



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

www.anvisa.gov.br

Consulta Pública nº 50, de 4 de setembro de 2008
D.O.U de 05/09/2008

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o inciso IV do art. 11 e o art. 35 do Regulamento da ANVISA aprovado pelo Decreto nº 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso V e nos §§ 1º e 3º do art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria nº 354 da ANVISA, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 19 de agosto de 2008, adota a seguinte Consulta Pública e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

considerando que é responsabilidade da ANVISA a atualização e revisão periódica da Farmacopéia Brasileira;

considerando o Processo de Revisão de Monografias da Farmacopéia Brasileira e o desenvolvimento e revisão de métodos gerais da Farmacopéia Brasileira por instituições de ensino superior;

considerando que devem ser observadas as especificações de qualidade determinadas pela Farmacopéia Brasileira, para fins de controle de qualidade, registro e análises fiscais de produtos sujeitos ao regime de vigilância sanitária;

adota a seguinte Consulta Pública e eu, Diretor-Presidente, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aberto, a contar da data de publicação desta **Consulta Pública**, o prazo de 60 (sessenta) dias para que sejam apresentadas sugestões quanto às propostas de revisão e **atualização dos Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira**, descritos no Anexo I.

Art. 2º Informar que os métodos gerais descritos no Anexo I, estarão disponíveis, na íntegra, durante o período de consulta no endereço eletrônico www.anvisa.gov.br, e as sugestões deverão ser encaminhadas por escrito para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/DIMCB/Farmacopéia Brasileira, SEPN 515, Bloco "B", Ed. Omega, 5º Andar, Sala 2, Asa Norte, Brasília/DF, CEP 70.770.541, ou Fax: (061) 3448-1119 ou e-mail: cp50.farmacopéia@anvisa.gov.br.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no Art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária submeterá à Comissão da Farmacopéia Brasileira as contribuições enviadas, para avaliação e os encaminhamentos devidos.

DIRCEU RAPOSO DE MELO

ANEXO I
Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira

ANEXO I – Métodos Gerais da Farmacopéia Brasileira

Os métodos gerais em questão são propostas para revisão/atualização dos seguintes métodos constantes na 4ª Edição da Farmacopéia Brasileira.

IV GENERALIDADES

V.1.1 DETERMINAÇÃO DE PESO

V.1.2 DETERMINAÇÃO DE VOLUME

V.1.3 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA EM COMPRIMIDOS

V.1.4 TESTES DE DESINTEGRAÇÃO
V.1.5 TESTE DE DISSOLUÇÃO
V.1.6 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS
V.1.8 TESTE DE GOTEJAMENTO
V.2.12. COR DE LÍQUIDOS
V.2.17.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
V.2.25 LIMPIDEZ DE SOLUÇÕES
V.3.2 ENSAIOS-LIMITE PARA IMPUREZAS INORGÂNICAS
V.3.4.10 ENSAIO IODOMÉTRICO DE ANTIBIÓTICOS
V.4 MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA
V.5.1 TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA
XI SUBSTÂNCIAS CORANTES

IV GENERALIDADES

TÍTULO

O título completo desta obra é “Farmacopéia da República Federativa do Brasil, x edição”.

Sua denominação pode ser abreviada para “Farmacopéia Brasileira, x^a edição”, “F. Bras. x” ou “F. BRAS. x”.

DEFINIÇÕES

Farmacopéico

A expressão *farmacopéico* substitui as expressões *oficial*, *oficinal* ou *magistral*, utilizadas em edições anteriores, equivalendo-se às 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 na qual se administra.

Medicamento

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

Medicamento farmacopéico

Medicamento inscrito numa das edições da Farmacopéia Brasileira.

Medicamento magistral

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

NOMENCLATURA

Os títulos das monografias obedecem à Denominação Comum Brasileira (DCB) 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 (IUPAC).

FÓRMULA QUÍMICA

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

MASSA ATÔMICA RELATIVA

As massas atômicas relativas, usadas para o cálculo de massas moleculares, são as constantes na Tabela de Massas Atômicas Relativas, publicada em 1979 pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), com base na massa do carbono 12 (^{12}C).

UNIDADES DE MEDIDA

São adotadas nessa Farmacopéia as unidades do Sistema Internacional de Unidades (SI), em conformidade com o Decreto Federal nº. 81.621 de 3 de maio de 1978. Excepcionalmente, são utilizadas outras unidades de uso corrente na prática farmacêutica.

As unidades e frações do Sistema Métrico Decimal utilizadas na F. BRAS. x, baseadas no Sistema Internacional de Unidades (SI), são representadas pelas abreviações relacionadas a seguir.

DE COMPRIMENTO

metro		– m
decímetro	– dm	= 10^{-1} m
centímetro	– cm	= 10^{-2} m
milímetro	– mm	= 10^{-3} m
micrômetro	– μm	= 10^{-6} m
nanômetro	– nm	= 10^{-9} m

DE VOLUME

litro		– l
decilitro	– dl	= 10^{-1} l
mililitro	– ml	= 10^{-3} l
microlitro	– μl	= 10^{-6} l

DE MASSA*

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

* As expressões massa e peso são adotadas indistintamente na F. BRAS. x.

** Nas prescrições e referências relativas a doses terapêuticas, μg equivale a “mcg” ou γ (gama).

DE RADIOATIVIDADE

becquerel		– Bq = desintegração nuclear por segundo
curie	– Ci	= $3,7 \times 10^{10}$ Bq
milicurie	– mCi	= $3,7 \times 10^7$ Bq
microcurie	– μCi	= $3,7 \times 10^4$ Bq
gigabecquerel	– GBq	= 27,027 mCi

megabecquerel – MBq= 27,027 µCi
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 ou outras preparações farmacopéicas, é permitido o uso de substâncias adjuvantes, descritas nas monografias e adicionadas com finalidade específica. Elas devem ser inócuas e não devem ter influência adversa sobre a eficácia terapêutica da substância ativa contida na preparação, nem interferir nos ensaios e determinações.

DESCRIÇÃO DE SUBSTÂNCIA

As informações referentes à descrição de uma substância são genéricas e destinam-se à avaliação preliminar da sua integridade. 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 expressão *solvente* refere-se à água, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

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

As solubilidades aproximadas constantes nas monografias são designadas por termos descritivos cujos significados figuram na Tabela 1.

Tabela 1 – Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

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 1000 partes
Muito pouco solúvel	de 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	mais de 10 000 partes

ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO

Os ensaios de identificação permitem verificar, com um nível de certeza aceitável, que a identidade do material sob exame está de acordo com o rótulo de sua embalagem. Embora específicos, eles não são necessariamente suficientes para estabelecer prova absoluta de identidade. Entretanto, o não-cumprimento dos requerimentos de um ensaio de identificação pode significar erro de rotulagem do material. Outros testes e especificações na monografia contribuem para a confirmação da identidade do artigo sob exame.

DOSEAMENTO E DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA

Nas monografias da Farmacopéia Brasileira, usualmente, são descritos mais de um método de doseamento. Nesses casos, os métodos devem ser considerados equivalentes, podendo ser utilizados indistintamente.

No caso de antibióticos, quando constarem na monografia individual métodos de determinação de potência e doseamento, empregar um dos métodos descritos.

DENSIDADE DE MASSA E DENSIDADE RELATIVA

A densidade de massa (ρ) 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

Usam-se, geralmente, as expressões *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 à perda em massa, por secagem, de água e outros componentes residuais voláteis, em condições especificadas.

IMPUREZAS

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

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 por uma gota de azul de bromotimol SI (pH 7,0).

É considerada *ácida* quando cora de 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 vermelho de congo ou 1 ml se cora de vermelho por 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 1 ml se cora de azul por uma gota de timolftaleína SI (pH 9,3 a 10,5) ou de vermelho por uma gota de fenolftaleína 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 farmacopéicos, quer como tais ou em soluções.

Indicadores – São substâncias utilizadas nos ensaios farmacopéicos 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 designadas por “SC”.

Soluções volumétricas – São soluções de reagentes de concentração conhecida, destinadas ao uso em determinações quantitativas. Na F. BRAS. x as concentrações das soluções volumétricas são expressas em molaridade. São designadas por “SV”.

Solução molar – É a solução que contém uma molécula-grama do soluto em 1000 ml da solução. Os múltiplos e submúltiplos da solução molar, também, são designados por números inteiros ou frações decimais como: 2 M; M; 0,5 M; 0,1 M; etc.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizadas em testes, ensaios e reações são preparadas com água purificada, a menos indicado de maneira diferente na monografia individual.

A expressão *recentemente preparada*, referente ao preparo de soluções utilizadas em testes, ensaios e reações, indica que a solução deve ser preparada não mais que 24 horas antes da realização do ensaio.

ÁGUA

A água mencionada nos testes, reações e ensaios é água purificada. Para preparações injetáveis, deve-se utilizar *água para injetáveis*, descrita em monografia individual. Quando for prescrito o uso de *água isenta de dióxido de carbono*, utilizar água purificada fervida por pelo menos 5 minutos e protegida do ar atmosférico durante o resfriamento e armazenagem.

EXPRESSÃO DE CONCENTRAÇÕES

As concentrações em porcentagem são expressas como segue.

Por cento p/p (peso em peso) ou % (p/p) – Expressa o número de g de um componente 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 de 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 de 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.

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. Caso o aparelho volumétrico não tenha sido aferido a 25 °C, as medidas de volume devem ser realizadas na temperatura nele indicada.

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

Os aparelhos volumétricos para 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

Todas as temperaturas constantes na F. BRAS. x são expressas na escala Celsius, e todas as medidas são feitas a 25 °C, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

BANHO-MARIA E BANHO A VAPOR

A expressão banho-maria significa o uso de um banho de água fervente, a menos que outra temperatura seja indicada na monografia individual. As expressões água quente e água muito quente indicam temperaturas aproximadas entre 60 °C e 70 °C e entre 85 °C e 95 °C, respectivamente.

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

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 ao uso de manômetros ou barômetros calibrados em relação à pressão exercida pela força de 1 newton uniformemente distribuída sobre uma superfície plana de 1 m² de área perpendicular à direção da força; 1 pascal equivale a 7,5 × 10⁻³ mm de mercúrio.

PRESSÃO REDUZIDA

A expressão *pressão reduzida* significa pressão menor ou igual a 6,7 kPa (aproximadamente 50 mm de mercúrio), a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual. Quando na monografia for

indicada *dessecação sob pressão reduzida sobre agente dessecante*, a operação deve ser feita sob 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 sob pressão reduzida é o que permite manter atmosfera de baixa umidade sob pressão de não mais que 6,7 kPa ou outra pressão indicada na monografia.

ODOR

As expressões *inodora*, *praticamente inodora*, *leve odor característico* ou suas variações são usadas examinando-se a amostra depois de exposta ao ar por 15 minutos, quando se tratarem de embalagens de até 25 g abertas recentemente. No caso de embalagens maiores, transferir amostras de aproximadamente 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 nos casos em que um odor particular não permitido seja indicado na monografia individual.

PROVA EM BRANCO

As expressões *executar branco paralelo*, *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 dessecação 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 depois de 1 hora de dessecação adicional nas condições especificadas.

INCINERAÇÃO ATÉ PESO CONSTANTE

Esta expressão significa que a incineração deve prosseguir a 800 ± 25 °C, ou em outra temperatura indicada na monografia individual, 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 depois de 15 minutos de incineração adicional.

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. Esses 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 na monografia são definidas as condições de temperatura na qual a substância deve ser conservada, são utilizados os termos descritos a seguir.

Em congelador – Em temperatura entre -20 °C e 0 °C.

Em refrigerador – Em temperatura entre 2 °C e 8 °C.

Local frio – Ambiente cuja temperatura não excede 8 °C.

Local fresco – Ambiente cuja temperatura permanece entre 8 °C e 15 °C.

Temperatura ambiente – Temperatura normalmente encontrada em um ambiente de trabalho, entre 15 °C e 30 °C.

Local quente – Ambiente cuja temperatura permanece entre 30 °C e 40 °C.

Calor excessivo – Indica temperaturas acima de 40 °C.

Quando for necessário conservar um fármaco em local fresco, pode-se conservá-lo em refrigerador, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

Quando na monografia não forem especificadas condições de conservação, elas 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 individuais, utilizando-se os termos relacionados a seguir.

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 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 do 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 nas embalagens a data do término do prazo de validade. Essa 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, edulcorantes, estabilizantes, diluentes, desagregantes, aglutinantes, desluzantes, antiaderentes, entre outras são aquelas empregadas para preparar a forma farmacêutica. 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 no 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 apropriados (dosadores, colheres-medida, etc.) para a dispensação de medicamentos, podem ser utilizadas medidas aproximadas. São, geralmente, unidades para uso doméstico, adotadas para informar ao paciente a medida da dose. Tais medidas têm a indicação de capacidade descrita a seguir.

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

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

PADRÕES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

São adotados na F. BRAS. x padrões e substâncias químicas de referência (SQR) desenvolvidos, aprovados e/ou oficializados pela Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. Na inexistência desses, podem-se adotar substâncias químicas de referência e padrões estabelecidos por farmacopéias consideradas oficiais no Brasil, conforme a legislação vigente.

Os padrões primários para Espectrofotometria de Absorção Atômica são listados pela denominação do metal, seguida 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 indicada na monografia.

ÁGUAS AROMÁTICAS

São soluções saturadas de óleos essenciais ou outras substâncias aromáticas em água. Possuem odor característico das substâncias utilizadas na sua preparação, recebendo, também, o nome delas.

CÁPSULAS

São formas farmacêuticas sólidas que encerram o fármaco em invólucro constituído de gelatina ou material elástico. São classificadas em duras ou moles. As cápsulas duras (gelatinosas) apresentam duas partes cilíndricas alongadas que se fecham uma na outra contendo, no seu interior, pós ou granulados. Nas

cápsulas moles o invólucro é constituído de duas partes fundidas contendo, no seu interior, material líquido ou semi-sólido.

As cápsulas devem atender às exigências de *Determinação de peso* (V.1.1), *Teste de desintegração* (V.1.4.1), *Teste de dissolução* (V.1.5), *Uniformidade de doses unitárias* (V.1.6) e às previstas nas monografias individuais.

COLÍRIOS

São preparações farmacêuticas líquidas destinadas à aplicação sobre a mucosa ocular. Devem atender às exigências de *Determinação de volume* (V.1.2), *Determinação de pH* (V.1.19), *Esterilidade* (V.5.1.1) e às previstas nas monografias individuais.

COMPRIMIDOS

São formas farmacêuticas sólidas obtidas por compressão. Podem ser não-revestidos, revestidos com filme ou com revestimento açucarado (drágeas). Comprimidos revestidos com filme são comprimidos revestidos com uma camada polimérica fina de material hidrossolúvel ou que resista à secreção gástrica. Drágeas são comprimidos revestidos com camadas constituídas por misturas de substâncias diversas, como resinas naturais ou sintéticas, gomas, gelatina, materiais inativos e insolúveis, açúcares, plastificantes, polióis, ceras, corantes autorizados e, às vezes, aromatizantes e princípios ativos. Comprimidos solúveis são comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme destinados a serem dissolvidos em água antes da administração. Comprimidos dispersíveis são comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme destinados a serem dispersos em água antes da administração.

Os comprimidos devem atender às exigências de *Determinação de peso* (V.1.1), *Teste de desintegração* (V.1.4.1), *Teste de dissolução* (V.1.5) e *Uniformidade de doses unitárias* (V.1.6) e às previstas nas monografias individuais.

O *Teste de dureza* (V.1.3.1) e o *Teste de friabilidade* (V.1.3.2) aplicam-se, unicamente, a comprimidos não-revestidos.

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.

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 os sistemas são classificados em óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O).

As emulsões devem atender às exigências contidas nas monografias individuais e ao teste de *Determinação de volume* (V.1.2). Quando destinadas para uso injetável, devem atender às exigências de *Esterilidade* (V.5.1.1) e *Pirogênios* (V.5.1.2). Quando destinadas para uso tópico ou aplicação em mucosas, devem atender às exigências de *Contagem microbiana em produtos não estéreis* (V.5.1.6) e *Pesquisa e identificação de patógenos* (V.5.1.7).

ESPÍRITOS

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

Os espíritos são obtidos pela dissolução de substâncias aromáticas em etanol, geralmente na proporção de 5% (p/V).

EXTRATOS

São preparações de consistência líquida, sólida ou intermediária obtidas a partir de material vegetal ou animal. O material utilizado na preparação de extratos pode sofrer tratamento preliminar, tal como inativação de enzimas, moagem ou desengorduramento.

Os extratos são preparados por percolação, maceração ou outro método adequado e validado, utilizando como solvente etanol, água ou outro solvente adequado. Após a extração, materiais indesejáveis podem ser eliminados.

EXTRATOS FLUIDOS

São preparações líquidas nas quais, exceto quando indicado de maneira diferente, uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca utilizada na sua preparação. Se necessário, os extratos fluidos podem ser padronizados em termos de concentração do solvente, teor de constituintes ou resíduo seco. Se necessário, podem ser adicionados conservantes inibidores do crescimento microbiano.

EXTRATOS MOLES

São preparações de consistência pastosa obtidas por evaporação parcial do solvente utilizado na sua preparação. São utilizados como solvente etanol, água ou misturas etanol/água em proporção adequada. Apresentam, no mínimo, 70% de resíduo seco, calculados como porcentagem de massa. Se necessário, podem ser adicionados conservantes inibidores do crescimento microbiano.

EXTRATOS SECOS

São preparações sólidas obtidas por evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentam, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como porcentagem de massa. Podem ser adicionados de materiais inertes adequados.

Os extratos secos padronizados têm o teor de seus constituintes ajustado pela adição de materiais inertes adequados ou pela adição de extratos secos obtidos com o mesmo fármaco utilizado na preparação.

Quando necessário, poderá ser prescrita na monografia a realização de ensaio-limite para o solvente utilizado na preparação.

INJETÁVEIS

São preparações estéreis destinadas à administração parenteral. Apresentam-se como soluções, suspensões, ou emulsões. Devem atender às exigências de *Determinação de volume* (V.1.2), *Esterilidade* (V.5.1.1), pirogênios e às previstas nas monografias individuais. Os requerimentos para pirogênios podem ser cumpridos aplicando-se o teste de *Pirogênios* (V.5.1.2) ou de *Endotoxinas bacterianas* (V.5.1.9).

Veículos aquosos

Água para injetáveis é geralmente utilizada como veículo, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual. Cloreto de sódio pode ser adicionado em quantidades suficientes para obter soluções isotônicas. Soluções de cloreto de sódio ou outras soluções adequadas podem ser utilizadas para substituir total ou parcialmente *água para injetáveis*, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual. Todos os veículos aquosos devem satisfazer às exigências especificadas nas provas de *Esterilidade* (V.5.1.1) e pirogênios.

Veículos não-aquosos

Veículos não-aquosos utilizados parcial ou totalmente na obtenção de preparações injetáveis podem ser miscíveis ou imiscíveis com a água. Entre os veículos miscíveis com a água, os mais usados são os poliálcoois 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 individuais e às descritas a seguir.

Teste de resfriamento – Dessecar a amostra de óleo fixo a 105 °C durante 2 horas e resfriar à temperatura ambiente em dessecador sobre sílica-gel. Transferir quantidade da amostra para recipiente cilíndrico de vidro incolor, com diâmetro interno de aproximadamente 25 mm. Fechar o recipiente e mergulhar durante 4 horas em água mantida a 10 °C. A amostra deve permanecer suficientemente límpida de modo que uma linha negra, de 0,5 mm de largura, possa facilmente ser visualizada quando mantida, verticalmente, atrás do cilindro, contra fundo branco.

Índice de saponificação – Entre 185 e 200 (V.3.3.8).

Índice de iodo – Entre 79 e 128 (V.3.3.10).

Substâncias insaponificáveis – Refluxar em banho-maria 10 ml da amostra com 15 ml de hidróxido de sódio a 16,7% (p/V) e 30 ml de etanol, agitando ocasionalmente até que a mistura se torne límpida. Transferir a mistura para cápsula de porcelana, evaporar o etanol em banho-maria e misturar o resíduo com 100 ml de água. Uma solução límpida deve ser obtida.

Ácidos graxos livres – No máximo 2 ml de hidróxido de sódio 0,02 M são gastos para neutralizar os ácidos graxos livres em 10 g da amostra (V.3.3.7).

Os mono ou diglicerídeos sintéticos de ácidos graxos devem ser líquidos e devem permanecer límpidos quando resfriados a 10 °C. Seu índice de iodo não deve ser 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. Essas substâncias devem ser selecionadas tendo em vista o aumento da estabilidade do produto, não devendo interferir 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 antioxidantes, os agentes quelantes, os tampões, os agentes antibacterianos, os agentes antifúngicos, os agentes antiespumantes e outros, quando especificados nas monografias. Não é permitida a adição de substâncias corantes.

A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, os limites máximos para alguns adjuvantes são os descritos a seguir.

Agentes contendo mercúrio ou compostos tensoativos catiônicos – 0,01%.

Agentes do tipo clorobutanol, cresol e fenol – 0,5%.

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 depois de perfuradas várias vezes.

Os recipientes para preparações injetáveis são classificados em recipientes para dose única, recipientes para doses múltiplas ou 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 opérculos fixos ou móveis. O conteúdo só deve ser utilizado em uma única dose, não podendo ser reaproveitado.

Os recipientes para doses múltiplas são frascos de vidro de paredes resistentes que, depois de 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, 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 *Determinação de volume (V.1.2), Produtos líquidos em recipientes para dose única e injetáveis*.

Esterilidade

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

Pirogênios

As preparações injetáveis devem satisfazer às exigências especificadas na monografia individual para o teste de *Pirogênios (V.5.1.2)* ou de *Endotoxinas bacterianas (V.5.1.9)*.

Contaminação por partículas

As preparações injetáveis devem satisfazer às exigências especificadas na monografia para o teste de *Contaminação por partículas (V.1.7)*.

LOÇÕES

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

MEDICAMENTOS PRESSURIZADOS

São medicamentos acondicionados em frascos mantidos sob pressão com sistema apropriado de aplicação. Devem atender às exigências das respectivas monografias.

ÓVULOS

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

Essas preparações devem atender às exigências de *Determinação de peso* (V.1.1), *Teste de desintegração* (V.1.4.2) e às 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). As preparações semi-sólidas são classificadas em pomadas, cremes, géis ou 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.

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 de *Determinação de peso* (V.1.1), *Teste de desintegração* (V.1.4.2) e às previstas nas monografias específicas.

SUSPENSÕES

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

As suspensões devem atender às exigências contidas nas monografias individuais, bem como ao teste de *Determinação de volume* (V.1.2).

Quando acondicionadas em recipientes para dose única devem satisfazer às exigências de *Uniformidade de doses unitárias* (V.1.6).

Quando se destinam ao uso injetável, devem satisfazer às exigências de *Esterilidade* (V.5.1.1) e pirogênios e não devem apresentar partículas maiores que 100 nm.

TINTURAS

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

A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, 10 ml de tintura simples correspondem a 1 g de droga seca.

XAROPES

São soluções aquosas concentradas de sacarose ou outros açúcares. Quando não se destinam ao consumo imediato, devem ser adicionados de conservadores antimicrobianos apropriados.

V.1 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS APLICADOS A MEDICAMENTOS

V.1.1 DETERMINAÇÃO DE PESO

O teste se aplica a formas farmacêuticas sólidas em dose unitária (comprimidos não-revestidos, comprimidos revestidos, pastilhas, cápsulas duras e moles e supositórios), formas farmacêuticas sólidas acondicionadas em recipientes para dose unitária (pós estéreis, pós liofilizados, pós para injetáveis e pós para reconstituição de uso oral) e a formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas acondicionadas em recipientes para doses múltiplas (granulados, pós, géis, cremes, pomadas e pós para reconstituição).

As pesagens são feitas em balanças de sensibilidade adequada.

PROCEDIMENTO PARA PRODUTOS EM DOSE UNITÁRIA

Para produtos em dose unitária, o teste permite verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso. Para realizar o teste, é necessário determinar, previamente, o peso médio de unidades do lote.

Comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme

Pesar, individualmente, 20 comprimidos e determinar o peso médio. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na Tabela 1, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Comprimidos com revestimento açucarado (drágeas)

Pesar, individualmente, 20 drágeas e determinar o peso médio. Pode-se tolerar não mais que cinco unidades fora dos limites especificados na Tabela 1, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Cápsulas duras

Pesar, individualmente, 20 unidades, remover o conteúdo de cada uma, limpar adequadamente e pesar novamente. Determinar o peso do conteúdo de cada cápsula pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. Com os valores obtidos, determinar o peso médio do conteúdo. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na Tabela 1, em relação ao peso médio do conteúdo, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Cápsulas moles

Proceder como descrito para *Cápsulas duras*. Para determinar o peso médio do conteúdo, cortar as cápsulas previamente pesadas e lavá-las com éter etílico ou outro solvente adequado. Deixar os invólucros expostos ao ar, em temperatura ambiente, até completa evaporação do solvente. Pesar novamente.

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 1, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Pós estéreis, pós liofilizados e pós para injetáveis

Realizar o teste com 20 unidades. Remover os lacres metálicos, no caso de frascos-ampola. Retirar rótulos que possam sofrer danos durante o teste. Secar, se necessário, a superfície externa dos recipientes. Pesar, individualmente, as 20 unidades, com as respectivas tampas. Remover o conteúdo e lavar os respectivos recipientes utilizando água e em seguida etanol. Secar em estufa a 105 °C, por 1 hora, ou em temperaturas inferiores a essa, dependendo da natureza do material, até peso constante. Resfriar à temperatura ambiente, recolocar a tampa e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo. Determinar o peso médio do conteúdo das 20 unidades. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na Tabela 1, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Pós para reconstituição (uso oral)

Proceder conforme descrito para *Pós estéreis, pós liofilizados e pós para injetáveis*. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados na Tabela 1, em relação ao peso médio, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

Tabela 1 – Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas sólidas em dose unitária

Formas farmacêuticas em dose unitária	Peso médio	Limites de variação
Comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme, comprimidos efervescentes, comprimidos sublinguais, comprimidos vaginais e pastilhas	80 mg ou menos mais que 80 mg e menos que 250 mg 250 mg ou mais	± 10,0% ± 7,5% ± 5,0%
Comprimidos com revestimento açucarado (drágeas)	25 mg ou menos mais que 25 mg e até 150 mg mais que 150 mg e menos que 300 mg 300 mg ou mais	± 15,0% ± 10,0% ± 7,5% ± 5,0%
Cápsulas duras e moles, cápsulas vaginais	menos que 300 mg 300 mg ou mais	± 10,0% ± 7,5%
Supositórios e óvulos	independente do peso médio	± 5,0 %
Pós estéreis, pós liofilizados e pós para injetáveis	mais que 40 mg*	± 10,0%
Pós para reconstituição (uso oral)	menos que 300 mg 300 mg ou mais	± 10,0% ± 7,5%

(*) Se o peso médio for de 40 mg ou menos, submeter ao teste de *Uniformidade de doses unitárias* (V.1.6).

PROCEDIMENTO PARA PRODUTOS EM DOSES MÚLTIPLAS

Para produtos acondicionados em recipientes para doses múltiplas, o teste permite verificar a homogeneidade no envase.

Pós para reconstituição (uso oral e parenteral)

Pesar, individualmente, 10 unidades. 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 das 10 unidades. Os valores individuais não diferem de ±10% em relação ao peso médio.

Granulados, pós, géis, cremes e pomadas

Nota: para realizar o teste, é necessário conhecer a quantidade nominal do envase.

Pesar, individualmente, 10 unidades. 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 das 10 unidades. O peso médio dos conteúdos não é inferior ao peso declarado e o peso individual de nenhuma das unidades testadas é inferior à porcentagem indicada na Tabela 2, em relação ao peso declarado.

Caso não seja cumprida essa exigência, determinar o peso individual do conteúdo de 20 unidades adicionais. O peso médio do conteúdo das 30 unidades não é inferior ao peso declarado, e o peso individual de não mais que uma unidade em 30 é inferior à porcentagem indicada na Tabela 2, em relação ao peso declarado.

Tabela 2 – Critérios de avaliação da determinação de peso para formas farmacêuticas em doses múltiplas

Formas farmacêuticas em doses múltiplas	Peso declarado	Porcentagem mínima em relação ao peso declarado
Granulados, pós, géis, cremes e pomadas	até 60 g	90,0%
	acima de 60 g e até 150 g	92,5%
	acima de 150,0 g	95,0%

V.1.2 DETERMINAÇÃO DE VOLUME

O teste de determinação de volume é requerido para produtos líquidos em recipientes para doses múltiplas e produtos líquidos em recipientes para dose única. O teste se aplica tanto a preparações líquidas quanto a preparações líquidas obtidas a partir de pós para reconstituição. O teste não é requerido para produtos líquidos em recipientes para dose única quando na monografia individual constar requerimento para *Uniformidade de doses unitárias*.

PROCEDIMENTO

Produtos líquidos em recipientes para doses múltiplas (exceto injetáveis)

Separar 10 unidades. Remover os lacres metálicos, quando for o caso. Retirar rótulos que possam sofrer danos durante o teste. Pesar, individualmente, cada recipiente com as respectivas tampas. Homogeneizar, remover e reunir os conteúdos e reservar para a determinação da densidade de massa. Lavar os recipientes e as tampas com água e, em seguida, com etanol. Secar em estufa a 105 °C, por 1 hora, ou em temperatura compatível com o material do recipiente, até peso constante. Esfriar à temperatura ambiente, recolocar a tampa e outras partes correspondentes e pesar novamente. A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo. Determinar os volumes individuais correspondentes (V), em ml, utilizando a expressão:

$$V = \frac{m}{\rho}$$

em que

m = peso do conteúdo, em g;

ρ = densidade de massa do produto, em g/ml, determinada a 20 °C, conforme descrito em *Determinação de massa e densidade relativa* (V.2.5).

A partir dos valores obtidos, determinar o volume médio das unidades testadas. O volume médio não é inferior ao volume declarado e o volume individual de nenhuma das unidades testadas é inferior a 95,0% do volume declarado.

Produtos líquidos em recipientes para doses múltiplas obtidos a partir de pós para reconstituição (exceto injetáveis)

Separar 10 unidades. Reconstituir cada unidade conforme indicado no rótulo. Proceder conforme descrito em *Produtos líquidos em recipientes para doses múltiplas (exceto injetáveis)*.

A partir dos valores obtidos, determinar o volume médio das unidades testadas. O volume médio não é inferior ao volume declarado e o volume individual de nenhuma das unidades testadas é inferior a 95,0% ou superior a 110,0% do volume declarado.

Produtos líquidos em recipientes para dose única (exceto injetáveis)

Separar 10 unidades. Verter, separadamente, o conteúdo de cada unidade em provetas secas calibradas de capacidade que não exceda 2,5 vezes o volume a ser medido, tomando precauções para evitar a formação de bolhas. Deixar o líquido escoar por 5 segundos, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual. Efetuar a medição.

A partir dos valores obtidos, determinar o volume médio das unidades testadas. O volume médio não é inferior ao volume declarado, e o volume individual de nenhuma das unidades testadas é inferior a 95,0% ou superior a 110,0% do volume declarado.

Produtos líquidos injetáveis

O teste se aplica a produtos líquidos injetáveis acondicionados em recipientes como ampolas, cartuchos ou seringas pré-carregadas. Os recipientes são preenchidos com pequeno excesso volume, de acordo com as características do produto, para permitir a administração do volume declarado. Os excessos de volume recomendados na Tabela 1 geralmente são suficientes para permitir a retirada e a administração do volume declarado.

Tabela 1 – Excesso de volume recomendado para produtos líquidos injetáveis.

Volume declarado (ml)	Excesso de volume recomendado	
	móveis / ml	viscosos / ml
0,5	0,10	0,12
1,0	0,10	0,15
2,0	0,15	0,25
3,0	0,20	0,35
4,0	0,25	0,45
5,0	0,30	0,50
10,0	0,50	0,70
20,0	0,60	0,90
30,0	0,80	1,20
50,0 ou mais	2%	3%

Suspensões e emulsões devem ser agitadas antes da retirada do conteúdo e antes da determinação da densidade. Preparações oleosas ou muito viscosas podem ser aquecidas, se necessário, segundo as indicações do rótulo ou a 37 °C, e agitadas vigorosamente antes da retirada do conteúdo. Os conteúdos são então esfriados entre 20 °C e 25 °C antes da medição do volume.

Para injetáveis em recipientes para dose única, testar 6 unidades se o volume declarado é igual ou superior a 10 ml, 10 unidades se o volume declarado é superior a 3 ml e inferior a 10 ml, ou 12 unidades se o volume declarado é igual ou inferior a 3 ml. Remover o conteúdo total de cada unidade com auxílio de seringa de capacidade que não exceda 3 vezes o volume a ser medido, munida de agulha número 21 com não menos que 2,5 cm de comprimento. Eliminar bolhas eventualmente existentes na agulha e na seringa e transferir o conteúdo da seringa, sem esvaziar a agulha, para proveta seca calibrada de capacidade que não exceda 2,5 vezes o volume a ser medido. Alternativamente, o conteúdo da seringa pode ser transferido para béquero seco tarado, sendo o volume calculado pelo peso do líquido, em gramas, dividido pela sua densidade. Para recipientes com volume declarado de 2 ml ou menos, os conteúdos dos recipientes podem ser reunidos para obter o volume necessário para a medição, devendo-se utilizar seringas e agulhas secas separadas para cada recipiente. O conteúdo de recipientes com volume declarado de 10 ml ou mais pode ser determinado esvaziando-se o conteúdo de cada recipiente diretamente em provetas calibradas ou béqueres tarados.

O volume de cada recipiente examinado não é inferior ao volume declarado. No caso de recipientes com volume declarado de 2 ml ou menos, o volume dos conteúdos reunidos não é inferior à soma dos volumes declarados dos recipientes utilizados no teste.

Para injetáveis em recipientes para doses múltiplas rotulados para conter um número específico de doses de um determinado volume, selecionar uma unidade e proceder conforme descrito para injetáveis em recipientes para dose única, utilizando número de seringas e agulhas separadas equivalente ao número de doses especificadas no rótulo. O volume dispensado por cada seringa não é inferior ao volume declarado por dose.

Para injetáveis em cartuchos ou seringas pré-carregadas, testar uma unidade se o volume declarado é igual ou superior a 10 ml, 3 unidades se o volume declarado é superior a 3 ml e inferior a 10 ml ou 5 unidades se o volume declarado é igual ou inferior a 3 ml. Ajustar aos recipientes os acessórios necessários para sua utilização (agulha, êmbolo, corpo de seringa), quando for o caso, e transferir o conteúdo de cada recipiente, sem esvaziar a agulha, para béquero seco tarado, empurrando o êmbolo lenta e regularmente. Calcular o volume, em mililitros, dividindo o peso do líquido, em gramas, pela sua densidade. O volume de cada recipiente não é inferior ao volume declarado.

Para preparações injetáveis de grande volume (infusões parenterais), selecionar duas unidades e transferir o conteúdo de cada recipiente para provetas secas calibradas de capacidade que não exceda 2,5 vezes o volume a ser medido. O volume de cada recipiente não é inferior ao volume declarado.

V.1.3 DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA MECÂNICA EM COMPRIMIDOS

Os testes de resistência mecânica, tais como dureza e friabilidade, são considerados oficiais dentro do contexto legal desta Farmacopéia, constituindo-se em elementos úteis na avaliação da qualidade integral dos comprimidos. Estes testes visam demonstrar a resistência dos comprimidos à ruptura provocada por quedas ou fricção.

V.1.3.1 TESTE DE DUREZA

O teste de dureza permite determinar a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. A dureza de um comprimido é proporcional à força de compressão e inversamente proporcional à sua porosidade. O teste se aplica, unicamente, a comprimidos não-revestidos.

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 newtons (N). Para a dureza de comprimidos, o mínimo aceitável é 30 N (aproximadamente 3 kgf).

APARELHAGEM

Podem ser utilizados diferentes tipos de aparelhos, os quais diferem basicamente quanto ao mecanismo empregado para exercer a pressão. A força pode ser exercida manualmente ou mecanicamente. À medida que a pressão aumenta, um êmbolo, uma placa ou um pistão aplica determinada força sobre o comprimido, apoiado em base fixa. O aparelho é calibrado com precisão de 1 N.

