

**Determinación Cuantitativa de G-1 en un concentrado emulsionable mediante cromatografía de gases capilar.**

**Quantitative determination of G-1 in an emulsifiable concentrate by gas chromatography capillary.**

Miguel Ángel Alba de Armas, Luis Ramón Bravo Sanchez y Annie Gallo Torres.

Departamento de Farmacia. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5<sup>1/2</sup>. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: [malba@uclv.edu.cu](mailto:malba@uclv.edu.cu)

**RESUMEN.** El G-1 es un bioactivo obtenido a partir del furfural (derivado de la caña de azúcar), al cual se le ha demostrado acción fungicida y bactericida de amplio espectro. En el presente trabajo se desarrolló y validó una técnica de Cromatografía de Gases Capilar para la determinación cuantitativa de G-1 en un concentrado emulsionable (utilizado en el tratamiento de afecciones en la piel), con vistas a su futuro control de calidad. Se utilizó para la separación cromatográfica una columna capilar, nitrógeno como gas portador y un detector de ionización por llama. Se optimizaron las condiciones cromatográficas hasta lograr una alta eficacia en la separación. La validación se desarrolló según lo reportado en las normas ICH. El tiempo de retención de G-1 bajo las condiciones desarrolladas es de 4,7 minutos. Dicha técnica cumplió con los principales parámetros de validación: linealidad (en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/mL), precisión [repetibilidad (Coeficiente de Variación = 1,11%) y precisión intermedia (Coeficiente de Variación = 1,17%)], exactitud (recobrado del 100%), sensibilidad (el límite de detección es de 0,0087 mg/mL y el límite de cuantificación es de 0,0092 mg/mL) y especificidad (los anchos en la semialtura y los factores de simetría no experimentaron variaciones significativas). Se concluye que la técnica analítica desarrollada es capaz de arrojar resultados satisfactorios, resultando fiable de acuerdo a los parámetros de validación vigentes.

**ABSTRACT.** G-1 is a bioactive obtained from furfural (a sugarcane derivative) which has demonstrated fungicide and bactericide effects on a broad spectrum. In this project a new capillary gas chromatography technique was developed and validated for the quantitative determination of G-1 in an emulsifiable concentrate (used in treatment of an affected skin) with view of future quality control. A capillary column for the separation, nitrogen as the carrier gas (mobile phase) and a flame ionization detector were used. Chromatographic conditions were optimized until high efficiency separation was achieved. Validation was done following the norms described by ICH. G-1 retention time under the created conditions was 4.7 minutes. This technique accomplished the principal validation parameters: linear (in the interval between 0.1 and 0.5 mg/mL), precision [repeatability (variation coefficient= 1.11%)] and intermediate precision (variation coefficient=1.17%), accuracy (covering 100%), sensitivity (the limit of detection is 0.0087mg/mL and the quantification limit is 0.0092mg/mL) and specificity (the width of the half height and symmetry factors did not show significant variations). The technique is hence rendered capable to produce satisfactory results, justifiable by the actual validation parameters.

**Palabras clave:** G-1, cromatografía de gases, validación, emulsionable.

**Keywords:** G-1, gas chromatography, validation, emulsifiable.

## INTRODUCCION

El ingrediente farmacéutico activo (IFA) G-1 (1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno),<sup>1</sup> que se fabrica en el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, se utiliza desde hace alrededor de una década en la elaboración de medicamentos de uso humano (Dermofural®), veterinario (Queratofural®) y más recientemente el Vitrofur®, como esterilizante químico para la fabricación de vitroplantas.

El desarrollo de formas farmacéuticas más estables resulta un tema de investigación no agotado aún. Tal es el caso del concentrado emulsionable para reconstituir al inicio del tratamiento de la piodermitis y micosis cutáneas, cuya formulación está compuesta por dicho IFA, el span 20 como emulgente y el aceite mineral como vehículo, que se ha desarrollado en el departamento de Farmacia, el cual promete ser una alternativa mejorada.

Para poder garantizar la calidad de los lotes elaborados de dicha formulación, resulta imprescindible contar con técnicas analíticas que permitan la cuantificación del IFA en un tiempo relativamente breve y a través de procedimientos sencillos y confiables; con este fin se suelen utilizar las técnicas cromatográficas y en especial, la cromatografía de gases<sup>2</sup> es el método de elección para compuestos volátiles y termoestables como es el caso del G-1, la cual permite lograr con facilidad la especificidad necesaria para el buen funcionamiento del método de análisis. El presente trabajo presenta los siguientes objetivos: Desarrollar una técnica analítica de Cromatografía de Gases Capilar para la determinación cuantitativa de G-1 en el concentrado emulsionable y Validar la técnica desarrollada según los parámetros de fiabilidad vigentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Método analítico empleado para la cuantificación del G-1 en el concentrado emulsionable (Cromatografía de Gases Capilar).

