipo e forma de materiais, a quantidade de animais por superfície de gaiola e o volume ambiente.

Realizar quarentena com os animais que não são de produção do biotério e estabelecer procedimento de controle de qualidade para verificar, permanentemente, o estado sanitário das colônias.

As carcaças dos animais e os detritos devem ser incinerados ou eliminados de acordo com disposições legais vigentes em cada município.

## XIII.2.2. AMBIENTE

Os animais de laboratório necessitam de ambiente adequado e constante, a fim de evitar enfermidades, estados de tensão emocional ou alterações comportamentais, fisiológicas, anatômicas etc. Os roedores comumente empregados em laboratório são homeotermos, apresentando, frente a condições variáveis, adaptações homeostáticas que podem alterar o estado metabólico, a temperatura, a atividade, o consumo de alimento, as concentrações hormonais, o aumento de peso, a fertilidade etc. Estas alterações podem diminuir a precisão e até mesmo invalidar os ensaios biológicos. Portanto, é indispensável manter constantes os fatores ambientes e, quando isto não for totalmente possível, recorrer-se a planejamento estatístico, descrito na parte correspondente desta farmacopéia, que permita o controle de fontes de variação conhecidas.

Entre os fatores ambientes que devem ser controlados destacam-se:

**Luz** – Recomenda-se o emprego de lâmpadas fluorescentes tipo "luz do dia" para evitar o calor das lâmpadas de filamento. Prover ciclo alternado de luz (12 ou 14 horas) e de escuridão (12 a 10 horas), sempre no mesmo horário. A intensidade não deve exceder de 300 lux a 1m de altura do piso. As lâmpadas devem estar distribuídas homogêneas no ambiente. A intensidade dentro das gaiolas não deve exceder a 60 lux. Observar que o grau de iluminação em gaiolas de plástico, pouco transparentes, pode variar 80 vezes entre a estante superior e a inferior.

**Temperatura** – Cada espécie de animal requer temperatura ambiente ótima (cobaias e coelhos 17 °C – 20 °C, ratos e camundongos 20 °C – 24 °C). Quando se adotar somente

uma temperatura, deve-se empregar 20 °C ± 2 °C para toda as espécies de roedores e lagomorfos.

**Ruído** – Os ruídos devem ser controlados abaixo de 60 dB. Os ruídos intermitentes são mais nocivos que os contínuos.

**Umidade** – Manter entre 55% ± 15% de umidade relativa.

**Amônio** – A concentração depende não só da quantidade de animais e bactérias, como também das condições de temperatura e umidade. A concentração de amônio deve permanecer abaixo de 25 ppm.

**Ventilação** – Prover de 10 a 20 trocas de ar por hora, evitando-se a recirculação. Os aparelhos de ar condicionado, de uso comum, não são adequados.

**Camas** – Seu emprego é necessário em alguns tipos de gaiolas para que certas espécies façam o ninho e para absorver a umidade, urina e fezes. Não empregar material abrasivo, tóxico ou comestível para camas de contato. Esta especificação torna-se menos importante quando a cama não entrar em contato direto com o animal. Os produtos residuais da madeira, como a maravalha, são os mais usados e devem ser peneirados para evitar excesso de pó etc.

As camas devem estar livres de pintura, conservantes de madeira, produtos químicos e agrotóxicos. Para evitar a transmissão de enfermidades decorrentes do contato com roedores selvagens ou animais domésticos durante o seu processamento, as camas devem ser esterilizadas e depositadas sobre estrados, em sacos fechados, afastadas das paredes em lugar isento de animais. Alguns tipos de madeira podem induzir enzimas microscópicas metabolizadoras de fármacos.

### XIII.2.3. NUTRIÇÃO

Recomenda-se o uso de rações balanceadas em forma de granulados. Estes devem possuir consistência adequada para que não se desagreguem e não dificultem a mastigação. Em geral são constituídas por produtos naturais compostos de proteínas animais ou vegetais, óleos vegetais ou animais, sementes oleosas, legumes e grãos de cereais. Devem ser adicionados minerais e vitaminas.

Devem ser consideradas a composição centesimal, a digestibilidade e a relação proteína/energia.

Devem ser especificados os limites para contaminantes como metais pesados, produtos químicos tóxicos, inseticidas, estrogênios, antibióticos, microrganismos, parasitos e fungos.

Não se aconselha a suplementação das rações com alimentos frescos, pela possibilidade de desequilibrar a

dieta e introduzir contaminações.

Caso existam dúvidas quanto à composição da ração para as cobaias, aconselha-se a adição de vitamina C à água, na proporção diária de 200 mg/l. A dieta das cobaias, excepcionalmente, pode ser suplementada com verduras frescas, ricas em vitamina C. Estas, porém, devem ser meticulosamente lavadas, preferencialmente com dispositivo mecânico e água clorada. Aconselha-se o consumo das rações dentro do prazo de 60 dias da data de sua fabricação, a qual obrigatoriamente deve ser declarada, não em código, na embalagem individual. As rações que necessitem autoclavagem para seu emprego devem possuir formulação especial para prevenir a fusão dos granulados e perdas dos nutrientes termolábeis. Devem ser acondicionadas em embalagens especiais.

### XIII.2.4. GENÉTICA

Os animais de laboratório, de acordo com o sistema de criação, se classificam em:

- a) *endocriados*: que são obtidos por cruzamento contínuo entre irmãos ou entre pais e filhos. Com este tipo de cruzamento, após 20 gerações alcança-se genótipo altamente homocigótico;
- b) *exocriados*: animais procriados de modo a evitar a consanguinidade. Os métodos utilizados dependem diretamente do tamanho da colônia;
- c) *reproduzidos seletivamente*: são obtidos através de cruzamento de animais não-consanguíneos que possuam as características desejadas;
- d) *híbridos*: são obtidos por cruzamento de duas diferentes populações endocriadas. São, em geral, vigorosos e, para muitos propósitos, mais uniformes que qualquer de seus ascendentes. Não devem ser usados como reprodutores.

A constituição genética é um dos fatores mais importantes a ser considerado na seleção de animais para ensaios farmacotxicológicos.

Os sistemas responsáveis pela atividade farmacológica e pelos efeitos tóxicos dos fármacos são, em geral, interações complexas de processos bioquímicos e metabólicos sujeitos a mecanismos reguladores que variam, não somente nas diferentes espécies, como apresentam diferenças acentuadas entre colônias e cepas de uma mesma espécie.

Na atualidade, para a maioria dos estudos farmacotxicológicos, empregam-se roedores exocriados. Para cada tipo de ensaio a adequabilidade de cada colônia de animais deve ser validada por ocasião da padronização do método no laboratório. Os animais, quando transferidos de laboratório, sob condições diferentes, podem ter suas características genéticas totalmente modificadas.

Para a denominação das colônias exocriadas de roedores, recomenda-se a adoção das normas padronizadas para a nomenclatura, conforme o Comitê Internacional de Animais de Laboratório (*JCLA-Bulletin* nº30, 1972). Para a designação de cepas endocriadas, recomenda-se, igualmente, a adoção da nomenclatura descrita em *Cancer Research*, 36, 4.333 (1976).

### XIII.2.5. ÉTICA

Os animais usados nos ensaios farmacopéicos são mamíferos capazes de sentir medo e dor. Devem ser manipulados com cuidados e albergados sob condições adequadas às suas necessidades fisiológicas. Na Tabela 2, constam as recomendações sobre as dimensões das gaiolas para camundongos, ratos, cobaias e coelhos.

Antes de submetê-los a qualquer técnica passível de provocar dor, deve-se administrar anestesia apropriada, e a recuperação pós-cirúrgica deve ser processada de modo a evitar dor desnecessária.

Após os experimentos, eliminar os animais, sem lhes causar sofrimento, empregando-se técnicas eutanásicas adequadas para cada espécie, tomando-se a precaução de certificar-se da morte dos mesmos.

Todos os ensaios que envolvam o uso de animais de laboratório devem ser superintendidos diretamente por profissional da área biológica, com qualificação e treinamento adequados. Devem ser cumpridas as disposições da Lei nº 6.638, de 18 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e dá outras providências.

Tabela 2 - Dimensões recomendadas para gaiolas de animais de laboratório

Animal	Peso	Área do piso/animal	Altura <sup>a</sup>
Camundongo	< 10 g	39 cm <sup>2</sup>	12,7 cm
	10-15 g	52 cm <sup>2</sup>	12,7 cm
	16-25 g	77 cm <sup>2</sup>	12,7 cm
	> 25 g	97 cm <sup>2</sup>	12,7 cm
Rato	< 100 g	110 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
	100-200 g	148 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
	201-300 g	187 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
	> 300 g	258 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
Cobaia	< 350 g	277 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
	> 350 g	652 cm <sup>2</sup>	17,8 cm
Coelho	< 2 kg	1 400 cm <sup>2</sup>	35,6 cm
	2-4 kg	2 800 cm <sup>2</sup>	35,6 cm
	4-6 kg	3 700 cm <sup>2</sup>	35,6 cm
	> 6 kg	4 600 cm <sup>2</sup>	35,6 cm

a = do piso de descanso ao teto.

### XIII.3. NOMES, SÍMBOLOS E MASSAS ATÔMICAS

A tabela que segue é a recomendada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* de 1978. As massas atômicas baseiam-se na massa atômica do  $^{12}\text{C} = 12$ .