PROCEDIMENTO

O teste é realizado com 10 comprimidos, eliminando qualquer resíduo superficial antes de cada determinação. Os comprimidos são testados, individualmente, obedecendo sempre à mesma orientação (considerar a forma, presença de ranhura e gravação). Nenhuma unidade apresenta dureza inferior a 30 N.

V.1.3.2 TESTE DE FRIABILIDADE

O teste de friabilidade permite determinar a resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. O teste se aplica, unicamente, a comprimidos não-revestidos.

O teste consiste em pesar com exatidão um número determinado de comprimidos, submetê-los à ação do aparelho e retirá-los depois de efetuadas 100 rotações. Após remover qualquer resíduo de pó dos comprimidos, eles são novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final representa a friabilidade, medida em função da porcentagem de pó perdido.

APARELHAGEM

O aparelho (Figura 1) consiste de um cilindro rotativo, com $287,0 \pm 4,0$ mm de diâmetro e $38,0 \pm 2,0$ mm de profundidade, constituído de polímero sintético transparente com faces internas polidas de baixa atividade estática, o qual gira em torno de seu eixo a uma velocidade de 25 ± 1 rotações por minuto. Uma das faces do cilindro é removível. Os comprimidos são recolhidos a cada volta do cilindro por uma projeção curva com raio interno de $80,5 \pm 5,0$ mm que se estende do centro à parede externa do cilindro, e levados a uma altura de $156,0 \pm 2,0$ mm, de onde caem repetidamente.

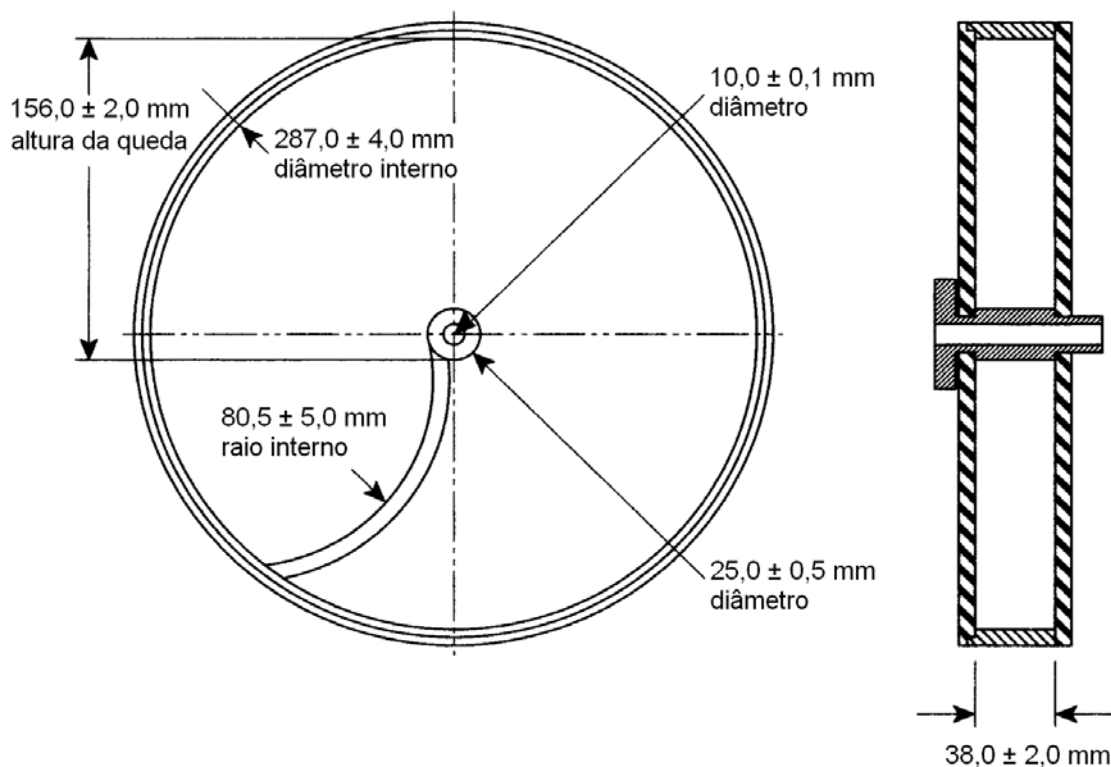


Figura 1 – Aparelho para teste de friabilidade (friabilômetro).

PROCEDIMENTO

Para comprimidos com peso médio igual ou inferior a 0,65 g, utilizar 20 comprimidos. Para comprimidos com peso médio superior a 0,65 g, utilizar 10 comprimidos. Pesar, com exatidão, os comprimidos, introduzi-los no aparelho. Ajustar a velocidade para 25 rotações por minuto e o tempo de teste para 4 minutos. Decorrido o prazo, remover qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos e pesar novamente. Nenhum comprimido pode apresentar-se, ao final do teste, quebrado, lascado, rachado ou partido. São considerados aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso ou a porcentagem estabelecida na monografia. Se o resultado for duvidoso ou se a perda for superior ao limite especificado, repetir o teste por mais duas vezes, considerando-se, na avaliação, o resultado médio das três determinações.

V.1.4 TESTES DE DESINTEGRAÇÃO

V.1.4.1 TESTE DE DESINTEGRAÇÃO PARA COMPRIMIDOS E CÁPSULAS

O teste de desintegração permite verificar se comprimidos e cápsulas se desintegram dentro do limite de tempo especificado, quando seis unidades do lote são submetidas à ação de aparelhagem específica sob condições experimentais descritas.

O teste se aplica a comprimidos não-revestidos, revestidos com filme ou com revestimento açucarado (drágeas), comprimidos com revestimento entérico, comprimidos sublinguais, comprimidos solúveis, comprimidos dispersíveis, cápsulas duras e cápsulas moles. Pode ser aplicado a comprimidos mastigáveis, nesse caso as condições e critérios de avaliação constarão na monografia individual. O teste não se aplica a pastilhas e comprimidos ou cápsulas de liberação controlada (prolongada).

A desintegração é definida, para os fins desse teste, como o estado no qual nenhum resíduo das unidades testadas (cápsulas ou comprimidos) permanece na tela metálica do aparelho de desintegração,

salvo fragmentos insolúveis de revestimento de comprimidos ou invólucros de cápsulas. Consideram-se, também, como desintegradas as unidades que durante o teste se transformam em massa pastosa, desde que não apresentem núcleo palpável.

APARELHAGEM

Consiste de sistema de cestas e tubos (Figura 1), de recipiente apropriado para o líquido de imersão (um béquer com capacidade de 1 litro), de termostato para manter o líquido a 37 ± 1 °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 $77,5 \pm 2,5$ mm, diâmetro interno entre 20,7 mm e 23,0 mm e espessura das paredes aproximadamente 2 mm.

Os tubos são mantidos verticalmente, adaptando-se em cada extremidade da cesta um disco de material transparente adequado, com diâmetro entre 88,0 mm e 92,0 mm e espessura entre 5,0 mm e 8,5 mm, possuindo seis orifícios nos quais são introduzidos os tubos. Os seis orifícios eqüidistam do centro de cada disco, estando igualmente espaçados. Na face externa do disco inferior encontra-se uma tela de arame (diâmetro de $0,635 \pm 0,030$ mm) de aço inoxidável, com abertura entre 1,8 mm e 2,2 mm, presa por meio de três parafusos.

Para o teste de desintegração de cápsulas, uma tela de arame de aço inoxidável, semelhante àquela adaptada ao disco inferior da cesta, ou outro dispositivo adequado pode ser adaptado à face externa do disco superior para evitar que as cápsulas escapem dos tubos durante o teste.

As partes que constituem a cesta são montadas e mantidas firmemente unidas mediante eixo metálico central, com diâmetro de cerca de 5 mm. A extremidade superior do eixo 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 transparente adequado, com densidade relativa entre 1,18 e 1,20, diâmetro de $20,70 \pm 0,15$ mm, e espessura de $9,50 \pm 0,15$ mm. Cada disco possui cinco orifícios, cada um com 2 mm de diâmetro, sendo um orifício no eixo do cilindro e os outros quatro eqüidistantes, dispostos sobre um círculo de 6 mm de raio relativo ao centro do disco. A superfície lateral do disco possui quatro moedas eqüidistantes, com profundidade de $2,6 \pm 0,1$ mm, em forma de V, as quais, no lado superior do disco, medem $9,4 \pm 0,2$ 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.

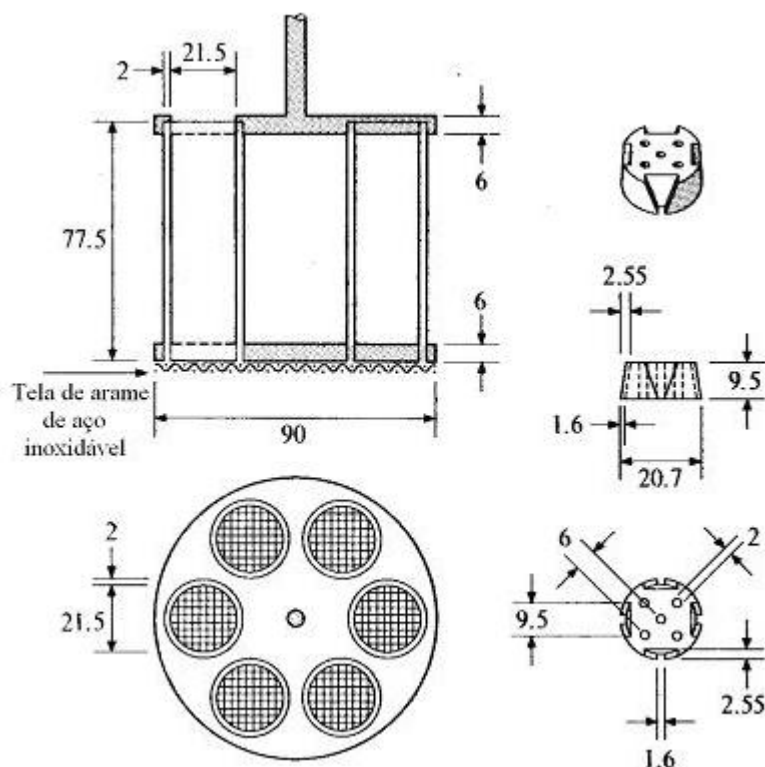


Figura 1 – Aparelho para teste de desintegração de comprimidos e cápsulas (dimensões em mm).

PROCEDIMENTO

Comprimidos não-revestidos

Utilizar seis comprimidos no teste. Colocar um comprimido em cada um dos seis tubos da cesta, adicionar um disco a cada tubo e acionar o aparelho, utilizando água mantida a 37 ± 1 °C como líquido de imersão, a menos que outro líquido 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. Se os comprimidos não se desintegrarem devido à aderência aos discos, repetir o teste com seis outros comprimidos, omitindo os discos. Ao final do teste, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados. O limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração de comprimidos não-revestidos é de 30 minutos, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

Comprimidos com revestimento açucarado (drágeas) ou revestidos com filme

Utilizar seis comprimidos no teste. Colocar um comprimido em cada um dos seis tubos da cesta. Colocar um disco em cada tubo e acionar o aparelho, utilizando água mantida a 37 ± 1 °C, como líquido de imersão. Ao final do intervalo de tempo especificado, cessar o movimento da cesta e observar o material em cada um dos tubos. Se os comprimidos não estiverem completamente desintegrados, testar outros seis comprimidos, substituindo a água por ácido clorídrico 0,1 M, mantido a 37 ± 1 °C, como líquido de imersão. 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. Se os comprimidos não se desintegrarem devido à aderência aos discos, repetir o teste com seis outros comprimidos, omitindo os discos. Ao final do teste, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados. O limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração de comprimidos revestidos com filme é de 30 minutos, e para comprimidos com revestimento açucarado (drágeas) é de 60 minutos, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

Comprimidos com revestimento entérico (gastro-resistentes)

Utilizar seis comprimidos no teste. Colocar um comprimido em cada um dos seis tubos da cesta. Acionar o aparelho, sem adicionar os discos, utilizando ácido clorídrico 0,1 M mantido a 37 ± 1 °C como líquido de

imersão, por 60 minutos ou o tempo especificado na monografia individual. Cessar o movimento da cesta e observar os comprimidos. Nenhuma unidade pode apresentar qualquer sinal de desintegração, rachadura ou amolecimento, que possibilite o extravasamento do seu conteúdo. Colocar um disco em cada tubo e acionar o aparelho, utilizando solução tampão fosfato pH 6,8 mantido a 37 ± 1 °C como líquido de imersão. Decorridos 45 minutos ou o tempo especificado na monografia, 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. Se os comprimidos não se desintegrarem devido à aderência aos discos, repetir o teste com seis outros comprimidos, omitindo os discos. Ao final do teste, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados.

Comprimidos sublinguais

Realizar o teste conforme descrito para *Comprimidos não-revestidos*, omitindo o uso de discos. Após 5 minutos, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados.

Comprimidos solúveis e comprimidos dispersíveis

Realizar o teste conforme descrito para *Comprimidos não-revestidos*, utilizando água mantida entre 15 °C e 25 °C, como líquido de imersão. Após 3 minutos, todos os comprimidos devem estar completamente desintegrados.

Cápsulas gelatinosas (duras)

Realizar o teste conforme descrito para *Comprimidos não-revestidos*, omitindo o uso dos discos. Utilizar uma tela com abertura de 1,8 mm a 2,2 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, na tela, apenas fragmentos insolúveis de consistência mole.

Cápsulas moles

Realizar o teste conforme descrito para *Comprimidos não-revestidos*, utilizando os discos. Observar as cápsulas após 30 minutos ou conforme especificado na monografia do medicamento. Todas as cápsulas devem estar completamente desintegradas, ou restando, na tela, apenas fragmentos insolúveis de consistência mole. Se as cápsulas não se desintegrarem devido à aderência aos discos, repetir o teste com seis outras unidades, omitindo os discos. Ao final do teste, todas as cápsulas devem estar completamente desintegradas.

V.1.4.2 TESTE DE DESINTEGRAÇÃO DE SUPOSITÓRIOS, ÓVULOS E COMPRIMIDOS VAGINAIS

Este teste permite verificar a maior ou menor capacidade dessas formas farmacêuticas de amolecerem ou se desagregarem em meio líquido, no espaço de tempo prescrito.

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.

APARELHAGEM

A aparelhagem (Figura 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 bquer de, pelo menos, 4 litros de capacidade, contendo água à temperatura de 36 °C a 37 °C, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual. O bquer é provido de agitador que opere em velocidade lenta e dispositivo que permita inverter o cilindro sem retirá-lo da água.

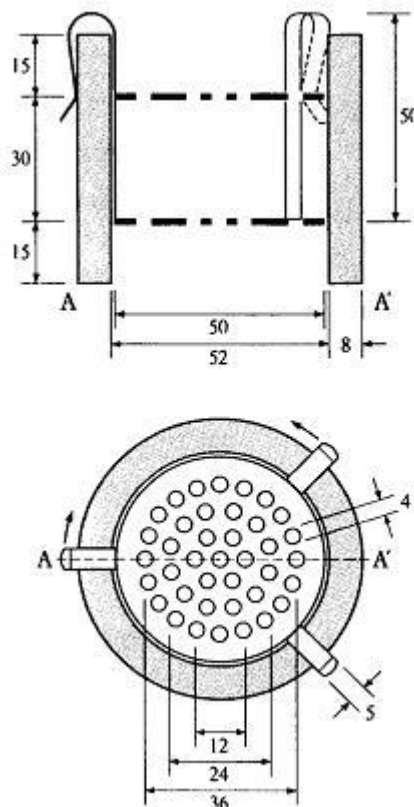


Figura 1 – Aparelho para teste de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais (dimensões em mm).

PROCEDIMENTO

Supositórios e óvulos

Utilizar três supositórios ou óvulos. Colocar cada um deles sobre o disco inferior do dispositivo, introduzir e fixar o disco no interior do cilindro. Inverter o aparelho a cada 10 minutos. Examinar as amostras depois de decorrido o tempo prescrito na monografia. O teste é considerado satisfatório se todas as amostras se apresentarem desintegradas. O limite de tempo estabelecido como critério geral para a desintegração é de 30 minutos para supositórios, óvulos e comprimidos vaginais com base hidrofóbica, e de 60 minutos para supositórios com base hidrofílica, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

Comprimidos vaginais

Utilizar o aparelho descrito em *Desintegração de supositórios e óvulos*, montado conforme Figura 2. Introduzir o cilindro em bquer de diâmetro adequado contendo água entre 36 °C e 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 depois de decorrido o tempo prescrito na monografia. O teste é considerado satisfatório se todas as amostras se apresentarem desintegradas.

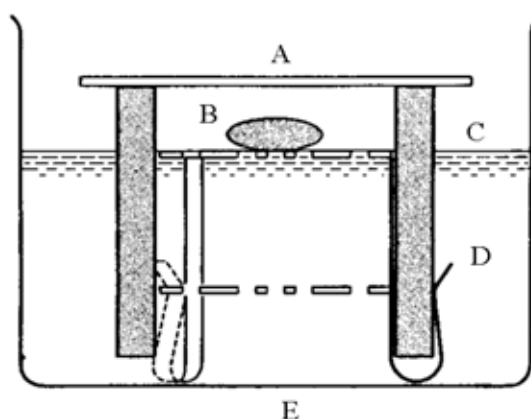


Figura 2 – Aparelho para teste de desintegração de supositórios, óvulos e comprimidos vaginais. A, placa de vidro; B, comprimido vaginal; C, superfície da água; D, água; E, fundo do recipiente.

V.1.5 TESTE DE DISSOLUÇÃO

O teste de dissolução permite determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais descritas. O resultado é expresso em porcentagem da quantidade declarada no rótulo. O teste visa demonstrar se o produto atende às exigências constantes da monografia do medicamento para comprimidos, cápsulas e outros casos em que o teste seja requerido.

APARELHAGEM

O aparelho de dissolução consiste em um sistema de três componentes, descritos a seguir.

(1) Recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico (cubas), feitos em vidro boro silicato, plástico ou outro material transparente e inerte, aos quais pode ser adaptada tampa de material inerte, com aberturas adequadas para o agitador, coleta de amostras e inserção de termômetro. As cubas podem apresentar as seguintes dimensões e capacidades: 185 ± 25 mm de altura e 102 ± 4 mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de um litro; 290 ± 10 mm de altura e 102 ± 4 mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de dois litros; 290 ± 10 mm de altura e 150 ± 5 mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de quatro litros.

(2) Hastes em aço inoxidável para prover agitação do meio, que podem apresentar-se sob duas formas: cestas (*Método 1*) ou pás (*Método 2*) (Figuras 1 e 2). A haste deve ser centralizada de tal forma que, ao ser acionada, seu eixo de rotação não se afaste mais de 2 mm em relação ao eixo vertical do recipiente contendo o meio de dissolução.

(3) Um motor que permita ajustar a velocidade de rotação da haste àquela especificada na monografia individual, mantendo-a dentro dos limites de $\pm 4\%$. A rotação não deve produzir efeitos indesejáveis na hidrodinâmica do sistema.

As cubas são imersas em banho de água termostatizado, de material transparente e tamanho adequado, em que a temperatura seja mantida a $37 \pm 0,5$ °C durante a execução do teste. O aparelho deve ser isento de qualquer fonte de vibração, inclusive externa, que possa influir na hidrodinâmica do sistema. De preferência, o aparelho deve permitir a visualização das amostras e dos agitadores durante o teste.

Método 1: Cestas

Quando especificado na monografia, utiliza-se como agitador uma haste de aço inoxidável, em cuja extremidade se adapta uma cesta do mesmo material (Figura 1). A tela padrão utilizada na confecção da cesta possui diâmetro de fio de 0,25 mm e abertura de malha quadrada de $0,40 \pm 0,04$ mm (mesh 40), salvo especificação em contrário na monografia individual. A amostra deve ser colocada dentro da cesta seca, antes do início do teste. Durante sua execução, uma distância de 25 ± 2 mm deve ser mantida entre a parte inferior da cesta e o fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução.

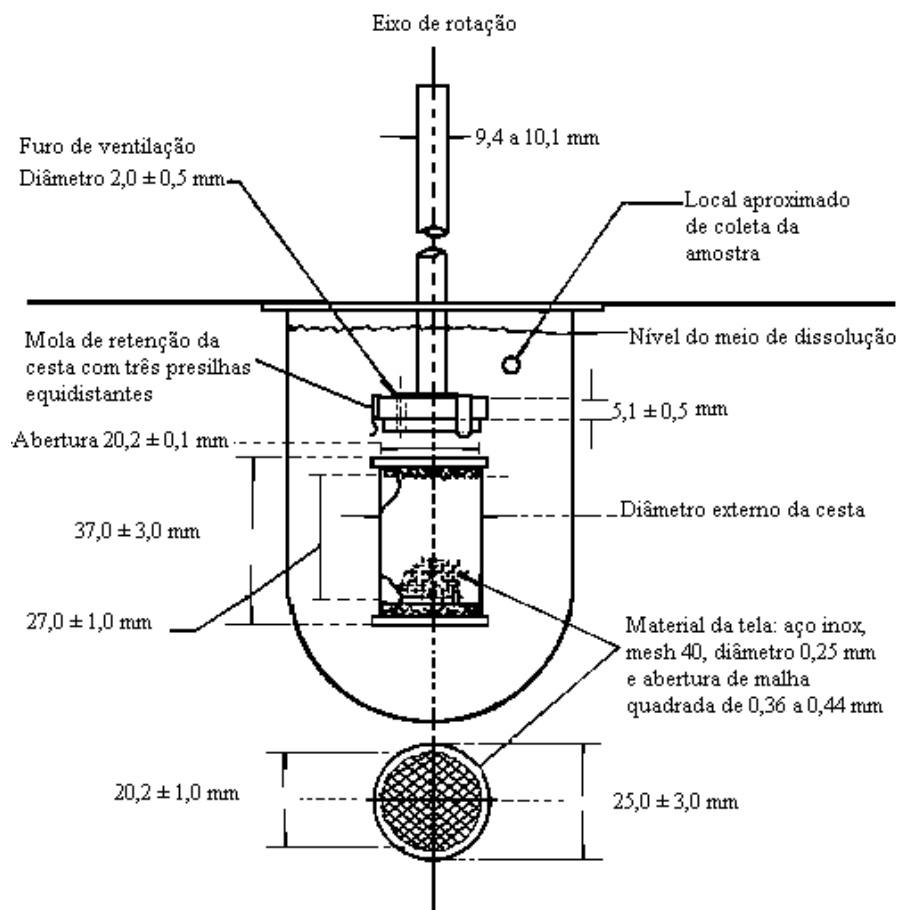


Figura 1 – Método 1 (Cestas). A cesta e a cuba não estão na mesma proporção.

Método 2: Pás

Quando especificado na monografia, utiliza-se como agitador uma haste de aço inoxidável, revestida ou não de material inerte, cuja extremidade apresenta a forma de pá (Figura 2), capaz de girar suavemente e sem desvio de eixo durante o tempo e velocidade especificados na monografia correspondente. A amostra deve ser adicionada, sempre que possível, antes do início do teste. Durante sua execução, uma distância de 25 ± 2 mm deve ser mantida entre o extremo inferior das pás e o fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução.

É importante que as amostras não flutuem no meio de dissolução. No caso de cápsulas, pode-se recorrer a um dispositivo apropriado, confeccionado em fio de aço espiralado em poucas voltas e em diâmetro suficiente para aprisionar a cápsula sem deformá-la nem reduzir a área de contato com o meio.

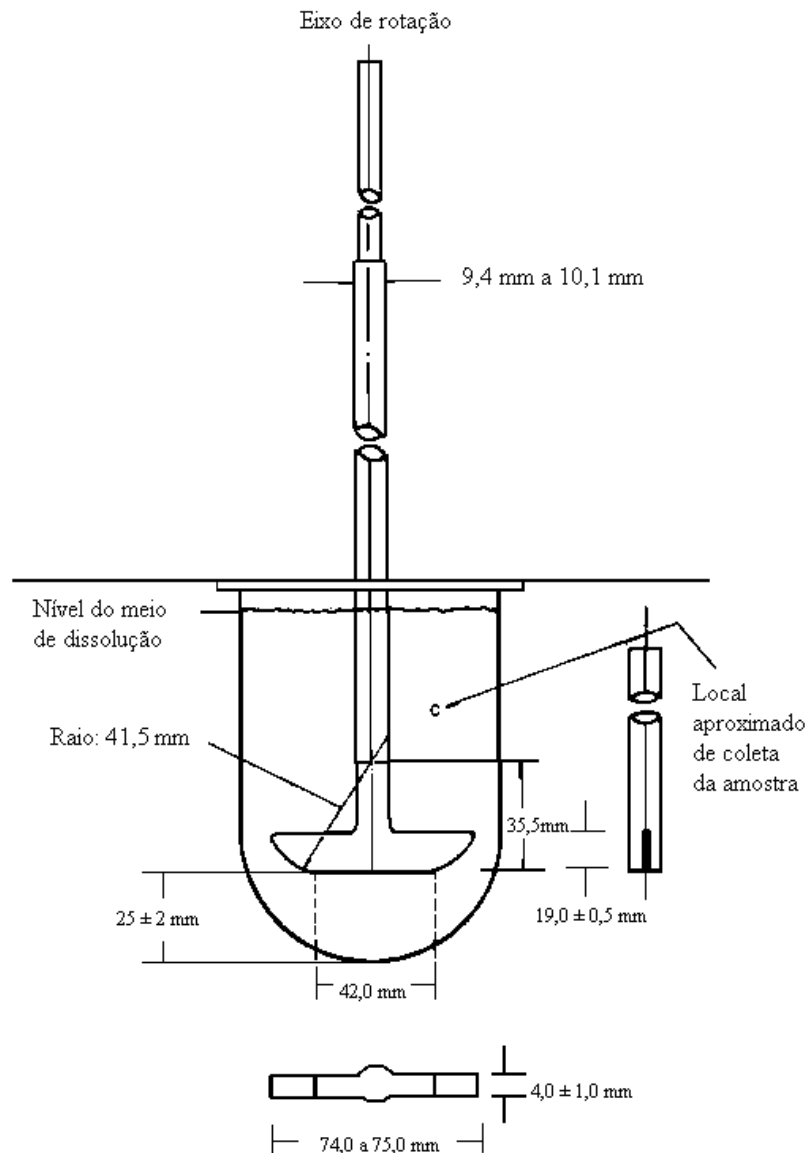


Figura 2 – Método 2 (Pás). A pá e a cuba não estão na mesma proporção.

MEIO DE DISSOLUÇÃO

Utiliza-se o meio de dissolução especificado na monografia do produto, previamente desgaseificado por procedimento conveniente, quando necessário, para evitar a formação de bolhas que possam interferir na velocidade de dissolução a ser medida. 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 substância ativa estabelecida na mesma. Quando mais de um tempo for especificado na monografia, devem ser tomadas alíquotas, adequadamente medidas, ao final de cada tempo indicado.

PROCEDIMENTO

Montar e verificar a aparelhagem conforme especificações mencionadas anteriormente, a fim de reduzir, ao mínimo, fatores que alterem significativamente a hidrodinâmica do sistema (desvio de eixo, vibração, etc.). Adicionar o volume medido do *Meio de dissolução* especificado na monografia do produto, convenientemente desgaseificado, caso necessário, ao recipiente da aparelhagem de dissolução. Manter a temperatura do meio a $37 \pm 0,5$ °C, retirando o termômetro antes de iniciar a agitação. No caso do *Método*

1, colocar a amostra dentro da cesta seca. No caso do *Método 2*, colocar a amostra dentro do recipiente de dissolução, como descrito anteriormente. Em ambos os casos, ao observar formação de bolhas na superfície das amostras, quando em contato com o meio de dissolução, verificar sua influência no resultado. Iniciar imediatamente a agitação, conforme velocidade pré-fixada. Em intervalo(s) de tempo especificado(s) na monografia do produto, retirar alíquota para análise da região intermédia entre a superfície do meio de dissolução e a parte superior do cesto ou pás, a não menos que 1 cm da parede interna do recipiente (Figuras 1 e 2). Durante a retirada da alíquota, manter a agitação. Filtrar imediatamente as amostras, caso não esteja utilizando filtros acoplados ao sistema de amostragem. Os filtros empregados devem ser inertes, não adsorver porção significativa do fármaco e possuir porosidade adequada. De acordo com o especificado na monografia do produto, o volume de amostra retirado pode ou não ser reposto. Se necessária a reposição, o mesmo meio de dissolução aquecido a 37 °C deve ser utilizado. Caso a reposição do meio de dissolução não seja realizada, corrigir o volume nos cálculos. Após filtração e diluição (quando necessário) da alíquota, a quantificação do fármaco é efetuada mediante a técnica indicada na monografia do produto. Repetir o teste com doses unitárias adicionais, conforme necessário, considerando os *Critérios de aceitação*.

Caso algum componente da gelatina da cápsula interfira na análise, esvaziá-la de qualquer resíduo de seu conteúdo e testá-la no mesmo volume de meio de dissolução especificado, efetuando a análise conforme as exigências descritas na monografia do produto. Qualquer interferência assim constatada deve ser corrigida ao se calcular os resultados. Correções superiores a 25% tornam o teste inválido.

CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO

O produto cumpre o teste se os resultados preencherem as exigências descritas na Tabela 1, salvo especificação em contrário na monografia individual.

Tabela 1 – Critérios de aceitação para o teste de dissolução

<i>Estágios</i>	<i>Nº. de amostras testadas</i>	<i>Critérios de aceitação</i>
E_1	06	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q + 5\%$
E_2	06	Média de 12 unidades ($E_1 + E_2$) é igual ou maior que Q e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$.
E_3	12	Média de 24 unidades ($E_1 + E_2 + E_3$) é igual ou maior do que Q , não mais que duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$.

O termo Q corresponde à quantidade dissolvida de fármaco, especificada na monografia individual, expressa como porcentagem da quantidade declarada. Os valores 5%, 15% e 25% também representam porcentagens da quantidade declarada.

Em circunstâncias especiais, a porcentagem máxima de dissolução deve ser estabelecida experimentalmente. Nesses casos, assegurar um valor de Q^∞ (quantidade dissolvida em tempo infinito) verificando que duas dosagens consecutivas não diferem entre si mais de 2% após 10 minutos.

Estágio E_1

No *Estágio E_1* são testadas seis unidades. Se cada unidade, individualmente, apresenta resultado igual ou maior do que $Q + 5\%$, o produto está em conformidade com o especificado, não sendo necessário efetuar o *Estágio E_2* .

Estágio E_2

Caso o critério para o *Estágio E_1* não seja atendido, repetir o teste com mais seis unidades. Se a média das doze unidades testadas (*Estágios E_1 e E_2*) é maior ou igual a Q e se nenhuma das unidades testadas apresenta resultado inferior a $Q - 15\%$, o produto está em conformidade com o especificado, não sendo necessário efetuar o *Estágio E_3* .

Estágio E_3

Caso o critério para o *Estágio E_2* ainda não seja atendido, repetir o teste com mais 12 unidades. Se a média das 24 unidades testadas (*Estágios E_1 , E_2 e E_3*) é maior ou igual a Q , no máximo duas unidades

apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$, o produto está em conformidade com o especificado. Caso o critério para o *Estágio E₃* ainda não seja atendido, o produto é considerado insatisfatório.

V.1.6 UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS

Para assegurar a administração de doses corretas, cada unidade do lote de um medicamento deve conter quantidade do componente ativo próxima da quantidade declarada. O teste de uniformidade de doses unitárias permite avaliar a quantidade de componente ativo em unidades individuais do lote e verificar se esta quantidade é uniforme nas unidades testadas. As especificações deste teste se aplicam às formas farmacêuticas com um único fármaco ou com mais de um componente ativo. A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, o teste se aplica, individualmente, a cada componente ativo do produto.

A uniformidade das doses unitárias de formas farmacêuticas pode ser avaliada por dois métodos: *Variação de peso* e *Uniformidade de Conteúdo*. A aplicação de cada método considerando a forma farmacêutica, dose e proporção do fármaco é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Aplicação do método de *Uniformidade de Conteúdo* (UC) ou de *Variação de peso* (VP) de acordo com a forma farmacêutica, dose e proporção do fármaco.

Forma Farmacêutica	Tipo	Subtipo	Dose e proporção do fármaco	
			≥ 25 mg e ≥ 25%	< 25 mg ou < 25%
Comprimidos	não-revestido		VP	UC
	revestido	filme	VP	UC
		outros	UC	UC
Cápsulas	dura		VP	UC
	mole	suspensões, emulsões ou géis	UC	UC
		soluções	VP	VP
Sólidos acondicionados em recipientes para dose única	componente único		VP	VP
	múltiplos componentes	solução liofilizada no recipiente final	VP	VP
		outros	UC	UC
Soluções acondicionadas em recipientes para dose única			VP	VP
Outros			UC	UC

O método de *Uniformidade de Conteúdo* para preparações em doses unitárias baseia-se no doseamento do conteúdo individual do componente ativo de um número de doses unitárias para determinar se o conteúdo individual está dentro dos limites especificados. O método de *Uniformidade de Conteúdo* pode ser aplicado em todos os casos.

O método de *Variação de peso* pode ser aplicado às seguintes formas farmacêuticas:

- (1) soluções acondicionadas em recipientes para dose única e em cápsulas moles;
- (2) sólidos (incluindo pós, grânulos e sólidos estéreis) acondicionados em recipientes para dose única que não contêm outras substâncias adicionadas, sejam elas ativas ou inativas;
- (3) sólidos (incluindo sólidos estéreis) acondicionados em recipientes para dose única, contendo ou não substâncias ativas ou inativas adicionadas, que tenham sido preparados a partir de soluções homogêneas liofilizadas nos recipientes finais, e sejam rotulados de modo a indicar este modo de preparação;
- (4) cápsulas duras, comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme, contendo 25 mg ou mais da substância ativa compreendendo 25% ou mais, em peso, da dose unitária ou, no caso de cápsulas duras, o conteúdo da cápsula, exceto que a uniformidade de outras substâncias ativas presentes em menores proporções deve ser demonstrada pelo método de *Uniformidade de Conteúdo*.

O método de *Uniformidade de Conteúdo* é exigido para todas as formas farmacêuticas que não atendem às condições especificadas para aplicação do método de *Varição de peso*.

UNIFORMIDADE DE CONTEÚDO

Para determinar a uniformidade de doses unitárias pelo método de uniformidade de conteúdo separar, no mínimo, 30 unidades e proceder conforme descrito para as formas farmacêuticas indicadas. Quando a quantidade de componente ativo de uma dose unitária for diferente do especificado no doseamento, fazer os ajustes de diluição das soluções e/ou o volume das alíquotas de modo a obter a concentração do componente ativo na solução final semelhante à do doseamento. No caso de doseamento por titulação, utilizar titulante com concentração diferente, se necessário, para consumo de volume adequado de titulante. Considerar qualquer modificação das diluições para efetuar os cálculos.

Quando houver procedimento especial para o teste de uniformidade de conteúdo na monografia individual, fazer a correção necessária dos resultados obtidos conforme descrito a seguir.

1. Pesar quantidade de unidades do produto suficiente para efetuar o doseamento e o procedimento especial do teste de uniformidade de conteúdo apresentados na monografia individual. Reduzir os comprimidos a pó fino (ou misturar os conteúdos das cápsulas, soluções, suspensões, emulsões, géis ou sólidos em recipientes para dose única) para obter mistura homogênea. Se não for possível obter mistura homogênea desta forma, usar solventes apropriados ou outros procedimentos para obter solução contendo o fármaco. Empregar alíquotas apropriadas desta solução para os ensaios especificados.

2. Analisar, separadamente, porções da amostra, medidas com precisão, conforme o procedimento indicado para o doseamento (*D*) e o procedimento especial indicado para uniformidade de conteúdo (*E*), descritos na monografia individual.

3. Calcular a quantidade de fármaco por peso médio utilizando os resultados obtidos pelo procedimento de doseamento (*D*) e pelo procedimento especial (*E*).

4. Calcular o fator de correção (*F*) segundo a equação:

$$F = D/E$$

em que

D = quantidade do componente ativo por peso médio da forma farmacêutica obtida pelo procedimento de doseamento;

E = quantidade do componente ativo por peso médio da forma farmacêutica obtida pelo procedimento especial.

