

Reformulación de la solución de hipoclorito de sodio al 1 % para su producción en tiempos de contingencia

*Reformulation of sodium hypochlorite solution 1 %
as des-infective agent to be produced during contingency times*

*Lic. Irina Licea-Jimenez^I, Dra. C. Alina González-Marañón^{II}, Lic. Rodolfo Sam-Pérez^{III},
Dra. C. Liliana Gómez-Luna^{IV}, Lic. Yadenis Ortega-Díaz^{IV}*

agm@uo.edu.cu

¹ *Empresa de Farmacias y Ópticas de Santiago de Cuba (OPTIMED), Cuba;*

² *Departamento de Farmacia, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba;*

³ *Empresa Nacional de Análisis y Servicio Técnicos de Recursos Hidráulicos (ENAST),
Santiago de Cuba, Cuba;* ⁴ *Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado,
Universidad de Oriente (CNEA), Santiago de Cuba, Cuba.*

Recibido: 8 de enero de 2018

Aprobado: 10 de abril de 2018

Resumen

La situación geográfica de Cuba la hace vulnerable a escenarios de contingencia impactando en la calidad y disponibilidad del agua. El objetivo del trabajo consiste en la reformulación de hipoclorito de sodio al 1 %, utilizando agua de las diferentes fuentes de abasto del municipio Santiago de Cuba (Quintero, San Juan, Parada y la red hidráulica), seleccionando la mejor formulación por su calidad y estabilidad farmacéutica. Las aguas y las formulaciones preparadas fueron evaluadas según las normas cubanas vigentes. La estabilidad del hipoclorito fue evaluada empleando estos parámetros de calidad a 0, 7, 14, 21 y 30 días. Los resultados demuestran que las aguas con comportamiento más cercano al agua destilada son Quintero y la red hidráulica, generando las formulaciones de mayor calidad-estabilidad. Se propone un factor matemático de corrección para estimar la concentración de cloro a añadir, que depende de la conductividad y el pH del agua.

Palabras clave: hipoclorito de sodio al 1 %, reformulación, estabilidad.

Abstract

The geographic situation of Cuba makes it vulnerable to contingency situations causing direct impacts into quality and water availability. The goal of this study consist in the reformulation of sodium hypochlorite 1%, using drinkable water of the different sources supplies from Santiago de Cuba municipality (Quintero, San Juan, Parada and the hydraulic net), selecting the best formulation by it quality and pharmaceutical stability. Waters and pharmaceutical formulation were analyzed in its quality according to the Cubans standards. Hypochlorite stability was analyzed using those quality control parameters at 0, 7, 14, 21 and 30 days. Results prove that the waters with closer behavior to distilled one are Quintero and hydraulic generating the best formulations. It is suggested a mathematical factor that allows to correcting chlorine concentration based in the values of conductivity and pH.

Keywords: sodium hypochlorite 1 %, reformulation, stability.

Introducción

La situación geográfica del archipiélago cubano lo hace vulnerable a diferentes escenarios de contingencia, los que pueden ser generados por sismos, huracanes, epidemias, sequías, entre otras; o bien ocasionados por la acción del hombre (consciente o inconsciente) como accidentes de transporte aéreos, marítimos y terrestres, accidentes en la industria química, minera, entre otros [1]. En los estados de contingencia, el agua es uno de los elementos que recibe mayor impacto negativo, ya sea por contaminación química, microbiológica, relacionada con la calidad de esta, o por problemas asociados a su disponibilidad; lo que afecta directamente a la población y a las actividades industriales. En el contexto cubano, las intensas sequías y los huracanes registrados en los últimos años han sido los eventos de contingencia más comunes, impactando directamente en la calidad y disponibilidad del agua y en la generación de brotes epidemiológicos, siendo las enfermedades diarreicas agudas las de mayor incidencia [2].