Tabela de massas atômicas relativas

Nome	Símbolo	Número atômico	Massa atômica relativa	Nome	Símbolo	Número atômico	Massa atômica relativa
Actínio	Ac	89	227,0278	Laurâncio	Lr	103	(260)
Alumínio	Al	13	26,98154	Lítio	Li	3	6,941
Amercúrio	Am	95	(243)	Lutécio	Lu	71	174,967
Antimônio	Sb	51	121,75	Magnésio	Mg	12	24,305
Argônio	Ar	18	39,948	Manganês	Mn	25	54,9380
Arsênio	As	33	74,9216	Mendelévio	Md	101	(258)
Astatínio	At	85	(210)	Mercurio	Hg	80	200,59
Bário	Ba	56	137,33	Molibdênio	Mo	42	95,94
Berílio	Be	4	9,01218	Neodímio	Nd	60	144,24
Berquélio	Bk	97	(247)	Neônio	Ne	10	20,179
Bismuto	Bi	83	208,9804	Netúnio	Np	93	237,0482
Boro	B	5	10,81	Nióbio	Nb	41	92,9064
Bromo	Br	35	79,904	Níquel	Ni	28	58,70
Cádmio	Cd	48	112,41	Nitrogênio	N	7	14,0067
Cálcio	Ca	20	40,08	Nobélio	No	102	(259)
Califórnia	Cf	98	(251)	Ósmio	Os	76	190,2
Carbono	C	6	12,011	Ouro	Au	79	196,9665
Cério	Ce	58	140,12	Oxigênio	O	8	15,9994
Césio	Cs	55	132,9054	Paládio	Pd	46	106,4
Chumbo	Pb	82	207,2	Platina	Pt	78	198,09
Cloro	Cl	17	35,453	Plutônio	Pu	94	(244)
Cobalto	Co	27	58,9332	Polônio	Po	84	(209)
Cobre	Cu	29	63,546	Potássio	K	19	39,0983
Criptônio	Kr	36	83,80	Praseodímio	Pr	59	140,9077
Cromo	Cr	24	51,996	Prata	Ag	47	108,868
Cúrio	Cm	96	(247)	Promécio	Pm	61	(145)
Disprósio	Dy	66	162,50	Protactínio	Pa	91	231,0359
Einsteinio	Es	99	(254)	Rádio	Ra	88	226,0254
Enxofre	S	16	32,06	Rênio	Rn	86	(222)
Érbio	Er	68	167,26	Rênio	Re	75	186,207
Escândio	Sc	21	44,9559	Ródio	Rh	45	102,9055
Estanho	Sn	50	118,69	Rubídio	Rb	37	85,4678
Estrôncio	Sr	38	87,62	Rutênio	Ru	44	101,07
Európio	Eu	63	151,96	Samário	Sm	62	150,4
Férmio	Fm	100	(257)	Selênio	Se	34	78,96
Ferro	Fe	26	55,847	Silício	Si	14	28,0855
Flúor	F	9	18,998403	Sódio	Na	11	22,98977
Fósforo	P	15	30,97376	Tálio	Tl	81	204,37
Frâncio	Fr	87	(223)	Tantálio	Ta	73	180,9479
Gadolínio	Gd	64	157,25	Tecnécio	Tc	43	(97)
Gálio	Ga	31	69,72	Telúrio	Te	52	127,60
Germânio	Ge	32	72,59	Térbio	Tb	65	158,9254
Háfnio	Hf	72	178,49	Titânio	Ti	22	47,90
Hélio	He	2	4,00260	Tório	Th	90	232,0381
Hidrogênio	H	1	1,0079	Túlio	Tm	69	168,9342
Hólmio	Ho	67	164,9304	Tungstênio	W	74	183,85
Índio	In	49	114,82	Urânio	U	92	238,029
Iodo	I	53	126,9045	Vanádio	V	23	50,9415
Írídio	Ir	77	192,22	Xenônio	Xe	54	131,30
Ítérbio	Yb	70	173,04	Zinco	Zn	30	63,38
Ítrio	Y	39	88,9059	Zircônio	Zr	40	91,22
Lantânio	La	57	138,9055				

## XIII.4. UNIDADES DO SISTEMA INTERNACIONAL (SI) USADAS NA FARMACOPÉIA E EQUIVALÊNCIA COM OUTRAS UNIDADES

### SISTEMA INTERNACIONAL DE UNIDADES (SI)

O Sistema Internacional de Unidades compreende três classes de unidades: unidades básicas, unidades derivadas e unidades complementares (1). As unidades básicas e suas definições encontram-se na Tabela 1.

As unidades derivadas podem ser formadas pela combinação de unidades básicas mediante relações algébricas. Algumas dessas unidades derivadas têm nomes e símbolos especiais. As unidades SI usadas na Farmacopéia Brasileira constam da Tabela 2. Unidades importantes e amplamente empregadas não constantes do Sistema Internacional estão arroladas na Tabela 3.

Os prefixos indicados na Tabela 4 são usados para formar os nomes e símbolos dos múltiplos e submúltiplos decimais das unidades do Sistema Internacional.

(1) As definições das unidades usadas no Sistema Internacional constam da obra "Le Système International d'Unités (SI)", publicada pelo Bureau de Poids et Mesures, Pavillon de Breteuil, F-92310 Sèvres, França.

**Tabela 1 – Unidades básicas SI**

Quantidade		Unidade		Definição
Nome	Símbolo	Nome	Símbolo	
Comprimento	<i>l</i>	metro	m	Comprimento igual a 1 650 763,73 comprimentos de onda no vácuo da radiação correspondente à transição entre os níveis $2p_{1/2}$ e $5d_{3/2}$ do átomo de criptônio 86.
Massa	<i>m</i>	quilograma	kg	Massa do protótipo internacional do quilograma.
Tempo	<i>t</i>	segundo	s	Duração de 9 192 631 770 períodos da radiação correspondente à transição entre dois níveis hiperfinos do estado fundamental do átomo de césio 133.
Corrente elétrica	<i>I</i>	ampère	A	Corrente elétrica invariável que, mantida em dois condutores retilíneos, paralelos, de comprimento infinito e de área de seção transversal desprezível e situados no vácuo a um metro de distância um do outro, produz entre esses condutores uma força igual a $2 \times 10^{-7}$ newtons por metro de comprimento desses condutores.
Temperatura termodinâmica	<i>T</i>	kelvin	K	Fração 1/273,16 da temperatura termodinâmica do ponto tríplice da água.
Quantidade de matéria	<i>n</i>	mole	mol	Quantidade de matéria de um sistema que contém tantas entidades elementares quantos são os átomos contidos em 0,012 quilogramas de carbono 12.
Intensidade luminosa	<i>I<sub>v</sub></i>	candela	cd	Intensidade luminosa, na direção perpendicular, de uma superfície plana de 1/600 000 m <sup>2</sup> de área de um corpo negro à temperatura de solidificação da platina, sob pressão de 101 325 pascals.

(1) Quando se usa o mol, as entidades elementares devem ser especificadas; podem ser átomos, moléculas, íons, elétrons ou outras partículas, bem como agrupamentos especificados de tais partículas.



Tabela 2 – Unidades SI usadas na Farmacópia e equivalência com outras unidades

Quantidade		Unidade				Conversão de outras unidades para o SI
Nome	Símbolo	Nome	Símbolo	Expressão em unidades SI básicas	Expressão em outras unidades SI	
Número de onda	$\nu$	1 por metro	1/m	$m^{-1}$		
Comprimento de onda	$\lambda$	nanômetro micrômetro	nm $\mu m$	$10^{-9} m$ $10^{-6} m$		
Área	$A, S$	metro quadrado	$m^2$	$m^2$		
Volume	$V$	metro cúbico	$m^3$	$m^3$		$1 ml = 1 cm^3 = 10^{-6} m^3$
Frequência	$\nu$	hertz	Hz	$s^{-1}$		
Massa específica	$\rho$	quilograma por metro cúbico	$kg/m^3$	$kg \cdot m^{-3}$		$1 g/ml = 1 g/cm^3 = 10^3 kg \cdot m^{-3}$
Velocidade	$\nu$	metro por segundo	m/s	$m \cdot s^{-1}$		
Força	$F$	newton	N	$m \cdot kg \cdot s^{-2}$		$1 dina = 1 g \cdot cm \cdot s^{-2} = 10^{-5} N$ $1 kp = 9,80665 N$
Pressão	$p$	pascal	Pa	$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-2}$	$N \cdot m^{-2}$	$1 dina/cm^2 = 10^{-1} Pa = 10^{-1} N \cdot m^{-2}$ $1 atm = 101325 Pa = 101,325 kPa$ $1 bar = 10^5 Pa = 0,1 MPa$ $1 mmHg = 133,322387 Pa$ $1 Torr = 133,322368 Pa$ $1 psi = 6,894757 kPa$
Viscosidade dinâmica	$\eta$	pascal-segundo	$Pa \cdot s$	$m^{-1} \cdot kg \cdot s^{-1}$	$N \cdot s \cdot m^{-2}$	$1 P = 10^{-1} Pa \cdot s = 10^{-1} N \cdot s \cdot m^{-2}$ $1 cP = 1 mPa \cdot s$
Viscosidade cinemática	$\nu$	metro quadrado por segundo	$m^2/s$	$m^2 \cdot s^{-1}$	$Pa \cdot s \cdot m^3 \cdot kg^{-1}$ $N \cdot m \cdot s \cdot kg^{-1}$	$1 St = 1 cm^2 \cdot s^{-1} = 10^{-4} m^2 \cdot s^{-1}$
Energia	$W$	joule	J	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-2}$	$N \cdot m$	$1 erg = 1 cm^2 \cdot g \cdot s^{-2} = 1 dina \cdot cm = 10^{-7} J$ $1 cal = 4.1868 J$
Fluxo radiante	$P$	watt	W	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3}$	$N \cdot m \cdot s^{-1}$ $J \cdot s^{-1}$	$1 erg/s = 1 dina \cdot cm \cdot s^{-1} = 10^{-7} W = 10^{-7} N \cdot m \cdot s^{-1} = 10^{-7} J \cdot s^{-1}$
Dose absorvida (de energia radiante)	$D$	gray	Gy	$m^2 \cdot s^{-2}$	$J \cdot kg^{-1}$	$1 rad = 10^{-2} Gy$
Potencial elétrico, força eletromotriz	$U$	volt	V	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-1}$	$W \cdot A^{-1}$	
Resistência elétrica	$R$	ohm	$\Omega$	$m^2 \cdot kg \cdot s^{-3} \cdot A^{-2}$	$V \cdot A^{-1}$	
Quantidade de eletricidade	$Q$	coulomb	C	$A \cdot s$		
Atividade de um radionuclídeo	$A$	becquerel	Bq	$s^{-1}$		$1 Ci = 37 \times 10^9 Bq = 37 \times 10^9 s^{-1}$
Concentração (quantidade de substâncias) Concentração molar	$c$	mol por metro cúbico	$mol/m^3$	$mol \cdot m^{-3}$		$1 mol/l = 1 M = 1 mol/dm^3 = 10^3 mol \cdot m^{-3}$

Tabela 3 – Unidades usadas com o SI

Quantidade	Unidade		Valor em unidades SI
	Nome	Símbolo	
Tempo	minuto	min	1 min = 60 s
	hora	h	1 h = 60 min = = 3600 s
	dia	d	1 d = 24 h = = 86400 s
Ângulo plano	grau	°	1° = ( $\pi$ / 180) rad
Volume	litro	l	1 l = 1 dm <sup>3</sup> = = 10 <sup>-3</sup> m <sup>3</sup>
Massa	tonelada	t	1 t = 10 <sup>3</sup> kg
Velocidade angular	rotação por minuto	rpm	rpm = ( $\pi$ / 30) rad·s <sup>-1</sup>

Notas:

1. Na Farmacopéia a temperatura usada é a Celsius (símbolo t). Ela é definida pela equação

$$t = T - T_0$$

em que, por definição,  $T_0 = 273,15$  K. A temperatura Celsius ou centígrada é expressa em graus Celsius (símbolo °C). A unidade "graus Celsius" é igual à unidade "Kelvin".