Se $(100|D - E|)/D$ for superior a 10, não é válido o uso de *F*.

5. Se *F* estiver entre 0,970 e 1,030, não há necessidade de correção.

6. A correção será aplicada quando o valor de *F* estiver entre 0,900 e 0,970 e entre 1,030 e 1,100 e deve ser efetuada calculando-se a quantidade do fármaco em cada unidade, multiplicando-se as quantidades obtidas no procedimento especial pelo fator de correção *F*.

Formas farmacêuticas sólidas

Analisar, individualmente, 10 unidades conforme indicado na monografia individual para o doseamento, a menos que um procedimento especial para uniformidade de conteúdo seja descrito na monografia. Calcular o *Valor de Aceitação (VA)*.

Formas farmacêuticas líquidas

Analisar, individualmente, 10 unidades conforme indicado na monografia individual para o doseamento, a menos que um procedimento especial para uniformidade de conteúdo seja descrito na monografia. Conduzir o teste, individualmente, em quantidade homogênea do material que é removida de cada recipiente em condições normais de uso. Expressar o resultado como quantidade dispensada por unidade. Calcular o *Valor de Aceitação (VA)*.

Valor de Aceitação para Uniformidade de Conteúdo

Calcular o *Valor de Aceitação (VA)* segundo a equação:

$$VA = |M - \bar{X}| + ks$$

cujos termos são definidos na Tabela 2.

VARIAÇÃO DE PESO

Para determinar a uniformidade de doses unitárias pelo método de variação de peso separar, no mínimo, 30 unidades e proceder conforme descrito para as formas farmacêuticas indicadas. A quantidade de fármaco por unidade é estimada a partir do resultado do doseamento e dos pesos individuais, assumindo-se distribuição homogênea do componente ativo. As quantidades individuais estimadas (x_i) são calculadas segundo a equação:

$$x_i = p_i \times A/P$$

em que

p_i = pesos individuais das unidades ou dos conteúdos das unidades testadas;

A = quantidade de componente ativo, expressa em porcentagem da quantidade declarada, determinada no doseamento;

P = peso médio das unidades utilizadas no doseamento.

Comprimidos não-revestidos ou revestidos com filme

Pesar, exatamente e individualmente, 10 comprimidos. A partir do resultado do doseamento e do peso individual de cada comprimido, estimar a quantidade de componente ativo em cada unidade e expressar os resultados individuais em porcentagem da quantidade declarada. Calcular o *Valor de Aceitação (VA)*.

Cápsulas duras

Pesar, exatamente e individualmente, 10 cápsulas, preservando a identidade de cada uma. Remover, cuidadosamente, o conteúdo e pesar as cápsulas vazias. Calcular o peso do conteúdo de cada cápsula e, a partir do resultado do doseamento, estimar a quantidade de componente ativo em cada cápsula. Expressar os resultados individuais em porcentagem da quantidade declarada. Calcular o *Valor de Aceitação (VA)*.

Cápsulas moles

Pesar, exatamente e individualmente, 10 cápsulas, preservando a identidade de cada uma. Cortar as cápsulas com lâmina e retirar o conteúdo, lavando os invólucros com solvente adequado. Deixar os invólucros à temperatura ambiente, por 30 minutos, para completa evaporação do solvente, tomando precauções para evitar adição ou perda de umidade. Pesar as cápsulas vazias e calcular o peso do conteúdo de cada cápsula. Estimar a quantidade de componente ativo em cada cápsula a partir do resultado do doseamento e do peso do conteúdo de cada cápsula. Calcular o *Valor de Aceitação (VA)*.

Formas farmacêuticas sólidas (exceto comprimidos e cápsulas)

Proceder como indicado em *Cápsulas duras*. Calcular o *Valor de Aceitação*.

Formas farmacêuticas líquidas

Pesar, exatamente e individualmente, a quantidade de líquido que é removida de cada um de 10 recipientes em condições normais de uso. Se necessário, calcular o volume equivalente do conteúdo removido após a determinação da densidade. Estimar a quantidade de componente ativo em cada recipiente a partir do resultado do doseamento e do peso do conteúdo removido dos recipientes individuais. Calcular o *Valor de Aceitação*.

Valor de Aceitação para Variação de Peso

Calcular o *Valor de Aceitação* conforme descrito em *Valor de Aceitação para Uniformidade de Conteúdo*, exceto que as quantidades individuais de componente ativo nas unidades são substituídas pelas quantidades individuais estimadas.

CRITÉRIOS

Aplicar os critérios a seguir, tanto para *Uniformidade de Conteúdo* como para *Variação de peso*, a menos que indicado de maneira diferente na monografia individual.

Formas farmacêuticas sólidas e líquidas

O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* calculado para as 10 primeiras unidades testadas não é maior que $L1$. Se o *Valor de Aceitação* for maior que $L1$, testar mais 20 unidades e calcular o *Valor de Aceitação*. O produto cumpre o teste de uniformidade de doses unitárias se o *Valor de Aceitação* final calculado para as 30 unidades testadas não é maior que $L1$ e a quantidade de componente ativo de nenhuma unidade individual é menor que $(1 - L2 \times 0,01)M$ ou maior que $(1 + L2 \times 0,01)M$. A menos que indicado de maneira diferente na monografia individual, $L1$ é 15,0 e $L2$ é 25,0.

Tabela 2 – Termos e expressões para o cálculo do Valor de Aceitação (VA).

Variável	Definição	Condições	Valores
\bar{X}	Média dos conteúdos individuais (x_1, x_2, \dots, x_n), expressa como porcentagem da quantidade declarada.		
x_1, x_2, \dots, x_n	Conteúdos individuais das unidades testadas, expressos como porcentagem da quantidade declarada.		
n	Número de unidades testadas		
k	Constante de aceitabilidade	Se $n = 10$, então $k =$	2,4
		Se $n = 30$, então $k =$	2,0
s	Desvio padrão da amostra		$\left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1} \right]^{1/2}$
M a ser utilizado quando $T \leq 101,5$ (caso 1)	Valor de referência	Se $98,5\% \leq \bar{X} \leq 101,5\%$, então	$M = \bar{X}$ ($VA = ks$)
		Se $\bar{X} < 98,5\%$, então	$M = 98,5\%$ ($VA = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		Se $\bar{X} > 101,5\%$, então	$M = 101,5\%$ ($VA = \bar{X} - 101,5 + ks$)
M a ser utilizado quando $T > 101,5$ (caso 2)	Valor de referência	Se $98,5 \leq \bar{X} \leq T$, então	$M = \bar{X}$ ($VA = ks$)
		Se $\bar{X} < 98,5\%$, então	$M = 98,5\%$ ($VA = 98,5 - \bar{X} + ks$)
		Se $\bar{X} > T$, então	$M = T$ ($VA = \bar{X} - T + ks$)
Valor de Aceitação (VA)			Fórmula geral:

			$ M - \bar{X} + ks$ Os cálculos são especificados acima para os diferentes casos
L1	Valor máximo permitido para o valor de aceitação		L1 = 15,0 a menos que especificado de forma diferente na monografia individual
L2	Desvio máximo permitido para cada unidade testada em relação ao valor de M utilizado nos cálculos do valor de aceitação.	Nenhum resultado individual é menor que $(1 - L2 \times 0,01)M$ ou maior que $(1 + L2 \times 0,01)M$	L2 = 25,0 a menos que especificado de forma diferente na monografia individual
T	Média dos limites especificados na monografia individual para a quantidade ou potência declarada, expressa em porcentagem.	T é igual a 100% a menos que outro valor tenha sido aprovado por razões de estabilidade; nestes casos, T é maior que 100%.	

V.1.8 TESTE DE GOTEJAMENTO

O teste de gotejamento destina-se a determinar a relação do número de gotas por mililitro e a quantidade de fármaco por gota em formas farmacêuticas líquidas acondicionadas em recipientes com dispositivo dosador integrado. Para realizar o teste é necessário conhecer o número declarado de gotas por mililitro.

PROCEDIMENTO

Determinação do número de gotas por mililitro

O gotejamento deve ser realizado com o frasco invertido na posição vertical ou conforme o ângulo de gotejamento declarado pelo fabricante, permitindo o fluxo por gravidade, a uma taxa constante, sem qualquer tipo de pressão adicional. Uma leve pressão pode ser aplicada em frascos de polietileno.

Separar 30 unidades. Proceder ao teste utilizando 10 unidades, em ambiente com temperatura controlada de 20 ± 2 °C. Para cada unidade determinar a massa relativa ao número de gotas correspondente a 1 mililitro, conforme declarado pelo fabricante.

Calcular o número de gotas por mililitro para cada unidade testada (N_i) segundo a equação:

$$N_i = \frac{(n_1 \times \rho)}{m_i}$$

em que

n_1 = número declarado de gotas por mililitro;

ρ = densidade de massa do produto, em g/ml, determinada a 20 °C, conforme descrito em *Determinação de densidade de massa e densidade relativa* (V.2.5);

m_i = massa, em g, correspondente ao número de gotas utilizado no teste.

Determinação da quantidade de fármaco por gota

Calcular a quantidade do fármaco, em mg/gota, para cada unidade testada (Q_i), segundo a equação:

$$Q_i = \frac{Q}{N_i}$$

em que

Q = quantidade de fármaco em mg/ml determinada no doseamento;
 N_i = número de gotas por mililitro calculado para cada unidade testada.

Calcular a porcentagem em relação à quantidade declarada, para cada unidade testada ($\%Q_i$), segundo a equação:

$$\%Q_i = \frac{Q_i}{(Q_d / n_1)} \times 100$$

em que

Q_i = quantidade do fármaco, em mg/gota, calculada para cada unidade testada;
 Q_d = quantidade declarada do fármaco, em mg/ml;
 n_1 = número declarado de gotas por mililitro.

Calcular a média das porcentagens individuais obtidas ($\overline{\%Q}$) e o desvio padrão relativo (DPR) segundo as equações:

$$\overline{\%Q} = \frac{\sum \%Q_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (\%Q_i - \overline{\%Q})^2}{n - 1}}$$

$$DPR = \frac{100 \times s}{\overline{\%Q}}$$

em que

$\%Q_i$ = porcentagem em relação à quantidade declarada calculada para cada unidade testada;
 s = desvio padrão;
 n = número de unidades testadas.

CRITÉRIOS

O produto cumpre os requisitos do teste se as porcentagens individuais, para cada uma das 10 unidades testadas, estão situadas entre 85,0% e 115,0% da quantidade declarada e o desvio padrão relativo (DPR) não é maior que 6,0%.

Se uma unidade estiver fora da faixa de 85,0% a 115,0% da quantidade declarada, ou se o DPR for maior que 6,0%, ou se ambas as condições forem observadas, testar mais 20 unidades.

O produto cumpre o teste se no máximo uma unidade está fora da faixa de 85,0% a 115,0% da quantidade declarada, nenhuma unidade está fora da faixa de 75,0% a 125,0% e o DPR das 30 unidades testadas não é maior que 7,8%.

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 três 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 tiosulfato 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 tiosulfato 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 tiosulfato 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 tiosulfato 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 do reto 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 tiosulfato 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 tiosulfato 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 férrico	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.2.17.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia a gás para as análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por CLAE. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e devem ocorrer em tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, esses dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária.

APARELHAGEM

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um software, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, softwares são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise.

Os sistemas cromatográficos modernos consistem de bombas de fluxo, controladas por software, que podem ser programadas para variar a relação de componentes da fase móvel, como é requerido para cromatografia por gradiente de solvente, ou para misturar, de forma isocrática, a fase móvel (fases móveis com relação fixa de solventes). Porém, a precisão da proporção de solventes pode ser mais bem controlada se a mistura for preparada previamente, em comparação com a mistura realizada no sistema cromatográfico. Pressões operacionais de até 5000 psi (cerca de 345 bar) e fluxo de até 10 ml por minuto podem ser utilizados.

Após dissolver a amostra na fase móvel ou em outro solvente adequado, a solução é injetada no sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático. Este consiste em um carrossel ou bandeja, capaz de acomodar diversos frascos contendo as amostras. Alguns amostradores automáticos podem ser programados para injetar diferentes volumes de amostra, diversas quantidades de injeções, controlar o intervalo entre injeções e outras variáveis operacionais.

Quando se trabalha a altas pressões, uma válvula de injeção é essencial. Essa apresenta um sistema calibrado, com volume definido, denominado anel de injeção ou alça de amostragem, que será preenchido com a solução a ser analisada e, posteriormente, transferida à coluna.

Para a maioria das análises farmacêuticas, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como *cromatografia em fase normal*, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados de *cromatografia em fase reversa*. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel.

As fases estacionárias utilizadas em *cromatografia em fase reversa* consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada à sílica ou outros suportes, como grafita porosa. O diâmetro das partículas é de, normalmente, 3 µm a 10 µm. Quanto menores o diâmetro da partícula e a película que recobre o suporte, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionárias e móveis. A polaridade da coluna depende dos grupos funcionais presentes, sendo os mais comuns os grupos apolares *octil*, *octadecil*, *fenil*, *cianopropil* e polar, *nitrila*. A proporção de grupos silanóis não ligados ao grupo funcional influencia, significativamente, na eficiência da separação cromatográfica e no formato do pico eluído. Comercialmente, estão disponíveis colunas cromatográficas com diferentes qualidades de fases estacionárias, inclusive aquelas com pequena proporção de grupos silanóis livres, denominadas *capeadas*. Geralmente, colunas de sílica em fase reversa apresentam vida útil na faixa de pH de 2 a 8, entretanto, colunas contendo grafita porosa ou materiais poliméricos, como o estireno-divinilbenzeno, são estáveis em

uma faixa mais ampla de pH. De forma menos comum, podem ser utilizados líquidos, não ligados, como revestimento do suporte de sílica e, portanto, devem ser imiscíveis com a fase móvel. As colunas normalmente usadas para separações analíticas têm diâmetros internos de 2 mm a 5 mm. Essas podem ser aquecidas, proporcionando separações mais eficientes, mas só raramente são utilizadas temperaturas superiores a 60 °C, devido ao potencial de degradação da fase estacionária ou à volatilidade da fase móvel. A menos que especificado na monografia da substância a ser analisada, as colunas são utilizadas em temperatura ambiente.

Os detectores mais freqüentemente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta passa, constantemente, pela célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma.

Detectores de índice de refração medem a diferença entre o índice de refração da fase móvel pura e da fase móvel contendo a substância a ser analisada. São utilizados para detectar substâncias que não absorvem no ultravioleta ou visível, entretanto são menos sensíveis que os detectores espectrofotométricos. Os detectores de índice de refração apresentam a desvantagem de serem sensíveis a pequenas mudanças da composição dos solventes da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura.

Detectores fluorimétricos são utilizados para detectar compostos naturalmente fluorescentes ou que podem ser convertidos em derivados fluorescentes, por transformação química ou adicionando reagentes fluorescentes a grupos funcionais específicos. Se a reação química é requerida, pode-se realizá-la no momento da preparação da amostra ou, alternativamente, o reagente pode ser introduzido na fase móvel, com a reação ocorrendo antes da detecção.

Detectores potenciométricos, voltamétricos ou eletroquímicos são úteis para quantificação de substâncias que podem ser oxidadas ou reduzidas em um eletrodo. Esses detectores são altamente seletivos, sensíveis e seguros, mas requerem fases móveis livres de oxigênio e íons de metais redutíveis. Uma bomba de fluxo contínuo deve ser utilizada, assegurando que o pH, a força iônica, e a temperatura da fase móvel permanecem constantes. Detectores eletroquímicos com eletrodo específicos de carbono podem ser utilizados, vantajosamente, para quantificar nanogramas de substâncias facilmente oxidáveis, como fenóis e catecóis.

Atualmente, sistemas de coleta de dados modernos estão disponíveis com as funções de receber e armazenar os sinais provenientes do detector e, posteriormente, proporcionar o manejo dessas informações, gerando os cromatogramas com os dados de área e altura do pico, identificação da amostra e métodos. As informações também podem ser coletadas em sistemas simples de gravação de dados, como registradores e integradores.

PROCEDIMENTO

O comprimento e o diâmetro interno da coluna, o tipo e o tamanho das partículas da fase estacionária, a temperatura da operação, a composição e o fluxo da fase móvel e o tipo de detecção são descritos nas monografias individuais.

A composição da fase móvel tem influência significativa na performance cromatográfica e na separação das substâncias presentes na solução a ser analisada. Para uma análise quantitativa precisa, reagentes de elevado grau de pureza ou solventes orgânicos de pureza cromatográfica devem ser utilizados. A água, de qualidade adequada, deve apresentar baixas condutividade e absorção na faixa do ultravioleta. Na cromatografia de partição, o coeficiente de partição e, conseqüentemente, a separação podem ser modificados pela adição de outro solvente à fase móvel. Na cromatografia de troca-iônica, a retenção das substâncias é afetada pelo pH, pela força iônica e por outras modificações na composição da fase móvel. A técnica de modificar continuamente a composição dos solventes da fase móvel durante a corrida cromatográfica é denominada de eluição gradiente, e é aplicada para separar misturas complexas de substâncias com diferentes fatores de capacidade. Entretanto, detectores que são sensíveis a modificações

na composição da fase móvel, como os refratômetros, têm sua utilização limitada com a técnica de eluição gradiente.

O detector deve apresentar uma ampla faixa de atuação e as substâncias a serem analisadas devem estar separadas de qualquer interferente. A faixa linear para uma substância é aquela na qual a resposta do detector é diretamente proporcional à sua concentração.

Os sistemas de CLAE são calibrados comparando-se as respostas dos picos obtidos com as respectivas concentrações de substâncias químicas de referência. Resultados quantitativos confiáveis são obtidos por meio de calibração com padrão externo, quando injetores ou amostradores automáticos são preferencialmente utilizados. Esse método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, separadamente analisados, das soluções padrão e amostra. Nos casos em que a padronização externa é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp(Ra / Rp)$$

em que,

Ca = concentração da solução amostra;

Cp = concentração da solução padrão;

Ra = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra;

Rp = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão.

Se a injeção é realizada por meio de seringa, melhores resultados quantitativos são obtidos por meio de calibração com padrão interno, adicionando-se uma quantidade conhecida de uma substância química de referência não interferente às soluções padrão e amostra. A relação das respostas obtidas com a substância a ser analisada e com o padrão interno é utilizada para expressar o resultado quantitativo. Nos casos em que a padronização interna é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp \frac{(Ra / Rai)}{(Rp / Rpi)}$$

em que,

Rai = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução amostra;

Rpi = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução padrão.

Devido a variações normais entre equipamentos, solventes, reagentes e técnicas, é necessário um teste de adequação do sistema para assegurar que o método descrito seja aplicado de forma irrestrita. Os principais parâmetros da adequação do sistema estão descritos em *Interpretação dos cromatogramas* e em *Adequação do sistema*.

INTERPRETAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Na *Figura 1* é representada uma separação cromatográfica típica de duas substâncias, sendo t_1 e t_2 os respectivos tempos de retenção. Os termos h , $h/2$ e $W_{h/2}$ correspondem à altura, à meia altura e à largura a meia altura, respectivamente, e W representa a largura do pico na linha de base, pelo método da triangulação. O sinal relativo ao tempo morto, t_0 , refere-se a uma substância não retida na coluna cromatográfica.

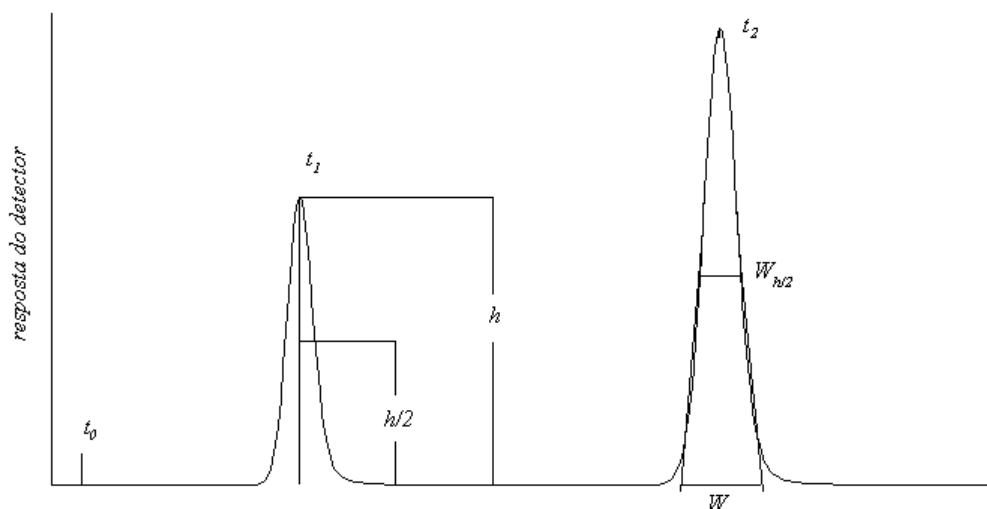


Figura 1 – Separação cromatográfica de duas substâncias.

Tempo de retenção (t), Fator de retenção (k) e Tempo de retenção relativo

O tempo de retenção em cromatografia é característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo. A comparação entre os tempos de retenção da amostra e da substância química de referência pode ser utilizada como indicativo da identidade da substância, porém é insuficiente para garantir a total caracterização da amostra. O tempo de retenção absoluto pode variar entre equipamentos e conforme o uso de solventes e reagentes diferentes. Nesse sentido, as comparações são feitas em termos de fator de retenção, k , calculado segundo a expressão:

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

em que,

t = tempo de retenção da substância analisada;

t_0 = tempo morto.

O fator de retenção, k , é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior a sua retenção.

O conceito de tempo de retenção relativo também pode ser aplicado. Para tanto, deve-se definir uma substância, de uma mistura, como a principal. Essa terá o tempo de retenção relativo de 1. Todas as outras substâncias terão seus tempos de retenção relacionados com o tempo de retenção da substância principal.

Número de pratos teóricos (N)

O número de pratos teóricos, N , é indicativo da eficiência da coluna. Pode ser expresso em números de pratos teóricos por coluna ou número de pratos teóricos por metro. Para picos com formato gaussiano, o número de pratos teóricos por coluna é calculado segundo as expressões:

$$N = 16 \times \left(\frac{t}{W} \right)^2 \text{ ou } N = 5,54 \times \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2.$$

O valor de N depende da substância a ser analisada e das condições de análise, como fase móvel, temperatura e fase estacionária.

Resolução (R)

A resolução, R , é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, e é calculada segundo as expressões,

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \text{ ou } R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

em que,

t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação;

$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

A área ou a altura do pico são, usualmente, proporcionais à quantidade da substância eluída. A área do pico, geralmente, é mais utilizada, entretanto pode ser menos precisa se houver outros picos interferentes. Para medidas manuais, o gráfico deve ser obtido em velocidade maior que a usual, minimizando os erros na obtenção da largura e da largura à meia altura dos picos. Para a análise quantitativa, as substâncias devem estar totalmente separadas de qualquer substância interferente.

Fator de cauda (T)

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, apresenta valor igual a 1 quando o pico é perfeitamente simétrico. Esse valor aumenta à medida que a assimetria do pico se torna mais pronunciada. Em alguns casos, valores inferiores a 1 podem ser observados. À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis. O fator de cauda é calculado segundo a expressão:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

em que,

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura;

f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura, de acordo com a *Figura 2*.

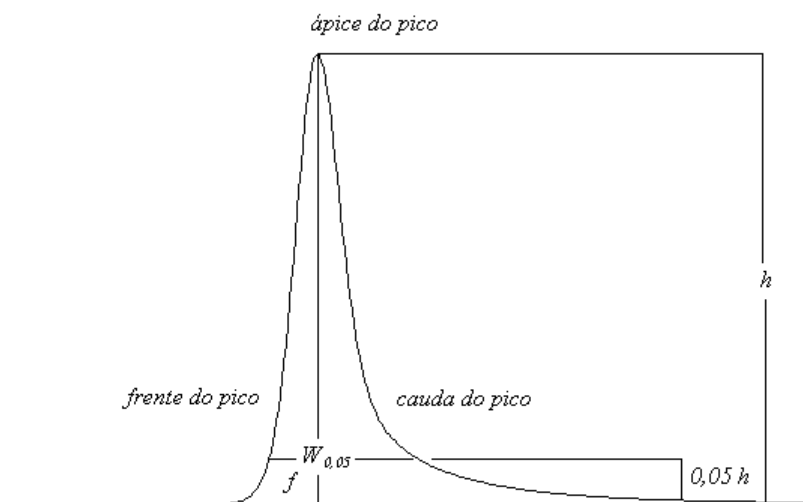


Figura 2 – Cromatograma representando a assimetria do pico.

ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida. São aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas. Os principais parâmetros necessários para a verificação da adequabilidade do sistema são descritos a seguir.

A resolução, R , é função da eficiência da coluna, N , e é especificada para garantir que substâncias eluídas proximamente, apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas.

Replicatas de injeções da solução padrão são trabalhadas, estatisticamente, para verificar se os requerimentos para a precisão da análise foram atingidos. A menos que especificado na monografia individual, são utilizados os dados de cinco replicatas de injeções para calcular o desvio padrão relativo (DPR), se a especificação for igual ou inferior a 2,0%. Se o desvio padrão relativo especificado for superior a 2,0%, os dados de seis replicatas devem ser utilizados.

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, é igual a 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria. Em alguns casos, valores menores que 1 podem ser observados.

Esses testes são realizados após coletar os resultados de replicatas de injeções da solução padrão ou outra solução especificada na monografia individual. A especificação desses parâmetros cromatográficos, em uma monografia, não impede a modificação das condições de análise. Ajustes nas condições de trabalho, de forma a atingir os parâmetros de adequabilidade do sistema, podem ser necessários. A menos que especificado na monografia individual, os parâmetros de adequabilidade do sistema são determinados a partir dos dados obtidos com o pico da substância de interesse. A precisão do sistema, demonstrada por meio de replicatas da solução padrão, deve ser alcançada antes das injeções das soluções amostras. A adequabilidade do sistema deve ser verificada durante toda a análise cromatográfica, por injeção de solução padrão em intervalos de tempo apropriados. Quando houver mudança significativa no equipamento ou em um reagente, os testes de adequabilidade do sistema devem ser realizados antes das injeções da amostra. A análise não será válida a menos que os requerimentos do teste de adequabilidade do sistema sejam alcançados.

V.2.17.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia a gás para as análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por CLAE. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e devem ocorrer em tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, esses dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária.

APARELHAGEM

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um software, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o detector, softwares são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística de análise.

Os sistemas cromatográficos modernos consistem de bombas de fluxo, controladas por software, que podem ser programadas para variar a relação de componentes da fase móvel, como é requerido para cromatografia por gradiente de solvente, ou para misturar, de forma isocrática, a fase móvel (fases móveis com relação fixa de solventes). Porém, a precisão da proporção de solventes pode ser mais bem controlada se a mistura for preparada previamente, em comparação com a mistura realizada no sistema cromatográfico. Pressões operacionais de até 5000 psi (cerca de 345 bar) e fluxo de até 10 ml por minuto podem ser utilizados.

Após dissolver a amostra na fase móvel ou em outro solvente adequado, a solução é injetada no sistema cromatográfico, de forma manual, utilizando seringa apropriada, ou por meio de um injetor ou amostrador automático. Este consiste em um carrossel ou bandeja, capaz de acomodar diversos frascos contendo as amostras. Alguns amostradores automáticos podem ser programados para injetar diferentes volumes de amostra, diversos quantidades de injeções, controlar o intervalo entre injeções e outras variáveis operacionais.

Quando se trabalha a altas pressões, uma válvula de injeção é essencial. Essa apresenta um sistema calibrado, com volume definido, denominado anel de injeção ou alça de amostragem, que será preenchido com a solução a ser analisada e, posteriormente, transferida à coluna.

Para a maioria das análises farmacêuticas, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como *cromatografia em fase normal*, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados de

cromatografia em fase reversa. A afinidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel.

As fases estacionárias utilizadas em *cromatografia em fase reversa* consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada à sílica ou outros suportes, como grafita porosa. O diâmetro das partículas é de, normalmente, 3 µm a 10 µm. Quanto menores o diâmetro da partícula e a película que recobre o suporte, mais rápida e eficiente será a transferência das substâncias entre as fases estacionárias e móveis. A polaridade da coluna depende dos grupos funcionais presentes, sendo os mais comuns os grupos apolares *octil*, *octadecil*, *fenil*, *cianopropil* e polar, *nitrila*. A proporção de grupos silanóis não ligados ao grupo funcional influencia, significativamente, na eficiência da separação cromatográfica e no formato do pico eluído. Comercialmente, estão disponíveis colunas cromatográficas com diferentes qualidades de fases estacionárias, inclusive aquelas com pequena proporção de grupos silanóis livres, denominadas *capeadas*. Geralmente, colunas de sílica em fase reversa apresentam vida útil na faixa de pH de 2 a 8, entretanto, colunas contendo grafita porosa ou materiais poliméricos, como o estireno-divinilbenzeno, são estáveis em uma faixa mais ampla de pH. De forma menos comum, podem ser utilizados líquidos, não ligados, como revestimento do suporte de sílica e, portanto, devem ser imiscíveis com a fase móvel. As colunas normalmente usadas para separações analíticas têm diâmetros internos de 2 mm a 5 mm. Essas podem ser aquecidas, proporcionando separações mais eficientes, mas só raramente são utilizadas temperaturas superiores a 60 °C, devido ao potencial de degradação da fase estacionária ou à volatilidade da fase móvel. A menos que especificado na monografia da substância a ser analisada, as colunas são utilizadas em temperatura ambiente.

Os detectores mais freqüentemente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta passa, constantemente, pela célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo. Detectores de comprimento de onda fixo operam em um único valor, tipicamente 254 nm, emitido por uma lâmpada de mercúrio de baixa pressão. Aqueles com comprimento de onda variável contêm uma fonte contínua de emissão, como uma lâmpada de deutério ou xenônio de alta pressão, e um monocromador ou um filtro de interferência, de modo a gerar radiação monocromática a um valor selecionado pelo operador, podendo, ainda, ser programados para alterar o comprimento de onda durante o desenvolvimento da análise. Os detectores de comprimento de onda múltiplo medem, simultaneamente, a absorvância em dois ou mais comprimentos de onda, sendo denominados de detectores de arranjo de diodos (DAD). Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma.

Detectores de índice de refração medem a diferença entre o índice de refração da fase móvel pura e da fase móvel contendo a substância a ser analisada. São utilizados para detectar substâncias que não absorvem no ultravioleta ou visível, entretanto são menos sensíveis que os detectores espectrofotométricos. Os detectores de índice de refração apresentam a desvantagem de serem sensíveis a pequenas mudanças da composição dos solventes da fase móvel, taxa de fluxo e temperatura.

Detectores fluorimétricos são utilizados para detectar compostos naturalmente fluorescentes ou que podem ser convertidos em derivados fluorescentes, por transformação química ou adicionando reagentes fluorescentes a grupos funcionais específicos. Se a reação química é requerida, pode-se realizá-la no momento da preparação da amostra ou, alternativamente, o reagente pode ser introduzido na fase móvel, com a reação ocorrendo antes da detecção.

Detectores potenciométricos, voltamétricos ou eletroquímicos são úteis para quantificação de substâncias que podem ser oxidadas ou reduzidas em um eletrodo. Esses detectores são altamente seletivos, sensíveis e seguros, mas requerem fases móveis livres de oxigênio e íons de metais redutíveis. Uma bomba de fluxo contínuo deve ser utilizada, assegurando que o pH, a força iônica, e a temperatura da fase móvel permanecem constantes. Detectores eletroquímicos com eletrodo específicos de carbono podem ser utilizados, vantajosamente, para quantificar nanogramas de substâncias facilmente oxidáveis, como fenóis e catecóis.

Atualmente, sistemas de coleta de dados modernos estão disponíveis com as funções de receber e armazenar os sinais provenientes do detector e, posteriormente, proporcionar o manejo dessas informações, gerando os cromatogramas com os dados de área e altura do pico, identificação da amostra e métodos. As informações também podem ser coletadas em sistemas simples de gravação de dados, como registradores e integradores.

PROCEDIMENTO

O comprimento e o diâmetro interno da coluna, o tipo e o tamanho das partículas da fase estacionária, a temperatura da operação, a composição e o fluxo da fase móvel e o tipo de detecção são descritos nas monografias individuais.

A composição da fase móvel tem influência significativa na performance cromatográfica e na separação das substâncias presentes na solução a ser analisada. Para uma análise quantitativa precisa, reagentes de elevado grau de pureza ou solventes orgânicos de pureza cromatográfica devem ser utilizados. A água, de qualidade adequada, deve apresentar baixas condutividade e absorção na faixa do ultravioleta. Na cromatografia de partição, o coeficiente de partição e, conseqüentemente, a separação podem ser modificados pela adição de outro solvente à fase móvel. Na cromatografia de troca-iônica, a retenção das substâncias é afetada pelo pH, pela força iônica e por outras modificações na composição da fase móvel. A técnica de modificar continuamente a composição dos solventes da fase móvel durante a corrida cromatográfica é denominada de eluição gradiente, e é aplicada para separar misturas complexas de substâncias com diferentes fatores de capacidade. Entretanto, detectores que são sensíveis a modificações na composição da fase móvel, como os refratômetros, têm sua utilização limitada com a técnica de eluição gradiente.

O detector deve apresentar uma ampla faixa de atuação e as substâncias a serem analisadas devem estar separadas de qualquer interferente. A faixa linear para uma substância é aquela na qual a resposta do detector é diretamente proporcional à sua concentração.

Os sistemas de CLAE são calibrados comparando-se as respostas dos picos obtidos com as respectivas concentrações de substâncias químicas de referência. Resultados quantitativos confiáveis são obtidos por meio de calibração com padrão externo, quando injetores ou amostradores automáticos são preferencialmente utilizados. Esse método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, separadamente analisados, das soluções padrão e amostra. Nos casos em que a padronização externa é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp(Ra / Rp)$$

em que,

Ca = concentração da solução amostra;

Cp = concentração da solução padrão;

Ra = resposta (área ou altura) do pico da solução amostra;

Rp = resposta (área ou altura) do pico da solução padrão.

Se a injeção é realizada por meio de seringa, melhores resultados quantitativos são obtidos por meio de calibração com padrão interno, adicionando-se uma quantidade conhecida de uma substância química de referência não interferente às soluções padrão e amostra. A relação das respostas obtidas com a substância a ser analisada e com o padrão interno é utilizada para expressar o resultado quantitativo. Nos casos em que a padronização interna é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ca = Cp \frac{(Ra / Rai)}{(Rp / Rpi)}$$

em que,

Rai = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução amostra;

Rpi = resposta (área ou altura) do pico do padrão interno na solução padrão.

Devido a variações normais entre equipamentos, solventes, reagentes e técnicas, é necessário um teste de adequação do sistema para assegurar que o método descrito seja aplicado de forma irrestrita. Os principais parâmetros da adequação do sistema estão descritos em *Interpretação dos cromatogramas* e em *Adequação do sistema*.

INTERPRETAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

Na *Figura 1* é representada uma separação cromatográfica típica de duas substâncias, sendo t_1 e t_2 os respectivos tempos de retenção. Os termos h , $h/2$ e $W_{h/2}$ correspondem à altura, à meia altura e à largura a meia altura, respectivamente, e W representa a largura do pico na linha de base, pelo método da

triangulação. O sinal relativo ao tempo morto, t_0 , refere-se a uma substância não retida na coluna cromatográfica.