Desde el año 2012, el Sistema de Salud cubano tomó medidas encaminadas a prevenir y minimizar los efectos de los brotes emergentes de enfermedades diarreicas agudas en la población, por lo que se hizo necesario garantizar que la misma tuviera acceso a productos desinfectantes para el agua. Para el logro de este propósito se asignó la elaboración de dichos productos a los Centros de Producción Locales (CPL), dispensando luego los desinfectantes a nivel de la red de farmacias comunitarias, para facilitar su adquisición por toda la población. Según los datos de los anuarios estadísticos cubanos, mientras que en 2012 el número de casos atendidos por enfermedades diarreicas agudas ascendió a 705 310 casos [3], después de la incorporación de la venta y distribución de los desinfectantes del agua, el número de casos disminuyó apreciablemente, registrándose en 2016 solo 288 832 [4], cifra que representa el 41 % de los casos registrados en 2012.

La cloración ha sido el medio más utilizado para la potabilización del agua, por su sencillez, costo y eficacia. Esta ha desempeñado una función crítica al proteger los sistemas de abastecimiento de agua potable, de las enfermedades infecciosas transmitidas a través de ella durante casi un siglo. Se ha reconocido ampliamente a la cloración del agua potable como uno de los avances más significativos en la protección de la salud pública. La filtración y la cloración prácticamente han eliminado las

enfermedades transmitidas por el agua (como el cólera (*Vibrium cholerae*), la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), la disentería (*Shigella* sp., *Entamoeba*) y la hepatitis A) [5].

Como se mencionó anteriormente, en tiempos de contingencia la calidad del agua se ve afectada [6], por lo que el cloro añadido en el proceso de potabilización del agua no siempre es suficiente, siendo el hipoclorito de sodio al 1 % la formulación establecida a nivel de farmacias comunitarias en Cuba, para su utilización domiciliaria. Ello permite eliminar los microorganismos que no fueron eliminados en fases iniciales del tratamiento, o que se incorporaron en la trayectoria de la red, o bien por manipulación inadecuada [7]. Normalmente, tras un tiempo de actuación de unos 30 min, el agua pasa a ser potable después del tratamiento con dicha solución. Gracias al efecto remanente del cloro, continúa siendo efectivo durante horas o días en función de las condiciones de almacenamiento y por supuesto, de la calidad de las materias primas con las cuales fue producido [8]. Esta protección residual impide un nuevo crecimiento microbiano y previene la posible contaminación del agua durante su recorrido, desde la planta de tratamiento hasta los grifos domésticos. La cloración es adecuada siempre que las fuentes de agua empleadas para la preparación de los desinfectantes posean la calidad necesaria.

El tratamiento del agua por cloración con hipoclorito al 1 % es muy efectivo. No obstante, a este nivel es incapaz de destruir ciertos microorganismos parásitos patógenos, por lo que la desinfección no garantiza la purificación por completo [9]. Entre las desventajas se presenta además su olor característico, la facilidad que tiene para decolorar, tiene una vida estante o anaquel corta, necesitando lugares frescos y oscuros, su interacción con materia orgánica reduce su potencial desinfectante; puede causar daños, irritaciones en piel [5, 10] y mucosas, siendo los individuos alérgicos los más vulnerables.

En la provincia de Santiago de Cuba, la Empresa Provincial de Farmacias y Ópticas (OPTIMED) tiene la misión de garantizar la producción total de hipoclorito de sodio al 1 %, destinado a la población para el tratamiento intradomiciliario del agua de consumo. Garantizando en ocasiones, el suministro a otras provincias de menor capacidad productiva como Guantánamo, Granma y Holguín. Las producciones anuales superan los tres millones de envases (de 120 mL) por año. No obstante, resulta frecuente y en especial en momentos de contingencia o condiciones excepcionales, que las plantas

suministradoras de agua destilada se encuentren afectadas, trayendo consigo que la materia prima no esté disponible en los momentos de mayor necesidad epidemiológica.

En la búsqueda de alternativas a dicha situación, la Dirección Provincial de Salud de Santiago de Cuba asignó la tarea de la reformulación de la solución de hipoclorito de sodio al 1 % a la empresa OPTIMED y a la Dirección Provincial de Higiene y Epidemiología. La reformulación es el proceso tecnológico que se adopta cuando es necesario cambiar en la formulación farmacéutica, alguno de sus componentes, para así evaluar el efecto del mismo sobre la calidad y estabilidad del nuevo producto obtenido [11]. En este caso en particular, la reformulación consiste en el empleo de otras fuentes de agua (no destilada) de fácil acceso y mayor disponibilidad, que permitan la elaboración en tiempos de contingencia, de un producto farmacéutico de bajo costo, con calidad y estabilidad farmacéutica aceptables según las condiciones del agua tratada empleada, pero que resulte efectiva para el control epidemiológico. Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, el objetivo de la presente investigación es la reformulación de la solución de hipoclorito de sodio al 1 % utilizando como materia prima, agua proveniente de las diferentes fuentes de abasto de Santiago de Cuba y la selección posterior de la mejor formulación, considerando como parámetros claves la calidad y estabilidad farmacéutica, para su producción en tiempos de contingencia.