2. As expressões práticas das concentrações usadas na Farmacopéia estão definidas nas Generalidades.
3. O radiano é o ângulo plano, entre 2 raios de um círculo, que corta a circunferência determinando um arco de comprimento igual ao do raio.
4. Na Farmacopéia, as condições de centrifugação são definidas com referência à aceleração da gravidade ( $g_n$ )

$$g_n = 9,80665 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$$

5. Na Farmacopéia usam-se grandezas adimensionais, a saber, densidade relativa, absorvância, absorvância específica e índice de refração, bem como grandezas expressas em outras unidades, tais como rotação óptica específica.
6. Define-se microkatal como a atividade enzimática que, sob condições definidas, produz a transformação, (hidrólise por exemplo), de 1 micromol de substrato por segundo.

Tabela 4 – Múltiplos e sub-múltiplos decimais de unidades

Fator	Prefixo	Símbolo	Fator	Prefixo	Símbolo
10 <sup>18</sup>	exa	E	10 <sup>-1</sup>	deci	d
10 <sup>15</sup>	peta	P	10 <sup>-2</sup>	centi	c
10 <sup>12</sup>	tera	T	10 <sup>-3</sup>	mili	m
10 <sup>9</sup>	giga	G	10 <sup>-6</sup>	micro	μ
10 <sup>6</sup>	mega	M	10 <sup>-9</sup>	nano	n
10 <sup>3</sup>	quilo	k	10 <sup>-12</sup>	pico	p
10 <sup>2</sup>	hecto	h	10 <sup>-15</sup>	femto	f
10 <sup>1</sup>	deca	da	10 <sup>-18</sup>	atto	a

## XIII.5. MICRORGANISMOS EMPREGADOS EM TESTES E ENSAIOS

Os microrganismos relacionados a seguir são indicados para ensaios e testes preconizados pela Farmacopéia. Outros microrganismos podem ser empregados, desde que se comprove sua sensibilidade ao antibiótico a ser examinado, e usados em condições adequadas de temperatura e pH.

### Principais fontes de microrganismos:

ATCC American Type Culture Collection (1)

CIP Collection de l'Institut Pasteur (2)  
INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (3)  
NCIB National Collection of Industrial Bacteria (4)  
NCPF National Collection of Pathogenic Fungi (5)  
NCTC National Collection of Type Cultures (6)  
NCYC National Collection of Yeast Cultures (7)  
SSI Statens Serum Institut (8)

- (1) American Type Culture Collection  
12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 USA
- (2) Collection de l'Institut Pasteur  
Service de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.) 25, rue du Docteur Roux, F 75015 Paris, France
- (3) Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Avenida Brasil, 4365, 21040 - Rio de Janeiro, R.J., Brasil
- (4) National Collection of Industrial Bacteria  
Torry Research Station, PO Box 31, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG
- (5) National Collection of Pathogenic Fungi  
London School of Hygiene and Tropical Medicine  
Keppel Street, London WC1E 7HT, Great Britain
- (6) National Collection of Type Cultures  
Central Public Health Laboratory  
Colindale Avenue, London NW9 5HT, Great Britain
- (7) National Collection of Yeast Cultures  
ARC Food Research Institute  
Colney Lane, Norwich NR 4 7UA, Great Britain
- (8) Statens Serum Institut  
80 Artager Boulevard, Copenhagen, Denmark

**A – Fungos e Leveduras**

<i>ATCC</i>	<i>CIP</i>	<i>INCQS</i>	<i>NCIB</i>
2601		40001	
9763	1432.83	40002	
9080		40003	
9533		40004	
14683		40005	
10231		40006	
2091			
16404			

**B – Bactérias**

<i>ATCC</i>	<i>CIP</i>	<i>INCQS</i>	<i>NCIB</i>
6633	52.62	001	8054
19659		002	
11778	64.52	003	
3584		004	
14458		005	
7469		006	
8014		007	
7830		008	
7468		009	
9341	53.65	010	
10240	53.160	011	
14452		012	
6538p	53.156	013	8625
13150		014	
25923		015	
12228	68.21	016	8853
4083		017	
14506		018	
10541		019	
19274		020	
607		021	
12598		022	
4617	53.157	023	

9826		024	
15442		025	
25619		026	
29336		027	
10708		028	
6539		029	
10031	53.153	030	
10536	54.127	031	8879
11229		032	
25922		033	
29214		034	
4797		035	
8043		036	
27291		037	
10749		038	
6538	4.83	039	9518
19214		040	
18323		041	
13313		042	
23229		043	
27065		044	
23230		045	
11303		046	
15669		047	
23724		048	
23226		049	
13706		050	
13863		051	
3626		052	
3624		053	
19397		054	
27517		055	
17786		056	
27322		057	
23387		058	
8482		059	
11437		060	
19404			
9027			
8739			

# ÍNDICE

## A

Absorção atômica, espectrofotometria . . . . .	V.2.13.	(1988)
Ação, uso e doses . . . . .	IV.	(1988)
Acetato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Acetato de amônio . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de amônio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de amônio 2M . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de celulose . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de chumbo(II) triidratado . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de chumbo, papel . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de chumbo(II) SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de chumbo (II), solução saturada . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de clorexidina 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de cortisona . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de cortisona injetável . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de desoxicortona . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de etila . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de fenilmercúrio . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de indofenol SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de prednisolona . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de sódio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de uranila . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de uranila e zinco SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetato de zinco . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetila, determinação do índice em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.13.	(1988)
Acetila, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Acetilacetona . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetona . . . . .	XII.2.	(1988)
Acetona desidratada . . . . .	XII.2.	(1988)
Acidez e alcalinidade, ensaios rápidos . . . . .	IV.	(1988)
Acidez, determinação do índice em gorduras e óleos . . . . .	3.3.7.	(1988)
Ácido acético diluído . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético glacial . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético 0,045 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético 2 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético 5 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido acético SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido ascórbico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido benzóico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido bórico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido bórico, solução saturada . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido bromídrico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido calconcarboxílico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico diluído . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico 0,5 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico M SV . . . . .	XII.3.	(1988)
Ácido clorídrico 2 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido clorídrico SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Ácido crômico . . . . .	XII.2.	(1988)

ÍNDICE

Ácido edético	XII.2.	(1988)
Ácido fenoldissulfônico SR	XII.2.	(1988)
Ácido fórmico	XII.2.	(1988)
Ácido fosfomolibdico	XII.2.	(1988)
Ácido fosfomolibdico 3,5%	XII.2.	(1988)
Ácido fosfórico	XII.2.	(1988)
Ácido fosfórico 6 M	XII.2.	(1988)
Ácido fosfórico SR	XII.2.	(1988)
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	XII.2.	(1988)
Ácido metafosfórico	XII.2.	(1988)
Ácido metafosfórico-acético SR	XII.2.	(1988)
Ácido nítrico	XII.2.	(1988)
Ácido nítrico fumegante	XII.2.	(1988)
Ácido nítrico M	XII.2.	(1988)
Ácido nítrico SR	XII.2.	(1988)
Ácido oxálico	XII.2.	(1988)
Ácido oxálico SR	XII.2.	(1988)
Ácido perclórico	XII.2.	(1988)
Ácido perclórico M	XII.2.	(1988)
Ácido perclórico 0,1 M SV em ácido acético glacial	XII.3.	(1988)
Ácido perclórico SR	XII.2.	(1988)
Ácido perfórmico	XII.2.	(1988)
Ácido salicílico	XII.2.	(1988)
Ácido sulfanílico	XII.2.	(1988)
Ácido sulfanílico SR	XII.2.	(1988)
Ácido sulfúrico	XII.2.	(1988)
Ácido sulfúrico M	XII.2.	(1988)
Ácido sulfúrico M SV	XII.3.	(1988)
Ácido sulfuroso	XII.2.	(1988)
Ácido tioglicólico	XII.2.	(1988)
Ácido tricloroacético	XII.2.	(1988)
Ágar	XII.2.	(1988)
Água, determinação	V.2.20.	(1988)
Água e sedimentos, determinação em gorduras e óleos	V.3.3.6.	(1988)
Água em drogas vegetais, determinação	V.4.2.3.	(1988)
Água, generalidades	IV.	(1988)
Água de bromo SR	XII.2.	(1988)
Água isenta de dióxido de carbono	XII.2.	(1988)
Águas aromáticas	IV.	(1988)
Alaranjado de metila I	XII.1.	(1988)
Alaranjado de xilenol I	XII.1.	(1988)
Alcalinidade e acidez, ensaios rápidos	IV.	(1988)
Alcalóide, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Álcool, determinação	V.3.4.8.	(1988)
Álcool isopropílico	XII.2.	(1988)
Álcool <i>n</i> -propílico	XII.2.	(1988)
Alizarina I	XII.1.	(1988)
Alumínio, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Alumínio, titulação por complexometria	V.3.4.4.	(1988)
Amaranto S	XII.2.	(1988)
Amarelo de alizarina GG I	XII.1.	(1988)
Amarelo de dimetila I	XII.1.	(1988)
Amarelo de metanila I	XII.1.	(1988)
Amarelo naftol I	XII.1.	(1988)
Amarelo titan I	XII.1.	(1988)
Ambiente, animais de laboratório	XIII.2.2.	(1988)
Amido I	XII.1.	(1988)
Amido SR	XII.2.	(1988)
Amido iodetado	XII.1.	(1988)
Amido solúvel	XII.2.	(1988)
Amidos	XII.2.	(1988)