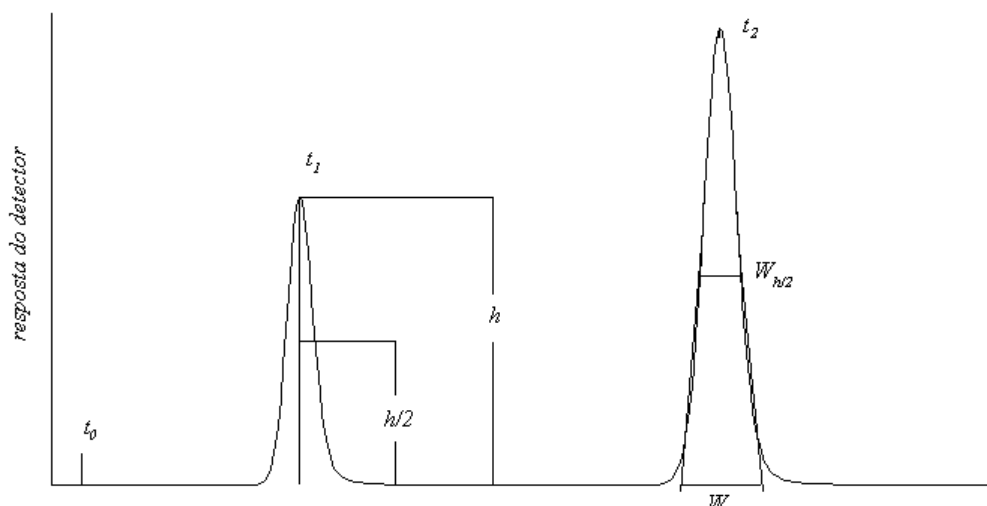


Figura 1 – Separação cromatográfica de duas substâncias.

Tempo de retenção (t), Fator de retenção (k) e Tempo de retenção relativo

O tempo de retenção em cromatografia é característico da substância analisada, entretanto não é exclusivo. A comparação entre os tempos de retenção da amostra e da substância química de referência pode ser utilizada como indicativo da identidade da substância, porém é insuficiente para garantir a total caracterização da amostra. O tempo de retenção absoluto pode variar entre equipamentos e conforme o uso de solventes e reagentes diferentes. Nesse sentido, as comparações são feitas em termos de fator de retenção, k , calculado segundo a expressão:

$$k = \frac{t - t_0}{t_0}$$

em que,

t = tempo de retenção da substância analisada;

t_0 = tempo morto.

O fator de retenção, k , é a razão entre a quantidade da substância com afinidade pela fase estacionária e a quantidade com afinidade pela fase móvel. Quanto maior a afinidade da substância pela fase estacionária maior a sua retenção.

O conceito de tempo de retenção relativo também pode ser aplicado. Para tanto, deve-se definir uma substância, de uma mistura, como a principal. Essa terá o tempo de retenção relativo de 1. Todas as outras substâncias terão seus tempos de retenção relacionados com o tempo de retenção da substância principal.

Número de pratos teóricos (N)

O número de pratos teóricos, N , é indicativo da eficiência da coluna. Pode ser expresso em números de pratos teóricos por coluna ou número de pratos teóricos por metro. Para picos com formato gaussiano, o número de pratos teóricos por coluna é calculado segundo as expressões:

$$N = 16 \times \left(\frac{t}{W} \right)^2 \text{ ou } N = 5,54 \times \left(\frac{t}{W_{h/2}} \right)^2.$$

O valor de N depende da substância a ser analisada e das condições de análise, como fase móvel, temperatura e fase estacionária.

Resolução (R)

A resolução, R , é o parâmetro cromatográfico que indica o grau de separação entre duas substâncias em uma mistura, e é calculada segundo as expressões,

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \text{ ou } R = 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{(W_{1,h/2} + W_{2,h/2})}$$

em que,

t_2 e t_1 = tempos de retenção das duas substâncias da mistura;

W_1 e W_2 = respectivas larguras dos picos na linha de base, pelo método da triangulação;

$W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ = respectivas larguras dos picos à meia altura.

A área ou a altura do pico são, usualmente, proporcionais à quantidade da substância eluída. A área do pico, geralmente, é mais utilizada, entretanto pode ser menos precisa se houver outros picos interferentes. Para medidas manuais, o gráfico deve ser obtido em velocidade maior que a usual, minimizando os erros na obtenção da largura e da largura à meia altura dos picos. Para a análise quantitativa, as substâncias devem estar totalmente separadas de qualquer substância interferente.

Fator de cauda (T)

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, apresenta valor igual a 1 quando o pico é perfeitamente simétrico. Esse valor aumenta à medida que a assimetria do pico se torna mais pronunciada. Em alguns casos, valores inferiores a 1 podem ser observados. À medida que a assimetria do pico aumenta, a integração e a precisão se tornam menos confiáveis. O fator de cauda é calculado segundo a expressão:

$$T = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

em que,

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5% da altura;

f = valor da porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura, de acordo com a *Figura 2*.

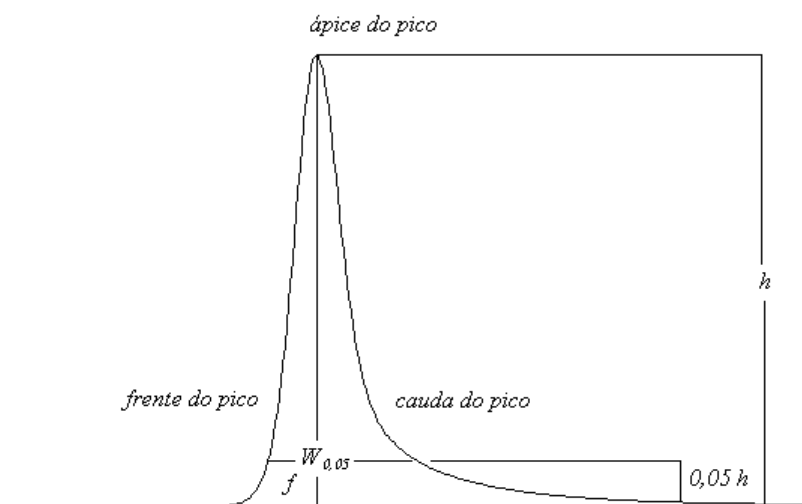


Figura 2 – Cromatograma representando a assimetria do pico.

ADEQUABILIDADE DO SISTEMA

Os testes de adequabilidade do sistema são parte integrante dos métodos de cromatografia líquida. São aplicados com a finalidade de verificar se a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão

adequadas para as análises a serem realizadas. Os principais parâmetros necessários para a verificação da adequabilidade do sistema são descritos a seguir.

A resolução, R , é função da eficiência da coluna, N , e é especificada para garantir que substâncias eluídas proximamente, apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas.

Replicatas de injeções da solução padrão são trabalhadas, estatisticamente, para verificar se os requerimentos para a precisão da análise foram atingidos. A menos que especificado na monografia individual, são utilizados os dados de cinco replicatas de injeções para calcular o desvio padrão relativo (DPR), se a especificação for igual ou inferior a 2,0%. Se o desvio padrão relativo especificado for superior a 2,0%, os dados de seis replicatas devem ser utilizados.

O fator de cauda, T , que indica a simetria do pico, é igual a 1 para picos perfeitamente simétricos e maior que 1 para picos que apresentam assimetria. Em alguns casos, valores menores que 1 podem ser observados.

Esses testes são realizados após coletar os resultados de replicatas de injeções da solução padrão ou outra solução especificada na monografia individual. A especificação desses parâmetros cromatográficos, em uma monografia, não impede a modificação das condições de análise. Ajustes nas condições de trabalho, de forma a atingir os parâmetros de adequabilidade do sistema, podem ser necessários. A menos que especificado na monografia individual, os parâmetros de adequabilidade do sistema são determinados a partir dos dados obtidos com o pico da substância de interesse. A precisão do sistema, demonstrada por meio de replicatas da solução padrão, deve ser alcançada antes das injeções das soluções amostras. A adequabilidade do sistema deve ser verificada durante toda a análise cromatográfica, por injeção de solução padrão em intervalos de tempo apropriados. Quando houver mudança significativa no equipamento ou em um reagente, os testes de adequabilidade do sistema devem ser realizados antes das injeções da amostra. A análise não será válida a menos que os requerimentos do teste de adequabilidade do sistema sejam alcançados.

V.2.25 LIMPEZ DE SOLUÇÕES

Utilizar tubos de vidro neutro, incolor e transparente, com fundo chato e de 15 a 25 mm de diâmetro interno, a menos que indicado de maneira diferente na monografia. Introduzir, em tubos separados, a solução em exame e a *suspensão de referência* indicada na monografia, preparando-a por ocasião do uso, conforme especificado na Tabela 1. Encher os tubos até a profundidade de 40 mm. Cinco minutos após o preparo da *suspensão de referência*, comparar o conteúdo dos tubos, observando-os verticalmente, sob luz visível difusa e contra fundo preto. A difusão da luz deve ser tal que a *suspensão de referência I* seja facilmente distinguida da água e da *suspensão de referência II*.

Uma solução é considerada límpida quando, ao ser examinada nas condições anteriormente descritas, sua transparência corresponde à da água ou à do solvente utilizado, ou quando sua opalescência não é mais pronunciada que a da *suspensão de referência I*.

Padrão de opalescência

Dissolver 1 g de sulfato de hidrazina em água e completar o volume para 100 ml com o mesmo solvente. Deixar em repouso por 4 a 6 horas. Adicionar 25 ml desta solução a uma solução contendo 2,5 g de metenamina em 25 ml de água. Misturar bem e deixar em repouso por 24 horas. Esta suspensão é estável por dois meses se conservada em recipiente de vidro, com superfície livre de defeitos. A suspensão não deve aderir às paredes do recipiente e deve ser vigorosamente agitada, no recipiente original, antes do uso. Para o preparo do *padrão de opalescência*, diluir 15 ml da suspensão para 1000 ml com água. O *padrão de opalescência* deve ser preparado no momento do uso e pode ser conservado por, no máximo, 24 horas.

Tabela 1 – Suspensões de referência

<i>Suspensão de referência</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Padrão de opalescência (ml)	5	10	30	50
Água (ml)	95	90	70	50

V.3.2 ENSAIOS-LIMITE PARA IMPUREZAS INORGÂNICAS

Ensaio-limite são ensaios quantitativos ou semiquantitativos realizados para verificar se o conteúdo de impurezas inorgânicas presentes em insumos farmacêuticos não excede o limite especificado na monografia da substância em exame, expresso em porcentagem (p/p) ou em microgramas por grama (ppm) da substância.

Os ensaios são realizados em tubos calibrados de vidro transparente, de diâmetro interno uniforme e

fundo plano, salvo indicação contrária na monografia. Os tubos devem apresentar marcas externas correspondentes aos volumes de 25 ml e 50 ml. Tubos de Nessler usualmente são adequados.

A coluna de líquido é observada segundo o eixo vertical do tubo, de cima para baixo, sob luz difusa, sobre fundo branco ou, se necessário, sobre fundo negro, salvo indicação contrária.

V.3.2.1 ENSAIO-LIMITE PARA CLORETOS

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado a quantidade de amostra especificada na monografia e adicionar 30 ml a 40 ml de água. Se a substância já estiver em solução, diluir para 30 ml a 40 ml com água. Neutralizar, se necessário, com ácido nítrico SR. Se após a neutralização a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar em papel de filtro isento de cloreto. Caso um volume específico de solução da amostra seja especificado na monografia individual, e o limite de cloreto corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido clorídrico padrão, o ensaio deve ser realizado sem diluição adicional da solução da amostra.

Preparação padrão

Transferir o volume de ácido clorídrico padrão (HCl 0,01 M) indicado na monografia ou na Tabela 1 (ou calculado conforme o limite especificado) para tubo adequado e proceder conforme descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Desenvolver padrão e amostra paralelamente. Adicionar às *preparações padrão e amostra* 1 ml de ácido nítrico SR e 1 ml de nitrato de prata SR. Diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Deixar em repouso ao abrigo da luz durante 5 minutos. Qualquer turbidez desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

Tabela 1 – Cálculo de limites para cloretos
 Equivalentes em parte de Cl por 1 milhão de partes da substância (p/p)
 Padrão: 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M (= 0,0003546 g de Cl)
 Volume final 50 ml
 Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 20 mm

<i>g de amostra</i>	<i>Cl p/milhão</i>	<i>g de amostra</i>	<i>Cl p/milhão</i>
0,10	3546 (= 0,355%)	3,8	93
0,15	2364 (= 0,236%)	4,0	88
0,20	1773 (= 0,180%)	4,2	84
0,25	1418 (= 0,142%)	4,4	80
0,30	1182 (= 0,120%)	4,6	77
0,35	1013 (= 0,100%)	4,8	74
0,40	886	5,0	71
0,45	788	5,2	68
0,50	709	5,4	65
0,55	645	5,6	63
0,60	591	5,8	61
0,65	545	6,0	59
0,70	506	6,2	57
0,75	473	6,4	55
0,80	443	6,6	53
0,85	417	6,8	52
0,90	394	7,0	50
0,95	373	7,2	49
1,00	354	7,4	48
1,2	285	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

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0003546 g de Cl), se o limite de cloretos para a substância sob exame for 354 ppm, submeter ao ensaio 1 g de amostra; se o limite for 71 ppm, submeter ao ensaio 5 g de amostra.

V.3.2.2 ENSAIO-LIMITE PARA SULFATOS

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado a quantidade de amostra especificada na monografia e adicionar 30 ml a 40 ml de água. Se a substância já estiver em solução, diluir para 30 ml a 40 ml com água. Neutralizar, se necessário, com ácido clorídrico SR. Eventualmente, pode-se utilizar ácido acético glacial tanto para neutralização quanto para acidificação da *preparação amostra*. Se após a neutralização a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar em papel de filtro isento de sulfato. Caso um volume específico de solução da amostra seja especificado na monografia individual, e o limite de sulfato corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido sulfúrico padrão, o ensaio deve ser realizado sem diluição adicional da solução da amostra.

Preparação padrão

Transferir o volume de ácido sulfúrico padrão (H_2SO_4 0,005 M) indicado na monografia ou na Tabela 1 (ou calculado conforme o limite especificado) para tubo adequado e proceder conforme descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Desenvolver padrão e amostra paralelamente. Adicionar às *preparações padrão e amostra* 1 ml de ácido clorídrico 3 M e 3 ml de cloreto de bário SR. Diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Deixar em repouso durante 10 minutos. Qualquer turbidez desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

Tabela 2 – Cálculo de limites para sulfatos

Equivalentes em parte de SO_4 por milhão de partes da substância (p/p)

Padrão: 2,5 ml de ácido sulfúrico 0,005 M (0,0012008 g de SO_4)

Volume final 50ml

Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 20 mm

g de substância	SO_4 p/milhão	g de substância	SO_4 p/milhão
0,50	2401 (= 0,240%)	4,6	261
0,55	2183 (= 0,220%)	4,8	250
0,60	2001 (= 0,200%)	5,0	240
0,65	1847 (= 0,185%)	5,2	231
0,70	1715 (= 0,171%)	5,4	222
0,75	1601 (= 0,160%)	5,6	214
0,80	1501	5,8	207
0,85	1412	6,0	200
0,90	1334	6,2	194
0,95	1264	6,4	187
1,00	1200	6,6	182
1,2	1001	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

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0012008 g de SO_4), se o limite de sulfatos para a substância sob exame for 500 ppm, submeter ao ensaio 2,4 g de amostra; se o limite for 151 ppm, submeter ao ensaio 8 g de amostra.

V.3.2.3 ENSAIO-LIMITE PARA METAIS PESADOS

O ensaio-limite para metais pesados destina-se a demonstrar que o conteúdo de impurezas metálicas que são coloridas pelo íon sulfeto não excede o limite especificado na monografia da substância em exame, expresso em porcentagem (p/p) ou em microgramas de chumbo por grama (ppm) da substância, conforme determinado pela comparação visual com uma preparação padrão chumbo (Pb). Substâncias tipicamente detectadas por este ensaio incluem chumbo, mercúrio, bismuto, arsênico, antimônio, estanho, cádmio, prata, cobre e molibdênio.

Realizar o ensaio utilizando o *Método I*, salvo indicação contrária na monografia individual. O *Método I* é utilizado para substâncias que produzem preparações límpidas e incolores sob as condições especificadas no ensaio. O *Método II* é empregado para substâncias que não produzem preparações límpidas e incolores sob as condições especificadas para o *Método I*, ou para substâncias que, em virtude de sua natureza complexa, interferem com a precipitação de metais pelo íon sulfeto, ou para óleos fixos e voláteis. O *Método III*, que inclui um processo de digestão úmida, é utilizado somente nos casos em que os *Métodos I* e *II* não podem ser utilizados.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de nitrato de chumbo

Dissolver, exatamente, 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 ml de água adicionada de 1 ml de ácido nítrico. Diluir com água para 1000 ml e homogeneizar. Preparar e estocar esta solução em recipientes de vidro isentos de sais solúveis de chumbo.

Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)

No dia do uso, diluir 10 ml da *solução estoque de nitrato de chumbo* para 100 ml com água. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 10 µg de chumbo (10 ppm Pb).

Tampão acetato pH 3,5

Dissolver 25,0 g de acetato de amônio em 25 ml de água e adicionar 38 ml de ácido clorídrico 6 M. Se necessário, ajustar o pH em 3,5 com hidróxido de amônio 6 M ou ácido clorídrico 6 M. Diluir para 100 ml com água e homogeneizar.

MÉTODO I

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado solução da amostra preparada conforme especificado na monografia e diluir para 25 ml com água, ou dissolver e diluir com água para 25 ml a quantidade de amostra, em gramas, especificada na monografia ou calculada segundo a equação:

$$2 / (1000L)$$

em que

L = limite de metais pesados na amostra em porcentagem (p/p).

Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético *M* ou hidróxido de amônio 6 *M* utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação controle

Transferir para um terceiro tubo volume solução da amostra preparada conforme descrito na monografia ou em *preparação amostra* e adicionar 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)*. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético *M* ou hidróxido de amônio 6 *M* utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Procedimento

A cada uma das preparações adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*. O teste somente é válido se a intensidade da coloração desenvolvida na *preparação controle* é igual ou superior àquela observada na *preparação padrão*. Do contrário, aplicar o *Método II* ao invés do *Método I* para a substância sob exame.

MÉTODO II

Preparação amostra

Utilizar a quantidade de amostra, em gramas, especificada na monografia ou calculada segundo a equação:

$$2 / (1000L)$$

em que

L = limite de metais pesados na amostra em porcentagem (p/p).

Transferir a amostra para cadinho adequado, adicionar ácido sulfúrico suficiente para umedecer a substância e incinerar, cuidadosamente, sob temperatura baixa. Adicionar à massa carbonizada 2 ml de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico. Aquecer, com cuidado, até que não mais se desprendam vapores brancos. Incinerar em mufla a 500-600 °C até completa combustão do carbono. Resfriar em temperatura ambiente, adicionar 4 ml de ácido clorídrico 6 *M*, cobrir, digerir em banho-maria por 15 minutos, descobrir e evaporar em banho-maria, lentamente, até seca. Umedecer o resíduo com 1 gota de ácido clorídrico, adicionar 10 ml de água quente e digerir em banho-maria por 2 minutos. Alcalinizar ao papel tornassol com hidróxido de amônio 6 *M* adicionado gota a gota. Diluir com água para 25 ml e ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético *M*, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Filtrar se necessário, lavar o cadinho e o filtro com 10 ml de água e combinar o filtrado e as águas de lavagem em tubo adequado para comparação de cor. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Proceder conforme descrito em *preparação padrão* no *Método I*.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO III

Preparação amostra

Transferir a quantidade ou volume de amostra indicada na monografia para um balão de Kjeldahl de 100 ml previamente limpo e seco (um balão de 300 ml pode ser utilizado nos casos em que a reação resulta em formação excessiva de espuma). Manter o balão inclinado em um ângulo de 45°. Se a substância sob exame for sólida, adicionar mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico em quantidade suficiente para umedecer completamente a amostra; se a substância sob exame for líquida, adicionar alguns mililitros de mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico. Aquecer, brandamente, para iniciar a reação. Quando a reação abrandar, adicionar porções da mistura ácida, aquecendo a cada adição. Repetir a operação até que se tenha acrescentado um volume total de 18 ml da mistura ácida. Aumentar a temperatura de aquecimento e ferver, brandamente, a mistura até o escurecimento da solução. Resfriar, adicionar 2 ml de ácido nítrico e aquecer novamente até o escurecimento da solução. Continuar o aquecimento até que nenhum escurecimento adicional seja observado, e então aquecer vigorosamente até que se produzam vapores brancos densos. Resfriar e adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água. Aquecer, brandamente, à ebulição até que vapores brancos densos sejam novamente produzidos e manter o aquecimento para reduzir o volume a 2-3 ml. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água e examinar a cor da solução. Se a cor é amarela, adicionar, cuidadosamente, 1 ml de peróxido de hidrogênio concentrado e aquecer à ebulição até que se produzam vapores brancos densos e o volume seja reduzido a 2-3 ml. Se a solução permanece amarela, repetir a adição de 5 ml de água e 1 ml de peróxido de hidrogênio concentrado até que a solução se torne incolor. Resfriar e diluir, cuidadosamente, com alguns mililitros de água. Transferir para tubo adequado para comparação de cor, lavar o balão com água, transferindo as águas de lavagem para o tubo e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico para balão de Kjeldahl de 100 ml previamente limpo e seco. Acrescentar volume adicional de ácido nítrico equivalente àquele que foi adicionado à *preparação amostra*. Aquecer a solução para a produção de vapores brancos densos. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água e, caso a *preparação amostra* tenha sido tratada com peróxido de hidrogênio, adicionar volume de peróxido de hidrogênio concentrado equivalente àquele que foi adicionado à substância sob exame. Aquecer, brandamente, à ebulição até que vapores brancos densos sejam novamente produzidos. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água, homogeneizar e aquecer, brandamente, à ebulição para produzir vapores brancos densos e reduzir o volume a 2-3 ml. Resfriar, diluir, cuidadosamente, com alguns mililitros de água, adicionar 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* e homogeneizar. Transferir para tubo adequado para comparação de cor, lavar o balão com água, transferindo as águas de lavagem para o tubo e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão e amostra* adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

V.3.2.4 ENSAIO-LIMITE PARA FERRO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de sulfato férrico amoniacal

Dissolver, exatamente, 0,8634 g de sulfato férrico amoniacal dodecaidratado em água contendo 25 ml de ácido sulfúrico M e diluir com água para 500 ml. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 200 µg de ferro (200 ppm Fe).

Solução padrão de ferro (100, 10 e 2 ppm Fe)

Imediatamente antes do uso, diluir com água, quantitativamente, volume adequado da *solução estoque*

de sulfato férrico amoniacal.

Ácido cítrico

Quanto utilizado no ensaio-limite para ferro, cumpre com o seguinte requerimento: dissolver 0,5 g em 10 ml de água, adicionar 0,1 ml de ácido tioglicólico, homogeneizar, alcalinizar com amônia 10 M e diluir com água para 25 ml; não se desenvolve coloração rosa.

Amônia

Quando utilizada no ensaio-limite para ferro, cumpre com o seguinte requerimento: evaporar 5 ml à secura em banho-maria, adicionar 10 ml de água, 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V) e 0,1 ml de ácido tioglicólico, homogeneizar, alcalinizar com amônia e diluir para 25 ml com água; não se desenvolver coloração rosa.

MÉTODO I

Preparação amostra

Dissolver em água a quantidade de amostra especificada na monografia, ou utilizar a solução amostra especificada na monografia, transferir para tubo adequado, diluir para 40 ml com água e adicionar 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V).

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 1 ml de *solução padrão de ferro (10 ppm Fe)* (ou 1 ml de *solução padrão de ferro (100 ppm Fe)* caso a quantidade de amostra submetida ao ensaio seja calculada segundo a Tabela 3), diluir para 40 ml com água e adicionar 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V).

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 2 gotas de ácido tioglicólico. Homogeneizar e alcalinizar com amônia. Diluir para 50 ml com água, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração rósea desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO II

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado 10 ml de solução da amostra especificada na monografia, adicionar 2 ml de ácido clorídrico 2 M e 0,5 ml de água de bromo. Após 5 minutos, retirar o excesso de bromo utilizando corrente de ar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 10 ml de *solução padrão de ferro (2 ppm Fe)*, adicionar 2 ml de ácido clorídrico 2 M e 0,5 ml de água de bromo. Após 5 minutos, retirar o excesso de bromo utilizando corrente de ar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 3 ml de tiocianato de potássio M, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO III

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado solução da amostra especificada na monografia e diluir, se necessário, para 45 ml com água, ou dissolver e diluir em água para 45 ml a quantidade, em gramas, de amostra

calculada segundo a equação:

$$1 / (1000L)$$

em que

L = limite de ferro na amostra em porcentagem (p/p).

Adicionar 2 ml de ácido clorídrico e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 1 ml de *solução padrão de ferro (10 ppm Fe)*, diluir para 45 ml com água, adicionar 2 ml de ácido clorídrico e homogeneizar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão e amostra* adicionar 50 mg de cristais de peroxidissulfato de amônio, 3 ml de tiocianato de amônio a 30% (p/V), diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

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	9000	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		

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0001 g de Fe), se o limite de ferro para a substância sob exame for 1000 ppm, submeter ao ensaio 0,1 g de amostra; se o limite for 200 ppm, submeter ao ensaio 0,5 g de amostra.

V.3.2.5 ENSAIO-LIMITE PARA ARSÊNIO

O ensaio-limite para arsênio consiste na determinação de traços de arsênio na substância sob exame, mediante sua conversão em arsina (AsH₃), que pode ser detectada por comparação visual ou espectrofotométrica. Os limites são estabelecidos em termos de arsênio (As) ou, em certos casos, em arsênico (As₂O₃).

Nota: metais como cromo, cobalto, mercúrio, molibdênio, níquel, paládio e prata ou seus respectivos sais podem interferir na geração de arsina.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de trióxido de arsênio

Pesar, exatamente, 132,0 mg de trióxido de arsênio previamente dessecado em estufa a 105 °C por 1

hora. Dissolver em 5 ml de hidróxido de sódio a 20% (p/V), neutralizar com ácido sulfúrico *M* e adicionar mais 10 ml de ácido sulfúrico *M*. Diluir para 1000 ml com água isenta de dióxido de carbono e homogeneizar.

Solução padrão de arsênio (1 ppm As)

Transferir 1 ml da *solução estoque de trióxido de arsênio* para balão volumétrico de 100 ml, adicionar 1 ml de ácido sulfúrico *M*, completar o volume com água isenta de dióxido de carbono e homogeneizar. Conservar a solução em recipiente de vidro e utilizar em até 3 dias. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 1 µg de arsênio (1 ppm As).

Algodão de acetato de chumbo

Imergir algodão absorvente em mistura de ácido acético 2 *M* e acetato de chumbo SR (1:10). Drenar o excesso de líquido colocando o algodão entre diversas camadas de papel de filtro, sem pressioná-lo. Deixar secar à temperatura ambiente. Estocar em recipientes perfeitamente fechados.

Papel de acetato de chumbo

Imergir papel de filtro branco pesando 80 g/m² (Whatman nº. 1 é adequado), cortado em pedaços de 6 mm × 80 mm, em mistura de ácido acético 2 *M* e acetato de chumbo SR (1:10). Deixar secar à temperatura ambiente. Estocar em recipientes perfeitamente fechados.

Papel de brometo mercúrico

Em um recipiente adequado contendo brometo mercúrico a 5% (p/V) em etanol absoluto imergir papel de filtro branco pesando 80 g/m² (Whatman nº. 1 é adequado), cortado em pedaços de 20 cm × 15 mm e dobrados ao meio. Decantar o excesso de líquido e secar o papel à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, suspendendo-o, verticalmente, em um fio não-metálico. Eliminar 1 cm de cada borda e cortar o pedaço remanescente em quadrados de 15 mm de lado ou discos de 15 mm de diâmetro. Estocar em recipientes bem-fechados, revestidos com papel preto.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O método espectrofotométrico baseia-se na conversão de traços de arsênio (As) em arsina, que passa através de uma solução de dietilditiocarbamato de prata para formar um complexo vermelho. A coloração produzida é comparada, visualmente ou espectrofotometricamente, com aquela produzida de forma similar por um controle contendo quantidade de arsênio equivalente ao limite especificado na monografia.

Nota: *antimônio, que forma estibina, interfere com o resultado produzindo cor ao reagir com o dietilditiocarbamato de prata. Quando se suspeitar da presença de antimônio, a coloração vermelha produzida com as preparações padrão e amostra deve ser comparada em espectrofotômetro ou colorímetro adequado, em comprimento de onda de absorção máxima entre 535-540 nm, faixa em que a interferência da estibina é desprezível.*

Dois métodos podem ser empregados diferindo, apenas, no tratamento preliminar da amostra e do padrão. O *Método I*, em geral, é utilizado para substâncias inorgânicas, enquanto o *Método II* é empregado para substâncias orgânicas.

O aparelho utilizado (Figura 1) compreende: (a) frasco gerador de arsina; (b e d) juntas; (c) unidade esmerilhada; (e) tubo de absorção. Eventualmente, outro aparelho adequado, que apresente as características essenciais do apresentado, pode ser utilizado.

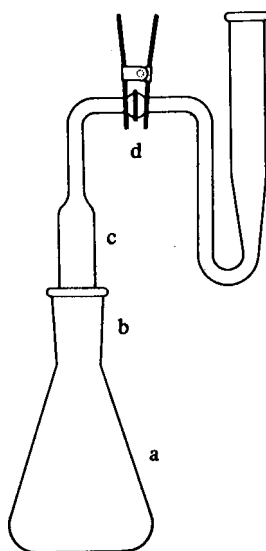


Figura 1 – Aparelho para determinação de arsênio pelo método espectrofotométrico.

MÉTODO I

Preparação amostra

Transferir para frasco gerador de arsina a quantidade de amostra especificada na monografia, ou a quantidade de amostra, em gramas, calculada segundo a equação:

$$3 / L$$

em que

L = limite de arsênio na amostra em ppm.

Dissolver e diluir com água para 35 ml. Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M, 2 ml de iodeto de potássio SR, 0,5 ml de cloreto estânico fortemente ácido SR e 1 ml de 2-propanol. Homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Na unidade (c) do aparelho descrito, introduzir duas mechas de *algodão de acetato de chumbo*, deixando entre elas espaço de 2 mm. As juntas (b) e (d) devem ser lubrificadas com vaselina e unidas conforme esquematizado na Figura 1.

Preparação padrão

Transferir para frasco gerador de arsina 3 ml de *solução padrão de arsênio (1 ppm As)*. Diluir com água para 35 ml e proceder como descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Transferir para as unidades de absorção (e) dos aparelhos contendo as *preparações padrão e amostra* 3 ml de dietilditiocarbamato de prata SR. Adicionar à mistura do frasco gerador de arsina 3 g de zinco granulado (malha de 1 mm). Imediatamente após adição do zinco, unir as unidades (c) e (e) ao frasco gerador. Deixar em banho de água a 25 ± 3 °C por 45 minutos. Agitar, suavemente, com movimentos circulares, em intervalos de 10 minutos. Desconectar a unidade de absorção das demais partes do aparelho e transferir a solução de absorção para cela com passo de 1 cm. Qualquer coloração vermelha produzida pela *preparação amostra* não é mais intensa que aquela obtida com a *preparação padrão*. Se necessário, determinar as absorvâncias em espectrofotômetro ou colorímetro adequado em comprimento de onda entre 535 nm e 540 nm, utilizando dietilditiocarbamato de prata SR para ajuste do zero.

MÉTODO II

Nota: os seguintes cuidados e procedimentos especiais devem ser observados durante a realização do ensaio.

(1) Algumas substâncias podem reagir com violência explosiva quando digeridas com peróxido de hidrogênio. Observar precauções de segurança durante este procedimento.

(2) Se a substância sob exame contém halogênios, utilizar temperatura mais baixa durante o aquecimento

da amostra com ácido sulfúrico, evitando ebulição da mistura, e adicionar o peróxido de hidrogênio com precaução, antes que a carbonização da amostra se inicie, para prevenir a perda de arsênio trivalente.

(3) Se a substância sob exame reage muito rapidamente com o ácido sulfúrico e começa a fumejar antes do aquecimento, utilizar, no lugar de 5 ml de ácido sulfúrico, 10 ml de ácido sulfúrico a 50% (V/V) resfriado e acrescentar algumas gotas de peróxido de hidrogênio antes do aquecimento.

Preparação amostra

Transferir para frasco gerador de arsina a quantidade de amostra especificada na monografia, ou a quantidade de amostra, em gramas, calculada segundo a equação:

$$3 / L$$

em que

L = limite de arsênio na amostra em ppm.

Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico e algumas pérolas de vidro. Se necessário, empregar maior quantidade do ácido para umedecer completamente a substância, não ultrapassando um volume total de 10 ml. Proceder à digestão em capela, de preferência usando placa de aquecimento, com temperatura não superior a 120 °C, até o início da combustão. Adicionar, com cuidado e gota a gota, peróxido de hidrogênio concentrado, permitindo o abrandamento da reação e aquecendo entre as adições. Adicionar as primeiras gotas aos poucos e muito lentamente, misturando cuidadosamente para prevenir reação rápida e interrompendo o aquecimento caso ocorra formação excessiva de espuma. Após a diminuição da intensidade da reação, aquecer, cautelosamente, agitando o frasco ocasionalmente, com movimentos circulares, para permitir a reação da amostra aderida nas paredes do frasco. Manter condições de oxidação durante toda a digestão por meio da adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio concentrado sempre que a mistura se tornar marrom ou escurecer. Continuar a reação até que a amostra seja completamente digerida, aumentando a temperatura de aquecimento até que vapores de trióxido de enxofre sejam abundantemente desprendidos e a solução se torne incolor ou mantenha apenas uma coloração levemente bege. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água, evaporar até que o trióxido de enxofre seja novamente desprendido e resfriar. Repetir este procedimento com mais 10 ml de água para remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Resfriar e adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água. Lavar as paredes do frasco com alguns mililitros de água e diluir para 35 ml com o mesmo solvente. Prosseguir conforme descrito para *preparação amostra* no *Método I* a partir de "Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M...".

Preparação padrão

Transferir para frasco gerador de arsina 3 ml de *solução padrão de arsênio (1 ppm As)*, adicionar 2 ml de ácido sulfúrico, homogeneizar e adicionar o mesmo volume de peróxido de hidrogênio concentrado empregado na *preparação amostra*. Aquecer a solução até que se formem vapores densos, resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água e aquecer novamente até formação de vapores densos. Repetir este procedimento com mais 10 ml de água para remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Resfriar e diluir para 35 ml com água.

Procedimento

Proceder conforme descrito no *Método I*.

MÉTODO VISUAL

O aparelho para a determinação visual de arsênio (Figura 2) consiste, basicamente, de frasco cônico adequado, geralmente de 100 ml, onde a arsina é gerada. Esse frasco é fechado com rolha de vidro esmerilhado. Por essa rolha passa um tubo de vidro de aproximadamente 200 mm de comprimento e diâmetro interno de 5 mm. A extremidade inferior desse tubo estreita-se para um diâmetro interno de 1 mm. A aproximadamente 15 mm da ponta desse tubo há um orifício com diâmetro de 2-3 mm que deve estar, no mínimo, 3 mm abaixo da superfície mais baixa da rolha de vidro. A extremidade superior do tubo apresenta uma superfície plana que forma, com o eixo do tubo, ângulo reto. Um outro tubo de mesmo diâmetro interno e 30 mm de comprimento, com uma superfície plana similar, é ajustado em contato com o primeiro e mantido nesta posição por meio de duas espirais. Dentro do tubo inferior são inseridos 50-60 mg de *algodão de acetato de chumbo*, frouxamente empacotados, ou um pedaço de *papel de acetato de chumbo* enrolado pesando 50-60 mg e um pequeno chumaço de algodão. Entre as superfícies planas dos tubos é colocado

um disco ou um quadrado de *papel de brometo mercúrico* com tamanho adequado para recobrir todo o orifício do tubo (15 mm × 15 mm).

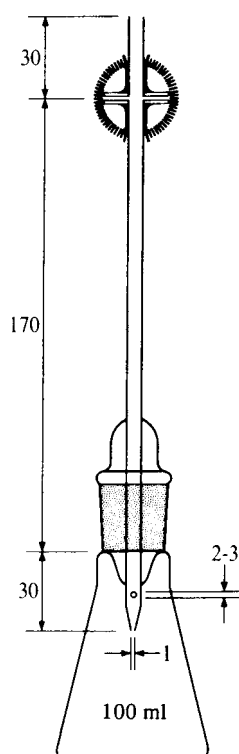


Figura 2 – Aparelho para determinação de arsênio pelo método visual (dimensões em mm).