El G-1 contenido en la formulación se determinó por Cromatografía de Gases Capilar, a través del método de patrón interno.

### Condiciones Cromatográficas

Columna capilar: sílice fundida. Longitud 30 m, diámetro interno 0,53 mm, fase estacionaria: 100% dimetil polisiloxano R

Modo de operación: Temperatura programada. Programa de temperatura: 200 °C (8 min), 15 °C/min hasta 230 °C (10 min).

Gas portador: Nitrógeno. Presión 5,1 psi. Velocidad de Flujo: 1 mL/min.

Inyector: Split-Splitless (modo splitless: tiempo de splitless: 1min). Temperatura de Inyección: 230 °C. Volumen de inyección: 1 µL

Detector: Ionización por llama (280 °C)

Gases auxiliares: Hidrógeno y aire para cromatografía.

### Procedimiento

#### Preparación de la disolución de estándar interno.

Se toman 0,05 mL de benzoato de bencilo, se transfieren a un matraz de 25 mL, se completa el volumen con n-hexano y se homogeniza la disolución. Disolución A.

#### Preparación de la disolución de referencia de G-1.

Se pesan con exactitud aproximadamente 0,050g de G-1, sustancia de referencia, se lleva a un matraz de 25 mL, se completa con n-hexano y se homogeniza la disolución. Disolución B (Debe protegerse de la luz). Luego se toman 0,2 mL de la solución A y 2 mL de la solución B, se

transfieren a un matraz aforado de 10 mL, se completa el volumen con n-hexano y se homogeniza la disolución. Disolución de referencia (Debe protegerse de la luz).

Preparación de la disolución de la muestra de ensayo.

Se pesan con exactitud aproximadamente 2 mL de concentrado emulsionable, se toman 0,2 mL de disolución A y se transfieren a un matraz aforado de 10 mL, se completa el volumen con n-hexano y se homogeniza la disolución (Debe protegerse de la luz). Una vez registrado el cromatograma e integrado los picos, se realizan los cálculos mediante la siguiente expresión:

$$C\% = \frac{Cp.Rm}{Rp.Pm}$$

Donde: C%: concentración de G-1 (%). Cp: concentración del patrón en mg/mL.

Pm: peso de la muestra en gramos. Rp: cociente de la respuesta del patrón. Rm: cociente de la respuesta de la muestra.

**Validación de la técnica de cromatografía de gases capilar**

Para validar la técnica se realizaron los ensayos de linealidad, precisión (repetibilidad y precisión intermedia), exactitud, especificidad y sensibilidad.<sup>3-7</sup>

**Linealidad**

Se pesa con exactitud aproximadamente 40 mg de G-1, se transfieren a un matraz aforado de 10 mL y se completa el volumen con n-hexano para, de esta forma, obtener la disolución madre de G-1. Luego se realizan 6 diluciones para obtener las disoluciones de patrón correspondientes a cada punto de la curva de calibración y para esto se toman de la disolución madre las alícuotas que se presentan en la Tabla 1, se transfieren a un matraz aforado de 10 mL y se añaden 0,2 mL de la disolución A (estándar interno) a cada matraz; se completa el volumen con n-hexano.

Se inyectan las disoluciones por duplicado cada 8 minutos. Se construye así una curva de calibración en el intervalo de concentraciones de 0,1mg/mL a 0,5 mg/mL

**Tabla 1.** Diluciones realizadas para la construcción de la curva de calibración.

Alícuotas (mL)	Volumen (mL)	C (X) – mg/mL
0,3	10	0,12
0,5	10	0,20
0,7	10	0,28
0,9	10	0,36
1,0	10	0,40
1,1	10	0,44

Teniendo en cuenta todos los valores experimentales, se calcula el coeficiente de correlación lineal (r) y el coeficiente de calidad (QC) para la linealidad a través de las expresiones siguientes.

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$

$$QC = \sqrt{\frac{\sum_i^n \left( \frac{yi - \bar{y}}{\bar{y}} \right)^2}{n - 1}}$$

Se determinó, además, el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf) que es la relación entre el área para cada pico y la concentración.

### **Precisión**

#### Repetibilidad.

Se realizan 7 réplicas de la muestra de ensayo, en condiciones homogéneas y se calcula el coeficiente de variación (CV). Se inyecta por duplicado.

#### Precisión intermedia.

Se realiza el experimento anterior, tres días consecutivos y se calcula el coeficiente de variación (CV) de todos los resultados.

### **Exactitud**

Se prepara con exactitud (pesadas con error de  $\pm 0,1$  mg) una muestra (lote) de concentrado emulsionable. Se realizan 6 determinaciones (réplicas) según la técnica de análisis descrita y se inyectan por duplicado; una vez registrado el cromatograma, los cálculos se realizan según lo explicado anteriormente.