ÍNDICE

Amina aromática primária, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Aminoácidos, análise . . . . .	V.3.4.9.	(1988)
Aminofenazona . . . . .	XII.2.	(1988)
Amônia e amina alifática volátil, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Amônia, ensaio-limite . . . . .	V.3.2.6.	(1988)
Amônia 6 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Amônia, solução concentrada . . . . .	XII.2.	(1988)
Amônia SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Amônio, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Amostragem, métodos de análise de drogas vegetais . . . . .	V.4.2.1.	(1988)
Análise de drogas vegetais, métodos . . . . .	V.3.4.9.	(1988)
Análise de aminoácidos . . . . .	V.4.2.	(1988)
Análise de drogas vegetais, métodos . . . . .	V.2.21.	(1988)
Análise de solubilidade por fases . . . . .	VI.5.2.	(1988)
Análise de variância . . . . .	XIII.	(1988)
Anexos . . . . .	XII.2.	(1988)
Anidrido acético . . . . .	XII.2.	(1988)
Anidrido acético-piridina SR . . . . .	XIII.2.	(1988)
Animais de laboratório . . . . .	XII.2.	(1988)
Anisaldeído . . . . .	XII.2.	(1988)
Anisaldeído, solução . . . . .	VIII.	(1988)
Antibacterianos, produção de discos e metodologia para teste de sensibilidade . . . . .	XIII.1.	(1988)
Antibiograma, metodologia para o teste de sensibilidade aos antibacterianos . . . . .	V.5.2.17.	(1988)
Antibióticos, ensaio microbiológico . . . . .	VI.10.2.	(1988)
Antibióticos, ensaio microbiológico, análise estatística . . . . .	V.3.1.	(1988)
Antimônio(III), ion, reações de identificação . . . . .	VI.5.1.	(1988)
Ao acaso, tipos de delineamento . . . . .	IV.	(1988)
Aparelhos volumétricos . . . . .	V.3.1.	(1988)
Arsênio, reações de identificação . . . . .	V.3.2.5.	(1988)
Arsênio, ensaio-limite . . . . .	XII.2.	(1988)
Asparagina . . . . .	IX.2.1.	(1988)
Avaliação física e química, recipientes de vidro . . . . .	IX.2.1.	(1988)
Avaliação visual, recipientes de vidro . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul de bromofenol I . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul de bromotimol I . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul de hidroxinaftol I . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul do nilo Al . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul de oracet B I . . . . .	XII.1.	(1988)
Azul de timol I . . . . .	XII.1.	(1988)

**B**

Banho-maria e banho a vapor . . . . .	IV.	(1988)
Barbital . . . . .	XII.2.	(1988)
Barbital sódico . . . . .	XII.2.	(1988)
Barbitúrico sem substituinte no nitrogênio, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bário, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bário SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Benzeno . . . . .	XII.2.	(1988)
Benzoato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bicarbonato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bicarbonato de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Biftalato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Biftalato de potássio 0,05 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Biológicos, métodos . . . . .	V.5.	(1988)
Bismuto, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bismuto, titulações complexométricas . . . . .	V.3.4.4.	(1988)
Bissulfato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Bissulfito, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Bissulfito de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Blocos ao acaso, tipos de delineamento . . . . .	VI.5.1.	(1988)



## ÍNDICE

Borato, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Bromato de potássio 0,1 M SV .....	XII.3.	(1988)
Brometo, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Brometo de iodo SR .....	XII.2.	(1988)
Brometo de potássio .....	XII.2.	(1988)
Bromo .....	XII.2.	(1988)
Bromo 0,2 M .....	XII.2.	(1988)
Butanol-1 .....	XII.2.	(1988)

### C

Calciferol .....	XII.2.	(1988)
Cálcio, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Cálcio SRA .....	XII.2.	(1988)
Cálcio, titulações complexométricas .....	V.3.4.4.	(1988)
Calcona I .....	XII.1.	(1988)
Carbonato de cálcio .....	XII.2.	(1988)
Carbonato de estrôncio .....	XII.2.	(1988)
Carbonato de lítio .....	XII.2.	(1988)
Carbonato de sódio anidro .....	XII.2.	(1988)
Carbonato de sódio decaidratado .....	XII.2.	(1988)
Carbonato de sódio monoidratado .....	XII.2.	(1988)
Carboximetilcelulose (veja carmelose) .....	V.2.17.	(1988)
Carmelose, para cromatografia em coluna .....	V.2.17.	(1988)
Cefalina .....	XII.2.	(1988)
Comissão permanente de revisão da farmacopéica brasileira e colaboradores ..	III.	(1988)
Chumbo, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Chumbo SRA .....	V.3.1.	(1988)
Chumbo, titulações complexométricas .....	V.3.4.4.	(1988)
Cianeto, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Cianeto de potássio .....	XII.2.	(1988)
Cicloexano .....	XII.2.	(1988)
Cineol, determinação .....	V.4.2.8.	(1988)
Cinzas insolúveis em ácido, determinação em drogas vegetais .....	V.4.2.5.	(1988)
Cinzas sulfatadas, (resíduos por incineração), determinação .....	V.2.10.	(1988)
Cinzas totais, determinação em drogas vegetais .....	V.4.2.4.	(1988)
Citrato, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Citrato de sódio .....	XII.2.	(1988)
Clorato, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Cloreto, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Cloreto cobaltoso .....	XII.2.	(1988)
Cloreto cobaltoso SR .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de amônio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de amônio SR .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de bário .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de bário SR .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de benzalcônio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de cálcio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de cálcio anidro .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de cálcio SR .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de cálcio 0,025 M .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de magnésio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de mercúrio(II) .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de metileno .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de metilrosanilínio I .....	XII.1.	(1988)
Cloreto de paládio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de potássio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de potássio, solução saturada .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de sódio .....	XII.2.	(1988)
Cloreto de sódio 0,9% .....	XII.2.	(1988)
Cloreto estanoso .....	XII.2.	(1988)

## ÍNDICE

Cloreto estanooso SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Cloreto férrico . . . . .	XII.2.	(1988)
Cloreto férrico I . . . . .	XII.1.	(1988)
Cloreto férrico SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Cloreto mercúrio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Cloretos, ensaios-limite . . . . .	V.3.2.1.	(1988)
Cloridrato de hidroxilamina . . . . .	XII.2.	(1988)
Cloreto mercurio(II) SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Clorobenzeno . . . . .	XII.2.	(1988)
Cobaltinitrito de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Cobre . . . . .	XII.2.	(1988)
Cobre SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Cobre(II), ion, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Colírios . . . . .	IV.	(1988)
Combinação de estimativas de potência, exemplos . . . . .	VI.10.4.	(1988)
Combinação de estimativas de potência . . . . .	VI.8.	(1988)
Combustão em frasco de oxigênio, método . . . . .	V.3.4.3.	(1988)
Complexométricas, titulações . . . . .	V.3.4.4.	(1988)
Condições sanitárias, animais de laboratório . . . . .	XIII.2.1.	(1988)
Conservação . . . . .	IV.	(1988)
Contagem de microrganismos viáveis . . . . .	V.5.1.6.	(1988)
Controle de qualidade de frascos de vidro . . . . .	IX.2.1.	(1988)
Controle dos discos contendo antibacterianos . . . . .	VIII.2.	(1988)
Corante BRP . . . . .	XII.1.	(1988)
Corantes . . . . .	IV.	(1988)
Corantes, substâncias . . . . .	XI.	(1988)
Cor de líquidos . . . . .	V.2.12.	(1988)
Corticotrofina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.2.	(1988)
Cremes . . . . .	IV.	(1988)
o-Cresol . . . . .	XII.2.	(1988)
Cristal violeta . . . . .	XIII.1.	(1988)
Cromato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Cromato de potássio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Cromatografia . . . . .	V.2.17.	(1988)
Cromatografia a gás . . . . .	V.2.17.5.	(1988)
Cromatografia em camada delgada . . . . .	V.2.17.1.	(1988)
Cromatografia em coluna . . . . .	V.2.17.3.	(1988)
Cromatografia em papel . . . . .	V.2.17.2.	(1988)
Cromatografia líquida de alta pressão . . . . .	V.2.17.4.	(1988)
Cruzado, tipo de delineamento . . . . .	VI.5.1.	(1988)

## D

Definições . . . . .	IV.	(1988)
Densidade de massa, determinação . . . . .	V.2.5.	(1988)
Densidade de massa, generalidades . . . . .	IV.	(1988)
Densidade relativa, determinação . . . . .	V.2.5.	(1988)
Densidade relativa, determinação em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.1.	(1988)
Densidade relativa, generalidades . . . . .	IV.	(1988)
Descrição de substância . . . . .	IV.	(1988)
Descrição dos meios de cultura e reagentes, método geral para pesquisa e identificação de patógenos . . . . .	V.5.1.7.3.	(1988)
Desintegração de comprimidos e cápsulas . . . . .	V.1.4.1.	(1988)
Desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais . . . . .	V.1.4.2.	(1988)
Desintegração, testes . . . . .	V.1.4.	(1988)
Dessecação até peso constante . . . . .	IV.	(1988)
Dessecação, determinação da perda . . . . .	V.2.9.	(1988)
Dessecador . . . . .	IV.	(1988)
Determinação da densidade de massa e densidade relativa . . . . .	V.2.5.	(1988)
Determinação da densidade relativa em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.1.	(1988)
Determinação da granulometria dos pós . . . . .	V.2.11.	(1988)

ÍNDICE

Determinação da massa . . . . .	V.2.1.	(1988)
Determinação da metoxila . . . . .	V.3.4.6.	(1988)
Determinação da perda por dessecação . . . . .	V.2.9.	(1988)
Determinação da resistência mecânica em comprimidos . . . . .	V.1.3.	(1988)
Determinação da temperatura de congelamento . . . . .	V.2.4.	(1988)
Determinação da temperatura de ebulição e faixa de destilação . . . . .	V.2.3.	(1988)
Determinação da temperatura e faixa de fusão . . . . .	V.2.2.	(1988)
Determinação da temperatura de fusão em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.2.	(1988)
Determinação da temperatura de solidificação em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.3.	(1988)
Determinação da viscosidade . . . . .	V.2.7.	(1988)
Determinação de água . . . . .	V.2.20.	(1988)
Determinação de água em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.3.	(1988)
Determinação de água e perda por dessecação . . . . .	IV.	(1988)
Determinação de água e sedimentos em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.6.	(1988)
Determinação de cinzas insolúveis em ácido em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.5.	(1988)
Determinação de cinzas sulfatadas (resíduo por incineração) . . . . .	V.2.10.	(1988)
Determinação de cinzas totais em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.4.	(1988)
Determinação de matéria insaponificável em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.14.	(1988)
Determinação de material estranho em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.2.	(1988)
Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl . . . . .	V.3.4.2.	(1988)
Determinação de óleos essenciais em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.6.	(1988)
Determinação de óleos fixos em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.7.	(1988)
Determinação de peso em formas farmacêuticas . . . . .	V.1.1.	(1988)
Determinação de resistência mecânica em comprimidos . . . . .	V.1.3.	(1988)
Determinação de substâncias extraíveis por álcool em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.10.	(1988)
Determinação de volume em formas farmacêuticas . . . . .	V.1.2.	(1988)
Determinação do álcool . . . . .	V.3.4.8.	(1988)
Determinação do cineol em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.8.	(1988)
Determinação do dióxido de enxofre . . . . .	V.3.4.7.	(1988)
Determinação do índice de acetila em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.13.	(1988)
Determinação do índice de acidez em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.7.	(1988)
Determinação do índice de espuma em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.9.	(1988)
Determinação do índice de ésteres em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.9.	(1988)
Determinação do índice de hidroxila em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.12.	(1988)
Determinação do índice de iodo em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.10.	(1988)
Determinação do índice de peróxidos em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.11.	(1988)
Determinação do índice de refração . . . . .	V.2.6.	(1988)
Determinação do índice de refração em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.4.	(1988)
Determinação do índice de saponificação em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.8.	(1988)
Determinação do pH . . . . .	V.2.19.	(1988)
Determinação do poder rotatório e do poder rotatório específico . . . . .	V.2.8.	(1988)
Determinação do poder rotatório em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.5.	(1988)
Determinação do tempo de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais . . . . .	V.1.4.2.	(1988)
Determinação do tempo de desintegração para comprimidos e cápsulas . . . . .	V.1.4.1.	(1988)
Determinação do tempo de dissolução para comprimidos e cápsulas . . . . .	V.1.5.	(1988)
Determinações em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.	(1988)
Diacetato de clorexidina . . . . .	XII.2.	(1988)
Diazotação, titulações . . . . .	V.3.4.1.	(1988)
Dicloreto de etileno . . . . .	XII.2.	(1988)
Diclorofenol-indofenol, solução padrão . . . . .	XII.3.	(1988)
2,6-Dicloroindofenol, sal sódico . . . . .	XII.2.	(1988)
Dicromato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Dicromato de potássio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Dietilamina . . . . .	XII.2.	(1988)
Dietilditiocarbamato de prata . . . . .	XII.2.	(1988)
Dietilditiocarbamato de prata SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Difenilcarbazida . . . . .	XII.2.	(1988)
Difenilcarbazida I . . . . .	XII.1.	(1988)
Difenilcarbazida SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Difenilcarbazona . . . . .	XII.2.	(1988)