Preparação amostra

Transferir para o frasco do aparelho a quantidade de amostra especificada na monografia, dissolver e diluir com água para 25 ml. Se a substância já estiver em solução, diluir para 25 ml com água. Adicionar 15 ml de ácido clorídrico, 0,1 ml de cloreto estanoso fortemente ácido SR e 5 ml de iodeto de potássio *M*. Deixar em repouso por 15 minutos.

Preparação padrão

Transferir 1 ml da *solução padrão de arsênio (1 ppm As)* para o frasco do aparelho e diluir com água para 25 ml. Adicionar 15 ml de ácido clorídrico, 0,1 ml de cloreto estanoso fortemente ácido SR e 5 ml de iodeto de potássio *M*. Deixar em repouso por 15 minutos.

Procedimento

Adicionar aos frascos contendo as *preparações padrão e amostra* 5 g de zinco ativado. Imediatamente, acoplar as duas partes do aparelho e imergir os frascos em banho de água mantido à temperatura tal que a liberação de arsina seja uniforme. Após não menos que 2 horas, a mancha eventualmente obtida no *papel de brometo mercúrico* da *preparação amostra* não é mais intensa que aquela obtida com a *preparação padrão*.

V.3.2.6 ENSAIO-LIMITE PARA AMÔNIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de cloreto de amônio

Dissolver 0,741 g de cloreto de amônio em água e diluir para 1000 ml com o mesmo solvente. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 250 µg de amônio (250 ppm NH₄).

Solução padrão de amônio (2,5 ppm NH₄)

Diluir 1 ml de *solução estoque de cloreto de amônio* para 100 ml com água.

Solução padrão de amônio (1 ppm NH₄)

Diluir 40 ml de *solução padrão de amônio (2,5 ppm NH₄)* para 100 ml com água.

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado quantidade de amostra especificada na monografia e dissolver com 14 ml de água. Alcalinizar, se necessário, com hidróxido de sódio 2 M e diluir para 15 ml com água.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 10 ml de *solução padrão de amônio (1 ppm NH₄)* e diluir para 15 ml com água.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão e amostra* adicionar 0,3 ml de iodeto de potássio mercúrico alcalino. Tampar os tubos, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração amarela desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

V.3.2.7 ENSAIO-LIMITE PARA CÁLCIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de carbonato de cálcio

Pesar, exatamente, 0,624 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em água contendo 3 ml de ácido acético 5 M e diluir para 250 ml com água.

Solução padrão de cálcio (400 ppm Ca)

Pesar, exatamente, 1 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em 23 ml de ácido clorídrico M e diluir para 100 ml com água. Imediatamente antes do uso, diluir 10 ml para 100 ml com água.

Solução padrão alcoólica de cálcio (100 ppm Ca)

Pesar, exatamente, 2,5 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em 12 ml de ácido acético 5 M e diluir para 1000 ml com água. Imediatamente antes do uso, diluir 10 ml para 100 ml com etanol.

Solução padrão de cálcio (100 ppm Ca)

Diluir 10 ml da *solução estoque de carbonato de cálcio* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de cálcio (10 ppm Ca)

Diluir 10 ml da *solução estoque de carbonato de cálcio* para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Em tubo adequado, adicionar 1 ml de oxalato de amônio SR a 0,2 ml de *solução padrão alcoólica de cálcio (100 ppm Ca)*. Aguardar 1 minuto e adicionar mistura de 1 ml de ácido acético diluído e 15 ml da solução da amostra especificada na monografia. Agitar. Preparar o padrão da mesma maneira, utilizando mistura de 1 ml de ácido acético diluído, 10 ml de *solução padrão de cálcio (10 ppm Ca)* e 5 ml de água. Após 15 minutos, qualquer opalescência desenvolvida na preparação amostra não é mais intensa do que aquela obtida na preparação padrão.

V.3.2.8 ENSAIO-LIMITE PARA MAGNÉSIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de sulfato de magnésio

Pesar, exatamente, 1,010 g de sulfato de magnésio heptaidratado, dissolver e diluir com água para 100 ml.

Solução padrão de magnésio (100 ppm Mg)

Diluir 10 ml da *solução estoque de sulfato de magnésio* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de magnésio (10 ppm Mg)

Diluir 10 ml da *solução estoque de sulfato de magnésio* para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Adicionar 0,1 g de tetraborato sódico a 10 ml da solução da amostra especificada na monografia. Se necessário, ajustar o pH da solução na faixa de 8,8-9,2 utilizando ácido clorídrico SR ou hidróxido de sódio SR. Extrair com duas porções de 5 ml de hidroxiquinolina a 0,1% (p/V) em clorofórmio, agitando durante 1 minuto a cada extração. Deixar decantar, separar e descartar a camada orgânica. Adicionar à camada aquosa 0,4 ml de butilamina e 0,1 ml de trietanolamina. Se necessário, ajustar o pH da solução na faixa de 10,5-11,5. Adicionar 4 ml de hidroxiquinolina a 0,1% (p/V) em clorofórmio, agitar por 1 minuto e deixar separar as camadas. Utilizar a camada inferior para a comparação. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando mistura de 1 ml de *solução padrão de magnésio (10 ppm Mg)* e 9 ml de água. Qualquer coloração desenvolvida na preparação amostra não é mais intensa do que aquela obtida na preparação padrão.

V.3.2.9 ENSAIO-LIMITE PARA MAGNÉSIO E METAIS ALCALINO-TERROSOS

A 200 ml de água adicionar 0,1 g de cloridrato de hidroxilamina, 10 ml tampão cloreto de amônio pH 10, 1 ml de solução de sulfato de zinco 0,1 M e cerca de 15 mg de negro de eriocromo T triturado. Aquecer a cerca de 40 °C e titular com edetato de sódio 0,01 M SV até viragem de violeta para azul. Adicionar à solução quantidade especificada da amostra dissolvida em 100 ml de água ou solução da amostra especificada na monografia. Se a coloração da solução mudar para violeta, titular com edetato de sódio 0,01 M SV até a viragem para azul. O volume de edetato de sódio 0,01 M SV gasto na segunda titulação não excede o estabelecido na monografia.

V.3.2.10 ENSAIO-LIMITE PARA ALUMÍNIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução padrão de alumínio (200 ppm Al)

Pesar, exatamente, 0,352 g de sulfato de alumínio e potássio dodecaidratado, dissolver em água, adicionar 10 ml de ácido sulfúrico diluído e diluir com água para 100 ml.

Solução padrão de alumínio (10 ppm Al)

Pesar, exatamente, 1,39 g de nitrato de alumínio nonaidratado, dissolver e diluir com água para 100 ml. Diluir 10 ml para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de alumínio (2 ppm Al)

Diluir 1 ml de *solução padrão de alumínio (200 ppm)* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Transferir para funil de separação a solução da amostra especificada na monografia e extrair com três porções de hidroxiquinolina a 0,5% (p/V) em clorofórmio, sendo as duas primeiras porções de 20 ml e a

última de 10 ml. Diluir os extratos clorofórmicos combinados para 50 ml com clorofórmio. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando a quantidade prescrita de *solução padrão de alumínio*. Preparar o branco da mesma maneira utilizando a solução em branco especificada na monografia.

Medir a intensidade da fluorescência (V.2.15) da solução amostra (I_1), do padrão (I_2) e do branco (I_3) utilizando o feixe de excitação em 392 nm e um filtro secundário com a faixa de transmissão centrada em 518 nm ou com o monocromador ajustado para transmitir neste comprimento de onda. A fluorescência ($I_1 - I_3$) da preparação amostra não é superior à da preparação padrão ($I_2 - I_3$).

V.3.2.11 ENSAIO-LIMITE PARA FOSFATOS

REAGENTES ESPECIAIS

Solução padrão de fosfato (5 ppm PO₄)

Pesar, exatamente, 0,716 g de fosfato monobásico de potássio, dissolver e diluir com água para 1000 ml. Diluir 10 ml para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

A 100 ml da solução da amostra especificada na monografia adicionar 4 ml de reagente sulfomolibdico e agitar. Adicionar 0,1 ml de cloreto estanoso SR e agitar. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando mistura de 2 ml de *solução padrão de fosfato (5 ppm PO₄)* e 98 ml de água. Aguardar 10 minutos e comparar as cores utilizando 20 ml de cada preparação. A coloração da preparação amostra não é mais intensa do que a da preparação padrão.

V.3.2.12 ENSAIO-LIMITE PARA CHUMBO

A determinação de chumbo em produtos farmacêuticos pode ser realizada por dois métodos. Para a determinação do conteúdo de metais pesados, geralmente expresso em chumbo equivalente, é adotado o ensaio-limite (V.3.2.3). Para a determinação do chumbo extraível por ditizona, o ensaio descrito a seguir é empregado.

Selecionar todos os reagentes para este teste de modo a conter o mínimo de chumbo possível e armazenar todas as soluções reagentes em recipientes de vidro de borossilicato. Enxaguar toda a vidraria com solução aquecida de ácido nítrico 50% (V/V) e, em seguida com água.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução de cianeto-amônia

Dissolver 2 g de cianeto de potássio em 15 ml de hidróxido de amônio e diluir para 100 ml com água.

Solução de citrato de amônio

Dissolver 40 g de ácido cítrico em 90 ml de água. Acrescentar 2 ou 3 gotas de vermelho de fenol a 0,1% (p/V). Adicionar, cautelosamente, hidróxido de amônio até que a solução adquira cor avermelhada. Remover qualquer chumbo eventualmente presente por meio de extração com porções de 20 ml de *solução extratora de ditizona*, até que a coloração laranja esverdeada na solução de ditizona seja mantida.

Solução padrão de chumbo (1 ppm Pb)

Diluir um volume exatamente medido de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* (V.3.2.3) para 10 volumes com ácido nítrico a 1% (V/V), de modo a obter solução contendo o equivalente a 1 µg de chumbo por mililitro (1 ppm Pb).

Solução extratora de ditizona

Dissolver 30 mg de ditizona em 1000 ml de clorofórmio e acrescentar 5 ml de etanol. Armazenar em refrigerador. Imediatamente antes do uso, agitar volume adequado desta solução com metade de seu volume de ácido nítrico a 1% (V/V). Descartar a camada ácida.

Solução de cloridrato de hidroxilamina

Dissolver 20 g de cloridrato de hidroxilamina em água para obter, aproximadamente, 65 ml. Transferir para funil de separação. Acrescentar 5 gotas de azul de timol a 0,1% (p/V) em etanol e adicionar hidróxido de amônio até que a solução adquira cor amarela. Adicionar 10 ml de solução aquosa de dietilditiocarbamato de sódio a 4% (p/V), agitar e deixar em repouso por 5 minutos. Extrair esta solução com sucessivas porções de 10 a 15 ml de clorofórmio até que uma porção de 5 ml do extrato de clorofórmio não adquira cor amarela quando agitada com sulfato cúprico a 12,5% (p/V). Adicionar ácido clorídrico 3 M até coloração rosa (se necessário, adicionar 1 ou 2 gotas de azul de timol a 0,1% (p/V) em etanol) e diluir para 100 ml com água.

Solução de cianeto de potássio

Dissolver 50 g de cianeto de potássio em água suficiente para 100 ml. Remover o chumbo desta solução por meio de extração com porções sucessivas de *solução extratora de ditizona*, até que a coloração laranja esverdeada na solução de ditizona seja mantida. Extrair qualquer ditizona que remanescente na solução de cianeto agitando com clorofórmio. Diluir a solução de cianeto com água suficiente de modo que cada 100 ml contenham 10 g de cianeto de potássio.

Solução padrão de ditizona

Dissolver 10 mg de ditizona em 1000 ml de clorofórmio. Conservar em frasco isento de chumbo, munido com tampa de vidro, em refrigerador, adequadamente embalado para proteger da luz.

PREPARAÇÃO AMOSTRA

Na ausência de especificação na monografia, preparar a solução da amostra como descrito a seguir.

Nota: *se a amostra reage muito rapidamente com o ácido sulfúrico e começa a fumar antes do aquecimento, utilizar, no lugar de 5 ml de ácido sulfúrico, 10 ml de ácido sulfúrico a 50% (V/V) resfriado e acrescentar algumas gotas de peróxido de hidrogênio antes do aquecimento. Observar precauções de segurança neste procedimento, pois algumas substâncias podem reagir com violência explosiva quando tratadas com peróxido de hidrogênio.*

Transferir 1 g da amostra para frasco adequado, adicionar 5 ml de ácido sulfúrico, acrescentar algumas pérolas de vidro e digerir em placa de aquecimento, em capela, até começar a fumar. Outros meios de aquecimento adequados podem ser utilizados. Se necessário, adicionar excesso de ácido sulfúrico para umedecer completamente a amostra, não ultrapassando um total de 10 ml. Adicionar, gota a gota e com precaução, peróxido de hidrogênio concentrado, permitindo o abrandamento da reação e aquecendo entre as adições. Adicionar as primeiras gotas aos poucos e muito lentamente, misturando cuidadosamente para prevenir reação rápida e interrompendo o aquecimento se ocorrer formação excessiva de espuma. Girar a solução no frasco para permitir a reação da amostra aderida nas paredes (acrescentar peróxido de hidrogênio sempre que a mistura se tornar marrom ou escurecer). Continuar a reação até que a amostra seja completamente digerida, vapores de trióxido de enxofre sejam abundantemente desprendidos e a solução se torne incolor. Resfriar, adicionar, com cuidado, 10 ml de água, evaporar até que o trióxido de enxofre seja novamente despendido e resfriar. Repetir este procedimento com outros 10 ml de água para remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Diluir, cuidadosamente, com 10 ml de água e resfriar.

PROCEDIMENTO

Transferir para funil de separação a *preparação amostra*, com auxílio de 10 ml de água, ou o volume de solução da amostra especificado na monografia. A menos que indicado de maneira diferente, acrescentar 6 ml de *solução de citrato de amônio* e 2 ml de *solução cloridrato de hidroxilamina* (para a determinação de chumbo em sais de ferro, utilizar 10 ml de *solução de citrato de amônio*). Adicionar 2 gotas de vermelho de fenol a 0,1% (p/V) em etanol, adicionar hidróxido de amônio suficiente para alcalinização (coloração vermelha) e homogeneizar. Resfriar a solução, se necessário, e acrescentar 2 ml de *solução de cianeto de potássio*. Extrair, imediatamente, com porções de 5 ml de *solução extratora de ditizona*, escoando cada extrato para outro funil de separação, até que a coloração verde da solução de ditizona seja mantida. Agitar as frações combinadas de ditizona durante 30 segundos com 20 ml de ácido nítrico a 1% (V/V) e descartar a camada clorofórmica. Adicionar à solução ácida 5 ml de *solução padrão de ditizona*, 4 ml de *solução de cianeto-amônia* e agitar durante 30 segundos. A camada clorofórmica não apresenta coloração violeta mais intensa que a de um controle preparado com um volume de *solução padrão de chumbo (1 ppm Pb)* equivalente à quantidade de chumbo permitida na substância sob exame, empregando os mesmos volumes de reagentes e o mesmo tratamento utilizado para a solução da amostra.

V.2.25 LIMPEZ DE SOLUÇÕES

Utilizar tubos de vidro neutro, incolor e transparente, com fundo chato e de 15 a 25 mm de diâmetro interno, a menos que indicado de maneira diferente na monografia. Introduzir, em tubos separados, a solução em exame e a *suspensão de referência* indicada na monografia, preparando-a por ocasião do uso, conforme especificado na Tabela 1. Encher os tubos até a profundidade de 40 mm. Cinco minutos após o preparo da *suspensão de referência*, comparar o conteúdo dos tubos, observando-os verticalmente, sob luz visível difusa e contra fundo preto. A difusão da luz deve ser tal que a *suspensão de referência I* seja facilmente distinguida da água e da *suspensão de referência II*.

Uma solução é considerada límpida quando, ao ser examinada nas condições anteriormente descritas, sua transparência corresponde à da água ou à do solvente utilizado, ou quando sua opalescência não é mais pronunciada que a da *suspensão de referência I*.

Padrão de opalescência

Dissolver 1 g de sulfato de hidrazina em água e completar o volume para 100 ml com o mesmo solvente. Deixar em repouso por 4 a 6 horas. Adicionar 25 ml desta solução a uma solução contendo 2,5 g de metenamina em 25 ml de água. Misturar bem e deixar em repouso por 24 horas. Esta suspensão é estável por dois meses se conservada em recipiente de vidro, com superfície livre de defeitos. A suspensão não deve aderir às paredes do recipiente e deve ser vigorosamente agitada, no recipiente original, antes do uso. Para o preparo do *padrão de opalescência*, diluir 15 ml da suspensão para 1000 ml com água. O *padrão de opalescência* deve ser preparado no momento do uso e pode ser conservado por, no máximo, 24 horas.

Tabela 1 – Suspensões de referência

<i>Suspensão de referência</i>	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>
Padrão de opalescência (ml)	5	10	30	50
Água (ml)	95	90	70	50

V.3.2 ENSAIOS-LIMITE PARA IMPUREZAS INORGÂNICAS

Ensaio-limite são ensaios quantitativos ou semiquantitativos realizados para verificar se o conteúdo de impurezas inorgânicas presentes em insumos farmacêuticos não excede o limite especificado na monografia da substância em exame, expresso em porcentagem (p/p) ou em microgramas por grama (ppm) da substância.

Os ensaios são realizados em tubos calibrados de vidro transparente, de diâmetro interno uniforme e fundo plano, salvo indicação contrária na monografia. Os tubos devem apresentar marcas externas correspondentes aos volumes de 25 ml e 50 ml. Tubos de Nessler usualmente são adequados.

A coluna de líquido é observada segundo o eixo vertical do tubo, de cima para baixo, sob luz difusa, sobre fundo branco ou, se necessário, sobre fundo negro, salvo indicação contrária.

V.3.2.1 ENSAIO-LIMITE PARA CLORETOS

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado a quantidade de amostra especificada na monografia e adicionar 30 ml a 40 ml de água. Se a substância já estiver em solução, diluir para 30 ml a 40 ml com água. Neutralizar, se necessário, com ácido nítrico SR. Se após a neutralização a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar em papel de filtro isento de cloreto. Caso um volume específico de solução da amostra seja especificado na monografia individual, e o limite de cloreto corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido clorídrico padrão, o ensaio deve ser realizado sem diluição adicional da solução da amostra.

Preparação padrão

Transferir o volume de ácido clorídrico padrão (HCl 0,01 M) indicado na monografia ou na Tabela 1 (ou calculado conforme o limite especificado) para tubo adequado e proceder conforme descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Desenvolver padrão e amostra paralelamente. Adicionar às *preparações padrão* e *amostra* 1 ml de ácido

nítrico SR e 1 ml de nitrato de prata SR. Diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Deixar em repouso ao abrigo da luz durante 5 minutos. Qualquer turbidez desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

Tabela 1 – Cálculo de limites para cloretos
 Equivalentes em parte de Cl por 1 milhão de partes da substância (p/p)
 Padrão: 1 ml de ácido clorídrico 0,01 M (= 0,0003546 g de Cl)
 Volume final 50 ml
 Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 20 mm

<i>g de amostra</i>	<i>Cl p/milhão</i>	<i>g de amostra</i>	<i>Cl p/milhão</i>
0,10	3546 (= 0,355%)	3,8	93
0,15	2364 (= 0,236%)	4,0	88
0,20	1773 (= 0,180%)	4,2	84
0,25	1418 (= 0,142%)	4,4	80
0,30	1182 (= 0,120%)	4,6	77
0,35	1013 (= 0,100%)	4,8	74
0,40	886	5,0	71
0,45	788	5,2	68
0,50	709	5,4	65
0,55	645	5,6	63
0,60	591	5,8	61
0,65	545	6,0	59
0,70	506	6,2	57
0,75	473	6,4	55
0,80	443	6,6	53
0,85	417	6,8	52
0,90	394	7,0	50
0,95	373	7,2	49
1,00	354	7,4	48
1,2	285	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

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0003546 g de Cl), se o limite de cloretos para a substância sob exame for 354 ppm, submeter ao ensaio 1 g de amostra; se o limite for 71 ppm, submeter ao ensaio 5 g de amostra.

V.3.2.2 ENSAIO-LIMITE PARA SULFATOS

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado a quantidade de amostra especificada na monografia e adicionar 30 ml a 40 ml de água. Se a substância já estiver em solução, diluir para 30 ml a 40 ml com água. Neutralizar, se necessário, com ácido clorídrico SR. Eventualmente, pode-se utilizar ácido acético glacial tanto para neutralização quanto para acidificação da *preparação amostra*. Se após a neutralização a solução não estiver perfeitamente límpida, filtrar em papel de filtro isento de sulfato. Caso um volume específico de solução da amostra seja especificado na monografia individual, e o limite de sulfato corresponda a volume igual ou inferior a 0,2 ml de ácido sulfúrico padrão, o ensaio deve ser realizado sem diluição adicional da solução da amostra.

Preparação padrão

Transferir o volume de ácido sulfúrico padrão (H₂SO₄ 0,005 M) indicado na monografia ou na Tabela 1

(ou calculado conforme o limite especificado) para tubo adequado e proceder conforme descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Desenvolver padrão e amostra paralelamente. Adicionar às *preparações padrão e amostra* 1 ml de ácido clorídrico 3 M e 3 ml de cloreto de bário SR. Diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Deixar em repouso durante 10 minutos. Qualquer turbidez desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

Tabela 2 – Cálculo de limites para sulfatos
 Equivalentes em parte de SO₄ por milhão de partes da substância (p/p)
 Padrão: 2,5 ml de ácido sulfúrico 0,005 M (0,0012008 g de SO₄)
 Volume final 50ml
 Tubo Nessler de 50 ml e diâmetro externo de 20 mm

<i>g de substância</i>	<i>SO₄ p/milhão</i>	<i>g de substância</i>	<i>SO₄ p/milhão</i>
0,50	2401 (= 0,240%)	4,6	261
0,55	2183 (= 0,220%)	4,8	250
0,60	2001 (= 0,200%)	5,0	240
0,65	1847 (= 0,185%)	5,2	231
0,70	1715 (= 0,171%)	5,4	222
0,75	1601 (= 0,160%)	5,6	214
0,80	1501	5,8	207
0,85	1412	6,0	200
0,90	1334	6,2	194
0,95	1264	6,4	187
1,00	1200	6,6	182
1,2	1001	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

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0012008 g de SO₄), se o limite de sulfatos para a substância sob exame for 500 ppm, submeter ao ensaio 2,4 g de amostra; se o limite for 151 ppm, submeter ao ensaio 8 g de amostra.

V.3.2.3 ENSAIO-LIMITE PARA METAIS PESADOS

O ensaio-limite para metais pesados destina-se a demonstrar que o conteúdo de impurezas metálicas que são coloridas pelo íon sulfeto não excede o limite especificado na monografia da substância em exame, expresso em porcentagem (p/p) ou em microgramas de chumbo por grama (ppm) da substância, conforme determinado pela comparação visual com uma preparação padrão chumbo (Pb). Substâncias tipicamente detectadas por este ensaio incluem chumbo, mercúrio, bismuto, arsênio, antimônio, estanho, cádmio, prata, cobre e molibdênio.

Realizar o ensaio utilizando o *Método I*, salvo indicação contrária na monografia individual. O *Método I* é utilizado para substâncias que produzem preparações límpidas e incolores sob as condições especificadas no ensaio. O *Método II* é empregado para substâncias que não produzem preparações límpidas e incolores sob as condições especificadas para o *Método I*, ou para substâncias que, em virtude de sua natureza complexa, interferem com a precipitação de metais pelo íon sulfeto, ou para óleos fixos e voláteis. O *Método*

III, que inclui um processo de digestão úmida, é utilizado somente nos casos em que os *Métodos I e II* não podem ser utilizados.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de nitrato de chumbo

Dissolver, exatamente, 159,8 mg de nitrato de chumbo em 100 ml de água adicionada de 1 ml de ácido nítrico. Diluir com água para 1000 ml e homogeneizar. Preparar e estocar esta solução em recipientes de vidro isentos de sais solúveis de chumbo.

Solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)

No dia do uso, diluir 10 ml da *solução estoque de nitrato de chumbo* para 100 ml com água. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 10 µg de chumbo (10 ppm Pb).

Tampão acetato pH 3,5

Dissolver 25,0 g de acetato de amônio em 25 ml de água e adicionar 38 ml de ácido clorídrico 6 M. Se necessário, ajustar o pH em 3,5 com hidróxido de amônio 6 M ou ácido clorídrico 6 M. Diluir para 100 ml com água e homogeneizar.

MÉTODO I

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado solução da amostra preparada conforme especificado na monografia e diluir para 25 ml com água, ou dissolver e diluir com água para 25 ml a quantidade de amostra, em gramas, especificada na monografia ou calculada segundo a equação:

$$2 / (1000L)$$

em que

L = limite de metais pesados na amostra em porcentagem (p/p).

Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação controle

Transferir para um terceiro tubo volume solução da amostra preparada conforme descrito na monografia ou em *preparação amostra* e adicionar 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)*. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético M ou hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Procedimento

A cada uma das preparações adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*. O teste somente é válido se a intensidade da coloração desenvolvida na *preparação controle* é igual ou superior àquela observada na *preparação padrão*. Do contrário, aplicar o *Método II* ao invés do *Método I* para a substância sob exame.

MÉTODO II

Preparação amostra

Utilizar a quantidade de amostra, em gramas, especificada na monografia ou calculada segundo a equação:

$$2 / (1000L)$$

em que

L = limite de metais pesados na amostra em porcentagem (p/p).

Transferir a amostra para cadinho adequado, adicionar ácido sulfúrico suficiente para umedecer a substância e incinerar, cuidadosamente, sob temperatura baixa. Adicionar à massa carbonizada 2 ml de ácido nítrico e 5 gotas de ácido sulfúrico. Aquecer, com cuidado, até que não mais se desprendam vapores brancos. Incinerar em mufla a 500-600 °C até completa combustão do carbono. Resfriar em temperatura ambiente, adicionar 4 ml de ácido clorídrico 6 *M*, cobrir, digerir em banho-maria por 15 minutos, descobrir e evaporar em banho-maria, lentamente, até *secura*. Umedecer o resíduo com 1 gota de ácido clorídrico, adicionar 10 ml de água quente e digerir em banho-maria por 2 minutos. Alcalinizar ao papel tornassol com hidróxido de amônio 6 *M* adicionado gota a gota. Diluir com água para 25 ml e ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com ácido acético *M*, utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Filtrar se necessário, lavar o cadinho e o filtro com 10 ml de água e combinar o filtrado e as águas de lavagem em tubo adequado para comparação de cor. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Proceder conforme descrito em *preparação padrão* no *Método I*.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO III

Preparação amostra

Transferir a quantidade ou volume de amostra indicada na monografia para um balão de Kjeldahl de 100 ml previamente limpo e seco (um balão de 300 ml pode ser utilizado nos casos em que a reação resulta em formação excessiva de espuma). Manter o balão inclinado em um ângulo de 45°. Se a substância sob exame for sólida, adicionar mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico em quantidade suficiente para umedecer completamente a amostra; se a substância sob exame for líquida, adicionar alguns mililitros de mistura de 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico. Aquecer, brandamente, para iniciar a reação. Quando a reação abrandar, adicionar porções da mistura ácida, aquecendo a cada adição. Repetir a operação até que se tenha acrescentado um volume total de 18 ml da mistura ácida. Aumentar a temperatura de aquecimento e ferver, brandamente, a mistura até o escurecimento da solução. Resfriar, adicionar 2 ml de ácido nítrico e aquecer novamente até o escurecimento da solução. Continuar o aquecimento até que nenhum escurecimento adicional seja observado, e então aquecer vigorosamente até que se produzam vapores brancos densos. Resfriar e adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água. Aquecer, brandamente, à ebulição até que vapores brancos densos sejam novamente produzidos e manter o aquecimento para reduzir o volume a 2-3 ml. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água e examinar a cor da solução. Se a cor é amarela, adicionar, cuidadosamente, 1 ml de peróxido de hidrogênio concentrado e aquecer à ebulição até que se produzam vapores brancos densos e o volume seja reduzido a 2-3 ml. Se a solução permanece amarela, repetir a adição de 5 ml de água e 1 ml de peróxido de hidrogênio concentrado até que a solução se torne incolor. Resfriar e diluir, cuidadosamente, com alguns mililitros de água. Transferir para tubo adequado para comparação de cor, lavar o balão com água, transferindo as águas de lavagem para o tubo e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de

amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir 8 ml de ácido sulfúrico e 10 ml de ácido nítrico para balão de Kjeldahl de 100 ml previamente limpo e seco. Acrescentar volume adicional de ácido nítrico equivalente àquele que foi adicionado à *preparação amostra*. Aquecer a solução para a produção de vapores brancos densos. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água e, caso a *preparação amostra* tenha sido tratada com peróxido de hidrogênio, adicionar volume de peróxido de hidrogênio concentrado equivalente àquele que foi adicionado à substância sob exame. Aquecer, brandamente, à ebulição até que vapores brancos densos sejam novamente produzidos. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 5 ml de água, homogeneizar e aquecer, brandamente, à ebulição para produzir vapores brancos densos e reduzir o volume a 2-3 ml. Resfriar, diluir, cuidadosamente, com alguns mililitros de água, adicionar 2 ml de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* e homogeneizar. Transferir para tubo adequado para comparação de cor, lavar o balão com água, transferindo as águas de lavagem para o tubo e diluir para 25 ml com água. Ajustar o pH entre 3,0 e 4,0 com hidróxido de amônio 6 M utilizando papel indicador de faixa estreita como indicador externo. Diluir com água para aproximadamente 40 ml e homogeneizar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão e amostra* adicionar 2 ml de *tampão acetato pH 3,5* e 1,2 ml de tioacetamida SR. Diluir com água para 50 ml, homogeneizar e deixar em repouso por 2 minutos. Observar as preparações de cima para baixo, segundo o eixo vertical do tubo, sobre fundo branco. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

V.3.2.4 ENSAIO-LIMITE PARA FERRO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de sulfato férrico amoniacal

Dissolver, exatamente, 0,8634 g de sulfato férrico amoniacal dodecaidratado em água contendo 25 ml de ácido sulfúrico M e diluir com água para 500 ml. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 200 µg de ferro (200 ppm Fe).

Solução padrão de ferro (100, 10 e 2 ppm Fe)

Imediatamente antes do uso, diluir com água, quantitativamente, volume adequado da *solução estoque de sulfato férrico amoniacal*.

Ácido cítrico

Quanto utilizado no ensaio-limite para ferro, cumpre com o seguinte requerimento: dissolver 0,5 g em 10 ml de água, adicionar 0,1 ml de ácido tioglicólico, homogeneizar, alcalinizar com amônia 10 M e diluir com água para 25 ml; não se desenvolve coloração rosa.

Amônia

Quando utilizada no ensaio-limite para ferro, cumpre com o seguinte requerimento: evaporar 5 ml à secura em banho-maria, adicionar 10 ml de água, 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V) e 0,1 ml de ácido tioglicólico, homogeneizar, alcalinizar com amônia e diluir para 25 ml com água; não se desenvolver coloração rosa.

MÉTODO I

Preparação amostra

Dissolver em água a quantidade de amostra especificada na monografia, ou utilizar a solução amostra especificada na monografia, transferir para tubo adequado, diluir para 40 ml com água e adicionar 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V).

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 1 ml de *solução padrão de ferro (10 ppm Fe)* (ou 1 ml de *solução padrão de ferro (100 ppm Fe)* caso a quantidade de amostra submetida ao ensaio seja calculada segundo a Tabela 3), diluir para 40 ml com água e adicionar 2 ml de ácido cítrico a 20% (p/V).

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 2 gotas de ácido tioglicólico. Homogeneizar e alcalinizar com amônia. Diluir para 50 ml com água, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração rósea desenvolvida na *preparação amostra* não é mais escura que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO II

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado 10 ml de solução da amostra especificada na monografia, adicionar 2 ml de ácido clorídrico 2 M e 0,5 ml de água de bromo. Após 5 minutos, retirar o excesso de bromo utilizando corrente de ar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 10 ml de *solução padrão de ferro (2 ppm Fe)*, adicionar 2 ml de ácido clorídrico 2 M e 0,5 ml de água de bromo. Após 5 minutos, retirar o excesso de bromo utilizando corrente de ar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 3 ml de tiocianato de potássio M, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

MÉTODO III

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado solução da amostra especificada na monografia e diluir, se necessário, para 45 ml com água, ou dissolver e diluir em água para 45 ml a quantidade, em gramas, de amostra calculada segundo a equação:

$$1 / (1000L)$$

em que

L = limite de ferro na amostra em porcentagem (p/p).

Adicionar 2 ml de ácido clorídrico e homogeneizar.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 1 ml de *solução padrão de ferro (10 ppm Fe)*, diluir para 45 ml com água, adicionar 2 ml de ácido clorídrico e homogeneizar.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão* e *amostra* adicionar 50 mg de cristais de peroxidissulfato de amônio, 3 ml de tiocianato de amônio a 30% (p/V), diluir para 50 ml com água e homogeneizar. Qualquer coloração desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

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	9000	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		

Exemplo: sendo o padrão fixo (0,0001 g de Fe), se o limite de ferro para a substância sob exame for 1000 ppm, submeter ao ensaio 0,1 g de amostra; se o limite for 200 ppm, submeter ao ensaio 0,5 g de amostra.

V.3.2.5 ENSAIO-LIMITE PARA ARSÊNIO

O ensaio-limite para arsênio consiste na determinação de traços de arsênio na substância sob exame, mediante sua conversão em arsina (AsH_3), que pode ser detectada por comparação visual ou espectrofotométrica. Os limites são estabelecidos em termos de arsênio (As) ou, em certos casos, em arsenico (As_2O_3).

Nota: metais como cromo, cobalto, mercúrio, molibdênio, níquel, paládio e prata ou seus respectivos sais podem interferir na geração de arsina.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de trióxido de arsênio

Pesar, exatamente, 132,0 mg de trióxido de arsênio previamente dessecado em estufa a 105 °C por 1 hora. Dissolver em 5 ml de hidróxido de sódio a 20% (p/V), neutralizar com ácido sulfúrico *M* e adicionar mais 10 ml de ácido sulfúrico *M*. Diluir para 1000 ml com água isenta de dióxido de carbono e homogeneizar.

Solução padrão de arsênio (1 ppm As)

Transferir 1 ml da *solução estoque de trióxido de arsênio* para balão volumétrico de 100 ml, adicionar 1 ml de ácido sulfúrico *M*, completar o volume com água isenta de dióxido de carbono e homogeneizar. Conservar a solução em recipiente de vidro e utilizar em até 3 dias. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 1 µg de arsênio (1 ppm As).

Algodão de acetato de chumbo

Imergir algodão absorvente em mistura de ácido acético 2 *M* e acetato de chumbo SR (1:10). Drenar o excesso de líquido colocando o algodão entre diversas camadas de papel de filtro, sem pressioná-lo. Deixar secar à temperatura ambiente. Estocar em recipientes perfeitamente fechados.

Papel de acetato de chumbo

Imergir papel de filtro branco pesando 80 g/m² (Whatman n^o. 1 é adequado), cortado em pedaços de 6 mm × 80 mm, em mistura de ácido acético 2 *M* e acetato de chumbo SR (1:10). Deixar secar à temperatura ambiente. Estocar em recipientes perfeitamente fechados.

Papel de brometo mercúrico

Em um recipiente adequado contendo brometo mercúrico a 5% (p/V) em etanol absoluto imergir papel de filtro branco pesando 80 g/m² (Whatman n^o. 1 é adequado), cortado em pedaços de 20 cm × 15 mm e dobrados ao meio. Decantar o excesso de líquido e secar o papel à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, suspendendo-o, verticalmente, em um fio não-metálico. Eliminar 1 cm de cada borda e cortar o pedaço remanescente em quadrados de 15 mm de lado ou discos de 15 mm de diâmetro. Estocar em recipientes bem-fechados, revestidos com papel preto.

MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O método espectrofotométrico baseia-se na conversão de traços de arsênio (As) em arsina, que passa através de uma solução de dietilditiocarbamato de prata para formar um complexo vermelho. A coloração produzida é comparada, visualmente ou espectrofotometricamente, com aquela produzida de forma similar por um controle contendo quantidade de arsênio equivalente ao limite especificado na monografia.