El recobrado se calcula a través de la expresión:

$$X = \frac{C_{real} * 100\%}{C_{teórica}}$$

Donde:

X – Recobrado (%)

C<sub>real</sub> – Concentración calculada (mg/mL)

C<sub>teórica</sub> – Concentración teórica según las pesadas realizadas (mg/mL)

### **Especificidad**

Se comparan los tiempos de retención de las sustancias presentes en la muestra y el patrón. Se mide, el ancho de la semialtura y se toman los factores de simetría de los picos en los cromatogramas correspondientes a tres inyecciones de patrón y tres de muestras; se determina la media y la varianza del patrón y de la muestra, se halla la T de Student y se calcula la F de Fisher, se comparan los valores de T y de F con los tabulados, con el objetivo de descartar posibles solapamientos de picos.

### **Sensibilidad**

Se toma el valor de la pendiente de la curva así como los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), los cálculos se realizan por el criterio de 3S y 10S.<sup>5</sup>

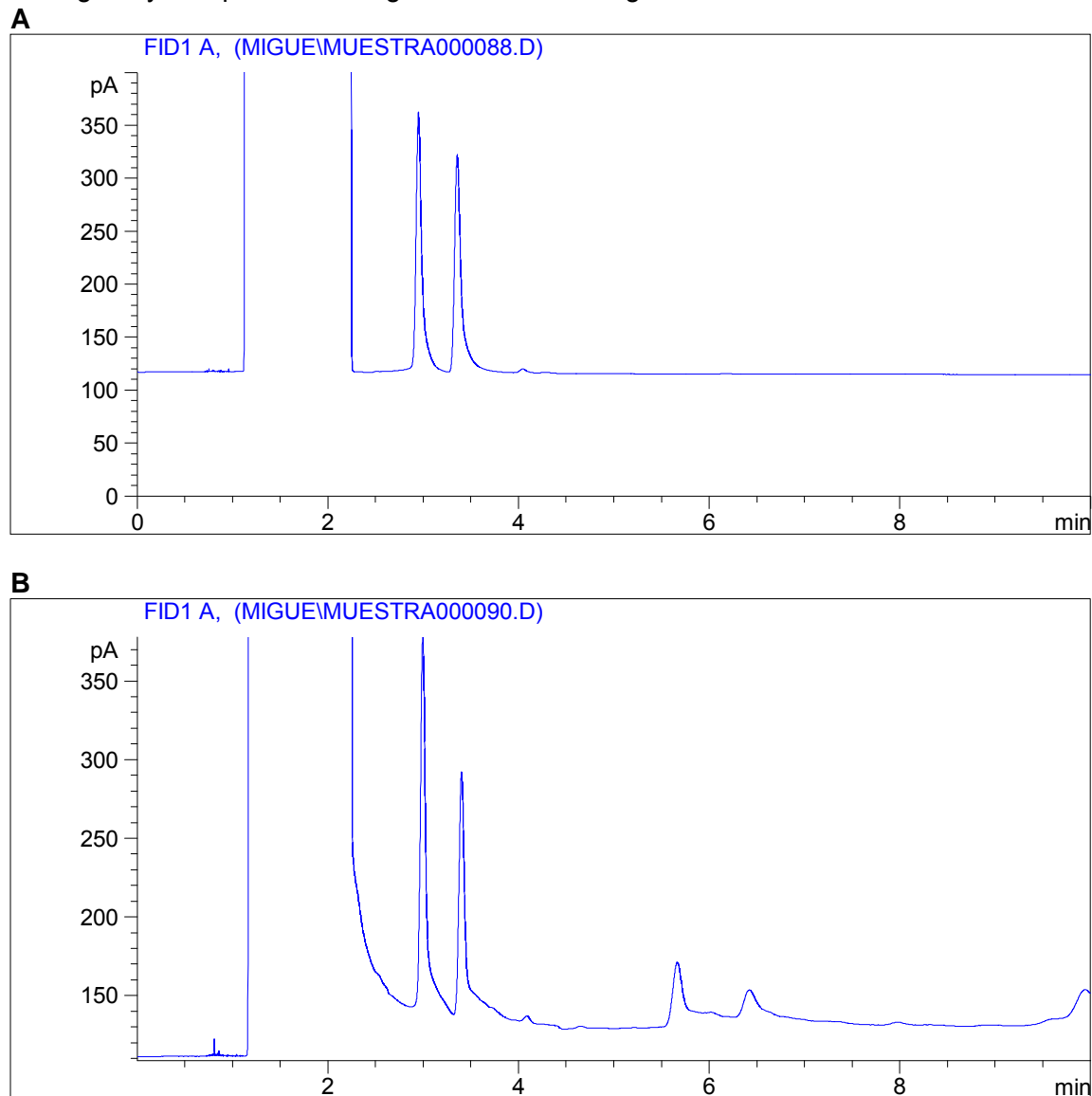
## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Determinación del contenido de G-1 el concentrado emulsionable**

El desarrollo de la técnica analítica y la determinación de las condiciones cromatográficas óptimas se efectuó basado en los estudios realizados a la materia prima (IFA G-1)<sup>8</sup> y las técnicas de Cromatografía en Capa Fina con elución<sup>9</sup> y de Cromatografía de Gases,<sup>10</sup> desarrolladas previamente para la cuantificación de G-1 en esta formulación.