Materiales y métodos

Características generales de la investigación

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del CPL de Martí y Reloj perteneciente a la empresa OPTIMED, el laboratorio de caracterización físico-química de la Empresa Nacional de Análisis y Servicios Técnicos de Recursos Hidráulicos (ENAST), los laboratorios de Química y Toxicología del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología y el Laboratorio de Ecotoxicología y Servicios Ambientales del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado (CNEA), de la Universidad de Oriente.

La experimentación constó de dos etapas. La primera estuvo relacionada con la evaluación de la calidad del agua utilizada como materia prima, proveniente de las tres principales fuentes de abasto de la provincia Santiago de Cuba: Quintero, San Juan y Parada y de la red hidráulica que llega directamente al CPL (donde se realiza la producción provincial del producto). La segunda consistente en la reformulación y estudio de estabilidad por un período de 30 días de las soluciones de hipoclorito de sodio al 1 % obtenidas.

Se conformaron cuatro grupos de estudio y uno control con agua destilada para cada una de las etapas del trabajo experimental.

El estudio de estabilidad consideró la evaluación de parámetros físico-químicos y microbiológicos, según las normas cubanas [12, 13] e internacionales [14] vigentes para calidad del agua, así como para la calidad y estabilidad de las formulaciones preparadas.

Características del universo y de las muestras

Las muestras de agua fueron obtenidas directamente de las tomas de salida de agua de las potabilizadoras del municipio Santiago de Cuba, en tres momentos diferentes de bombeo. Las colectas se realizaron en recipientes plásticos inocuos, rellenos al máximo del volumen (5 L) y cerrados herméticamente. Los análisis físico-químicos de calidad se realizaron en los laboratorios de la ENAST y del CNEA (respaldado por los certificados de calidad según las normas ISO 9001 y 14001). Los análisis microbiológicos se realizaron en la ENAST.

Las formulaciones de hipoclorito de sodio al 1 % fueron elaboradas y envasadas en frascos ámbar de 120 mL en el CPL y analizadas en el laboratorio de Química y Toxicología del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología.

Determinación de la calidad de la materia prima

Encada una de las muestras experimentales se determinaron las propiedades organolépticas (color y olor) y ocho parámetros físico-químicos de calidad (pH, conductividad eléctrica, salinidad, turbidez, sólidos totales disueltos y dureza total) según las normas cubanas para agua potable y para abasto a la población [12, 13], así como otros parámetros relevantes oxígeno disuelto y clorofila A [14]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La conductividad eléctrica, el pH, la salinidad y los sólidos totales disueltos se determinaron potenciométricamente empleando un medidor multiparamétrico Mettler-Toledo de procedencia española, con resolución de $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$; 0,00 u; 0,01 ppt y $0,1 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. El oxígeno disuelto fue analizado por potenciometría empleando un medidor específico de oxígeno Mettler-Toledo, equipo de procedencia española con resolución de $\pm 1 \%$, mientras que la clorofila A *in vivo* se determinó con un fluorímetro Aquafluor Turner Design, de EUA, con capacidad resolutive de $0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La turbidez se determinó empleando un Turbidímetro HF Scientific- micro 100 (EUA) evitando la presencia de burbujas de aire en la muestra, así como fuentes de

vibración adyacentes. Se empleó para este análisis una disolución control de formacina de 20 NTU.

La dureza total se determinó por volumetría con formación de complejos, empleando solución recién estandarizada de EDTA ($0,1 \text{ mgmL}^{-1}$) ajustando a $\text{pH} = 10$ con buffer amoniacal, en presencia de Negro de Eriocromo T como indicador. La misma se expresa en miligramos de carbonato de calcio por litro. La dureza cálcica se realizó en medio básico (NaOH) empleando calceína como indicador. La dureza magnésica se determinó por diferencia entre la total y la cálcica.