Nota: antimônio, que forma estibina, interfere com o resultado produzindo cor ao reagir com o dietilditiocarbamato de prata. Quando se suspeitar da presença de antimônio, a coloração vermelha produzida com as preparações padrão e amostra deve ser comparada em espectrofotômetro ou colorímetro adequado, em comprimento de onda de absorção máxima entre 535-540 nm, faixa em que a interferência da estibina é desprezível.

Dois métodos podem ser empregados diferindo, apenas, no tratamento preliminar da amostra e do padrão. O *Método I*, em geral, é utilizado para substâncias inorgânicas, enquanto o *Método II* é empregado para substâncias orgânicas.

O aparelho utilizado (Figura 1) compreende: (a) frasco gerador de arsina; (b e d) juntas; (c) unidade esmerilhada; (e) tubo de absorção. Eventualmente, outro aparelho adequado, que apresente as características essenciais do apresentado, pode ser utilizado.

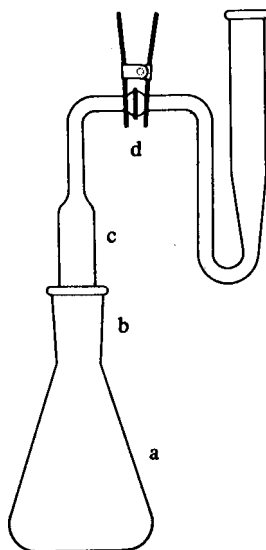


Figura 1 – Aparelho para determinação de arsênio pelo método espectrofotométrico.

MÉTODO I

Preparação amostra

Transferir para frasco gerador de arsina a quantidade de amostra especificada na monografia, ou a quantidade de amostra, em gramas, calculada segundo a equação:

$$3 / L$$

em que

L = limite de arsênio na amostra em ppm.

Dissolver e diluir com água para 35 ml. Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M, 2 ml de iodeto de potássio SR, 0,5 ml de cloreto estanoso fortemente ácido SR e 1 ml de 2-propanol. Homogeneizar. Deixar em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Na unidade (c) do aparelho descrito, introduzir duas mechas de *algodão de acetato de chumbo*, deixando entre elas espaço de 2 mm. As juntas (b) e (d) devem ser lubrificadas com vaselina e unidas conforme esquematizado na Figura 1.

Preparação padrão

Transferir para frasco gerador de arsina 3 ml de *solução padrão de arsênio (1 ppm As)*. Diluir com água para 35 ml e proceder como descrito para a *preparação amostra*.

Procedimento

Transferir para as unidades de absorção (e) dos aparelhos contendo as *preparações padrão e amostra* 3 ml de dietilditiocarbamato de prata SR. Adicionar à mistura do frasco gerador de arsina 3 g de zinco granulado (malha de 1 mm). Imediatamente após adição do zinco, unir as unidades (c) e (e) ao frasco gerador. Deixar em banho de água a 25 ± 3 °C por 45 minutos. Agitar, suavemente, com movimentos circulares, em intervalos de 10 minutos. Desconectar a unidade de absorção das demais partes do aparelho e transferir a solução de absorção para cela com passo de 1 cm. Qualquer coloração vermelha produzida pela *preparação amostra* não é mais intensa que aquela obtida com a *preparação padrão*. Se necessário, determinar as absorvâncias em espectrofotômetro ou colorímetro adequado em comprimento de onda entre 535 nm e 540 nm, utilizando dietilditiocarbamato de prata SR para ajuste do zero.

MÉTODO II

Nota: os seguintes cuidados e procedimentos especiais devem ser observados durante a realização do ensaio.

(1) *Algumas substâncias podem reagir com violência explosiva quando digeridas com peróxido de hidrogênio. Observar precauções de segurança durante este procedimento.*

(2) *Se a substância sob exame contém halogênios, utilizar temperatura mais baixa durante o aquecimento da amostra com ácido sulfúrico, evitando ebulição da mistura, e adicionar o peróxido de hidrogênio com precaução, antes que a carbonização da amostra se inicie, para prevenir a perda de arsênio trivalente.*

(3) *Se a substância sob exame reage muito rapidamente com o ácido sulfúrico e começa a fumer antes do aquecimento, utilizar, no lugar de 5 ml de ácido sulfúrico, 10 ml de ácido sulfúrico a 50% (V/V) resfriado e acrescentar algumas gotas de peróxido de hidrogênio antes do aquecimento.*

Preparação amostra

Transferir para frasco gerador de arsina a quantidade de amostra especificada na monografia, ou a quantidade de amostra, em gramas, calculada segundo a equação:

$$3 / L$$

em que

L = limite de arsênio na amostra em ppm.

Adicionar 5 ml de ácido sulfúrico e algumas pérolas de vidro. Se necessário, empregar maior quantidade do ácido para umedecer completamente a substância, não ultrapassando um volume total de 10 ml. Proceder à digestão em capela, de preferência usando placa de aquecimento, com temperatura não superior a 120 °C, até o início da combustão. Adicionar, com cuidado e gota a gota, peróxido de hidrogênio concentrado, permitindo o abrandamento da reação e aquecendo entre as adições. Adicionar as primeiras gotas aos poucos e muito lentamente, misturando cuidadosamente para prevenir reação rápida e interrompendo o aquecimento caso ocorra formação excessiva de espuma. Após a diminuição da intensidade da reação, aquecer, cautelosamente, agitando o frasco ocasionalmente, com movimentos circulares, para permitir a reação da amostra aderida nas paredes do frasco. Manter condições de oxidação durante toda a digestão por meio da adição de pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio concentrado sempre que a mistura se tornar marrom ou escurecer. Continuar a reação até que a mostra seja completamente digerida, aumentando a temperatura de aquecimento até que vapores de trióxido de enxofre sejam abundantemente desprendidos e a solução se torne incolor ou mantenha apenas uma coloração levemente bege. Resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água, evaporar até que o trióxido de enxofre seja novamente desprendido e resfriar. Repetir este procedimento com mais 10 ml de água para

remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Resfriar e adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água. Lavar as paredes do frasco com alguns mililitros de água e diluir para 35 ml com o mesmo solvente. Prosseguir conforme descrito para *preparação amostra* no *Método I* a partir de “Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico 2 M...”.

Preparação padrão

Transferir para frasco gerador de arsina 3 ml de *solução padrão de arsênio* (1 ppm As), adicionar 2 ml de ácido sulfúrico, homogeneizar e adicionar o mesmo volume de peróxido de hidrogênio concentrado empregado na *preparação amostra*. Aquecer a solução até que se formem vapores densos, resfriar, adicionar, cuidadosamente, 10 ml de água e aquecer novamente até formação de vapores densos. Repetir este procedimento com mais 10 ml de água para remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Resfriar e diluir para 35 ml com água.

Procedimento

Proceder conforme descrito no *Método I*.

MÉTODO VISUAL

O aparelho para a determinação visual de arsênio (Figura 2) consiste, basicamente, de frasco cônico adequado, geralmente de 100 ml, onde a arsina é gerada. Esse frasco é fechado com rolha de vidro esmerilhado. Por essa rolha passa um tubo de vidro de aproximadamente 200 mm de comprimento e diâmetro interno de 5 mm. A extremidade inferior desse tubo estreita-se para um diâmetro interno de 1 mm. A aproximadamente 15 mm da ponta desse tubo há um orifício com diâmetro de 2-3 mm que deve estar, no mínimo, 3 mm abaixo da superfície mais baixa da rolha de vidro. A extremidade superior do tubo apresenta uma superfície plana que forma, com o eixo do tubo, ângulo reto. Um outro tubo de mesmo diâmetro interno e 30 mm de comprimento, com uma superfície plana similar, é ajustado em contato com o primeiro e mantido nesta posição por meio de duas espirais. Dentro do tubo inferior são inseridos 50-60 mg de *algodão de acetato de chumbo*, frouxamente empacotados, ou um pedaço de *papel de acetato de chumbo* enrolado pesando 50-60 mg e um pequeno chumaço de algodão. Entre as superfícies planas dos tubos é colocado um disco ou um quadrado de *papel de brometo mercúrico* com tamanho adequado para recobrir todo o orifício do tubo (15 mm × 15 mm).

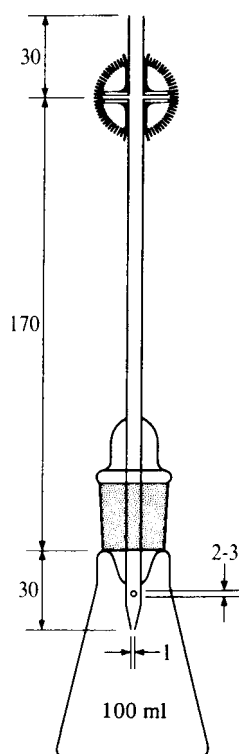


Figura 2 – Aparelho para determinação de arsênio pelo método visual (dimensões em mm).

Preparação amostra

Transferir para o frasco do aparelho a quantidade de amostra especificada na monografia, dissolver e diluir com água para 25 ml. Se a substância já estiver em solução, diluir para 25 ml com água. Adicionar 15 ml de ácido clorídrico, 0,1 ml de cloreto estânico fortemente ácido SR e 5 ml de iodeto de potássio *M*. Deixar em repouso por 15 minutos.

Preparação padrão

Transferir 1 ml da *solução padrão de arsênio (1 ppm As)* para o frasco do aparelho e diluir com água para 25 ml. Adicionar 15 ml de ácido clorídrico, 0,1 ml de cloreto estânico fortemente ácido SR e 5 ml de iodeto de potássio *M*. Deixar em repouso por 15 minutos.

Procedimento

Adicionar aos frascos contendo as *preparações padrão e amostra* 5 g de zinco ativado. Imediatamente, acoplar as duas partes do aparelho e imergir os frascos em banho de água mantido à temperatura tal que a liberação de arsina seja uniforme. Após não menos que 2 horas, a mancha eventualmente obtida no *papel de brometo mercúrico da preparação amostra* não é mais intensa que aquela obtida com a *preparação padrão*.

V.3.2.6 ENSAIO-LIMITE PARA AMÔNIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de cloreto de amônio

Dissolver 0,741 g de cloreto de amônio em água e diluir para 1000 ml com o mesmo solvente. Cada mililitro desta solução contém o equivalente a 250 µg de amônio (250 ppm NH₄).

Solução padrão de amônio (2,5 ppm NH₄)

Diluir 1 ml de *solução estoque de cloreto de amônio* para 100 ml com água.

Solução padrão de amônio (1 ppm NH₄)

Diluir 40 ml de *solução padrão de amônio (2,5 ppm NH₄)* para 100 ml com água.

Preparação amostra

Transferir para tubo adequado quantidade de amostra especificada na monografia e dissolver com 14 ml de água. Alcalinizar, se necessário, com hidróxido de sódio 2 *M* e diluir para 15 ml com água.

Preparação padrão

Transferir para tubo adequado 10 ml de *solução padrão de amônio (1 ppm NH₄)* e diluir para 15 ml com água.

Procedimento

Aos tubos contendo as *preparações padrão e amostra* adicionar 0,3 ml de iodeto de potássio mercúrico alcalino. Tampar os tubos, homogeneizar e deixar em repouso por 5 minutos. Qualquer coloração amarela desenvolvida na *preparação amostra* não é mais intensa que aquela observada na *preparação padrão*.

V.3.2.7 ENSAIO-LIMITE PARA CÁLCIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de carbonato de cálcio

Pesar, exatamente, 0,624 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em água contendo 3 ml de ácido acético 5 *M* e diluir para 250 ml com água.

Solução padrão de cálcio (400 ppm Ca)

Pesar, exatamente, 1 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em 23 ml de ácido clorídrico *M* e diluir para 100 ml com água. Imediatamente antes do uso, diluir 10 ml para 100 ml com água.

Solução padrão alcoólica de cálcio (100 ppm Ca)

Pesar, exatamente, 2,5 g de carbonato de cálcio previamente dessecado, dissolver em 12 ml de ácido acético 5 *M* e diluir para 1000 ml com água. Imediatamente antes do uso, diluir 10 ml para 100 ml com etanol.

Solução padrão de cálcio (100 ppm Ca)

Diluir 10 ml da *solução estoque de carbonato de cálcio* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de cálcio (10 ppm Ca)

Diluir 10 ml da *solução estoque de carbonato de cálcio* para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Em tubo adequado, adicionar 1 ml de oxalato de amônio SR a 0,2 ml de *solução padrão alcoólica de cálcio (100 ppm Ca)*. Aguardar 1 minuto e adicionar mistura de 1 ml de ácido acético diluído e 15 ml da solução da amostra especificada na monografia. Agitar. Preparar o padrão da mesma maneira, utilizando mistura de 1 ml de ácido acético diluído, 10 ml de *solução padrão de cálcio (10 ppm Ca)* e 5 ml de água. Após 15 minutos, qualquer opalescência desenvolvida na preparação amostra não é mais intensa do que aquela obtida na preparação padrão.

V.3.2.8 ENSAIO-LIMITE PARA MAGNÉSIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução estoque de sulfato de magnésio

Pesar, exatamente, 1,010 g de sulfato de magnésio heptaidratado, dissolver e diluir com água para 100 ml.

Solução padrão de magnésio (100 ppm Mg)

Diluir 10 ml da *solução estoque de sulfato de magnésio* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de magnésio (10 ppm Mg)

Diluir 10 ml da *solução estoque de sulfato de magnésio* para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Adicionar 0,1 g de tetraborato sódico a 10 ml da solução da amostra especificada na monografia. Se necessário, ajustar o pH da solução na faixa de 8,8-9,2 utilizando ácido clorídrico SR ou hidróxido de sódio SR. Extrair com duas porções de 5 ml de hidroxiquinolina a 0,1% (p/V) em clorofórmio, agitando durante 1 minuto a cada extração. Deixar decantar, separar e descartar a camada orgânica. Adicionar à camada aquosa 0,4 ml de butilamina e 0,1 ml de trietanolamina. Se necessário, ajustar o pH da solução na faixa de 10,5-11,5. Adicionar 4 ml de hidroxiquinolina a 0,1% (p/V) em clorofórmio, agitar por 1 minuto e deixar separar as camadas. Utilizar a camada inferior para a comparação. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando mistura de 1 ml de *solução padrão de magnésio (10 ppm Mg)* e 9 ml de água. Qualquer coloração desenvolvida na preparação amostra não é mais intensa do que aquela obtida na preparação padrão.

V.3.2.9 ENSAIO-LIMITE PARA MAGNÉSIO E METAIS ALCALINO-TERROSOS

A 200 ml de água adicionar 0,1 g de cloridrato de hidroxilamina, 10 ml tampão cloreto de amônio pH 10, 1 ml de solução de sulfato de zinco 0,1 M e cerca de 15 mg de negro de eriocromo T triturado. Aquecer a cerca de 40 °C e titular com edetato de sódio 0,01 M SV até viragem de violeta para azul. Adicionar à solução quantidade especificada da amostra dissolvida em 100 ml de água ou solução da amostra especificada na monografia. Se a coloração da solução mudar para violeta, titular com edetato de sódio 0,01 M SV até a viragem para azul. O volume de edetato de sódio 0,01 M SV gasto na segunda titulação não excede o estabelecido na monografia.

V.3.2.10 ENSAIO-LIMITE PARA ALUMÍNIO

REAGENTES ESPECIAIS

Solução padrão de alumínio (200 ppm Al)

Pesar, exatamente, 0,352 g de sulfato de alumínio e potássio dodecaidratado, dissolver em água, adicionar 10 ml de ácido sulfúrico diluído e diluir com água para 100 ml.

Solução padrão de alumínio (10 ppm Al)

Pesar, exatamente, 1,39 g de nitrato de alumínio nonaidratado, dissolver e diluir com água para 100 ml. Diluir 10 ml para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

Solução padrão de alumínio (2 ppm Al)

Diluir 1 ml de *solução padrão de alumínio (200 ppm)* para 100 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

Transferir para funil de separação a solução da amostra especificada na monografia e extrair com três porções de hidroxiquinolina a 0,5% (p/V) em clorofórmio, sendo as duas primeiras porções de 20 ml e a última de 10 ml. Diluir os extratos clorofórmicos combinados para 50 ml com clorofórmio. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando a quantidade prescrita de *solução padrão de alumínio*. Preparar o branco da mesma maneira utilizando a solução em branco especificada na monografia.

Medir a intensidade da fluorescência (V.2.15) da solução amostra (I_1), do padrão (I_2) e do branco (I_3) utilizando o feixe de excitação em 392 nm e um filtro secundário com a faixa de transmissão centrada em 518 nm ou com o monocromador ajustado para transmitir neste comprimento de onda. A fluorescência ($I_1 - I_3$) da preparação amostra não é superior à da preparação padrão ($I_2 - I_3$).

V.3.2.11 ENSAIO-LIMITE PARA FOSFATOS

REAGENTES ESPECIAIS

Solução padrão de fosfato (5 ppm PO_4)

Pesar, exatamente, 0,716 g de fosfato monobásico de potássio, dissolver e diluir com água para 1000 ml. Diluir 10 ml para 1000 ml com água imediatamente antes do uso.

PROCEDIMENTO

A 100 ml da solução da amostra especificada na monografia adicionar 4 ml de reagente sulfomolibdico e agitar. Adicionar 0,1 ml de cloreto estânico SR e agitar. Preparar o padrão da mesma maneira utilizando mistura de 2 ml de *solução padrão de fosfato (5 ppm PO_4)* e 98 ml de água. Aguardar 10 minutos e comparar as cores utilizando 20 ml de cada preparação. A coloração da preparação amostra não é mais intensa do que a da preparação padrão.

V.3.2.12 ENSAIO-LIMITE PARA CHUMBO

A determinação de chumbo em produtos farmacêuticos pode ser realizada por dois métodos. Para a determinação do conteúdo de metais pesados, geralmente expresso em chumbo equivalente, é adotado o ensaio-limite (V.3.2.3). Para a determinação do chumbo extraível por ditizona, o ensaio descrito a seguir é empregado.

Selecionar todos os reagentes para este teste de modo a conter o mínimo de chumbo possível e armazenar todas as soluções reagentes em recipientes de vidro de borossilicato. Enxaguar toda a vidraria com solução aquecida de ácido nítrico 50% (V/V) e, em seguida com água.

REAGENTES ESPECIAIS

Solução de cianeto-amônia

Dissolver 2 g de cianeto de potássio em 15 ml de hidróxido de amônio e diluir para 100 ml com água.

Solução de citrato de amônio

Dissolver 40 g de ácido cítrico em 90 ml de água. Acrescentar 2 ou 3 gotas de vermelho de fenol a 0,1% (p/V). Adicionar, cautelosamente, hidróxido de amônio até que a solução adquira cor avermelhada. Remover qualquer chumbo eventualmente presente por meio de extração com porções de 20 ml de *solução extratora de ditizona*, até que a coloração laranja esverdeada na solução de ditizona seja mantida.

Solução padrão de chumbo (1 ppm Pb)

Diluir um volume exatamente medido de *solução padrão de chumbo (10 ppm Pb)* (V.3.2.3) para 10 volumes com ácido nítrico a 1% (V/V), de modo a obter solução contendo o equivalente a 1 µg de chumbo por mililitro (1 ppm Pb).

Solução extratora de ditizona

Dissolver 30 mg de ditizona em 1000 ml de clorofórmio e acrescentar 5 ml de etanol. Armazenar em refrigerador. Imediatamente antes do uso, agitar volume adequado desta solução com metade de seu volume de ácido nítrico a 1% (V/V). Descartar a camada ácida.

Solução de cloridrato de hidroxilamina

Dissolver 20 g de cloridrato de hidroxilamina em água para obter, aproximadamente, 65 ml. Transferir para funil de separação. Acrescentar 5 gotas de azul de timol a 0,1% (p/V) em etanol e adicionar hidróxido de amônio até que a solução adquira cor amarela. Adicionar 10 ml de solução aquosa de dietilditiocarbamato de sódio a 4% (p/V), agitar e deixar em repouso por 5 minutos. Extrair esta solução com sucessivas porções de 10 a 15 ml de clorofórmio até que uma porção de 5 ml do extrato de clorofórmio não adquira cor amarela quando agitada com sulfato cúprico a 12,5% (p/V). Adicionar ácido clorídrico 3 M até coloração rosa (se necessário, adicionar 1 ou 2 gotas de azul de timol a 0,1% (p/V) em etanol) e diluir para 100 ml com água.

Solução de cianeto de potássio

Dissolver 50 g de cianeto de potássio em água suficiente para 100 ml. Remover o chumbo desta solução por meio de extração com porções sucessivas de *solução extratora de ditizona*, até que a coloração laranja esverdeada na solução de ditizona seja mantida. Extrair qualquer ditizona que remanescente na solução de cianeto agitando com clorofórmio. Diluir a solução de cianeto com água suficiente de modo que cada 100 ml contenham 10 g de cianeto de potássio.

Solução padrão de ditizona

Dissolver 10 mg de ditizona em 1000 ml de clorofórmio. Conservar em frasco isento de chumbo, munido com tampa de vidro, em refrigerador, adequadamente embalado para proteger da luz.

PREPARAÇÃO AMOSTRA

Na ausência de especificação na monografia, preparar a solução da amostra como descrito a seguir.

Nota: se a amostra reage muito rapidamente com o ácido sulfúrico e começa a fumegar antes do aquecimento, utilizar, no lugar de 5 ml de ácido sulfúrico, 10 ml de ácido sulfúrico a 50% (V/V) resfriado e acrescentar algumas gotas de peróxido de hidrogênio antes do aquecimento. Observar precauções de segurança neste procedimento, pois algumas substâncias podem reagir com violência explosiva quando tratadas com peróxido de hidrogênio.

Transferir 1 g da amostra para frasco adequado, adicionar 5 ml de ácido sulfúrico, acrescentar algumas pérolas de vidro e digerir em placa de aquecimento, em capela, até começar a fumegar. Outros meios de aquecimento adequados podem ser utilizados. Se necessário, adicionar excesso de ácido sulfúrico para umedecer completamente a amostra, não ultrapassando um total de 10 ml. Adicionar, gota a gota e com precaução, peróxido de hidrogênio concentrado, permitindo o abrandamento da reação e aquecendo entre as adições. Adicionar as primeiras gotas aos poucos e muito lentamente, misturando cuidadosamente para prevenir reação rápida e interrompendo o aquecimento se ocorrer formação excessiva de espuma. Girar a solução no frasco para permitir a reação da amostra aderida nas paredes (acrescentar peróxido de hidrogênio sempre que a mistura se tornar marrom ou escurecer). Continuar a reação até que a amostra seja completamente digerida, vapores de trióxido de enxofre sejam abundantemente desprendidos e a solução se torne incolor. Resfriar, adicionar, com cuidado, 10 ml de água, evaporar até que o trióxido de enxofre seja novamente despendido e resfriar. Repetir este procedimento com outros 10 ml de água para remover qualquer traço de peróxido de hidrogênio. Diluir, cuidadosamente, com 10 ml de água e resfriar.

PROCEDIMENTO

Transferir para funil de separação a *preparação amostra*, com auxílio de 10 ml de água, ou o volume de solução da amostra especificado na monografia. A menos que indicado de maneira diferente, acrescentar 6 ml de *solução de citrato de amônio* e 2 ml de *solução cloridrato de hidroxilamina* (para a determinação de chumbo em sais de ferro, utilizar 10 ml de *solução de citrato de amônio*). Adicionar 2 gotas de vermelho de fenol a 0,1% (p/V) em etanol, adicionar hidróxido de amônio suficiente para alcalinização (coloração vermelha) e homogeneizar. Resfriar a solução, se necessário, e acrescentar 2 ml de *solução de cianeto de potássio*. Extrair, imediatamente, com porções de 5 ml de *solução extratora de ditizona*, escoando cada extrato para outro funil de separação, até que a coloração verde da solução de ditizona seja mantida. Agitar as frações combinadas de ditizona durante 30 segundos com 20 ml de ácido nítrico a 1% (V/V) e descartar a camada clorofórmica. Adicionar à solução ácida 5 ml de *solução padrão de ditizona*, 4 ml de *solução de cianeto-amônia* e agitar durante 30 segundos. A camada clorofórmica não apresenta coloração violeta mais intensa que a de um controle preparado com um volume de *solução padrão de chumbo (1 ppm Pb)* equivalente à quantidade de chumbo permitida na substância sob exame, empregando os mesmos volumes de reagentes e o mesmo tratamento utilizado para a solução da amostra.

V.3.4.10 ENSAIO IODOMÉTRICO DE ANTIBIÓTICOS

O ensaio iodométrico de antibióticos destina-se ao doseamento de fármacos antibióticos penicilâmicos e de seus produtos farmacêuticos elaborados, para os quais a titulação iodométrica é particularmente adequada.

PREPARAÇÃO PADRÃO

Dissolver quantidade adequada, exatamente pesada, da substância química de referência (SQR) especificada na monografia individual, utilizando o solvente descrito na Tabela 1. Diluir, quantitativamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução com concentração final conhecida, especificada na Tabela 1. Transferir 2 ml desta solução para erlenmeyer de 125 ml com tampa.

PREPARAÇÃO AMOSTRA

A menos que especificado de outra forma na monografia individual, dissolver quantidade adequada, exatamente pesada, da amostra, utilizando o solvente descrito na Tabela 1. Diluir, quantitativamente, com o mesmo solvente, de modo a obter solução com concentração final conhecida, especificada na Tabela 1. Transferir 2 ml desta solução para erlenmeyer de 125 ml com tampa.

Tabela 1 – Solventes e concentrações finais

Antibiótico	Solvente*	Concentração final
Amoxicilina triidratada	Água	1,00 mg/ml
Ampicilina	Água	1,25 mg/ml
Ampicilina sódica	<i>Solução 1</i>	1,25 mg/ml
Ampicilina triidratada	Água	1,25 mg/ml
Benzilpenicilina benzatina	<i>Solução 1</i>	2000 U/ml
Benzilpenicilina potássica	<i>Solução 1</i>	2000 U/ml
Benzilpenicilina procaína	<i>Solução 1</i>	2000 U/ml
Benzilpenicilina sódica	<i>Solução 1</i>	2000 U/ml

* A menos que especificado de outra forma, a *Solução 1* é aquela definida na seção *Soluções* em *Ensaio microbiológico de antibióticos* (V.5.2.17), exceto que a esterilização não é necessária.

PROCEDIMENTO

Inativação e titulação

A cada erlenmeyer contendo, respectivamente, 2 ml das *preparações padrão* e *amostra*, adicionar 2 ml de hidróxido de sódio *M*, homogeneizar com movimentos circulares e deixar em repouso por 15 minutos. Adicionar 2 ml de ácido clorídrico 1,2 *M*, 10 ml de iodo 0,005 *M* SV, tampar imediatamente e deixar em repouso por 15 minutos. Titular com tiosulfato de sódio 0,01 *M* SV. Próximo ao ponto final, adicionar 3 gotas de amido SI e prosseguir com a titulação até o desaparecimento da cor azul.

Ensaio em branco

Adicionar 10 ml de iodo 0,005 *M* SV a erlenmeyer de 125 ml contendo 2 ml da *preparação padrão*. Se a *preparação padrão* contiver amoxicilina ou ampicilina, adicionar imediatamente 0,1 ml de ácido clorídrico 1,2 *M*. Titular imediatamente com tiosulfato de sódio 0,01 *M* SV. Próximo ao ponto final, adicionar 3 gotas de amido SI e prosseguir com a titulação até o desaparecimento da cor azul. Proceder de forma similar para erlenmeyer contendo 2 ml da *preparação amostra*.

Cálculos

Calcular o fator de equivalência (*F*), em µg ou Unidades, para cada mililitro de tiosulfato de sódio 0,01 *M* SV consumido pela *preparação padrão* segundo a equação:

$$F = \frac{2(C_p \times P_p)}{(B_p - I_p)}$$

em que

C_p = concentração, em mg/ml, da substância química de referência na *preparação padrão*;

P_p = potência, em µg/mg ou Unidades/mg, da substância química de referência;

B_p = volume de titulante, em ml, consumido no *Ensaio em branco* da *preparação padrão*;

I_p = volume de titulante, em ml, consumido na *Inativação e titulação* da *preparação padrão*.

Calcular a potência da amostra ou a quantidade de antibiótico penicilâmico no medicamento segundo a equação indicada na monografia individual.

V.4 MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA

V.4.1 EXAME VISUAL E INSPEÇÃO MICROSCÓPICA

V.4.1.1 EXAME VISUAL, ODOR E SABOR

A identidade, pureza e qualidade de um material vegetal devem ser estabelecidas mediante detalhado exame visual, macroscópico e microscópico. Sempre que possível, o material vegetal deve ser comparado com matéria-prima autêntica, oriunda de amostra perfeitamente identificada na Farmacopéia. A amostra que não for semelhante em cor, consistência, odor e sabor deve ser descartada por não apresentar os requisitos mínimos especificados nas monografias. A identificação macroscópica das drogas, quando inteiras, é baseada na forma, tamanho, cor, superfície, textura, fratura e aparência da superfície de fratura. Em virtude de essas observações serem subjetivas e existirem adulterantes muito parecidos, é necessário realizar, ao mesmo tempo, análises microscópica e físico-química da amostra. A inspeção microscópica é indispensável quando o material estiver rasurado ou em pó.

Tamanho

Medidas de comprimento, largura e espessura devem coincidir com aquelas citadas nas monografias. Frutos e sementes pequenos exigem uma amostra igual a 10 unidades e posteriores cálculos da média e do desvio padrão.

Cor

Examinar a matéria-prima antes de qualquer tratamento, à luz do dia ou sob lâmpadas de comprimento de onda similares aos da luz do dia. A cor da amostra deve ser comparada com o material de referência.

Superfície, textura e fratura

Examinar a matéria-prima antes de qualquer tratamento. Quando necessário, utilizar lente de 5 até 10 aumentos. Quando indicado na monografia, umedecer com água ou reagente especificado para observar características da superfície de fratura. Tocar o material para verificar se é macio ou duro, dobrar e partir o material para a obtenção de informações quanto à fragilidade e aparência da fratura, se é fibrosa, lisa, rugosa, granulada, entre outras.

Odor

Antes de verificar o odor do material, certificar-se de que não existe risco. Colocar uma pequena amostra na palma da mão ou em recipiente de vidro e inalar devagar e repetidamente. Se o odor for indistinto, pressionar parte do material entre os dedos e inalar novamente. Quando a monografia indicar material tóxico, colocar um pouco de material esmagado em água quente. Primeiramente, determinar a intensidade do odor: nenhum, fraco, distinto ou forte e, a seguir, a sensação causada pelo odor: aromático, frutoso, mofado ou rançoso. Quando possível, é importante a comparação do odor com substância definida, como, por exemplo, hortelã-pimenta deve ter odor similar ao mentol e cravo-da-índia, similar ao eugenol.

Sabor

Testar o sabor apenas quando exigido na monografia.

V.4.1.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL PARA ANÁLISE MICROSCÓPICA

AMOLECIMENTO DO MATERIAL

Como normalmente os órgãos e tecidos vegetais empregados se apresentam secos, para serem observados ao microscópio, é conveniente primeiro amolecê-los mediante tratamento com água quente. O tempo necessário para o amolecimento de cada órgão vegetal varia de acordo com a sua textura. Tratando-se de órgão recém-colhido, apenas os de consistência mais firme necessitam de tal tratamento.

Método de hidratação para materiais secos

Colocar a amostra em solução de hidratação, preparada com 5 partes de água, 4 partes de etanol, uma parte de glicerina e 5 gotas de detergente comercial para cada 200 ml de solução, em estufa a 60 °C, no mínimo por 48 horas.

EXECUÇÃO DOS CORTES

Uma vez amolecidos, proceder 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. Incluir a amostra em material adequado que permita fixar o fragmento, a fim de ser seccionado. Cortes melhores e mais precisos podem ser obtidos com o emprego de micrótomos. Há, basicamente, três tipos de micrótomos: os de congelamento, usados para os materiais mais frágeis; os rotativos, para cortes em série de material incluído em parafina; e os de guia, para aqueles materiais mais resistentes, como ramos, partes de caules e de raízes. Neste último caso, um método relativamente fácil de preparo do material a ser cortado consiste em sua inclusão em macrogol solúvel em água ou em historresina.

Inclusão do material em parafina

- Ferver a amostra em água, quando seca, para amolecer e retirar o ar;
- desidratar a amostra em série de etanol diluído em água: 50, 70, 80, 96% e, por último, em etanol absoluto;
- transferir a amostra para mistura de etanol absoluto e xilol na proporção 3:1 (V/V) e, a seguir, para 1:1 e 1:3;
- transferir a amostra para xilol puro;
- transferir a amostra para xilol em parafina na proporção 1:1, mantendo-a em estufa;
- transferir a amostra para parafina aquecida, para que ocorra a infiltração, mantendo-a na estufa até que permaneça depositada no fundo do recipiente;
- emblocar e deixar esfriar em recipiente com água gelada;
- aparar o bloco para introdução no micrótomo;
- cortar o material e colocar em lâmina de vidro previamente untada com adesivo de Haupt ou Bissing;
- colocar as lâminas sobre placa aquecedora para distender os cortes;
- desparafinizar;
- aguardar, no mínimo, uma hora antes de corar.

Inclusão do material em macrogol (polietilenoglicol – PEG 4000 ou PEG 6000)

- Ferver a amostra em água, quando seca, para amolecer e retirar o ar;
- colocar a amostra em béquer, contendo macrogol a 20% (p/V);
- marcar o béquer, a partir da superfície do líquido, dividindo-o em cinco partes aproximadamente iguais;
- deixar o material em estufa a 65 °C por 3 a 4 dias;
- quando a solução evaporar até 1/5 de seu volume inicial, transferir a amostra para macrogol puro e fundido onde deve permanecer durante 12 a 25 horas, em estufa a 65°C;
- retirar da estufa, emblocar e deixar esfriar à temperatura ambiente;
- aparar os blocos para introdução no micrótomo;
- cortar o material a seco;
- lavar os cortes com água e corar.

Inclusão em historresina

Existem diferentes marcas de historresina no mercado, comercializadas em kits, sendo a metodologia para emblocamento característica de cada fabricante. Obedecer ao manual de instruções. Todas contêm três elementos principais: uma resina, um agente endurecedor e um agente acelerador ou catalisador. A mistura e temperatura devem seguir as especificações, para que haja completa interação, obtendo-se como produto final um polímero. Os materiais vegetais devem ser previamente fixados e desidratados. Sugere-se que as secções a serem emblocadas sejam imersas na resina durante uma noite, para que haja completa infiltração. Só após, substituir a resina de infiltração pela mistura de nova porção de resina, agente endurecedor e agente acelerador. A resina de infiltração pode ser reutilizada por duas a quatro vezes, devendo então ser descartada. Os cortes são colocados sobre as lâminas sem adesivo. Corar.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

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% (p/V) em etanol: coloração de cutina, lignina e suberina.
- Solução de Fast Green a 0,5% (p/V) em etanol: coloração de celulose.
- Azul de Astra a 1% (p/V) em etanol: coloração de compostos pécnicos da lamela média e parede.
- Solução de floroglucina a 1% em etanol: coloração de lignina.

Coloração composta (algumas misturas de corantes que podem ser usadas)

- Safranina-Azul de Astra: colore a lignina de vermelho e a celulose de azul. Colocar a amostra em safranina aquosa a 1% (p/V) 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 destilada. Passar por bateria de etanol a 50%, 70%, 90%, 96%, e etanol absoluto (duas vezes), xilol. Montar em lâminas com bálsamo do Canadá ou resina sintética.
- Safranina-Fast Green: colore a lignina de vermelho e a celulose de verde. Não desparafinizar as lâminas. Colocar em safranina aquosa a 1% (p/V) por 10 a 20 minutos (ou mais). Lavar em água corrente. Colocar em água destilada por 1 minuto. Escorrer a água da lâmina. Colocar em Fast Green a 0,5% (p/V) em etanol por 10 a 40 minutos. Lavar em água corrente. Colocar em água destilada por 1 minuto. Repetir a operação. Escorrer a água da lâmina. Secar em placa aquecedora por 30 minutos. Remover a parafina com xilol em duas trocas de 5 minutos. Montar em lâminas com bálsamo do Canadá ou resina sintética.