Basados en los estudios de solubilidad realizados al G-1 y de miscibilidad con el aceite mineral, así como los antecedentes de la técnica de Cromatografía en Capa Fina,<sup>9</sup> se seleccionó al n-hexano como el disolvente adecuado para llevar a cabo la inyección. Para el desarrollo de las condiciones cromatográficas se partió de las condiciones optimizadas en estudios anteriores<sup>8</sup> y se fueron variando hasta optimizarlas. Primeramente se inyectó el patrón y la muestra de

ensayo bajo las siguientes condiciones: Columna capilar: sílice fundida. Longitud 30 m, diámetro interno 0,53 mm, fase estacionaria: 100% dimetil polisiloxano R. Modo de operación: Isocrático a 210 °C. Gas portador: Nitrógeno. Presión 6,3 psi. Velocidad de Flujo: 1,3 mL/min. Inyector: Split-Splitless (modo splitless: tiempo de spliless: 1min). Temperatura de Inyección: 230 °C. Volumen de inyección: 1 µL. Detector: Ionización por llama (280 °C). Gases auxiliares: Hidrógeno y aire para cromatografía. Los cromatogramas obtenidos se observan en la Fig. 1.



**Fig. 1.** Cromatogramas del patrón de G-1(A) y el concentrado emulsionable de G-1 (B) a las condiciones de análisis antes expuestas.

Como se puede apreciar en la inyección de patrón (Fig. 1 A) los picos poseen buenas características y el tiempo de retención del G-1 es relativamente bajo (3,3 min).

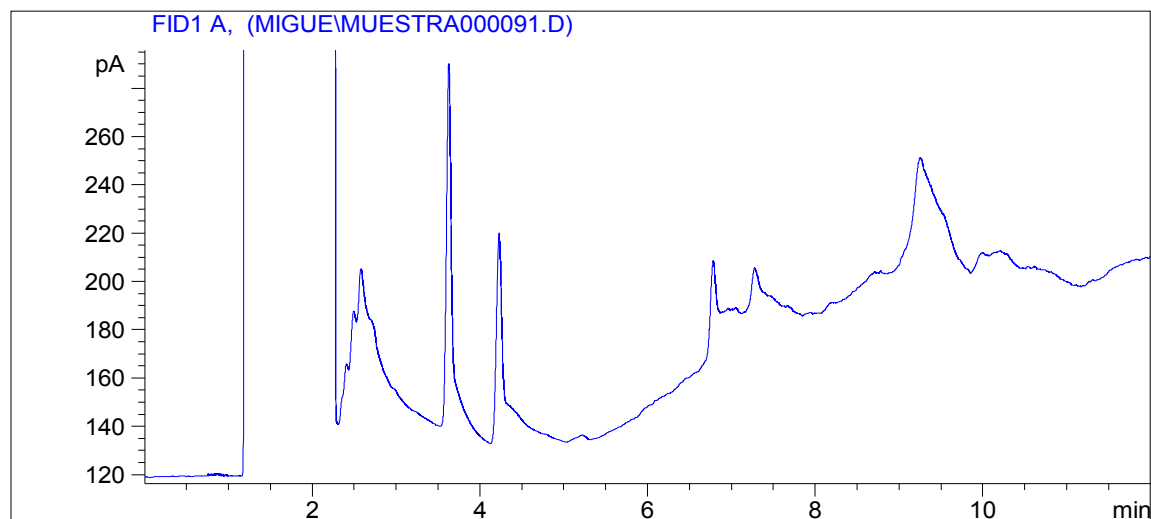
En el caso de la muestra (Fig. 1 B), los picos no poseen buenas características y eluyen solapados con algún otro componente o impureza; además, se observan otros picos a tiempos de retención superiores (alrededor de los 5 minutos) que pueden pertenecer a impurezas.

Se valoró, entonces, la conveniencia de disminuir la temperatura de la columna para favorecer la resolución de los picos, al estar un poco más retenidos, y se adoptó el modo de operación

con programación de temperatura para hacer que eluyan aquellas impurezas que pudieran quedar retenidas en la columna y eluir de manera indeseada en próximas inyecciones.