Para la identificación del fitoplancton presente en las aguas fue empleado un Microscopio óptico tipo MOTIC de procedencia alemana y un Microscopio invertido Zeiss. Para la identificación taxonómica se consideraron varias claves dicotómicas.

Para el análisis de la calidad microbiológica se tuvo en cuenta la Norma Cubana 1095:2015 [15]. Se determinaron Coliformes Totales (CT), Coliformes Termotolerantes (CTT) y *Escherichia coli*, a través del método del número más probable en 100 mL (NMP100 mL^{-1}).

Formulación del hipoclorito de sodio. Determinación de su calidad y estabilidad

Para la preparación de la formulación, se añade al volumen determinado de hipoclorito de sodio concentrado un volumen X del excipiente (agua), se agita durante 10 min y se deja la solución en reposo por al menos una hora para luego proceder al envasado. El volumen X a añadir es calculado por la ley fundamental de la volumetría en dependencia de la concentración de la materia prima hipoclorito de sodio concentrado y el volumen que se desea preparar.

Se realizan quince formulaciones de hipoclorito de sodio al 1 %: tres por cada una de las cuatro fuentes de agua tratada y tres por el grupo control con agua destilada.

Para evaluar la calidad de la materia prima (hipoclorito de sodio concentrado) y de las formulaciones realizadas al 1 %, se consideraron los parámetros descritos por la Norma Cubana 385:2015 [16] y la norma española UNE-EN 901, 2007 [17]. Los parámetros analizados fueron: propiedades organolépticas (aspecto, color y olor), así como los parámetros físico-químicos (alcalinidad, cloro activo y pH). Los análisis se realizaron por triplicado.

El cloro activo fue determinado por volumetría redox empleando como agente valorante tiosulfato de sodio y como indicador una disolución de almidón soluble. Los resultados se expresan en porcentaje de cloro activo.

La alcalinidad fue determinada por volumetría ácido-base. Este método se basa en la descomposición del hipoclorito de sodio con peróxido de hidrógeno, la precipitación del carbonato con cloruro de bario y la valoración del hidróxido con ácido sulfúrico, utilizando fenolftaleína como indicador. La alcalinidad se expresa en gramos por litro.

La determinación del pH fue realizada como se explicó anteriormente.

La estabilidad de las quince formulaciones de hipoclorito de sodio al 1 % fue evaluada empleando los parámetros de calidad descritos en el apartado anterior, a los 0, 7, 14, 21 y 30 días.

Técnicas de obtención y procesamiento de la información

Los ensayos físico-químicos se realizaron por triplicado, informando los valores medios y las desviaciones estándar. Se realizó un Análisis de Varianza para la comparación múltiple de las medias entre las muestras. Las diferencias estadísticamente significativas entre ellas fueron calculadas por el método de las mínimas diferencias significativas de Tukey, mientras que el análisis de asociación se realizó considerando las medias de las distancias euclidianas entre grupos. Se calculó la matriz de correlación Pearson entre variables.

En el ensayo de estabilidad, la alteración significativa de forma sostenida o tendencial de cualquiera de las variables monitoreadas en el tiempo, se considera como una alteración de la calidad de la formulación y por ende, de la pérdida de estabilidad de la misma. Se realizó un análisis de regresión lineal simple y múltiple para evaluar la influencia de los diferentes parámetros de calidad del agua en la estabilidad de las formulaciones. Se empleó el paquete estadístico Software Statgraphic Centurion V8.1/2015 para el análisis estadístico de los resultados, informándose en todos los casos la significación estadística para un $P = 0,05$.

Resultados y discusión

Determinación de la calidad de la materia prima

Los resultados de las propiedades organolépticas de la materia prima (agua potable procedente de las fuentes de abasto de la ciudad de Santiago de Cuba) se presentan en la

tabla 1, considerando en todos los casos el promedio de tres muestras, tomadas en horario diferentes.

Como se observa, solamente el agua proveniente de San Juan presenta aspecto transparente, es inodora y presenta similitudes con los parámetros obtenidos para el agua pura/destilada, utilizada como control.