## ÍNDICE

Difenilcarbazona I	XII.1.	(1988)
Difalato de potássio 0,05 M (veja biftalato)	XII.2.	(1988)
Difusão em ágar, ensaio microbiológico	V.5.2.17.1.	(1988)
Digital, ensaio biológico	V.5.2.12.	(1988)
Digital, ensaio estatístico	VI.10.1.	(1988)
<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldeído	XII.2.	(1988)
<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldeído 5% em ácido clorídrico	XII.2.	(1988)
<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldeído 0,1%	XII.2.	(1988)
Dimetilformamida	XII.2.	(1988)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	XII.2.	(1988)
Dioxana	XII.2.	(1988)
Dióxido de enxofre, determinação	V.3.4.7.	(1988)
Dióxido de enxofre	XII.2.	(1988)
Dióxido de manganês	XII.2.	(1988)
Dissolução, determinação do tempo para comprimidos e cápsulas	V.1.5.	(1988)
Ditiol	XII.2.	(1988)
Ditiol SR	XII.2.	(1988)
Ditizona	XII.2.	(1988)
Ditizona SR	XII.2.	(1988)
Ditizona 0,025% em etanol	XII.2.	(1988)
Ditizona 0,002% em tetracloreto de carbono	XII.2.	(1988)
Doses	IV.	(1988)
Doses e medidas aproximadas	IV.	(1988)
Drogas vegetais, métodos de análise	V.4.2.	(1988)
Duração do efeito da insulina	V.5.2.4.	(1988)
Dureza, determinação em comprimidos	V.1.3.1.	(1988)

## E

Edetato dissódico	XII.2.	(1988)
Edetato dissódico 0,05 M	XII.2.	(1988)
Edetato dissódico, 0,05 M SV	XII.3.	(1988)
Eletroforese	V.2.22.	(1988)
Elixires	IV.	(1988)
Embalagem, material de acondicionamento	IV.	(1988)
Eosina Y I	XII.1.	(1988)
Emulsões	IV.	(1988)
Enriquecimento não seletivo, para pesquisa e identificação de patógenos	V.5.1.7.1.	(1988)
Ensaio biológico de corticotrofina	V.5.2.2.	(1988)
Ensaio biológico de digital	V.5.2.12.	(1988)
Ensaio biológico de felipressina	V.5.2.15.	(1988)
Ensaio biológico de glucagon	V.5.2.5.	(1988)
Ensaio biológico de gonadorelina	V.5.2.10.	(1988)
Ensaio biológico de gonadotrofina coriônica	V.5.2.9.	(1988)
Ensaio biológico de gonadotrofina sérica	V.5.2.8.	(1988)
Ensaio biológico de heparina	V.5.2.6.	(1988)
Ensaio biológico de insulina	V.5.2.3.	(1988)
Ensaio biológico de lipressina	V.5.2.14.	(1988)
Ensaio biológico de menotrofina	V.5.2.11.	(1988)
Ensaio biológico de oxitocina	V.5.2.1.	(1988)
Ensaio biológico de somatotrofina	V.5.2.16.	(1988)
Ensaio biológico de sulfato de protamina	V.5.2.7.	(1988)
Ensaio biológico de vasopressina	V.5.2.13.	(1988)
Ensaio-limite para amônia	V.3.2.6.	(1988)
Ensaio-limite para arsênio	V.3.2.5.	(1988)
Ensaio-limite para cloretos	V.3.2.1.	(1988)
Ensaio-limite para ferro	V.3.2.4.	(1988)
Ensaio-limite para metais pesados	V.3.2.3.	(1988)
Ensaio-limite para sulfatos	V.3.2.2.	(1988)
Ensaio microbiológico de antibióticos	V.5.2.17.	(1988)
Ensaio microbiológico por difusão em ágar	V.5.2.17.1.	(1988)

ÍNDICE

Ensaio microbiológico por turbidimetria . . . . .	V.5.2.17.2.	(1988)
Ensaios químicos . . . . .	V.3.4.	(1988)
Ensaios biológicos . . . . .	V.5.2.	(1988)
Ensaios biológicos, precisão . . . . .	IV.	(1988)
Ensaios biológicos, procedimentos estatísticos . . . . .	VI.	(1988)
Ensaios diretos . . . . .	VI.4.	(1988)
Ensaios estatísticos, exemplos . . . . .	VI.10.	(1988)
Ensaios indiretos quantitativos . . . . .	VI.5.	(1988)
Ensaios indiretos "tudo ou nada" . . . . .	VI.7.	(1988)
Ensaios-limite para impurezas inorgânicas . . . . .	V.3.2.	(1988)
Espectrofotometria de absorção atômica . . . . .	V.2.13.	(1988)
Espectrofotometria de absorção no ultravioleta, visível e infravermelho . . . . .	V.2.14.	(1988)
Espectrofotometria de fluorescência . . . . .	V.2.15.	(1988)
Espíritos . . . . .	IV.	(1988)
Estatísticas, tabelas . . . . .	VI.10.	(1988)
Estearato de metila . . . . .	XII.2.	(1988)
Éster, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Ésteres, determinação do índice em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.9.	(1988)
Esterilidade, teste . . . . .	V.5.1.1.	(1988)
Esterilização e acondicionamento dos meios de cultura, método geral de pesquisa e identificação de patógenos . . . . .	V.5.1.7.4.	(1988)
Esterilização, métodos . . . . .	X.	(1988)
Esteróides estranhos, pesquisa . . . . .	V.3.1.3.	(1988)
Esteróides, identificação . . . . .	V.3.1.2.	(1988)
Estimativa da potência e limites de confiança . . . . .	VI.5.4.	(1988)
Estimativa de erro residual . . . . .	VI.9.11.	(1988)
Estimativa de potência, combinação . . . . .	VI.8.	(1988)
Estolato de eritromicina . . . . .	XII.2.	(1988)
Estrôncio SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Etanol . . . . .	XII.2.	(1988)
Etanol absoluto . . . . .	XII.2.	(1988)
Éter de petróleo . . . . .	XII.2.	(1988)
Éter etílico . . . . .	XII.2.	(1988)
Ética, animais de laboratório . . . . .	XIII.2.5.	(1988)
Exemplo de combinação de estimativas de potência . . . . .	VI.10.4.	(1988)
Exemplo de ensaio direto . . . . .	VI.10.1.	(1988)
Exemplo de ensaio indireto "tudo ou nada" . . . . .	VI.10.3.	(1988)
Exemplos de ensaios estatísticos . . . . .	VI.10.	(1988)
Exemplos de ensaios indiretos quantitativos . . . . .	VI.10.2.	(1988)
Extratos fluidos . . . . .	IV.	(1988)
Extratos . . . . .	IV.	(1988)
Extratos moles . . . . .	IV.	(1988)
Extratos secos . . . . .	IV.	(1988)

F

Faixa de destilação e temperatura de ebulição, determinação . . . . .	V.2.3.	(1988)
Farmacognosia, métodos . . . . .	V.4.	(1988)
Felipressina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.15.	(1988)
Fenol . . . . .	XII.2.	(1988)
Fenolftaleína . . . . .	XII.2.	(1988)
Fenolftaleína I . . . . .	XII.1.	(1988)
Fenolftaleína 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Fenotiazinas, identificação . . . . .	V.3.1.5.	(1988)
Fenotiazinas, pesquisa de impurezas . . . . .	V.3.1.6.	(1988)
2-Fenoxietanol . . . . .	XII.2.	(1988)
Ferricianeto de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Ferricianeto de potássio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Férrico, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Ferrocianeto de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Ferrocianeto de potássio SR . . . . .	XII.2.	(1988)

## ÍNDICE

Ferro, ensaio-limite . . . . .	V.3.2.4.	(1988)
Ferro(ico), reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Ferro(oso), reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Fitofármacos, veja preparo de material vegetal . . . . .	V.4.1.	(1988)
Fluoreto de cálcio . . . . .	XII.2.	(1988)
Fluorescência, espectrofotometria . . . . .	V.2.15.	(1988)
Formaldeído . . . . .	XII.2.	(1988)
Formamida . . . . .	XII.2.	(1988)
Formas farmacêuticas, determinação de peso . . . . .	V.1.1.	(1988)
Formas farmacêuticas, determinação do volume . . . . .	V.1.2.	(1988)
Fórmula química . . . . .	IV.	(1988)
Fosfato ou ortofosfato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Fosfato de potássio monobásico . . . . .	XII.2.	(1988)
Fosfato de sódio dibásico, diidratado . . . . .	XII.2.	(1988)
Fosfato de sódio dibásico, dodecaidratado . . . . .	XII.2.	(1988)
Fosfato de sódio dibásico, dodecaidratado SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Fosfato de sódio tribásico, dodecaidratado . . . . .	XII.2.	(1988)
Fosfato equimolal 0,05 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Friabilidade, determinação em comprimidos . . . . .	V.1.3.2.	(1988)
Frutose . . . . .	XII.2.	(1988)
Frutose 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Fundamentos dos procedimentos estatísticos . . . . .	VI.2.	(1988)
Fusão, determinação de temperatura em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.3.	(1988)
Fusão, determinação da temperatura e faixa . . . . .	V.2.2.	(1988)