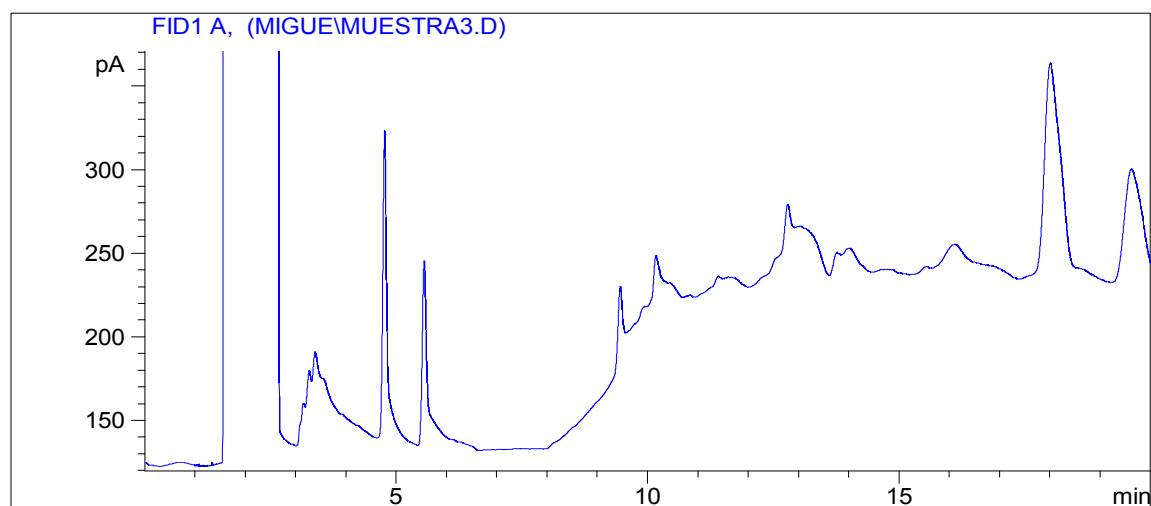
Las condiciones cromatográficas que se variaron se describen a continuación:

Modo de operación: Temperatura programada. Programa de temperatura: 200 °C (5 min), 15°C/min hasta 230 °C (5 min). Las demás condiciones permanecieron constantes. En la Fig. 2 se observa el cromatograma obtenido para la muestra bajo las nuevas condiciones.



**Fig. 2.** Cromatograma del concentrado emulsionable de G-1 (muestra) y su estándar interno (SI) en las condiciones siguientes: temperatura de 200 °C (5 min.) a 15° C/min. hasta 230 °C (5 min).

Como se observa en la Figura 2, se eliminó la interferencia mencionada con anterioridad, no obstante se observa un gran número de impurezas a tiempos de retención elevados, por lo que se decidió alargar aún más los tiempos de las mesetas. Con vistas a mejorar la eficacia de la separación, pues los picos presentan alguna cola, se procedió a variar el flujo de gas portador para lo cual se fijó la presión en 5,1 psi (flujo: 1 mL/min). Bajo las nuevas condiciones se obtuvo el siguiente cromatograma (Fig. 3).



**Fig. 3.** Cromatograma del concentrado emulsionable de G-1 y su estándar interno (SI) en las condiciones siguientes: Temperatura de 200 °C (8 min.) a 15° C/min. hasta 230 °C (10 min). Presión 5,1 psi (flujo: 1 mL/min).

Como se puede apreciar, se mejoró la eficacia de la separación y eluyeron otras impurezas a tiempos superiores a los 15 minutos. El tiempo de retención del G-1 bajo estas condiciones es 4,7 min. De esta manera se llegó a las condiciones óptimas de análisis descritas anteriormente. Se recomienda realizar los análisis por duplicado.

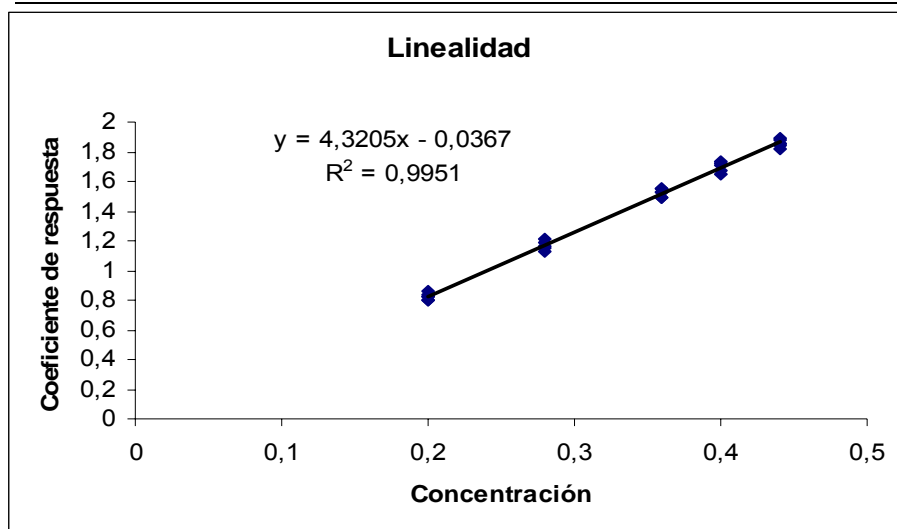
**Validación de la técnica de determinación, por cromatografía gaseosa, del contenido de G-1 en el concentrado emulsionable**