Las muestras del acueducto de Quintero y de las redes hidráulicas donde se encuentra emplazado el CPL presentaron una transparencia aceptable y un ligero olor a cloro, característico del tratamiento con este compuesto en el proceso de potabilización [18]. Por último, el agua proveniente de la presa Parada resultó estar ligeramente coloreada y turbia, con olor característico. De esta fuente de agua, resulta importante aclarar que solo una de las muestras presentó características aceptables para su uso como materia prima, mientras que las otras dos, presentaron mayor turbidez. En la tabla 1, se muestran además los resultados de la calidad microbiológica de las muestras, indicando un comportamiento regular en ellas, a excepción del sistema Parada donde el contenido de coliformes totales fue de 16 NMP, siendo las muestras dos y tres las que más influyen en este resultado. Este parámetro supera el valor máximo establecido por las NC 827:2012 y 1021:2014 invalidando su uso como agua potable.

Realizando un análisis de los resultados se puede explicar de forma complementaria que en el sistema de potabilización Parada, cuando los tanques de tratamiento están recién llenos, la calidad del agua es buena; pero cuando estos comienzan a filtrar el agua que se acumula en la parte inferior de los mismos, el proceso resulta menos eficiente, tal y como se refleja en los resultados obtenidos para las muestras 2 y 3. Ello obliga a hacer un llamado de cambio del tratamiento o del material de filtrado, el cual en la época de colecta estaba “aparentemente” saturado.

El resto de las aguas muestran valores por debajo de la norma, clasificando como aptas para el consumo humano según las normas cubanas vigentes.

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LAS FUENTES AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE SANTIAGO DE CUBA

Muestras	Olor	Color	CT NMP/100m L	CTT NMP/100m L	E. coli NMP/100 mL
Agua Destilada	Inodoro	Transparente, sin partículas visiblemente suspendidas.	-	-	-
Quintero	a cloro (ligero)	Transparente (menos que el agua destilada), pero sin partículas visiblemente suspendidas.	<2,2	<2,2	<2,2
San Juan	Inodoro	Transparente, sin partículas visiblemente suspendidas.	<2,2	<2,2	<2,2
Parada	Característico	Ligeramente verde-parduzca y con una muy ligera turbidez por presencia de partículas disueltas.	16	2,2	2,2
Red hidráulica	a cloro (ligero)	Transparente (menos que el agua destilada), pero sin partículas visiblemente suspendidas.	<2,2	<2,2	<2,2

Legenda: CT: Coliformes Totales, CTT: Coliformes Termotolerantes, E. coli: *Escherichia coli*, NMP: número más probable. Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones.

En la tabla 2 se presenta la variación de los parámetros físico-químicos de las aguas empleadas como materia prima. Las concentraciones de oxígeno disuelto de la distribuidora Quintero y del control agua destilada no presentan diferencias estadísticas, mientras que los valores disminuyen significativamente en las muestras de Parada, la red hidráulica y San Juan. Resulta interesante el hecho de que la muestra de la red hidráulica es diferente a la de Quintero, que es la fuente de suministro que llega donde se emplaza el CPL. Esto podría deberse a que, en el proceso de bombeo, las presiones a las que se ve sometida el líquido hacen que el mismo pierda parte del oxígeno disuelto [19] o a los tiempos de estacionamiento en reservorios secundarios.

**TABLA 2. PARÁMETROS QUÍMICO-FÍSICOS DE CALIDAD
DE LAS FUENTES AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE SANTIAGO DE CUBA**