### G

Galactose . . . . .	XII.2.	(1988)
Galactose 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Géis . . . . .	IV.	(1988)
Gelatina . . . . .	XII.2.	(1988)
Generalidades . . . . .	IV.	(1988)
Genética, animais de laboratório . . . . .	XIII.2.4.	(1988)
Glicerol . . . . .	XII.2.	(1988)
Glicose . . . . .	XII.2.	(1988)
Glicose 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Glossário de símbolos . . . . .	VI.1.	(1988)
Glucagon, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.5.	(1988)
Gonadorelina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.10.	(1988)
Gonadotrofina coriônica, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.9.	(1988)
Gonadotrofina, ensaio estatístico . . . . .	VI.10.2.	(1988)
Gonadotrofina sérica, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.8.	(1988)
Gorduras e óleos, determinações . . . . .	V.3.3.	(1988)
Granulometria dos pós, determinação . . . . .	V.2.11.	(1988)

### H

Heparina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.6.	(1988)
Heparina, ensaio estatístico . . . . .	VI.10.2.	(1988)
Heparina sódica . . . . .	XII.2.	(1988)
Heptano . . . . .	XII.2.	(1988)
n-Heptano . . . . .	XII.2.	(1988)
Hexano . . . . .	XII.2.	(1988)
n-Hexano . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidrato de cloral . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de amônio . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de amônio 6 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de cálcio . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de cálcio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de cálcio saturado a 25°C . . . . .	XII.2.	(1988)
Hidróxido de cálcio, solução saturada . . . . .	XII.2.	(1988)

## ÍNDICE

Hidróxido de potássio .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de potássio aproximadamente 0,5 M .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de potássio M SV .....	XII.3.	(1988)
Hidróxido de sódio .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de sódio M .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de sódio M SV .....	XII.3.	(1988)
Hidróxido de sódio SR .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de sódio, solução concentrada SR .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de tetrabutilamônio .....	XII.2.	(1988)
Hidróxido de tetrabutilamônio 0,1 M SV .....	XII.3.	(1988)
Hidroxila, determinação do índice em gorduras e óleos .....	V.3.3.12.	(1988)
Hipoxitolueno butilado .....	XII.2.	(1988)
Hipofosfito de sódio .....	XII.2.	(1988)
Hipofosfito de sódio SR .....	XII.2.	(1988)
Hipofosfito, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Histamina, teste para .....	V.5.1.5.	(1988)
Histórico .....	II.	(1988)
Hormônio do crescimento, veja somatotrofina .....	V.5.2.16.	(1988)

### I

Identificação de esteróides por cromatografia em camada delgada .....	V.3.1.2.	(1988)
Identificação de fenotiazinas por cromatografia em camada delgada .....	V.3.1.5.	(1988)
Identificação, reações .....	V.3.1.	(1988)
Identificação e pesquisa de patógenos, método geral .....	V.5.1.7.	(1988)
Imidazol .....	XII.2.	(1988)
Impurezas .....	IV.	(1988)
Impurezas inorgânicas, ensaios-limite .....	V.3.2.	(1988)
Incineração até peso constante .....	IV.	(1988)
Indicadores .....	X.2.	(1988)
Indicadores biológicos .....	IV.	(1988)
Indicadores, generalidades .....	XII.1.	(1988)
Índice de acetila, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.13.	(1988)
Índice de acidez, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.7.	(1988)
Índice de ésteres, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.9.	(1988)
Índice de espuma, determinação em urogas vegetais .....	V.4.2.9.	(1988)
Índice de hidroxila, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.12.	(1988)
Índice de iodo, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.10.	(1988)
Índice de peróxidos, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.11.	(1988)
Índice de refração, determinação .....	V.2.6.	(1988)
Índice de refração, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.4.	(1988)
Índice de saponificação, determinação em gorduras e óleos .....	V.3.3.8.	(1988)
Infravermelho, espectrofotometria de absorção .....	V.2.14.	(1988)
Injetáveis .....	IV.	(1988)
Iodeto de mercúrio(II) .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de potássio .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de potássio aproximadamente M .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de potássio SR .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de potássio mercúrico alcalino .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de sódio .....	XII.2.	(1988)
Iodeto de sódio em ácido acético .....	XII.2.	(1988)
Iodeto, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Iodo, determinação do índice em gorduras e óleos .....	V.3.3.10.	(1988)
Iodo .....	XII.2.	(1988)
Iodo SR .....	XII.2.	(1988)
Iodo 0,5% SR .....	XII.2.	(1988)
Iodo 0,1 M SV .....	XII.3.	(1988)
Iodobismutato de potássio SR .....	XII.2.	(1988)
Iodobismutato de potássio, aquo-acético .....	XII.2.	(1988)

ÍNDICE

Iodo 1% em metanol . . . . .	XII.2.	(1988)
Íons, grupos e funções, reações de identificação . . . . .	V.3.1.1.	(1988)
Insulina, duração do efeito . . . . .	V.5.2.4.	(1988)
Insulina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.3.	(1988)
Insulina, ensaio estatístico (ensaio duplo cruzado) . . . . .	VI.10.2.	(1988)
Insulina, ensaio estatístico (ensaio "tudo ou nada") . . . . .	VI.10.3.	(1988)
Interpretação da precisão dos dados numéricos e limites de tolerância . . . . .	IV.	(1988)
Irganox 1010 . . . . .	XII.2.	(1988)
Irganox 1076 . . . . .	XII.2.	(1988)
Irganox P 5.800 . . . . .	XII.2.	(1988)
<b>K</b>		
Karl-Fischer, reagente . . . . .	V.2.20.1.	(1988)
<b>L</b>		
Lactato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Lactose . . . . .	XII.2.	(1988)
Lactose 0,1% . . . . .	XII.2.	(1988)
Laurato de metila . . . . .	XII.2.	(1988)
Laurilsulfato de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Laurilsulfato de sódio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Lecitina . . . . .	XII.2.	(1988)
Limites de confiança e potência média ponderada . . . . .	VI.8.1.	(1988)
Limites de tolerância, interpretação dos dados numéricos . . . . .	IV.	(1988)
Limpidez de soluções, reações químicas . . . . .	IV.	(1988)
Lipessina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.14.	(1988)
Líquidos, cor . . . . .	V.2.12.	(1988)
Lítio, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Lítio SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Loções . . . . .	IV.	(1988)
<b>M</b>		
Macrogol 300 . . . . .	XII.2.	(1988)
Magnésio, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Magnésio SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Magnésio, titulações complexométricas . . . . .	V.3.4.4.	(1988)
Magneson . . . . .	XII.2.	(1988)
Magneson I . . . . .	XII.1.	(1988)
Massa atômica relativa . . . . .	IV.	(1988)
Massas atômicas, símbolos e nomes . . . . .	XIII.3.	(1988)
Massa, determinação . . . . .	V.2.1.	(1988)
Matéria insaponificável, determinação em gorduras e óleos . . . . .	V.3.3.14.	(1988)
Material de acondicionamento e embalagem . . . . .	IV.	(1988)
Material para cromatografia . . . . .	V.2.17.6.	(1988)
Material plástico . . . . .	IX.1.1.	(1988)
Material plástico, recipientes . . . . .	IX.2.2.	(1988)
Materiais empregados na fabricação de recipientes . . . . .	IX.1.	(1988)
Materiais estranhos, determinação em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.2.	(1988)
Materiais plásticos à base de cloreto de polivinila (PVC) . . . . .	IX.1.1.1.	(1988)
Materiais empregados na fabricação de recipientes . . . . .	IX.1.	(1988)
Médias móveis . . . . .	VI.6.	(1988)
Medicamentos pressurizados . . . . .	IV.	(1988)
Medidas aproximadas e doses . . . . .	IV.	(1988)
Medidas de pressão . . . . .	IV.	(1988)
Meio não-aquoso, titulações . . . . .	V.3.4.5.	(1988)
Meios de cultura recomendados para ensaios microbiológicos de antibióticos . . . . .	V.5.2.17.	(1988)
Meios de cultura, para pesquisa e identificação de patógenos . . . . .	V.5.1.7.4.	(1988)
Meios de cultura, teste de esterilidade . . . . .	V.5.1.1.	(1988)



## ÍNDICE

Menotrofina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.11	(1988)
Mercúrio, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Mercúrio . . . . .	XII.2.	(1988)
Mercúrio SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Metabissulfito sódico . . . . .	XII.2.	(1988)
Metais pesados, ensaio-limite . . . . .	V.3.2.3.	(1988)
Metanol . . . . .	XII.2.	(1988)
Metenamina . . . . .	XII.2.	(1988)
Método da destilação azeotrópica, determinação de água . . . . .	V.2.20.2.	(1988)
Métodos biológicos . . . . .	V.5.	(1988)
Método de combustão em frasco de oxigênio . . . . .	V.3.4.3.	(1988)
Método de filtração por membrana, teste de esterilidade . . . . .	V.5.1.1.	(1988)
Método geral para pesquisa e identificação de patógenos . . . . .	V.5.1.7.	(1988)
Método gravimétrico, determinação de água . . . . .	V.2.20.3.	(1988)
Método de inoculação ou direto, teste de esterilidade . . . . .	V.5.1.1.	(1988)
Métodos químicos . . . . .	V.3.	(1988)
Métodos químicos, esterilização . . . . .	X.1.2.	(1988)
Método volumétrico, determinação de água . . . . .	V.2.20.1.	(1988)
Metodologia para o teste de sensibilidade aos antibacterianos, antibiograma . . . . .	XIII.1.	(1988)
Metodologia para teste de sensibilidade aos antibacterianos . . . . .	VIII.	(1988)
Métodos de análise . . . . .	V.	(1988)
Métodos de análise de drogas vegetais . . . . .	V.4.2.	(1988)
Métodos de esterilização . . . . .	X.1.	(1988)
Métodos físicos e físico-químicos . . . . .	V.2.	(1988)
Métodos físicos, esterilização . . . . .	X.1.1.	(1988)
Métodos de farmacognosia . . . . .	V.4.	(1988)
Métodos de preparação . . . . .	X.	(1988)
Métodos químicos, esterilização . . . . .	V.3.	(1988)
Metoxiazobenzeno . . . . .	XII.2.	(1988)
Metoxiazobenzeno SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Metóxido de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Metóxido de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Metóxido de sódio 0,1 M SV . . . . .	XII.3.	(1988)
Metoxila, determinação . . . . .	V.3.4.6.	(1988)
Microrganismos recomendados para ensaio microbiológico de antibióticos . . . . .	V.5.2.17.	(1988)
Microrganismos empregados em testes e ensaios . . . . .	XIII.5.	(1988)
Microrganismos viáveis, contagem . . . . .	V.5.1.6.	(1988)
Miristato de metila . . . . .	XII.2.	(1988)
Mistura anidrido acético-piridina SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Mistura composta de calcona, indicador . . . . .	XII.1.	(1988)
Mistura indicadora ABT, VM, F . . . . .	XII.1.	(1988)
Mistura de negro de eriocromo T . . . . .	XII.2.	(1988)
Molibdato de amônio . . . . .	XII.2.	(1988)
Molibdato de amônio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Molibdovanádio SR . . . . .	XII.2.	(1988)