**Linealidad**

En la tabla 2 se relacionan los datos experimentales y en la Fig. 4 se muestra la curva de calibración obtenida. Los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación establecidos, demostrándose que la técnica de determinación del contenido de G-1 en el concentrado emulsionable, por cromatografía de gases, es lineal en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5 mg/mL.

**Tabla 2.** Parámetros de la recta de regresión.

Parámetro	Valor experimental	Criterio
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,9951	-
Pendiente (b)	4,3205	-
Ordenada en el origen (a)	0,0367	-
Coefficiente de Variación de los factores de respuesta (CVf)	4,17	CVf $\leq$ 5%
Coefficiente de Calidad (QC)	0,27	QC < 2,5



**Fig. 4.** Curva de calibración para determinar linealidad del método de cromatografía de gases para la cuantificación de G-1 en el concentrado emulsionable.

## Precisión

### Repetibilidad

Los resultados de las réplicas realizadas, en condiciones homogéneas, se muestran en la Tabla 3. Según estos valores de concentraciones se determinaron los parámetros siguientes:

Media  $\bar{X} = 0,225\%$

Desviación estándar  $S = 0,0025\%$

Coefficiente de variación  $CV = 1,11\%$

Si se comparan los valores del coeficiente de variación obtenido experimentalmente y el valor máximo aceptado  $CV \leq 3\%$ <sup>3</sup> se puede comprobar la repetibilidad del método analítico.

### Precisión intermedia

Para la determinación de este parámetro relacionado con la precisión del método, bajo las condiciones descritas, se utilizaron los resultados de las réplicas que se observan en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Réplicas realizadas para la determinación de la repetibilidad del método.

Determinaciones	Contenido de G-1 (%)
1	0,227
2	0,227
3	0,227
4	0,222
5	0,226
6	0,222
7	0,228

**Tabla 4.** Réplicas realizadas para la determinación de la precisión intermedia del método.

Día 1	Día 2	Día 3
0,227	0,220	0,227
0,227	0,226	0,226
0,227	0,223	0,224
0,222	0,222	0,222
0,226	0,221	0,221
0,222	0,221	0,221
0,228	0,225	0,222

Teniendo en cuenta los valores de concentración obtenidos se determinaron los siguientes parámetros:

Media  $\bar{X} = 0,224\%$

Desviación estándar  $S = 0,0026\%$

Coefficiente de variación  $CV = 1,17\%$

El coeficiente de variación obtenido es menor que el valor máximo permisible ( $CV \leq 5\%$ ).<sup>3</sup>



Todos los resultados anteriormente discutidos demuestran que el método cumple con la precisión intermedia y si se tiene en cuenta que el método cumple también con lo establecido para la repetibilidad, entonces se puede considerar preciso.

### Exactitud

Los resultados obtenidos para demostrar la exactitud del método se muestran en la Tabla 5. Teniendo en cuenta los valores de concentración obtenidos se determinó el promedio que fue de 0,233 % (s=0,00194). Se determinó entonces el recobrado, para el cual se tuvo en cuenta el valor teórico de la concentración de G-1 que fue de 0,233 % (Masa de Span 20: 1,9639 g, Masa de Aceite Mineral: 27,9717 g y Masa de G-1: 0,0699 g). El recobrado calculado fue de 100 %. Como el recobrado calculado se encuentra dentro del intervalo permisible (98 -102%)<sup>3</sup> la recuperación es satisfactoria. Por tanto la técnica se puede considerar exacta.