Muestras	OD (mg/L)	Conductividad a 25 °C (μ S/cm)	pH (u)	Salinidad (ppt)	STD (mg/L)	Clorofila A in vivo (μ g/L)	Turbidez (NTU)	DT (mg/L)
Agua Destilada	4,41 $\pm 0,01^a$	31,73 $\pm 0,82^a$	5,92 $\pm 0,02^a$	0,02 $\pm 0,00^a$	15,89 $\pm 0,41^a$	0,08 $\pm 0,01^a$	0,83 $\pm 0,05^a$	10,00 $\pm 0,00^a$
Quintero	4,39 $\pm 0,01^a$	279,33 $\pm 0,47^b$	7,41 $\pm 0,08^c$	0,13 $\pm 0,00^b$	139,63 $\pm 0,19^b$	3,95 $\pm 0,53^b$	3,03 $\pm 0,05^c$	140,00 $\pm 8,17^b$
San Juan	3,37 $\pm 0,07^d$	716,00 $\pm 2,16^d$	7,20 $\pm 0,01^b$	0,35 $\pm 0,00^d$	357,67 $\pm 0,97^d$	0,44 $\pm 0,16^a$	1,63 $\pm 0,05^b$	260,00 $\pm 8,17^c$
Parada	4,03 $\pm 0,03^b$	697,00 $\pm 2,83^c$	7,61 $\pm 0,00^d$	0,34 $\pm 0,00^c$	348,00 $\pm 1,41^c$	7,71 $\pm 0,42^c$	6,83 $\pm 0,05^c$	343,33 $\pm 4,71^d$
Red hidráulica	3,74 $\pm 0,11^c$	280,67 $\pm 1,25^b$	7,46 $\pm 0,00^c$	0,14 $\pm 0,00^b$	280,67 $\pm 1,21^b$	3,46 $\pm 0,46^b$	3,07 $\pm 0,09^d$	143,33 $\pm 9,43^b$

Leyenda: OD: Oxígeno disuelto, STD: Sólidos totales disueltos, DT: Dureza total.

Supraíndices con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas Test LSD Tukey p-valor=0,05

Al analizar el pH de las muestras (tabla 2) se observa que para el agua destilada se obtienen valores ligeramente ácidos, lo cual es de esperar, ya que en el proceso de destilación se pierden la mayor parte de las sales disueltas, además de que en su exposición al aire esta absorbe dióxido de carbono, para formar ácido carbónico que la acidifica [18]. Del resto de las aguas evaluadas, la de menor pH resulta San Juan, seguida de Quintero, red hidráulica y Parada ($p = 0,05$). Para este parámetro, no existen diferencias significativas entre el agua de Quintero y la red hidráulica. Todos estos valores caen dentro del rango de calidad establecido por las normas cubanas (6,5 - 8,5 u) y los estándares de la Organización Mundial de la Salud [20].

La turbidez es originada por las partículas en suspensión o coloides (arcilla, limo, tierra finamente dividida, entre otras) que reducen la transparencia del agua en mayor o menor grado. La muestra de menor turbidez fue la del control de agua destilada, seguida por San Juan, Quintero, red hidráulica y Parada. Esta variable está muy relacionada con el color y la apariencia de las muestras estudiadas, confirmando la mayor transparencia del agua de San Juan con respecto al resto de las aguas evaluadas. El agua del embalse Parada resultó “no apta” según los límites establecidos por las NC (5 NTU) [12].

Al realizar el análisis de correlación entre variables (r de Pearson) se evidencia que existe un número de parámetros físico-químicos que muestran correlación significativa, la salinidad, la conductividad eléctrica, los sólidos totales disueltos y la dureza total (tabla 3).

TABLA 3. CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE LOS PARES DE VARIABLES DE CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA Y SU SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

	OD	pH	Salinidad	Conductividad	STD	Clorofila A	Turbidez	DT
OD		-0,413 4 (0,489 0)	-0,690 0 (0,197 2)	-0,679 0 (0,207 5)	-0,518 2 (0,371 1)	0,037 5 (0,952 3)	0,017 5 (0,977 7)	-0,537 8 (0,349 8)
pH	-0,413 4 (0,489 0)		0,647 1 (0,237 9)	0,658 8 (0,226 6)	0,645 7 (0,239 2)	0,767 9 (0,129 4)	0,699 1 (0,189 0)	0,758 2 (0,137 4)
Salinidad	-0,690 0 (0,197 2)	0,647 1 (0,237 9)		0,999 6 (0,000 0)	0,964 9 (0,007 9)	0,516 9 (0,372 4)	0,537 5 (0,350 2)	0,962 5 (0,008 7)
Conductividad	-0,679 0 (0,207 5)	0,658 8 (0,226 6)	0,999 6 (0,000 0)		0,964 7 (0,007 9)	0,525 6 (0,363 0)	0,542 5 (0,344 8)	0,964 9 (0,007 9)
STD	-0,518 2 (0,371 1)	0,645 7 (0,239 2)	0,964 9 (0,007 9)	0,964 7 (0,007 9)		0,681 7 (0,204 9)	0,715 4 (0,174 3)	0,987 2 (0,001 7)
Clorofila A	0,037 5 (0,952 3)	0,767 9 (0,129 4)	0,516 9 (0,372 4)	0,525 6 (0,363 0)	0,681 7 (0,204 9)		0,988 6 (0,001 5)	0,729 8 (0,161 6)
Turbidez	0,017 5 (0,977 7)	0,699 1 (0,189 0)	0,537 5 (0,350 2)	0,542 5 (0,344 8)	0,715 4 (0,174 3)	0,988 6 (0,001 5)		0,743 0 (0,150 3)
DT	-0,537 8 (0,349 8)	0,758 2 (0,137 4)	0,962 5 (0,008 7)	0,964 9 (0,007 9)	0,987 2 (0,001 7)	0,729 8 (0,161 6)	0,743 0 (0,150 3)	