## N

1-Naftilamina . . . . .	XII.2.	(1988)
2-Naftol . . . . .	XII.2.	(1988)
2-Naftol SR . . . . .	XII.2.	(1988)
1-Naftolbenzeína I . . . . .	XII.1.	(1988)
1-Naftolftaleína I . . . . .	XII.1.	(1988)
Nefelometria e turbidimetria . . . . .	V.2.16	(1988)
Negro de eriocromo T I . . . . .	XII.1.	(1988)
Negro de eriocromo T . . . . .	XII.2.	(1988)
Ninidrina . . . . .	XII.2.	(1988)
Ninidrina SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)

## ÍNDICE

Nitrato de amônio . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de amônio, solução saturada . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de amônio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de bário . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de bário 0,05 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de cobalto(II) . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de cobalto(II) SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de chumbo . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de lantânio . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de lantânio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de mercúrio(I) . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de mercúrio(I) SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de mercúrio(II) . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de mercúrio(II) 0,1 M SV . . . . .	XII.3.	(1988)
Nitrato de prata 0,1 M . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de prata 0,1 M SV . . . . .	XII.3.	(1988)
Nitrato de prata . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de prata SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato de tório . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrato fenilmercúrico . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrito de sódio . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrito de sódio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrito de sódio 0,1 M SV . . . . .	XII.3.	(1988)
Nitrito, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Nitrobenzeno . . . . .	XII.2.	(1988)
Nitrogênio, determinação pelo método de Kjeldahi . . . . .	V.3.4.2.	(1988)
Nitrogênio em aminas aromáticas primárias . . . . .	V.3.4.1.	(1988)
Nome químico . . . . .	IV.	(1988)
Nomenclatura . . . . .	IV.	(1988)
Nomes, símbolos e massas atômicas . . . . .	XIII.3.	(1988)
Nutrição, animais de laboratório . . . . .	XIII.2.3.	(1988)

### O

Odor, generalidades . . . . .	IV.	(1988)
Óleos essenciais, determinação em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.6.	(1988)
Óleos fixos, determinação em drogas vegetais . . . . .	V.4.2.7.	(1988)
Óvulos . . . . .	IV.	(1988)
Oxalato, reações de identificação . . . . .	V.3.1.	(1988)
Oxalato de amônio . . . . .	XII.2.	(1988)
Oxalato de amônio I . . . . .	XII.1.	(1988)
Oxalato de amônio SR . . . . .	XII.2.	(1988)
Oxalato de potássio . . . . .	XII.2.	(1988)
Óxido de alumínio . . . . .	XII.2.	(1988)
Óxido de hólmió . . . . .	XII.2.	(1988)
Óxido de magnésio . . . . .	XII.2.	(1988)
Óxido mercúrico . . . . .	XII.2.	(1988)
Oxitocina, ensaio biológico . . . . .	V.5.2.1.	(1988)
Oxitocina, ensaio estatístico . . . . .	VI.10.2.	(1988)

### P

Padrões e substâncias de referência . . . . .	IV.	(1988)
Paládio SRA . . . . .	XII.2.	(1988)
Palmitato de metila . . . . .	XII.2.	(1988)
Papel de amarelo de titan . . . . .	XII.1.	(1988)
Papel de amido iodetato . . . . .	XII.1.	(1988)
Papel de fenolftaleína . . . . .	XII.1.	(1988)
Papel de prata-manganês . . . . .	XII.2.	(1988)
Papel de tornassol azul . . . . .	XII.1.	(1988)
Papel de tornassol vermelho . . . . .	XII.1.	(1988)

## ÍNDICE

Papel de vermelho de congo	XII.1.	(1988)
Pastas	IV.	(1988)
Patógenos, método geral	V.5.1.7.	(1988)
Pentóxido de fósforo	XII.2.	(1988)
Pentóxido de vanádio	XII.2.	(1988)
Peptona	XII.2.	(1988)
Perda por dessecação, determinação	V.2.9.	(1988)
Perda por dessecação, determinação de água	IV.	(1988)
Permanganato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Permanganato de potássio	XII.2.	(1988)
Permanganato de potássio SR	XII.2.	(1988)
Peroxidissulfato de amônio	XII.2.	(1988)
Peróxido de hidrogênio 3%	XII.2.	(1988)
Peróxido de hidrogênio concentrado	XII.2.	(1988)
Peróxido de hidrogênio 30 volumes SR	XII.2.	(1988)
Peróxido, determinação do índice em gorduras e óleos	V.3.3.11.	(1988)
Peróxido, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Persulfato de sódio	XII.2.	(1988)
Peso constante, dessecação	IV.	(1988)
Peso, determinação em formas farmacêuticas	V.1.1.	(1988)
Pesos e medidas	IV.	(1988)
Pesquisa de esteróides estranhos por cromatografia em camada delgada	V.3.1.3.	(1988)
Pesquisa de impurezas relacionadas a fenotiazinas por cromatografia em camada delgada	V.3.1.6.	(1988)
Pesquisa de substâncias relacionadas a sulfonamidas por cromatografia em camada delgada	V.3.1.4.	(1988)
pH, determinação	V.2.19.	(1988)
Piridina	XII.2.	(1988)
Pirrogênios, teste	V.5.1.2.	(1988)
Plástico, material	IX.1.1.	(1988)
Poder rotatório, determinação em gorduras e óleos	V.3.3.5.	(1988)
Poder rotatório e poder rotatório específico, determinação	V.2.8.	(1988)
Polarografia	V.2.18	(1988)
Polarografia de pulso	V.2.18.	(1988)
Poliacrilamida	XII.2.	(1988)
Poliestireno	IX.1.1.2.4.	(1988)
Poliestireno opaco	IX.1.1.2.5.	(1988)
Poliétileno de alta densidade	IX.1.1.2.2.	(1988)
Poliétileno de baixa densidade	IX.1.1.2.1.	(1988)
Polioléfinas	IX.1.1.2.	(1988)
Polipropileno	IX.1.1.2.3.	(1988)
Polissorbato 80	XII.2.	(1988)
Pomadas	IV.	(1988)
Porcentagens	IV.	(1988)
Pós, determinação da granulometria	V.2.11.	(1988)
Potássio, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Potássio SRA	XII.2.	(1988)
Potência e limites de confiança, estimativa	VI.5.4.	(1988)
Potência média ponderada e limites de confiança	VI.8.1.	(1988)
Prata, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Prazo de validade	IV.	(1988)
Precisão dos ensaios biológicos	IV.	(1988)
Prednisolona	XII.2.	(1988)
Prednisona	XII.2.	(1988)
Prefácio	I.	(1988)
Preparo de soluções	IV.	(1988)
Preparações tópicas semi-sólidas	IV.	(1988)
Preparo de material vegetal para observação e estudos histológicos	V.4.1.	(1988)
Pressão reduzida	IV.	(1988)
Preto brilhante BN	XII.2.	(1988)
Procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos	VI.	(1988)

ÍNDICE

Procedimentos técnicos aplicados a medicamentos	V.1.	(1988)
Processos de fabricação	IV.	(1988)
Produção de discos	VIII.1.	(1988)
Produção de discos e metodologia para teste de sensibilidade aos antibacterianos	VIII.	(1988)
Propilenoglicol	XII.2.	(1988)
Protamina (sulfato), ensaio biológico	V.5.2.7.	(1988)
Prova em branco	IV.	(1988)
Púrpura de bromocresol I	XII.1.	(1988)
Púrpura de metacresol I	XII.1.	(1988)

Q

Quadrado latino, tipos de delineamento	VI.5.1.	(1988)
Quinalizarina	XII.2.	(1988)

R

Radiofármacos	VII.	(1988)
Reações de identificação (Conceito)	IV.	(1988)
Reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Reações químicas e limpidez de soluções	IV.	(1988)
Reagentes	XII.	(1988)
Reagente de púrpura de bromocresol	XII.1.	(1988)
Reagentes e soluções reagentes	XII.2.	(1988)
Reagentes, indicadores, soluções reagentes, soluções indicadoras, soluções colorimétricas e soluções volumétricas	IV.	(1988)
Recipientes	IX.2.	(1988)
Recipientes de material plástico	IX.2.2.	(1988)
Recipientes de vidro	IX.2.1.	(1988)
Recipientes e materiais empregados na sua fabricação	IX.	(1988)
Refração, determinação do índice	V.2.6.	(1988)
Requisitos para a produção de discos e metodologia para teste de sensibilidade aos antibacterianos	VIII.	(1988)
Resazurina	XII.2.	(1988)
Resazurina I	XII.1.	(1988)
Resíduo por incineração, determinação	V.2.10.	(1988)
Resistência mecânica em comprimidos, determinação	V.1.3.	(1988)
Resorcinol	XII.2.	(1988)
Resorcinol I	XII.1.	(1988)
Rotulagem	IV.	(1988)

S

Sacarose	XII.2.	(1988)
Sacarose 0,1%	XII.2.	(1988)
Safranina 0	XII.2.	(1988)
Salicilato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Saponificação, determinação do índice em gorduras e óleos	V.3.3.8.	(1988)
Segurança biológica, testes	V.5.1.	(1988)
Sílica-gel dessecada	XII.2.	(1988)
Sílica-gel "G"	XII.2.	(1988)
Sílica-gel "GF 254"	XII.2.	(1988)
Sílica-gel "H"	XII.2.	(1988)
Sílica-gel "HF 254"	XII.2.	(1988)
Símbolos, glossário de procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos	VI.1.	(1988)
Sódio, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Sódio SRA	XII.2.	(1988)
Solidificação, determinação da temperatura em gorduras e óleos	V.3.3.3.	(1988)
Solubilidade por fases, análise	V.2.21.	(1988)