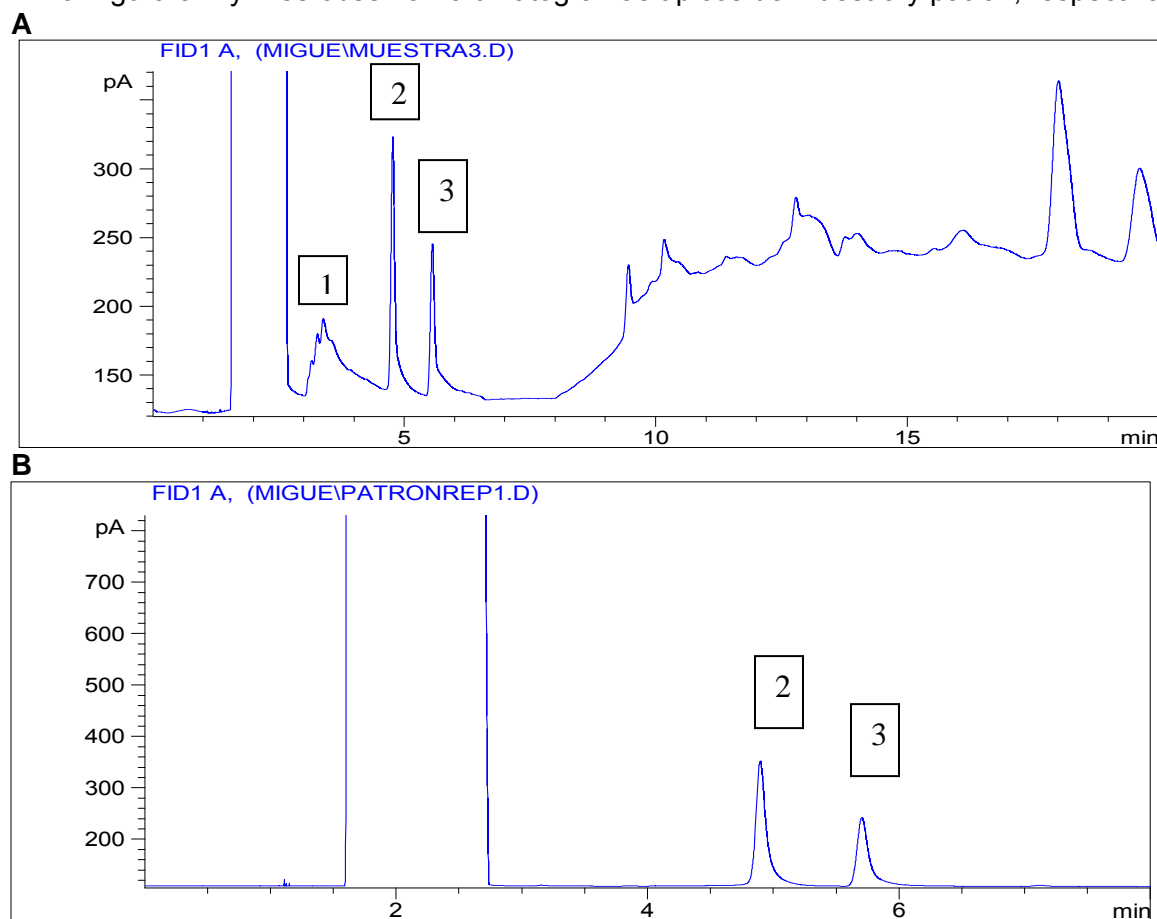
**Tabla 5.** Réplicas realizadas para la determinación de la exactitud del método

Réplicas	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Concentración (%)	0,233	0,230	0,235	0,235	0,234	0,232

### Especificidad

Se analizaron comparativamente los tiempos de retención del G-1 presente en muestra y patrón, así como se midió el ancho de la semialtura y los factores de simetría de los picos en los cromatogramas correspondientes a tres inyecciones de patrón y tres de muestras.

En la Figura 5 A y B se observan cromatogramas típicos de muestra y patrón, respectivamente.



**Fig. 5.** Comparación de los picos cromatográficos para evaluar la especificidad. A- Muestra y B- Patrón de G-1 (1-impureza desconocida, 2- G-1, 3- estándar interno)

Si se compara patrón y muestra bajo las condiciones óptimas de análisis no se observan a simple vista colas, frentes difusos u hombros que puedan indicar solapamientos de picos. Se compararon los tiempos de retención de las sustancias presentes en la muestra y el patrón y no se observaron variaciones significativas en los mismos, los cuales se mantuvieron dentro del intervalo  $4,7 \pm 5 \%$ . Además, se determinaron los anchos en las semialturas y los factores de simetría de los picos correspondientes a tres inyecciones de las disoluciones de referencia (patrones) y tres de las muestras analizadas, comparándose estadísticamente con vistas a demostrar que ninguno de estos factores experimentaba variaciones significativas.

Ancho de la semialtura: Tanto en las muestras como en los patrones se observó el mismo ancho de la semialtura (2mm).

Factores de simetría: En la Tabla 6 se recogen los valores correspondientes a los factores de simetría pertenecientes al pico de G-1 en disoluciones de muestra y patrón.

**Tabla 6.** Factores de simetría de los picos cromatográficos de G-1 en muestras y patrones.

	<b>Muestra</b>	<b>Patrón</b>
<b>Valor 1</b>	0,663	0,679
<b>Valor 2</b>	0,655	0,658
<b>Valor 3</b>	0,639	0,662
<b>Media</b>	0,652	0,666
<b>Desviación estándar</b>	0,0122	0,0111
<b>Intervalo de confianza</b>	0,632 - 0,673	0,648 - 0,685

Como se aprecia en la Tabla 6, el intervalo de confianza de la muestra está incluido dentro del intervalo de confianza del patrón, por lo que se puede decir que no existen diferencias significativas entre sus valores medios. ( $T_{tab}=2,920$  para un 95% de confianza y 2 grados de libertad).