PREPARO E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Os cortes histológicos são montados, entre lâmina e lamínula, em água, glicerol, hidróxido de potássio a 30% (p/V), hidrato de cloral a 50% (p/V), ou outro líquido qualquer que permita a observação. O glicerol é mais usado nos estudos microquímicos de mucilagens, goma, inulina e aleurona. O hidróxido de potássio é agente diafanizador, tendo ação sobre proteínas, amido, gordura, 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 (selo), 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 montados entre lâmina e lamínula, com resina sintética, bálsamo do Canadá ou outro meio conveniente. Deve-se manter a montagem comprimida por meio da aplicação de pequenos pesos sobre a lamínula, em posição perfeitamente horizontal e sobre papel de filtro, com a finalidade de evitar possíveis extravasamentos do meio de montagem.

MACERAÇÃO DOS TECIDOS

Secções de caules, raízes, cascas ou outras partes vegetais nem sempre dão idéia precisa da natureza real de suas células. O mesmo acontece com matéria-prima comercializada, quando rasurada ou em pó. 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, a estrutura a ser estudada é tratada com substâncias químicas capazes de dissolver a lamela média e, desta forma, permitir a separação das células.

Método de dissociação de tecidos

- Cortar o material em pequenos fragmentos ou em fatias com cerca de 300 nm de espessura e colocar em água;

- retirar todo o ar do material, fervendo e resfriando rapidamente;
- macerar o material em solução de Jeffrey. O tempo de maceração varia com a natureza do material. Geralmente as células começam a se separar em cerca de 24 horas. Se necessário, pode ser usado bastão de vidro de ponta arredondada para amassar muito levemente o material. Havendo 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 um funil contendo papel de filtro;
- fechar a abertura inferior do funil e cobrir o macerado com solução aquosa de safranina a 1% (p/V), 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 etanol a 50%, 70%, 90% e etanol 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;
- manter a lâmina em posição horizontal, porém não utilizar peso sobre a lamínula, pois as células maceradas são muito frágeis.

OBSERVAÇÃO DA EPIDERME FOLIAR E ÍNDICE ESTOMÁTICO

Separação da epiderme com solução de Jeffrey

- Para obter epiderme foliar, seccionar pequenos pedaços de folha e colocá-los em solução de Jeffrey diluída em água destilada a 50% (V/V), tampar o recipiente e deixar de 12 a 48 horas, de acordo com a textura da folha (a solução atacará o mesofilo, deixando a epiderme isolada);
- quando o mesofilo estiver destruído, lavar as amostras várias vezes com água destilada;
- colocar uma amostra sobre lâmina, seccionar entre as epidermes e colocar as duas partes de forma que as faces externas estejam voltadas para cima;
- corar o material sobre a lâmina com solução etanólica de safranina a 1% (p/V);
- preparar a lâmina com gelatina glicerinada e selar.

Separação da epiderme com hidrato de cloral

- Usar fragmentos de folhas de cerca de 0,5 cm de largura por 0,5 cm de comprimento;
- colocar os fragmentos em um tubo de ensaio, adicionando 5 ml de hidrato de cloral, aquecer em banho-maria por cerca de 15 minutos ou até que os fragmentos fiquem transparentes;
- transferir os fragmentos para uma lâmina, cuidando para que a face abaxial fique disposta para cima;
- adicionar uma gota de hidrato de cloral e uma gota de etanol glicerinado e cobrir com lamínula para impedir a desidratação. Selar.

REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

As reações podem ser feitas com material fresco seccionado ou material cortado em micrótomo e incluído em parafina ou macrogol, adicionando-se uma gota dos reativos sobre uma lâmina com uma secção da amostra.

Amido. Adicionar uma gota de Reativo de Lugol SR. O amido adquire coloração azul ou azul-violeta.

Carbonato de cálcio. Adicionar ácido acético a 6% (p/V) ou ácido clorídrico a 7% (p/V). Cristais ou depósitos de carbonato de cálcio dissolvem-se lentamente, com produção de efervescência.

Hidroxiانtraquinonas. Adicionar uma gota de hidróxido de potássio a 5% (p/V). As células que contêm 1,8-diidroxiانtraquinonas coram de vermelho.

Inulina. Adicionar 1 gota de 1-naftol e ácido sulfúrico. Esferocristais de inulina coram-se de roxo-avermelhado e se dissolvem.

Lignina. Adicionar 1 gota de floroglucina SR, aquecer rapidamente a lâmina e adicionar uma gota de ácido clorídrico a 25% (p/V). A lignina cora-se de vermelho.

Lipídios. Adicionar Sudan III ou IV por 10 minutos, lavar rapidamente com etanol a 70% (V/V). Lipídios, cutina e suberina coram-se de laranja-avermelhado.

Mucilagens. Adicionar 1 gota de tinta nanquim sobre amostra seca. A mucilagem aparece como fragmentos esféricos dilatados e transparentes sobre um fundo negro. A caracterização também pode ser realizada pela adição de 1 gota de tionina SR à amostra seca, deixando repousar por 15 minutos, seguida de lavagem em etanol a 20% (V/V). A mucilagem toma-se violeta-avermelhada (lignina e celulose coram-se de azul ou azul-violeta).

Oxalato de cálcio. Cristais de oxalato de cálcio são insolúveis em ácido acético a 6% (p/V) e solúveis em ácido clorídrico a 7% (p/V), sem produzir efervescência.

Proteínas. Adicionar ninidrina a 0,5% (p/V) em etanol absoluto, e manter a 37 °C por 24 horas. Lavar em etanol absoluto e em água destilada, adicionar Reagente de Schiff SR e deixar em contato por 10 a 30 minutos. Lavar em água e adicionar bissulfito de sódio a 2% (p/V), deixar em contato por 1 a 2 minutos. Lavar em água corrente por 10 a 20 minutos, desidratar e montar a lâmina. As proteínas coram-se de vermelho púrpura. Realizar este procedimento somente com material fresco.

Saponinas. Adicionar uma gota de ácido sulfúrico. Ocorre uma seqüência de cor amarela, seguida de cor vermelha e, finalmente, cor violeta ou azul-esverdeada.

Taninos. Adicionar cloreto férrico a 10% (p/V) e uma pequena quantidade de carbonato de sódio, deixar em contato por 2 a 3 minutos, lavar com água destilada. Os taninos coram-se de azul-esverdeado.

ANÁLISE DO PÓ (IDENTIFICAÇÃO DE MATÉRIA-PRIMA COMERCIALIZADA EM PÓ)

- Colocar 1 ou 2 gotas de água, ou glicerol-etanol (1:1) ou hidrato de cloral em uma lâmina;
- acrescentar um pouco do pó e misturar com uma agulha histológica;
- cobrir com lamínula e observar ao microscópio;
- outros fluidos podem ser usados com a mesma técnica;
- corantes ou reações histoquímicas podem ser utilizados.

XII.2 REAGENTES E SOLUÇÕES REAGENTES

Solução de Jeffrey

Preparação – Misturar partes iguais de ácido nítrico a 10% (p/V) e ácido crômico a 10% (p/V).

Gelatina glicerinada

Preparação – Dissolver 1 g de gelatina em 100 ml de água aquecida à temperatura não superior a 30 °C. Acrescentar 1 ml de salicilato de sódio a 2% (p/V) e 15 ml de glicerina; agitar bem e filtrar a mistura aquecida em lâ de vidro.

Etanol glicerinado

Preparação – Misturar 20 ml de glicerina e 80 ml de etanol a 70% (V/V).

Reativo de Lugol SR

Preparação – Dissolver 1 g de iodeto de potássio em 100 ml de água, acrescentar 1 g de iodo, agitar, deixar em repouso por algumas horas e filtrar em lâ de vidro. Conservar em frasco âmbar.

Floroglucina SR

Preparação – Dissolver 1 g de floroglucinol em etanol e diluir para 100 ml com o mesmo solvente.

Sudan III

Preparação – Dissolver 0,5 g de Sudan III em 100 ml de etanol 80%, aquecido a 60°C, esfriar e filtrar.

Sudan IV

Preparação – Dissolver 2 g de Sudan IV em 100 ml de etanol a 92% (V/V) aquecido a 60 °C, esfriar, filtrar e adicionar 5 ml de glicerina.

Tionina SR

Preparação – Adicionar 1 g de tionina a 2,5 g de fenol e completar o volume de 100 ml com água.

Reagente de Schiff

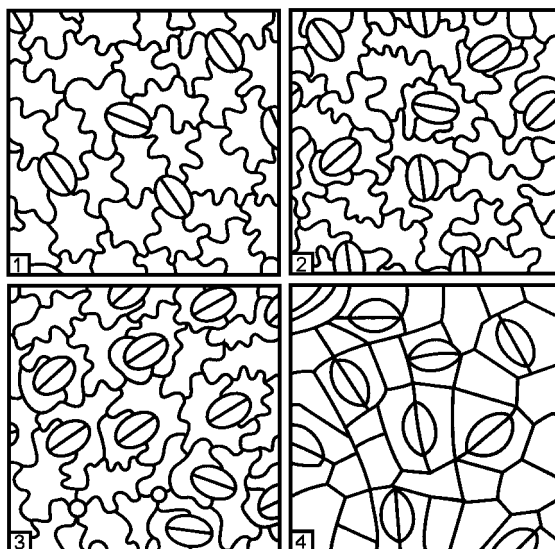
Preparação – Dissolver 1 g de fucsina básica e 1,8 g de metabissulfito de sódio em 100 ml de ácido clorídrico a 0,15 M. Agitar ocasionalmente até que a solução fique amarelo-clara ou marrom-clara. Adicionar 0,5 g de carvão recém-ativado, agitar por 1 a 2 minutos e filtrar, lavando o resíduo com água para restaurar o volume de 100 ml original.

V.4.1.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESTÔMATOS

ESTÔMATOS

Os tipos de estômatos (ver figura), que se distinguem pela forma e disposição das células que os rodeiam, são:

- 1) O tipo anomocítico (células irregulares), o qual se caracteriza por estarem os estômatos rodeados por um número variável de células que não diferem, em geral, em nenhuma característica das outras células da epiderme.
- 2) O tipo anisocítico (células desiguais), em que os estômatos estão normalmente rodeados por 3 células anexas, uma delas nitidamente menor que as outras.



- 3) O tipo diacítico (células transversais), em que os estômatos estão acompanhados por 2 células anexas cujas paredes comuns formam um ângulo reto com as células guardas dos estômatos.
- 4) O tipo paracítico (células paralelas), em que os estômatos apresentam de cada lado uma ou várias células anexas paralelas ao eixo longitudinal do ostíolo e células guardas dos estômatos.

ÍNDICE DE ESTÔMATOS

O índice de estômatos é calculado segundo a equação $100S / (E + S)$, sendo S o número de estômatos em uma área determinada da superfície da folha e E o número de células epidérmicas, incluindo os tricomas, existentes na mesma superfície da folha. Para cada amostra de folhas, efetuar e calcular a média de, no mínimo, 10 determinações.

V.4.2 MÉTODOS DE ANÁLISE DE DROGAS VEGETAIS

V.4.2.1 AMOSTRAGEM

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 homogeneidade, recolher amostras segundo o esquema a seguir.

Número de embalagens	Número de embalagens a serem amostradas
1 a 3	Todos
4 a 10	3
11 a 20	5
21 a 50	6
51 a 80	8
81 a 100	10
Mais de 100	10% do total de embalagens

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 horizontal), 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 quarteamento, 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 quarteamento, 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.

QUARTEAMENTO

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 MATÉRIA ESTRANHA

Matéria estranha à droga é classificada em três tipos: (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 ou orgânica, não-inerentes à droga.

PROCEDIMENTO

Determinar a quantidade de amostra a ser submetida ao ensaio conforme especificado a seguir.

- Raízes, rizomas, cascas, planta inteira e partes aéreas: 500 g
- Folhas, inflorescências, sementes e frutos: 250 g
- Materiais particulados ou fracionados (peso médio inferior a 0,5 g/componente): 50 g
- Pós: 25 g

Colher, por quarteamento, a quantidade de amostra especificada, a partir da amostra obtida, segundo o procedimento descrito anteriormente, e espalhá-la em camada fina sobre a 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 amostra submetida ao ensaio.

V.4.2.3 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA EM DROGAS VEGETAIS

Três métodos são empregados: gravimétrico (dessecação), azeotrópico (destilação com tolueno) e volumétrico (Karl Fischer). O primeiro, tecnicamente mais simples e rápido, não é aplicável quando a droga contém substâncias voláteis. Os demais requerem equipamentos especiais e compreendem técnicas mais complexas.

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 da amostra.

Método gravimétrico

Transferir cerca de 2 a 5 g, ou o especificado na monografia, exatamente pesados, de amostra preparada conforme instruções anteriores, para pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Dessecar a amostra a 100-105 °C durante 5 horas, até peso constante. Calcular a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar.

Método volumétrico

Proceder conforme descrito em *Determinação de água* (V.2.20.1).

Método azeotrópico

Proceder conforme descrito em *Determinação de água* (V.2.20.2).

V.4.2.4 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

As cinzas totais incluem cinzas fisiológicas e de materiais estranhos e cinzas não-fisiológicas.

PROCEDIMENTO

Pesar, exatamente, cerca de 3 g da amostra pulverizada, ou a quantidade especificada na monografia, transferir para cadinho (de silício ou platina) previamente tarado. Distribuir a amostra uniformemente no cadinho e incinerar aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até que todo o carvão seja eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200 °C, 60 minutos a 400 °C e 90 minutos a 600 °C) pode ser utilizado. 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. Evaporar até secura em banho-maria e, em seguida, sobre chapa quente, e incinerar até peso constante. 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 silícicos da droga.

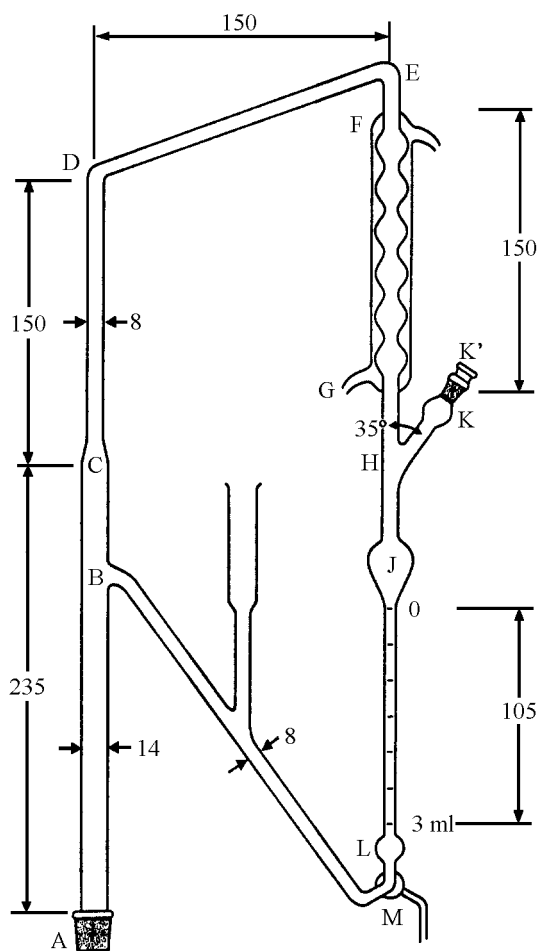
PROCEDIMENTO

Ferver o resíduo obtido na determinação de cinzas totais durante 5 minutos com 25 ml de ácido clorídrico a 7% (p/V) em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavar o vidro de relógio com 5 ml de água quente, juntando a água de lavagem 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 de vapor, com auxílio de equipamento descrito a seguir.

O equipamento (Figura), confeccionado em vidro resistente, de qualidade apropriada, compreende:



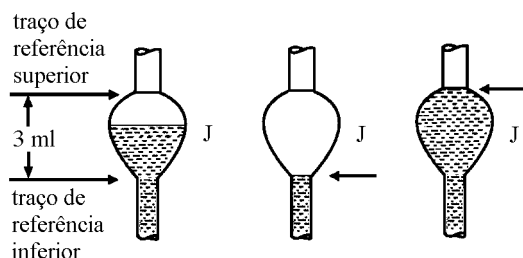
- 1) balão de fundo redondo de 500 ml a 1000 ml de capacidade, de colo curto, provido de uma junta 24/40, fêmea;
- 2) condensador, adaptável ao balão por meio de uma junta esmerilhada 24/40, macho, construído em peça única de vidro, compreendendo as partes descritas a seguir, com as respectivas medidas:
 - 2.1) tubo vertical (AC) de 210 a 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 pêra (J) de 3 ml de capacidade;
 - 2.7) tubo (JL) provido de escala graduada de 100-110 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;
 - 2.10) tubo de conexão (BM) de 7-8 mm de diâmetro, provido de tubo de segurança. O ponto de inserção (B) encontra-se a 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 regulagem fina da chama;
- 4) suporte vertical adequado.

Antes da utilização, o aparelho 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. A escala graduada deve ser aferida e, se necessário, estabelecer fator de correção para cada aparelho.

PROCEDIMENTO

Introduzir no balão o volume do líquido indicado na monografia e fragmentos de porcelana porosa ou contas de vidro para regularizar a ebulição. Adaptar o condensador ao balão. Retirar a rolha esmerilhada (K') e, pela abertura (K), introduzir a água até que esta 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 razão de 2 a 3 ml por minuto, ou conforme prescrito na monografia.

Para determinar a velocidade da destilação, escoar a água com auxílio de torneira de três vias, até que o menisco esteja no nível do traço de referência inferior (Figura abaixo). Fechar a torneira e cronometrar o tempo necessário para encher o volume compreendido entre os traços de referência inferior e superior (3 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.



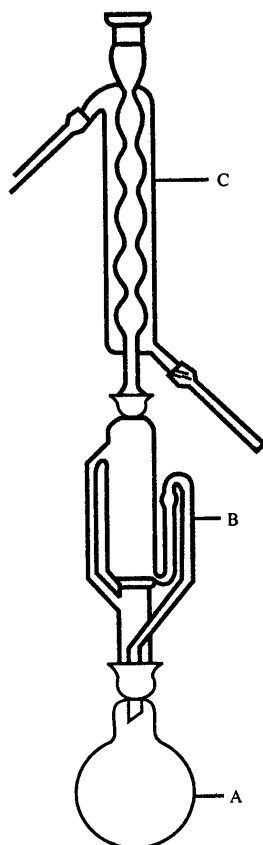
Introduzir no balão a quantidade de droga prescrita na monografia e destilar por arraste de vapor, como descrito acima, pelo tempo e na velocidade indicada na monografia. Terminada a operação, deixar esfriar por 10 minutos e ler o volume do óleo essencial recolhido no tubo graduado. Subtrair da leitura 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.

Empregar o aparelho de Soxhlet (Figura). O equipamento, confeccionado em vidro resistente, de qualidade apropriada, compreende balão de fundo redondo (A), com 500 ml a 1000 ml de capacidade, conectado ao extrator Soxhlet (B) e condensador de refluxo (C).



Antes da utilização, o aparelho 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.

PROCEDIMENTO

Transferir, exatamente, cerca de 10 g de droga previamente dessecada conforme descrito em *Determinação de água em drogas vegetais (V.4.2.3), Método gravimétrico*, e transferir para aparelho extrator de Soxhlet (B), cobrindo-a com algodão desengordurado. Pesá-lo o balão (A) 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 (C). 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. Desconectar 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. Calcular a porcentagem de óleos fixos na droga com base na massa de droga pesada e na massa de óleo obtida.

V.4.2.8 DETERMINAÇÃO DE 1,8-CINEOL EM ÓLEOS ESSENCIAIS

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 niauli. Determinações em outras essências não são recomendadas sem comprovação prévia de exatidão em vista de alguns constituintes do óleo essencial 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 ou 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 amostra do óleo essencial 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 óleo essencial, 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 de água com temperatura controlada, 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 de 1,8-cineol em óleos essenciais.

Temperatura (°C)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
24	45,6	45,7	45,9	46,0	46,1	46,3	46,4	46,5	46,6	46,8
25	46,9	47,0	47,2	47,3	47,4	47,6	47,7	47,8	47,9	48,1
26	48,2	48,3	48,5	48,6	48,7	48,9	49,0	49,1	49,2	49,4
27	49,5	49,6	49,8	49,9	50,0	50,2	50,3	50,4	50,5	50,7
28	50,8	50,9	51,1	51,2	51,3	51,5	51,6	51,7	51,8	52,0
29	52,1	52,2	52,4	52,5	52,6	52,8	52,9	53,0	53,1	53,3
30	53,4	53,5	53,7	53,8	53,9	54,1	54,2	54,3	54,4	54,6
31	54,7	54,8	55,0	55,1	55,2	55,4	55,5	55,6	55,7	55,9
32	56,0	56,1	56,3	56,4	56,5	56,7	56,8	56,9	57,0	57,2
33	57,3	57,4	57,6	57,7	57,8	58,0	58,1	58,2	58,3	58,5
34	58,6	58,7	58,9	59,0	59,1	59,3	59,4	59,5	59,6	59,8
35	59,9	60,0	60,2	60,3	60,4	60,6	60,7	60,8	60,9	61,1
36	61,2	61,3	61,5	61,6	61,7	61,9	62,0	62,1	62,2	62,4
37	62,5	62,6	62,8	62,9	63,0	63,2	63,3	63,4	63,5	63,7
38	63,8	63,9	64,1	64,2	64,4	64,5	64,6	64,8	64,9	65,1
39	65,2	65,4	65,5	65,7	65,8	66,0	66,2	66,3	66,5	66,6
40	66,8	67,0	67,2	67,3	67,5	67,7	67,9	68,1	68,2	68,4
41	68,6	68,8	69,0	69,2	69,4	69,6	69,7	69,9	70,1	70,3
42	70,5	70,7	70,9	71,0	71,2	71,4	71,6	71,8	71,9	72,1
43	72,3	72,5	72,7	72,9	73,1	73,3	73,4	73,6	73,8	74,0
44	74,2	74,4	74,6	74,8	75,0	75,2	75,3	75,5	75,7	75,9
45	76,1	76,3	76,5	76,7	76,9	77,1	77,2	77,4	77,6	77,8
46	78,0	78,2	78,4	78,6	78,8	79,0	79,2	79,4	79,6	79,8
47	80,0	80,2	80,4	80,6	80,8	81,1	81,3	81,5	81,7	81,9
48	82,1	82,3	82,5	82,7	82,9	83,2	83,4	83,6	83,8	84,0
49	84,2	84,4	84,6	84,8	85,0	85,3	85,5	85,7	85,9	86,1

50	86,3	86,6	86,8	87,1	87,3	87,6	87,8	88,1	88,3	88,6
51	88,8	89,1	89,3	89,6	89,8	90,1	90,3	90,6	90,8	91,1
52	91,3	91,6	91,8	92,1	92,3	92,6	92,8	93,1	93,3	93,6
53	93,8	94,1	94,3	94,6	94,8	95,1	95,3	95,6	95,8	96,1
54	96,3	96,6	96,9	97,2	97,5	97,8	98,1	98,4	98,7	99,0
55	99,3	99,7	100,0							

V.4.2.9 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ESPUMA

Pesar, exatamente, 1 g do material vegetal reduzido a pó fino (malha de 180 μ m, V.2.11) e transferir para erlenmeyer contendo 50 ml de água fervente. Manter sob fervura moderada durante 30 minutos. Resfriar, filtrar para balão volumétrico de 100 ml. Completar o volume, através do filtro, até 100 ml.

Distribuir o decocto obtido em 10 tubos de ensaio com tampa (16 mm de diâmetro por 16 cm de altura), em uma série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 ml, e ajustar o volume do líquido em cada tubo a 10 ml com água. Tampar os tubos e agitá-los com movimentos verticais por 15 segundos, com 2 agitações por segundo. Deixar em repouso por 15 minutos e medir a altura da espuma.

Se a altura da espuma de todos os tubos for inferior a 1 cm, o índice de espuma é menor do que 100.

Se, em qualquer um dos tubos, a altura da espuma medida for 1 cm, a diluição do material vegetal nesse tubo (A) é o índice observado. Se esse tubo for o primeiro ou segundo na série, é necessário fazer uma diluição intermediária, pelo mesmo método descrito anteriormente, para obter um resultado mais preciso.

Se a altura da espuma for maior do que 1 cm em todos os tubos, o índice de espuma é maior do que 1000. Nesse caso, a determinação precisa ser feita com uma nova série de diluições do decocto para se obter um resultado preciso.

O índice de espuma é calculado segundo a equação $1000/A$, sendo A o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

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 0,2 g de hidróxido de sódio e etanol absoluto em quantidade suficiente. Extrair por 5 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 etanol por diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco. Referir o resultado em relação à droga seca (*Determinação de água em drogas vegetais*, V.4.2.3).

V.4.2.11 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE AMARGOR

As propriedades amargas dos materiais vegetais são determinadas pela comparação da concentração limiar de amargor de um extrato com a de uma solução diluída de cloridrato de quinina. O valor do índice de amargor é expresso em termos de unidades, equivalentes a uma solução de cloridrato de quinina a 0,05% (p/V).

Para a extração dos materiais vegetais e para a lavagem da boca depois de cada degustação, deve-se utilizar água potável como veículo. A dureza da água raramente tem influência significativa sobre o amargor.

A sensibilidade ao amargor pode variar de indivíduo para indivíduo ou, mesmo para um indivíduo em situações diferentes (fadiga, fumo, ingestão de alimentos). Portanto, a determinação da concentração limiar de amargor do material a ser testado com cloridrato de quinina deve ser feita pela mesma pessoa, dentro de um curto espaço de tempo. A sensação de amargor não é percebida por toda a superfície da língua, mas é restrita às partes superior e lateral da base da língua. A determinação da concentração limiar da solução requer treinamento do analista. Primeiramente, é feita a determinação da concentração limiar do cloridrato de quinina e, em seguida, a do material a ser testado. Indivíduos insensíveis à sensação amarga induzida por uma solução contendo 0,058 mg de cloridrato de quinina em 10 ml de água não são indicados para a realização do teste.

A preparação da solução-estoque de material vegetal a ser testado (ST) deve ser especificada na monografia correspondente. Em séries únicas de teste, a determinação sempre inicia com a menor concentração (a menos que outra ordem seja especificada na monografia) para manter a sensibilidade dos botões gustativos.

PREPARO DAS SOLUÇÕES

Solução estoque e solução diluída de cloridrato de quinina

Dissolver 0,1 g de cloridrato de quinina em quantidade suficiente de água potável para completar 100 ml. Diluir 5 ml desta solução para 500 ml com água potável. Esta solução padrão de cloridrato de quinina (SQ) contém 0,01 mg/ml. Para o teste inicial, utilizar 9 tubos de ensaio para a diluição em série, como indicado na tabela para o teste inicial.

	Teste inicial								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SQ (ml)	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8
Água potável (ml)	5,8	5,6	5,4	5,2	5,0	4,8	4,6	4,4	4,2
Cloridrato de quinina (mg/10 ml) (c)	0,042	0,044	0,046	0,048	0,050	0,052	0,054	0,056	0,058

Solução estoque e solução diluída do material vegetal

Preparar a solução estoque como especificado na monografia (ST). Utilizar 10 tubos de ensaio para a diluição em série, como indicado na tabela para o segundo teste.

	Segundo teste									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ST (b) (ml)	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00	6,00	7,00	8,00	9,00	10,0
Água potável (ml)	9,00	8,00	7,00	6,00	5,00	4,00	3,00	2,00	1,00	-

PROCEDIMENTO

Após enxaguar a boca com água potável, provar 10 ml da diluição, girando-a na boca, principalmente perto da base da língua por 30 segundos. Sempre começar com a solução menos concentrada da série, exceto quando prescrito de maneira diferente na monografia. Se a sensação de amargor não é mais sentida, remover a solução e esperar 1 minuto para assegurar que não há sensibilidade retardada. Enxaguar a boca com água. Aguardar, pelo menos, 10 minutos para testar a próxima diluição. A concentração limiar de amargor é a diluição de menor concentração em que o material ainda provoca sensação de amargor. Após a primeira série de testes, enxaguar bem a boca com água, até que o amargor não seja mais percebido e esperar, no mínimo, 10 minutos antes de fazer a segunda série de testes.

Nesta série de testes, para maior rapidez, é aconselhável assegurar que a solução no tubo número 5 (contendo 5 ml de ST em 10 ml de solução) provoque sensação de amargor. Se percebida, encontrar a concentração de amargor do material, provando as diluições nos tubos de números 1 a 4. Se a solução no tubo de número 5 não provocar sensação de amargor, encontrar a concentração limiar de amargor nos tubos de números 6 a 10.

Todas as soluções e a água devem estar numa temperatura entre 20 °C e 25 °C.

O índice de amargor é calculado segundo a equação:

$$V = 2000c / (ab)$$

em que

V = valor de amargor, em unidades/g;

a = quantidade de material, em mg/ml, na ST;

b = volume de ST em 10 ml da diluição da concentração limiar de amargor;

c = quantidade de cloridrato de quinina, em mg/10 ml, na diluição da concentração limiar de amargor.

V.4.2.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica de extratos vegetais, ou de uma preparação contendo saponinas, é determinada por comparação com a atividade de uma referência de saponina com atividade hemolítica de 1000 unidades por grama. Uma suspensão de eritrócitos é misturada com volumes iguais de uma diluição em série do extrato. A menor concentração a provocar hemólise completa é determinada após deixar o sistema em repouso por um período específico de tempo. Um teste similar é feito simultaneamente com solução de referência de saponina.

PROCEDIMENTO

Para a preparação da suspensão de sangue, colocar citrato de sódio 3,65% (p/V) em um frasco com tampa até 1/10 de sua capacidade. Agitar para molhar totalmente as paredes do frasco e adicionar sangue bovino fresco, com nova agitação. O sangue com citrato de sódio assim preparado pode ser armazenado por 8 dias a uma temperatura entre 2 °C e 4 °C.

Em balão volumétrico de 50 ml, diluir cuidadosamente 1 ml de sangue com citrato de sódio em quantidade suficiente de tampão fosfato pH 7,4 para completar 50 ml. Esta suspensão de sangue diluída (2%) pode ser utilizada durante o tempo em que o líquido sobrenadante permanecer límpido e incolor, sendo mantida fria.

Para a solução de referência, transferir, exatamente, 10 mg de saponina R para balão volumétrico de 100 ml e completar o volume com tampão fosfato pH 7,4. Esta solução deve ser recém-preparada. O extrato vegetal e diluições devem ser preparados como especificado na monografia, utilizando-se, também, solução tampão fosfato pH 7,4.

Teste preliminar

Preparar uma diluição em série do extrato vegetal com a solução tampão fosfato e suspensão de sangue (2%), usando 4 tubos de ensaio conforme quadro abaixo:

Tubo	1	2	3	4
Extrato vegetal (ml)	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4 (ml)	0,90	0,80	0,50	–
Suspensão de sangue (2%) (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00

Logo que os tubos forem preparados, invertê-los cuidadosamente para misturar, evitando a formação da espuma. Após 30 minutos, agitar novamente e deixar descansar por 6 horas à temperatura ambiente. Examinar os tubos e anotar em qual diluição ocorreu hemólise total, o que será indicado por uma solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos.

- Se a hemólise total for observada apenas no tubo de número 4, usar o extrato vegetal original diretamente para o teste principal.
- Se a hemólise total for observada nos tubos 3 e 4, diluir duas vezes o extrato original com tampão fosfato.
- Se a hemólise total for observada nos tubos 2, 3 e 4, preparar uma solução diluída cinco vezes, como descrito acima.
- Se, após 6 horas, todos os tubos contiverem uma solução límpida e vermelha, preparar uma solução diluída 10 vezes e fazer o teste preliminar, como descrito acima.
- Se a hemólise total não for observada em nenhum dos tubos, repetir o teste preliminar, usando um extrato mais concentrado.

Teste principal

Preparar a diluição em série do extrato vegetal, diluindo ou não, como determinado pelo teste preliminar, com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue (2%), utilizando 13 tubos de ensaio, conforme especificado no quadro a seguir.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Extrato vegetal (ou diluição) (ml)	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1,00
Tampão fosfato (ml)	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	–
Suspensão de sangue 2% (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Fazer as diluições e avaliações como no teste preliminar, observando os resultados após 24 horas. Calcular a quantidade de material vegetal em gramas, ou proporção em g/ml que produz hemólise total (b).

Teste para saponinas

Para eliminar o efeito de variações individuais na resistência de suspensão de sangue à solução de saponina, preparar uma série de diluições de saponina da mesma maneira descrita anteriormente para o extrato vegetal. Calcular a quantidade de saponinas (g) que produz hemólise total (a).

Atividade hemolítica

A atividade hemolítica é calculada segundo a equação

$$1000 a / b$$

em que

1000 = atividade hemolítica da saponina, em relação ao sangue bovino;

a = quantidade, em gramas, de saponina;

b = quantidade, em gramas, de material vegetal.

V.4.2.13 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INTUMESCÊNCIA

O índice de intumescência ou índice de intumescimento é a medida do volume ocupado pelo intumescimento de 1 g da droga, pela adição de água ou outro agente intumescente, sob condições definidas.

Conduzir simultaneamente, no mínimo, três determinações. Pesar, exatamente, 1 g da droga vegetal pulverizada e colocar em proveta de 25 ml com tampa esmerilhada. O comprimento da parte graduada deve ser de, aproximadamente, 125 mm e o diâmetro interno, próximo a 16 mm, subdividido em 0,2 ml, marcado de 0 a 25 ml, de forma ascendente. Adicionar 25 ml de água, ou outro agente definido, e agitar a cada 10 minutos, por uma hora. Deixar a mistura repousar por 3 horas, à temperatura ambiente.

Medir o volume, em mililitros, ocupado pelo material vegetal acrescido da mucilagem ou qualquer outro material aderido subtraído do volume inicial da droga. Calcular o valor médio obtido a partir das várias determinações individuais realizadas e relacionar a 1 g de material vegetal.

V.4.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE EXTRATOS VEGETAIS

V.4.3.1 DETERMINAÇÃO DE METANOL E 2-PROPANOL EM EXTRATOS FLUIDOS

Proceder à destilação do extrato conforme descrito em *Determinação de etanol* (V.3.4.8.1). Examinar o destilado por *Cromatografia a gás* (V.2.17.5), utilizando cromatógrafo provido de detector de ionização de chama, coluna cromatográfica de vidro com 2 m de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com copolímero de etilvinilbenzeno/divinilbenzeno, partículas de 125 µm a 150 µm, e nitrogênio para cromatografia como gás de arraste, com fluxo de 30 ml/min. Manter a temperatura da coluna em 130 °C, a temperatura do injetor em 200 °C e a temperatura do detector em 220 °C.

Solução padrão interno: solução de 1-propanol a 2,5% (V/V) em água.

Solução amostra: adicionar a um volume determinado do destilado 2 ml da *solução padrão interno*. Diluir para 50 ml com água ou etanol a 90% (V/V), ajustando o teor de etanol para 10% (V/V).

Solução padrão: preparar 50 ml de solução contendo 2 ml de *solução padrão interno*, 10% de etanol (V/V), 0,05% de 2-propanol (V/V) e 0,05% de metanol anidro (V/V).

Procedimento: injetar, separadamente 1 µl das *soluções padrão e amostra*, registrar os cromatogramas e medir as áreas dos picos. Calcular os teores de metanol e 2-propanol em relação à amostra submetida à destilação a partir das respostas obtidas com as *soluções padrão e amostra*.

V.4.3.2 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO EM EXTRATOS FLUIDOS E MOLES

Transferir 2 ml ou 2 g de extrato para pesa-filtros ou placa de Petri, medindo, aproximadamente, 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura. Evaporar até *secura* em banho-maria e dessecar em estufa a 100-105

°C, por 3 horas. Deixar esfriar em dessecador, sobre pentóxido de fósforo e pesar. Calcular o resíduo seco em porcentagem sobre a massa ou sobre o volume.

V.4.3.3 DETERMINAÇÃO DE RESÍDUO SECO EM EXTRATOS SECOS

Pesar, em placa de Petri medindo, aproximadamente, 50 mm em diâmetro e 30 mm de altura, 0,50 g de extrato seco finamente pulverizado. Dessecar em estufa a 100-105 °C por 3 horas. Deixar esfriar em dessecador, sobre pentóxido de fósforo e pesar. Calcular o resíduo seco em porcentagem sobre a massa.