ÍNDICE

Solubilidade	IV.	(1988)
Solução de bário 10 ppm	XII.2.	(1988)
Solução de cádmio 5 ppm	XII.2.	(1988)
Solução de cloreto 5 ppm	XII.2.	(1988)
Solução de estanho 5 ppm	XII.2.	(1988)
Solução de Karl-Fischer	XII.2.	(1988)
Solução de zinco 10 ppm	XII.2.	(1988)
Soluções e reagentes	XII.2.	(1988)
Soluções empregadas nos ensaios microbiológicos de antibióticos	V.5.2.17.	(1988)
Soluções indicadoras (veja indicadores)	XII.1.	(1988)
Soluções reagentes, indicadoras, colorimétricas e volumétricas	IV.	(1988)
Soluções volumétricas	XII.3.	(1988)
Somatotrofina, ensaio biológico	V.5.2.16.	(1988)
Subnitrato de bismuto	XII.2.	(1988)
Substâncias adjuvantes	IV.	(1988)
Substâncias corantes	XI.	(1988)
Substâncias extraíveis por álcool, determinação em drogas vegetais	V.4.2.10.	(1988)
Substâncias pressoras, teste	V.5.1.8.	(1988)
Substâncias relacionadas a sulfonamidas, pesquisa por cromatografia em camada delgada	V.3.1.4.	(1988)
Substâncias vasodpressoras, teste	V.5.1.4.	(1988)
Succinato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Sudan III	XII.2.	(1988)
Sulfanilamida	XII.2.	(1988)
Sulfato cúprico pentaidratado	XII.2.	(1988)
Sulfato cúprico SR	XII.2.	(1988)
Sulfato de amônio	XII.2.	(1988)
Sulfato de bário	XII.2.	(1988)
Sulfato de cádmio	XII.2.	(1988)
Sulfato de cálcio hemidratado	XII.2.	(1988)
Sulfato de cálcio solução saturada SR	XII.2.	(1988)
Sulfato de manganês	XII.2.	(1988)
Sulfato de potássio	XII.2.	(1988)
Sulfato de protamina	XII.2.	(1988)
Sulfato de sódio anidro	XII.2.	(1988)
Sulfato de sódio decaidratado	XII.2.	(1988)
Sulfato de zinco heptaidratado	XII.2.	(1988)
Sulfato de zinco 0,1 M	XII.2.	(1988)
Sulfato de zinco 0,1 M SV	XII.3.	(1988)
Sulfato férrico	XII.2.	(1988)
Sulfato férrico amoniacal	XII.2.	(1988)
Sulfato férrico amoniacal SR	XII.2.	(1988)
Sulfato férrico-ferricianeto de potássio SR	XII.2.	(1988)
Sulfato ferroso heptaidratado	XII.2.	(1988)
Sulfato ferroso SR	XII.2.	(1988)
Sulfato ferroso 0,5 M	XII.2.	(1988)
Sulfato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Sulfatos, ensaio-limite	V.3.2.2.	(1988)
Sulfeto de amônio em solução	XII.2.	(1988)
Sulfeto de amônio SR	XII.2.	(1988)
Sulfeto de hidrogênio	XII.2.	(1988)
Sulfeto de hidrogênio SR	XII.2.	(1988)
Sulfeto de sódio	XII.2.	(1988)
Sulfeto de sódio SR	XII.2.	(1988)
Sulfito, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Sulfonamidas, substâncias relacionadas, pesquisa por cromatografia em camada delgada	V.3.1.4.	(1988)
Supositórios	IV.	(1988)
Suspensões	IV.	(1988)

## T

Tabelas estatísticas	VI.9.	(1988)
Tampão acetato-acetato de amônio	XII.4.	(1988)
Tampão acetato-cianato de amônio	XII.4.	(1988)
Tampão acetato-ácido clorídrico - pH 3,5	XII.4.	(1988)
Tampão acetato - pH 4,4	XII.4.	(1988)
Tampão acetato - pH 7,0	XII.4.	(1988)
Tampão albumina-fosfato - pH 7,2	XII.4.	(1988)
Tampão amônia - pH 10,9	XII.4.	(1988)
Tampão barbital - pH 8,6	XII.4.	(1988)
Tampão cloreto de amônio - pH 10,0	XII.4.	(1988)
Tampão fosfato - pH 6,0	XII.4.	(1988)
Tampão fosfato - pH 6,8	XII.4.	(1988)
Tampão fosfato - pH 7,2	XII.4.	(1988)
Tampão fosfato equimolar 0,025 - pH 6,86	XII.4.	(1988)
Tampão fosfato M/15 - pH 7,0	XII.4.	(1988)
Tampão imidazol - pH 7,4	XII.4.	(1988)
Tampão tris-cloreto de sódio - pH 7,5	XII.4.	(1988)
Tanino	XII.2.	(1988)
Tartarato ácido de epinefrina	XII.2.	(1988)
Tartarato de sódio	XII.2.	(1988)
Tartarato de sódio e potássio	XII.2.	(1988)
Tartarato de sódio e potássio SR	XII.2.	(1988)
Tartarato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Temperatura ambiente	IV.	(1988)
Temperatura de congelamento, determinação	V.2.4.	(1988)
Temperatura de ebulição, determinação	V.2.3.	(1988)
Temperatura de fusão, determinação	V.2.2.	(1988)
Temperatura de fusão, determinação em gorduras e óleos	V.3.3.2.	(1988)
Temperatura de solidificação, determinação em gorduras e óleos	V.3.3.3.	(1988)
Tempo de desintegração para comprimidos e cápsulas, determinação	V.1.4.1.	(1988)
Tempo de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais, determinação	V.1.4.2.	(1988)
Tempo de dissolução para comprimidos e cápsulas, determinação	V.1.5.	(1988)
Teste de esterilidade	V.5.1.1.	(1988)
Teste de pirogênicos	V.5.1.2.	(1988)
Teste de toxicidade	V.5.1.3.	(1988)
Teste de valores aberrantes	VI.9.	(1988)
Teste para histamina	V.5.1.5.	(1988)
Teste para substâncias pressoras	V.5.1.8.	(1988)
Teste para substâncias vasodepressoras	V.5.1.4.	(1988)
Teste de confirmação para pesquisa e identificação de patógenos	V.5.1.7.2.	(1988)
Testes de desintegração	V.1.4.	(1988)
Testes de segurança biológica	V.5.1.	(1988)
Testes de validade	VI.5.3.	(1988)
Tetraborato sódico	XII.2.	(1988)
Tetraborato sódico 0,01 M	XII.2.	(1988)
Tetracloroeto de carbono	XII.2.	(1988)
Tetrafenilborato de sódio	XII.2.	(1988)
Tetrafenilborato de sódio 0,02 M SV	XII.3.	(1988)
Tetrahidrofurano	XII.2.	(1988)
Tetraoxalato de potássio	XII.2.	(1988)
Tetraoxalato de potássio 0,05 M	XII.2.	(1988)
Timolftaleína I	XII.1.	(1988)
Tinturas	IV.	(1988)
Tioacetamida	XII.2.	(1988)
Tioacetamida SR	XII.2.	(1988)
Tiocianato de amônio	XII.2.	(1988)
Tiocianato de amônio I	XII.1.	(1988)
Tiocianato de amônio SR	XII.2.	(1988)

ÍNDICE

Tiocianato de amônio 0,1 M SV	XII.3.	(1988)
Tiocianato de amônio 0,5 M	XII.2.	(1988)
Tiocianato de potássio	XII.2.	(1988)
Tiocianato de potássio aproximadamente M	XII.2.	(1988)
Tiocianato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Tioglicolato de sódio	XII.2.	(1988)
Tiosulfato de sódio	XII.2.	(1988)
Tiosulfato de sódio 0,1 M	XII.2.	(1988)
Tiosulfato de sódio 0,1 M SV	XII.3	(1988)
Tiosulfato, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Tipos de delineamento, ensaios indiretos quantitativos	VI.5.1.	(1988)
Tipos de vidro, recipientes de vidro	IX.2.1.	(1988)
Titulações complexométricas	V.3.4.4.	(1988)
Titulações em meio não-aquoso	V.3.4.5.	(1988)
Titulações por diazotação	V.3.4.1.	(1988)
Título	IV.	(1988)
Tolueno	XII.2.	(1988)
Torina	XII.2.	(1988)
Tornassol I	XII.1.	(1988)
Toxicidade, teste	V.5.1.3.	(1988)
Trióxido de arsênio	XII.2.	(1988)
Trióxido de cromo	XII.2.	(1988)
Tropeolina O I	XII.1.	(1988)
Tropeolina OO I	XII.1.	(1988)
Trombina	XII.2.	(1988)
Tromboplastina	XII.2.	(1988)
Prometamina	XII.2.	(1988)
Turbidimetria e nefelometria	V.2.16.	(1988)
Turbidimetria, ensaio microbiológico	V.5.2.17.2.	(1988)

U

Ungüentos, veja preparações tópicas semi-sólidas	IV.	(1988)
Unidade de medida	IV.	(1988)
Unidades do sistema internacional (SI) usados na farmacopéia e equivalente com outras unidades	XIII.4.	(1988)
Uso e doses	IV.	(1988)
Ultravioleta, visível e infravermelho, espectrofotometria e absorção	V.2.14.	(1988)

V

Validade, testes	VI.5.3.	(1988)
Valores aberrantes	VI.3.	(1988)
Variância, análise	VI.5.2.	(1988)
Vasopressina, ensaio biológico	V.5.2.13.	(1988)
Varfarina sódica	XII.2.	(1988)
Vegetal, preparo do material para observação e estudos histológicos	V.4.1.	(1988)
Verde de bromocresol I	XII.1.	(1988)
Verde de metila I	XII.1.	(1988)
Vermelho cresol I	XII.1.	(1988)
Vermelho de congo I	XII.1.	(1988)
Vermelho de fenol I	XII.1.	(1988)
Vermelho de metila I	XII.1.	(1988)
Vermelho de quinaldina I	XII.1.	(1988)
Vidro, controle de qualidade de frascos	IX.2.1.	(1988)
Vidro, recipientes	IX.2.1.	(1988)
Viscosidade, determinação	V.2.7.	(1988)
Volume, determinação em formas farmacêuticas	V.1.2.	(1988)

X

Xantina, reações de identificação	V.3.1.	(1988)
Xaropes	IV.	(1988)

## ÍNDICE

### Z

Zinco ativado .....	XII.2.	(1988)
Zinco granulado .....	XII.2.	(1988)
Zinco, reações de identificação .....	V.3.1.	(1988)
Zinco SRA .....	XII.2.	(1988)
Zinco, titulações complexométricas .....	V.3.4.4.	(1988)