El valor de F de Fisher, teniendo en cuenta que las varianzas obtenidas para ambos conjuntos de datos resultaron ser  $1,5 \times 10^{-4}$  y  $1,2 \times 10^{-4}$ , para muestra y patrón, respectivamente, fue de  $F_{exp\ G-1} = 0,8571$ . Este valor es menor que la F de Fischer crítica o tabulada:  $F_{tab} = 19,00$  para un 95 % de confianza y 2 grados de libertad, lo cual expresa la homogeneidad de varianzas. En resumen, los factores de simetría no experimentan diferencias significativas, según demuestra el análisis estadístico comparativo entre los valores medios y las dispersiones. Esto permite plantear que no deben existir solapamientos, pues la existencia de picos superpuestos siempre hace variar significativamente este parámetro.

Los resultados discutidos hasta el momento (comparación del ancho en la semialtura y los factores de simetría) demuestran que no existen interferencias de ninguna naturaleza que puedan afectar la determinación confiable del G-1 en la muestra (concentrados emulsionables). Con todos estos resultados se puede concluir entonces que el método es específico.

### **Sensibilidad**

Es conocido que la pendiente de la curva de calibración puede tomarse como expresión de la sensibilidad de un método, en este caso tiene un valor de 4,32, mientras mayor valor tenga la pendiente, más sensible será este. De igual manera los límites de detección y de cuantificación serán menores mientras mayor sea la sensibilidad. Como resultado del cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC), según los criterios 3S y 10S<sup>5</sup>, se obtuvo que el LD = 0,0087 mg/mL y el LC = 0,0092 mg/mL, con lo que se puede concluir que el método empleado para la cuantificación de G-1 en el concentrado emulsionable es suficientemente sensible para los propósitos de la determinación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los principales parámetros de validación de la técnica analítica puede afirmarse que la misma es fiable.

En resumen, puede decirse que el método analítico desarrollado y validado en este trabajo, supera al método anteriormente empleado (Cromatografía en Capa Fina con elución)<sup>9</sup> para dicha cuantificación, en cuanto a la practicabilidad, pues resulta más simple y rápido que este. En cuanto a la idoneidad, el hecho de que se emplee una columna capilar hace que la eficacia sea mayor, respecto al método que utiliza la columna de relleno.<sup>10</sup> Por las características de este tipo de columna y su durabilidad, puede decirse que el sistema responderá, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método, por un tiempo relativamente prolongado.

## **CONCLUSIONES**

La técnica analítica de Cromatografía de Gases Capilar desarrollada para la determinación cuantitativa de G-1 en un concentrado emulsionable es capaz de arrojar resultados satisfactorios que superan a las técnicas precedentes de Cromatografía en Capa Fina con elución y Cromatografía de Gases con columna de relleno.

La técnica desarrollada resultó fiable de acuerdo a los parámetros de validación vigentes.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

1. Centro de Bioactivos Químicos. Registro del Dermofural. Resúmenes de la información química, preclínica y clínica. 1993.
2. Sarduy, D. Estudio de la estabilidad acelerada de la solución alcohólica del ingrediente activo G-1. Trabajo de Diploma. Facultad de Química – Farmacia. UCLV. 1993.
3. Castro, M; Gascón, S; Pujol, M; Vicente, L. "Validación de Métodos Analíticos " Septiembre 1989.
4. Apers, S.; Pieters, L, Vlietinck, A. Validation of Physicochemical Methods. PNO Laboratorio de Farmacognosia. Universidad de Amberes. Bélgica. 2003.
5. EURACHEM Guide. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". ISBN: 0-948926-12-0. Reino Unido. 1998.
6. ICH Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology Availability". Part VIII. Federal Register. FDA. USA, 2005.
7. ICH Harmonised Tripartite Guideline. "International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of analytical procedures and Methodology, Geneva 2005.
8. Jorge, E; Jiménez I; Calvo A; Morales S; Bravo, L; Carta A; Ramos T; Aguilera O; Tristá, M. G1 Materia Prima. Métodos de Control de G-1. Centro de Bioactivos Químicos. Laboratorio de Control de la Calidad. 1995.
9. Alba, M. A. Diseño y desarrollo de una emulsión oleoacuosa de G-1. Evaluación de su estabilidad física, química y microbiológica. Tesis de Maestría. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. 2000.
10. Meneses, G. I. Desarrollo y Validación de una Técnica de Cromatografía de Gases para la Determinación de G-1 en un Concentrado Emulsionable. Tesis de Licenciatura en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Las Villas. 2006.