Leyenda: en números y arriba la correlación de Pearson, entre paréntesis y debajo el p-valor. En negritas correlaciones significativas.

En la tabla 2 se puede observar que los parámetros salinidad, conductividad eléctrica y sólidos totales disueltos, muestran un comportamiento que sigue el orden de Agua destilada < Quintero = red hidráulica < Parada < San Juan. A mayores concentraciones de estos parámetros, disminuye la calidad del agua. Esta relación resulta interesante, pues ubica al agua procedente de San Juan como la de peor calidad, sin embargo, es una de las más apreciadas por la población debido a sus características organolépticas. De hecho, la conductividad eléctrica es uno de los parámetros de más relevancia cuando de pureza de agua se trata. Los sólidos totales disueltos se correlacionan con valores elevados (> 0,96) con la salinidad/conductividad, lo que puede traducirse en que estos sólidos en suspensión son predominantemente sustancias de naturaleza inorgánica.

Al analizar la dureza total, se observa que el agua proveniente de Parada, es la que presenta las mayores concentraciones. En todos los casos las muestras cumplen con lo establecido en las NC de abasto y de agua potable (400 mgL⁻¹). Si se comparan los valores obtenidos con los criterios propuestos por Rodríguez [21], se puede afirmar que las aguas provenientes de Quintero se clasifican como aguas duras y las provenientes de San Juan y Parada como muy duras. Hay que señalar que algunos autores plantean que esta característica no es determinante en la calidad de las formulaciones de hipoclorito [5, 10].

La dureza del agua refleja la naturaleza en la formación geológica con la cual ha estado en contacto y es el resultado de la sumatoria de la concentración de iones calcio y

magnesio, los cuales tributan de manera positiva a la conductividad eléctrica, reflejándose en su elevada correlación (0,965). No obstante, es conocido que los iones de las sales de los metales alcalino-térreos son menos conductores que las sales de los metales alcalinos y ello hace pensar que la mayor conductividad y salinidad de las aguas de San Juan están relacionadas con la presencia de iones de sodio y potasio, mientras que la de Parada por la presencia de sales de calcio y magnesio.

La concentración de clorofila A en las aguas es un parámetro importante por su incidencia en las características organolépticas de la misma, ya que está relacionada directamente con el número de microorganismos fotosintetizadores presentes. Los valores de esta variable se comportan Agua Destilada=San Juan<red hidráulica=Quintero<Parada. Se hace evidente que las menores concentraciones se presentan en San Juan, lo que resulta coherente con las características del agua según otros parámetros determinados. El origen del agua de San Juan es de una cuenca subterránea en la cual las aguas son oligotróficas, lo que se corresponde con los valores de oxígeno disuelto y las características organolépticas.

Destacan los altos valores de clorofila A en Parada, coincidente con un brote de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*, especie severamente dañina, por estar asociada a la producción de cilindrospremopsina [22]. En las aguas de Quintero y la red de agua hay especies fitoplanctónicas sin llegar a detectarse condiciones de brote, pero si la presencia de algunas especies potencialmente tóxicas. Esta situación no afecta a la muestra de San Juan, en la que los valores son mínimos y entran en el rango de aguas oligotróficas considerando los valores de clorofila, como se explicó anteriormente.