EXTRATOS FLUIDOS

Extracta fluida

DEFINIÇÃO

Extratos fluidos são preparações líquidas nas quais, exceto quando especificado de maneira diferente, uma parte do extrato, em massa ou volume, corresponde a uma parte, em massa, da droga seca, utilizada na sua preparação. Se necessário, os extratos fluidos podem ser padronizados, em termos de concentração do solvente, teor de constituintes ou resíduo seco. Se necessário, podem ser adicionados de conservantes inibidores do crescimento microbiano.

OBTENÇÃO

Os extratos fluidos podem ser obtidos por percolação, maceração ou por dissolução de extratos secos ou moles utilizando como solvente unicamente etanol, água ou misturas etanol/água de proporção adequada. Se necessário, o extrato obtido pode ser filtrado. Qualquer que seja o processo de obtenção, os extratos fluidos apresentam composição e características comparáveis. A formação de um ligeiro sedimento durante a armazenagem é aceitável, desde que a composição do extrato não sofra modificações significativas.

ENSAIOS DE PUREZA

Densidade relativa (V.3.3.1). Quando for o caso, os extratos fluidos devem cumprir com os limites prescritos na monografia.

Determinação de etanol (V.3.4.8). Determinar teor de etanol em extratos fluidos obtidos com etanol ou misturas etanol/água. O teor de etanol deve cumprir o especificado na monografia.

Determinação de metanol e 2-propanol (V.4.3.1). A menos que especificado de maneira diferente, os extratos fluidos devem conter não mais de 0,05% (V/V) de metanol e não mais de 0,05% (V/V) de 2-propanol.

Determinação do resíduo seco (V.4.3.2). O resíduo seco deve cumprir com o especificado na monografia.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem-fechados, ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

O rótulo deve conter as seguintes informações:

- nomenclatura botânica da droga que deu origem ao extrato;
- se o extrato foi preparado com planta fresca (quando for o caso);

- composição do solvente e o teor de etanol em porcentagem (V/V) no solvente utilizado na preparação;
- quando for o caso o teor de etanol em porcentagem (V/V) no produto final;
- teor de princípios ativos e/ou relação droga/extrato final;
- nome e concentração de conservantes antimicrobianos adicionados.

EXTRATOS MOLES

Extracta spissa

DEFINIÇÃO

Os extratos moles são preparações de consistência pastosa obtidos por evaporação parcial do solvente utilizado na sua preparação. São obtidos utilizando-se como solvente unicamente etanol, água ou misturas etanol/água na proporção adequada. Apresentam no mínimo 70% de resíduo seco (p/p). Os extratos moles podem ser adicionados de conservantes para inibir crescimento microbiano.

ENSAIOS DE PUREZA

Resíduo seco (V.4.3.2). O resíduo seco deve cumprir com o especificado na monografia.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes bem-fechados, ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

O rótulo deve conter as seguintes informações:

- nomenclatura botânica da droga que deu origem ao extrato;
- nome e quantidade do material inerte utilizado;
- se o extrato foi preparado com planta fresca (quando for o caso);
- composição do solvente e o teor de etanol em porcentagem (V/V) no extrato líquido que lhe deu origem;
- teor de princípios ativos e/ou relação droga/extrato final;
- nome e concentração de conservantes antimicrobianos adicionados.

EXTRATOS SECOS

Extracta sicca

DEFINIÇÃO

Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Apresentam, no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como porcentagem de massa. Os extratos secos podem ser adicionados de materiais inertes adequados.

Os extratos secos padronizados têm o teor de seus constituintes ajustado pela adição de materiais inertes adequados ou pela adição de extratos secos obtidos com a mesma droga utilizada na preparação.

Quando necessário, a monografia poderá prescrever realização de ensaio limite para o solvente utilizado na preparação.

ENSAIOS DE PUREZA

Resíduo seco (V.4.3.3). O resíduo seco deve cumprir com o especificado na monografia.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipientes hermeticamente fechados, ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

O rótulo deve conter:

- nomenclatura botânica da droga que deu origem ao extrato;
- nome e quantidade do material inerte utilizado;
- se o extrato foi preparado com planta fresca (quando for o caso);
- nome do solvente e o teor de etanol em porcentagem (V/V) no solvente utilizado na preparação;
- teor de princípios ativos e/ou relação droga/extrato final.

V.5.1 TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

V.5.1.1 ESTERILIDADE

Os testes de esterilidade aplicam-se a insumos farmacêuticos, medicamentos e correlatos que, de acordo com a Farmacopéia, devem ser estéreis, sendo adequados para revelar a presença de bactérias, fungos e leveduras. Contudo, um 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 lote 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 de fabricação, de acordo com as Boas Práticas de Fabricação.

PRECAUÇÕES DURANTE O TESTE

Os testes devem ser realizados sob condições assépticas, utilizando, por exemplo, capela de fluxo laminar classe A (3500 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$), que deve estar instalada em sala limpa classe B (350 000 partículas $\geq 0,5 \mu\text{m}^3$). Não devem ser realizados testes sob exposição direta de luz ultravioleta ou em áreas sob tratamento com aerossóis. As condições devem ser adequadas de forma a evitar contaminação acidental da amostra durante o teste e, também, não afetar a detecção de possíveis contaminantes. Controles ambientais das áreas de trabalho devem ser realizados regularmente (controle do ar e de superfícies, contagens de partículas, determinação de velocidade e direção do fluxo de ar, entre outros).

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura usualmente utilizados para testes de esterilidade são o *Meio líquido de tioglicolato* e o *Caldo de caseína-soja*. O primeiro é utilizado primariamente para cultura de bactérias anaeróbicas, embora também possa detectar o crescimento de bactérias aeróbicas. O segundo é adequado para a cultura de leveduras, fungos e bactérias aeróbicas. Os meios utilizados devem cumprir com os requisitos dos *Testes de adequação dos meios de cultura*. Preparar os meios de cultura conforme descrito a seguir. Formulações desidratadas também podem ser utilizadas, devendo-se demonstrar que, após reconstituição conforme indicações do fabricante, os requisitos dos *Testes de adequação dos meios de cultura*.

Meio líquido de tioglicolato

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 (ou ácido tioglicólico)	0,5 g (0,3 ml)
Resazurina sódica a 0,1% (p/V) recentemente preparada	1,0 ml
Água	1000 ml
pH do meio após esterilização	$7,1 \pm 0,2$

Misturar a L-cistina, cloreto de sódio, dextrose, extrato de levedura e caseína de digestão pancreática com 1000 ml de água e aquecer até dissolução total. Dissolver o tioglicolato de sódio ou ácido tioglicólico nesta solução e ajustar o pH com hidróxido de sódio *M* de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $7,1 \pm 0,2$. Se houver necessidade de filtração, aquecer a solução novamente, sem deixar alcançar a ebulição e filtrar, ainda quente, em papel de filtro. Adicionar a solução de resazurina sódica, misturar e

distribuir em frascos adequados. O meio deve apresentar uma coloração rósea na sua superfície que não exceda um terço da altura da sua massa líquida. No caso de se obter um meio com coloração rósea em mais de um terço de sua massa líquida, restaurar o meio por um único aquecimento em banho-maria ou em vapor fluente. Esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre 2 °C e 25 °C. Não utilizar o meio por um período de estocagem superior àquele para o qual ele foi validado.

O *Meio líquido de tioglicolato* deve ser incubado a 30-35 °C sob condições aeróbicas.

Meio líquido de tioglicolato alternativo

Proceder conforme descrito para *Meio líquido de tioglicolato* sem a adição do ágar e da resazurina sódica.

O *Meio líquido de tioglicolato alternativo* deve ser incubado a 30-35 °C sob condições anaeróbicas.

Caldo de caseína-soja

Caseína de digestão pancreática	17,0 g
Farinha de 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	1000 ml

pH do meio após esterilização 7,3 ± 0,2

Dissolver todos os componentes em água, aquecendo brandamente. Resfriar à temperatura ambiente e ajustar o pH com hidróxido de sódio *M* de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de 7,3 ± 0,2. Se necessário, filtrar para clarificação do meio. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado. Se não for utilizar imediatamente, estocar em temperatura entre 2 °C e 25 °C. Não utilizar o meio por um período de estocagem superior àquele para o qual ele foi validado.

O *Caldo de caseína-soja* deve ser incubado a 20-25 °C sob condições aeróbicas.

Meios para penicilinas e cefalosporinas

Nos casos em que os meios de cultura são utilizados para o teste de esterilidade de penicilinas e cefalosporinas pelo método de *Inoculação direta*, a preparação do *Meio líquido de tioglicolato* e do *Caldo de caseína-soja* deve ser modificada conforme descrito a seguir. Transferir, assepticamente, para os frascos esterilizados contendo cada meio, quantidade de β -lactamase suficiente para inativar o antibiótico presente na amostra. Número representativo de frascos contendo meio com β -lactamase sem amostra devem ser incubados durante o período do teste (controle negativo). Controles positivos também devem ser incluídos. Para verificar se toda penicilina ou cefalosporina foi inativada, proceder ao *Teste de validação para bacteriostase e fungistase*, utilizando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) como microrganismo teste. A observação de crescimento microbiano típico constitui confirmação de que a concentração de β -lactamase utilizada é apropriada.

PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Usualmente, são necessários ajustes para se obter densidade específica de células microbianas viáveis (não mais que 100) no meio de cultura. Para estabelecer um volume que contenha a densidade recomendada de células, diluições em série devem ser realizadas a partir de uma suspensão estoque, procedendo-se a contagens em placas para determinar a densidade bacteriana obtida com cada diluição. Se o procedimento estiver bem padronizado, é possível reproduzir os resultados com a mesma cepa de bactérias.

Nota: os meios de cultura utilizados na padronização do inóculo são aqueles descritos na monografia *Contagem de microrganismos viáveis totais (V.5.1.6) para cada microrganismo*.

Procedimento

Com o auxílio de alça de cultivo, transferir o crescimento do microrganismo específico para tubo de ensaio contendo ágar inclinado indicado para o seu crescimento. Semear a cultura sobre a superfície do ágar inclinado, de modo a obter película uniforme de crescimento. Incubar nas condições ótimas de

crescimento do microrganismo teste.

Após o período de incubação lavar o crescimento do microrganismo com 1 ml de água estéril (solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/V)) e transferir para frasco contendo 99 ml de água estéril (solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/V) - (suspensão estoque). Homogeneizar a suspensão manualmente ou em agitador de tubos do tipo vórtex.

Preparar diluições em série (1:100, 1:10 000 e 1:1 000 000) a partir da suspensão estoque utilizando solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/V) como diluente. Incorporar 1 ml de cada diluição em meio sólido adequado para o microrganismo, homogeneizar e incubar.

Proceder à contagem do número de colônias que se desenvolveram no meio sólido e escolher, a partir dos resultados, a diluição a ser utilizada para obter-se não mais que 100 células por frasco de meio de cultura.

Repetir o procedimento para cada microrganismo utilizado.

TESTES DE ADEQUAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados devem cumprir com os testes descritos a seguir, realizados antes ou paralelamente ao *Teste de esterilidade da amostra*.

Esterilidade

Confirmar a esterilidade de cada lote de meio esterilizado incubando porções dos meios nas condições especificadas durante, no mínimo, 14 dias. Não ocorre crescimento de microrganismos.

Promoção de crescimento

Cada lote de meio deve ser testado quanto à sua capacidade em promover o crescimento de microrganismo. Inocular, separadamente, em duplicata, frascos de cada meio com volume de inóculo contendo não mais que 100 células microbianas viáveis de cada cepa listada na Tabela 1 e incubar conforme as condições especificadas para cada meio. O teste de promoção de crescimento é considerado válido se há evidência de crescimento microbiano, visualizado pela turvação e/ou por métodos microscópicos, após 3 dias de incubação dos meios inoculados com bactérias e após 5 dias de incubação dos meios inoculados com fungos.

Tabela 1 – Microrganismos indicados para utilização em testes de promoção de crescimento e de validação

Meio	Microrganismo	Cepa
Meio líquido de tioglicolato	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538, NCTC 10788
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027, NCIMB 8626
	<i>Clostridium sporogenes</i> *	ATCC 19404, NCTC 532 ou ATCC 11437
Tioglicolato alternativo	<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404, NCTC 532 ou ATCC 11437
Caldo de caseína-soja	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633, NCIMB 8054
	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 NCPF 3179
	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404

* *Bacteroides vulgatus* (ATCC 8482) pode ser utilizado alternativamente a *Clostridium sporogenes*, quando não for necessário o uso de um microrganismo esporulado.

FLUIDOS DE DILUIÇÃO E LAVAGEM

Fluido I

Tecido animal de digestão péptica 1,0 g
Água 1000 ml
pH após esterilização 7,0 ± 0,2

Dissolver o tecido animal de digestão péptica em água, filtrar ou centrifugar para clarificação do meio, se necessário, e ajustar o pH em 7,1 ± 0,2. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

Para a realização do teste de esterilidade de penicilinas ou cefalosporina pelo método de *Filtração em membrana*, adicionar, assepticamente, ao *Fluido I* esterilizado, quantidade de β -lactamase suficiente para inativar qualquer atividade antibiótica residual na membrana após a filtração da amostra.

Fluido II

Para cada litro de *Fluido I*, adicionar 1 ml de polissorbato 80 antes da esterilização. Ajustar o pH em $7,1 \pm 0,2$. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

Fluido III

Tecido animal de digestão péptica	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Polissorbato 80	10,0 g
Água	1000 ml
pH após esterilização $6,9 \pm 0,2$	

Misturar todos os componentes e aquecer, brandamente, até dissolução. Filtrar, se necessário, e ajustar o pH de modo que, após a esterilização, o pH da solução seja de $6,9 \pm 0,2$. Distribuir em frascos adequados e esterilizar utilizando processo validado.

TESTE DE VALIDAÇÃO PARA BACTERIOSTASE E FUNGISTASE

Antes de se estabelecer um procedimento para o teste de esterilidade de insumos farmacêuticos, medicamentos ou correlatos, deve-se garantir que qualquer atividade bacteriostática ou fungistática inerente ao produto não tem influência adversa sobre a confiabilidade do teste, demonstrando-se que o procedimento utilizado é adequado para o produto sob exame.

O teste de validação para bacteriostase e fungistase deve ser realizado quando o teste de esterilidade for realizado pela primeira vez para um produto e sempre que houver modificações na formulação do produto e/ou nas condições experimentais do teste. A validação pode ser feita prévia ou simultaneamente ao teste de esterilidade do produto sob exame.

Procedimento

Para realizar o teste de validação, proceder conforme descrito em *Procedimentos para o teste de esterilidade*, empregando exatamente os mesmos métodos, exceto para as modificações que se seguem.

Nota: para ambos os métodos descritos a seguir, utilizar os microrganismos previamente especificados (Tabela 1). Realizar testes de Promoção de crescimento (Testes de adequação dos meios de cultura) como controle positivo. Incubar todos os frascos contendo os meios por não mais que 5 dias.

Método de filtração em membrana

Após transferência do conteúdo do recipiente ou recipientes sob exame (conforme especificado na Tabela 3) para o dispositivo de filtração, adicionar não mais que 100 células do microrganismo teste à última alíquota do fluido estéril utilizado para lavagem da membrana.

Método de inoculação direta

Após transferência do conteúdo do recipiente ou recipientes sob exame (conforme especificado na Tabela 3) para frascos com os meios de cultura, adicionar não mais que 100 células dos microrganismos testes aos frascos.

Interpretação

Se o crescimento de microrganismos obtido após a incubação é visivelmente comparável àquele obtido no controle positivo (frasco sem adição de amostra), a amostra não apresenta atividade antimicrobiana sob as condições do teste ou tal atividade foi satisfatoriamente eliminada. O teste de esterilidade pode, então, ser conduzido sem necessidade de modificações.

Se o crescimento de microrganismos não é obtido na presença da amostra, ou se ele não é visivelmente comparável àquele obtido nos controles positivos, a amostra apresenta atividade antimicrobiana que não foi

satisfatoriamente eliminada sob as condições do teste. Nesse caso, devem ser feitas modificações nas condições do teste para eliminar a atividade antimicrobiana, tais como diluição, uso de substâncias neutralizantes, aumento do número de lavagens no método de filtração em membrana ou uma combinação delas. O teste de validação deve ser repetido para verificar se a atividade antimicrobiana foi eliminada pela modificação proposta.

PROCEDIMENTOS PARA O TESTE DE ESTERILIDADE

O teste de esterilidade pode ser realizado utilizando os métodos de filtração em membrana ou de inoculação direta, exceto quando um dos métodos for especificado na monografia individual. Em ambos os casos, controles negativos apropriados devem ser incluídos.

Antes de proceder ao teste, efetuar assepsia das paredes externas dos frascos e ampolas, mergulhando-os em solução antimicrobiana adequada. 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.

Nota: o teste de esterilidade deve ser realizado utilizando dois ou mais dos meios de cultura previamente especificados.

AMOSTRAGEM

A menos que especificado de forma diferente na monografia individual, testar o número de unidades da amostra especificado na Tabela 2. Se as unidades da amostra apresentam conteúdo em quantidade suficiente (Tabela 3), o conteúdo de cada unidade pode ser dividido em duas porções iguais para cada tipo de meio de cultura utilizado. Se as unidades da amostra não apresentam conteúdo em quantidade suficiente para cada meio, separar o dobro do número de unidades especificado na Tabela 2 para realização do teste.

Tabela 2 – Número mínimo de unidades a serem testadas em função do tamanho do lote

Número de unidades no lote	Número mínimo de unidades a serem testadas^{a,b}
<i>Preparações parenterais</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
Parenterais de grande volume	2% ou 10 unidades (o que for menor)
<i>Antibióticos sólidos</i>	
Frascos com capacidade < 5 g	20 unidades
Frascos com capacidade ≥ 5 g	6 unidades
<i>Oftálmicos e outras preparações não injetáveis</i>	
Até 200	5% ou 2 unidades (o que for maior)
Acima de 200	10 unidades
<i>Correlatos médicos cirúrgicos</i>	
Até 100	10% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 100 até 500	10 unidades
Acima de 500	2% ou 20 unidades (o que for menor)
<i>Produtos sólidos</i>	
Até 4	Cada unidade
Acima de 4 até 50	20% ou 4 unidades (o que for maior)
Acima de 50	2% ou 10 unidades (o que for maior)

^a Amostragem especificada considerando-se que o conteúdo de um recipiente é suficiente para inocular ambos os meios de cultura.

^b Para matérias-primas, a amostragem satisfatória pode ser baseada na raiz quadrada do número total de recipientes do lote.

Tabela 3 – Quantidades mínimas a serem utilizadas para cada meio de cultura

Quantidade por recipiente	Volume mínimo a ser inoculado em cada meio (ml)
<i>Líquidos (não antibióticos)</i>	
Amostras de 1 ml	do conteúdo
Amostras de 1 a 40 ml	Porcentagem do conteúdo mas não menos que 1 ml
Amostras de 40 ml até 100 ml	ml
Amostras de 100 ml	% do conteúdo do produto mas não menos que 20 ml
Antibióticos (líquidos)	1 ml
Outras preparações solúveis em água ou em solvente do tipo miristato de isopropila	Conteúdo total mas não menos que 0,2 g
Cremes e pomadas insolúveis a serem suspensos ou emulsificados	Conteúdo total mas não menos que 0,2 g
<i>Sólidos</i>	
Amostras de 50 mg	do conteúdo
Amostras de 50 mg até 0,3 g	Porcentagem do conteúdo mas não menos que 50 mg
Amostras de 0,3 g até 5 g	15 g
Amostras de 5 g	5 g
<i>Correlatos</i>	
Amostras cirúrgicas	Partes do fio (30 cm de comprimento cada)
Paradrapo cirúrgico/gaze/algodão em embalagem múltipla	0 mg por embalagem
Amostras e outros materiais em embalagens individuais	do material
Outros correlatos médicos	do material cortado em pedaços.

MÉTODO DE FILTRAÇÃO EM MEMBRANA

Utilizar membranas filtrantes com porosidade nominal não superior a 0,45 µm cuja eficiência em reter microrganismos tenha sido estabelecida. Filtros de nitrato de celulose, por exemplo, são utilizados para soluções aquosas, oleosas e fracamente alcoólicas, e filtros de acetato de celulose, por exemplo, para soluções fortemente alcoólicas. Filtros especialmente adaptados podem ser requeridos para determinados produtos, como antibióticos.

Os procedimentos descritos a seguir aplicam-se a membranas com diâmetro de aproximadamente 50 mm. Se filtros com diâmetros diferentes são utilizados, os volumes das diluições e lavagens devem ser ajustados conforme o diâmetro da membrana empregada. O dispositivo de filtração e a membrana são esterilizados por processo adequado. O dispositivo apresenta configuração tal que a solução a ser examinada pode ser introduzida e filtrada sob condições assépticas. O dispositivo de filtração deve permitir, ainda, a remoção asséptica da membrana para sua transferência ao meio de cultura ou ser adequado para proceder à incubação após adição do meio de cultura ao próprio dispositivo.

O tipo de fluido utilizado na lavagem da membrana depende da natureza do produto, sendo especificado na monografia individual, quando for o caso. Controles negativos ou brancos devem ser incluídos para os fluidos e solventes utilizados, para os quais não se deve observar crescimento de microrganismos. Deve-se verificar, ainda, se os fluidos utilizados não apresentam atividade antimicrobiana nas condições do teste.

Líquidos miscíveis em veículos aquosos

Transferir pequena quantidade de diluente estéril, como o *Fluido I*, para a membrana e filtrar. O diluente pode conter substâncias neutralizantes e ou inativantes, como no caso de antibióticos. Transferir para a membrana os conteúdos dos recipientes a serem testados ou a diluição apropriada (previamente definida no *Teste de validação para bacteriostase e fungistase*) em quantidades não inferiores às recomendadas nas Tabelas 2 e 3 e filtrar imediatamente. Se o produto apresentar atividade antimicrobiana, lavar a membrana não menos que três vezes filtrando, a cada vez, o volume do diluente estéril escolhido e utilizado no *Teste de validação para bacteriostase e fungistase*. A quantidade de fluido de lavagem utilizada não deve ser superior a cinco porções de 200 ml, mesmo se durante o teste de validação tenha sido demonstrado que tal ciclo de lavagens não elimina completamente a atividade antimicrobiana. Transferir a membrana inteira para

o meio de cultura ou seccioná-la, assepticamente, em duas partes iguais e transferir cada metade para os meios selecionados. Utilizar os mesmos volumes de meio empregados no teste de validação. Incubar os meios por pelo menos 14 dias.

Óleos e soluções oleosas

Utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas Tabelas 2 e 3. Óleos e soluções oleosas de baixa viscosidade podem ser filtradas sem diluição através da membrana seca. Óleos viscosos devem ser diluídos em solvente adequado como, por exemplo, miristato de isopropila, desde que demonstrado não possuir atividade antimicrobiana nas condições do teste. Deixar o óleo penetrar na membrana, filtrar utilizando vácuo ou sucção, gradualmente. Lavar a membrana com, no mínimo, três porções do *Fluido III*. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Pomadas e cremes

Utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas Tabelas 2 e 3. Pomadas de base oleosa e emulsões do tipo água em óleo podem ser diluídas para 1% em solvente adequado (miristato de isopropila ou outro) como descrito no item anterior, aquecendo, se necessário, a 40 °C (no máximo até 44 °C). Filtrar o mais rapidamente possível e prosseguir conforme descrito em *Óleos e soluções oleosas*. No caso de utilização do miristato de isopropila como diluente, este deve ser esterilizado antes do uso, por filtração em membrana, e seu extrato aquoso deve apresentar pH não inferior a 6,5.

Sólidos solúveis (não antibióticos)

Utilizar, para cada meio de cultura, quantidade de amostra especificada nas Tabelas 2 e 3. Dissolver o produto em fluido adequado, como o *Fluido I*, e prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Sólidos para preparações injetáveis (não antibióticos)

Reconstituir o produto como descrito no rótulo e prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos* ou *Óleos e soluções oleosas*, dependendo do caso. Se necessário, pode ser utilizado um excesso de diluente para auxiliar na reconstituição e filtração do produto.

Antibióticos sólidos para preparações injetáveis

Para embalagens com menos de 5 g retirar, assepticamente, de cada um dos 20 recipientes recomendados, cerca de 0,3 g de amostra, dissolver em 200 ml de *Fluido I* e misturar. Alternativamente, reconstituir o produto conforme descrito no rótulo, transferir o equivalente, em líquido, a 0,3 g de amostra e diluir para 200 ml com *Fluido I*. Para embalagens com 5 g ou mais transferir, assepticamente, de cada seis recipientes, 1 g de amostra para frasco adequado, dissolver em 200 ml de *Fluido I* e misturar. Alternativamente, reconstituir as seis unidades do produto como recomendado pelo fabricante, transferir quantidade de líquido equivalente a 1 g da amostra para frasco adequado, diluir para 200 ml com *Fluido I* e misturar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Aerossóis estéreis

Para produtos líquidos pressurizados, congelar o conteúdo em mistura de etanol e gelo seco a -20 °C, por 1 hora. Se possível, antes da abertura da embalagem, deixar o propelente escapar e transferir o conteúdo para frasco adequado. Adicionar 100 ml de *Fluido II* e homogeneizar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos* ou *Óleos e soluções oleosas*, conforme o caso.

Seringas já preenchidas

Expelir o conteúdo de cada seringa diretamente sobre a(s) membrana(s) ou em frascos separados e depois filtrar. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

Algodão purificado, gaze e material relacionado (categorite, suturas, etc.)

Fazer amostragem de acordo com as Tabela 2 e 3. 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 conforme descrito em *Líquidos miscíveis em veículos aquosos*.

MÉTODO DE INOCULAÇÃO DIRETA EM MEIO DE CULTURA

Transferir, direta e assepticamente, para os meios de cultura, quantidade da amostra especificada nas Tabelas 2 e 3, de tal forma que o volume da amostra não seja maior que 10% do volume do meio de cultura, a menos que especificado de maneira diferente na monografia individual ou nessa seção.

Se a amostra apresentar atividade antimicrobiana, realizar o teste após a neutralização do efeito, com substância neutralizante ou por diluição em quantidade suficiente de meio de cultura. Quando for necessário o uso de grandes volumes da amostra, pode-se trabalhar com meio de cultura concentrado, preparado levando-se em conta a diluição subsequente à adição do produto. Se o recipiente comportar, o meio concentrado pode ser adicionado diretamente à amostra.

Líquidos

Transferir as quantidades especificadas da amostra para os tubos contendo os meios utilizando pipeta estéril ou seringa e agulha estéreis. Misturar o líquido com o meio, sem arear excessivamente. Incubar nas condições especificada para cada meio durante 14 dias.

Óleos líquidos

Utilizar meio de cultura contendo agente emulsificante em concentração que tenha se mostrado adequada no teste de validação, por exemplo, polissorbato 80 a 1% (p/V).

Pomadas e cremes

Preparar diluição da amostra a 10% utilizando um agente emulsificante adequado adicionado a um diluente estéril como o *Fluido I*. Transferir a amostra diluída para meios de cultura sem emulsificante. Incubar os meios inoculados por, no mínimo, 14 dias. Observar os meios durante todo o período de incubação. Agitar, suavemente, os frascos de meio de cultura contendo óleo, diariamente, durante todo o período de incubação. Os frascos contendo *Meio líquido de tioglicolato* ou outro meio similar devem ser agitados de forma a não prejudicar as condições de anaerobiose.

Sólidos

Transferir quantidade de amostra especificada nas Tabelas 2 e 3 ou preparar uma solução ou suspensão do produto adicionando volume não superior a 20 ml de diluente estéril ao recipiente. Transferir o material assim obtido para 200 ml de *Meio líquido de tioglicolato*. Do mesmo modo, transferir a mesma quantidade do material para 200 ml de *Caldo de caseína-soja*. Misturar e prosseguir conforme descrito para *Líquidos*.

Categute e outras suturas cirúrgicas

Para cada meio, utilizar a quantidade de amostra especificada nas Tabelas 2 e 3. Abrir a embalagem assepticamente e remover três porções do fio para cada meio de cultura. Essas porções devem ser retiradas no início, no meio e no final e terem 30 cm de comprimento. Cobrir cada parte do fio com volume suficiente dos meios (20 ml a 150 ml).

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 0,1 g a 0,5 g das partes mais internas da amostra. Para materiais em embalagem individual, tais como chumaço de gaze, retirar duas porções individuais de 0,25 g a 0,5 g, ou duas unidades totais, no caso de unidades pequenas (ex: bandagens menores que 25 mm a 75 mm). Transferir uma porção para tubo com 40 ml de *Meio líquido de tioglicolato* e outra para tubos com 40 ml de *Caldo de caseína-soja*. Prosseguir conforme descrito para *Líquidos*.

Aparelhos parenterais

Para aparelhos de formas e dimensões que permitam sua imersão em volume de meio que não ultrapasse 1000 ml, fazer a sua imersão utilizando as quantidades especificadas nas Tabelas 2 e 3 e proceder conforme descrito em *Líquidos*. Para aparelhos muito grandes, fazer a imersão de partes que entrem em contato com o paciente em volume de meio suficiente para a imersão de todas as partes. Para cateteres cujos lumens, interno e externo, devam ser estéreis, passar o meio dentro do lúmen ou preencher

o lúmen com o meio e promover a imersão do aparelho inteiro.

OBSERVAÇÕES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Durante o período de incubação e até o seu término, examinar os meios quanto a evidências macroscópicas de crescimento microbiano. Se a amostra sob exame provoca turvação dos meios de cultura, de modo a impedir a observação do crescimento microbiano, transferir porções adequadas de cada frasco (não menos que 1 ml) para frascos novos dos mesmos meios 14 dias após o início da incubação. Incubar os frascos originais e os frascos novos por um período adicional de não menos que 4 dias.

Se, ao final do período de incubação, não houver evidências de crescimento microbiano, a amostra sob exame cumpre com o requisito de esterilidade. Se for evidenciado crescimento de microrganismos, a amostra não cumpre com o requisito de esterilidade, a não ser que se evidencie falha durante a execução do teste como, por exemplo, contaminação não relacionada com o produto em análise.

O teste de esterilidade pode ser considerado inválido se uma ou mais das seguintes condições forem observadas.

- a) Os dados de monitoramento microbiológico do local de realização do teste demonstram falha.
- b) Uma revisão dos procedimentos utilizados durante o teste revela falha.
- c) Crescimento microbiano é observado nos controles negativos.
- d) Após a identificação do microrganismo (ou microrganismos) isolado a partir do teste, o crescimento desta espécie (ou espécies) pode ser atribuído, indubitavelmente, a falhas relacionadas ao material utilizado e/ou a técnicas utilizadas na execução do teste de esterilidade.

Se for considerado inválido, o teste de esterilidade deve ser repetido com o mesmo número de unidades do teste inicial. Se, após a repetição do teste, não for observado crescimento microbiano, a amostra cumpre com o requisito de esterilidade. Se for observado crescimento microbiano após a repetição do teste, a amostra sob exame não cumpre com o requisito de esterilidade.

APLICAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE A PREPARAÇÕES PARENTERAIS, OFTÁLMICAS E OUTRAS PREPARAÇÕES NÃO-INJETÁVEIS COM REQUERIMENTO PARA ESTERILIDADE

Ao empregar a técnica de filtração em membrana, utilizar, sempre que possível, todo o conteúdo do recipiente, mas não menos que a quantidade indicada nas Tabelas 2 e 3, diluindo, quando necessário, para aproximadamente 100 ml com uma solução estéril adequada, como o *Fluido I*.

A empregar a técnica de inoculação direta, utilizar as quantidades indicadas nas Tabelas 2 e 3, a menos que de outra forma indicado e justificado. Os testes para bactérias e fungos são realizados com uma mesma unidade da amostra sob exame. Quando o volume ou a quantidade em um único recipiente é insuficiente para a realização do teste, os conteúdos de dois ou mais recipientes são utilizados para inocular os diferentes meios.

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. As substâncias corantes podem ser classificadas em corantes orgânicos naturais, corantes orgânicos sintéticos e corantes minerais.

Aos medicamentos destinados à aplicação por via oral, retal, vaginal ou cutânea podem ser adicionadas substâncias corantes constantes nas Tabelas 1, 2 e 3 ou a 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.

Tabela 1 – Corantes orgânicos naturais

Cor	Nome oficial	Nº. C.I.	Descrição
Amarela	Curcumina	72.220	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-tetraidroxipentil)isoaloxazina

Laranja	Beta-caroteno	40.800	β -Caroteno extraído de fontes naturais ou obtido por síntese
Laranja	Cantaxantina	40.850	β,β -Caroteno-4.4'-diona extraída de fontes naturais ou obtida por síntese
Laranja	Apo-8-carotenal	40.820	β -Apo-8-carotenal extraído de fontes naturais ou obtido por síntese
Laranja	Urucum	75.120	Extrato obtido pelo tratamento de <i>Bixa orellana</i> L. por solventes orgânicos, óleos e gorduras vegetais comestíveis, mono e diglicerídeos 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- ψ,ψ -carotenocíico) e norbixina (ácido 6,6'-diapo- ψ,ψ -carotenocíico isolados ou reproduzidos por síntese e seus sais sódicos ou potássicos)
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 vegetal	–	Carvão vegetal farmacopéico
Verde	Clorofila	75.810	Mistura de clorofilas a e b. Clorofila a: $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$, éster ftílico do complexo magnesiano de [(1,3,5,8-tetrametil-4-etil-2-vinil-9-oxo-10-metoxicarbonil)forbinil]-7-propionato. Clorofila b: $C_{55}H_{70}MgN_4O_6$, éster do complexo magnesiano 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
Vermelha	Carmin de cochonilha	75.470	Laca de alumínio ou de cálcio, 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.)

Tabela 2 – Corantes orgânicos sintéticos

Cor	Nome oficial	Nº. C.I.	Descrição
Amarela	Amarelo crepúsculo	15.985	Sal dissódico do ácido 1- <i>p</i> -sulfofenilazo-2-naftol-6-sulfônico
Amarela	Amarelo ácido	13.015	Sal dissódico do ácido 5-(4-sulfofenilazo)-2-naftolsulfônico
Amarela	Tartrazina	19.140	Sal trissódico do ácido 1- <i>p</i> -sulfofenil-4- <i>p</i> -sulfofenilazo-5-hidroxipirazol-3-carboxílico
Laranja	Laranja GGN	15.980	Sal dissódico do ácido 1-(3-sulfofenilazo)-2-naftolsulfônico
Azul	Azul brilhante	42.090	Sal dissódico do sal interno de hidróxido de <i>N</i> -etil- <i>N</i> -[4-[[4-etil(3-sulfofenil)metil]amino]fenil](2-sulfofenil)metileno]-2,5-cicloexadien-1-ilideno]-3-sulfobenzenometanamínio
Azul	Azul de idantreno	69.800	<i>N,N</i> -diidro-1',2'-antraquinonazina
Azul	Indigotina	73.015	Sal dissódico do ácido indigotin-5,5-dissulfônico

Vermelha	Amaranto	16.185	Sal trissódico do ácido 3-hidroxi-4-[(4-sulfo-1-naftalenil)azo]-2,7-naftalenodissulfônico
Vermelha	Eritrosina	45.430	Sal dissódico monoidratado de 3',6'-diidroxí-2',4',5',7'-tetraiodospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanten]-3-ona
Vermelha	Vermelho 40	16.035	Sal dissódico do ácido 6-hidroxi-5-(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenilazo)-2-naftalenossulfônico
Vermelha	Ponceau 4R	16.255	Sal trissódico do ácido 1-(4'-sulfo-1'-naftilazo)-2-naftol-6,8-dissulfônico

Tabela 3 – Corantes minerais

<i>Cor</i>	<i>Nome oficial</i>	<i>Nº. C.I.</i>	<i>Descrição</i>
Branca	Carbonato de cálcio	72.220	Carbonato de cálcio, CaCO ₃
Branca	Dióxido de titânio	77.891	Dióxido de Titânio, TiO ₂
Amarela	Óxido de ferro	77492	Óxido férrico hidratado
Vermelha	Óxido de ferro	77.491	Sesquióxido de ferro anidro
Preta	Óxido de ferro	77.499	Óxido ferroso-férrico

Os corantes sintéticos podem ser usados na forma de lacas (sobre substrato de alumina), na forma descrita nas respectivas monografias. O uso dos corantes tartrazina e laca de tartrazina deve ser obrigatoriamente declarado no rótulo.