Para determinar cuáles fuentes de agua presentan un comportamiento más cercano al agua destilada, se realizó un análisis de asociación considerando las medias de las distancias euclidianas entre grupos (figura 1). Como se muestra en el dendograma, las aguas con comportamiento más cercano al agua destilada son las de Quintero y red hidráulica con un comportamiento similar entre las dos últimas. En un tercer grupo aparece el agua proveniente de San Juan; para ubicar en la zona más alejada la proveniente de Parada, la cual como se ha evidenciado en este estudio, no clasifica como potable.

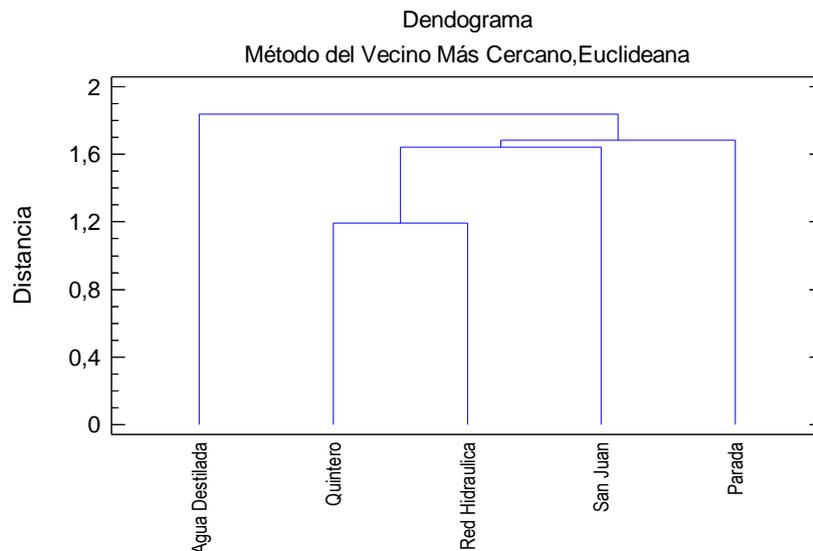


Fig. 1. Dendograma construido teniendo en cuenta el comportamiento de las propiedades organolépticas, características físico-químicas y microbiológicas de las fuentes de agua potable de Santiago de Cuba

Estabilidad de las formulaciones de hipoclorito de sodio al 1 %

Independientemente de las diferencias entre las aguas distribuidas por los circuitos de la ciudad de Santiago de Cuba y atendiendo a que la formulación de hipoclorito de sodio se utiliza precisamente para garantizar la desinfección de las aguas; se decide considerar para el estudio de la formulación todas las fuentes de agua, incluyendo la de Parada. Los valores de los parámetros de la calidad de las formulaciones realizadas según la NC 385:2015 [16]; así como su estabilidad en el período de 30 días, se muestran en la tabla 4.

TABLA 4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LAS FORMULACIONES DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 1 %. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Muestras	Determinaciones	Días				
		t=0	t=7	t=14	t=21	t=30
Agua Destilada	Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	Color	Ligeramente amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo
	Olor	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro
	Cloro activo (%)	0,99 ±0,05 ^{a,I}	0,98 ±0,03 ^I	0,98 ±0,03 ^I	1,01 ±0,05 ^I	0,98 ±0,03 ^I
	Alcalinidad (gL ⁻¹)	1,06	1,10	1,10	1,06	1,06
	pH	11,80 ±0,03 ^{a,I}	11,79 ±0,01 ^I	11,81 ±0,03 ^{I,II}	11,88 ±0,07 ^{I,II}	11,90 ±0,05 ^{II}
Quintero	Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	Color	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo
	Olor	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro
	Cloro activo	0,90 ±0,03 ^{a,b,I}	0,88 ±0,03 ^I	0,88 ±0,03 ^I	0,86 ±0,06 ^I	0,88 ±0,07 ^I
	Alcalinidad (gL ⁻¹)	1,02	1,10	1,06	1,06	1,06
	pH	11,69 ±0,01 ^{b,I}	11,67 ±0,02 ^I	11,66 ±0,01 ^I	11,80 ±0,03 ^{II}	11,87 ±0,05 ^{III}
San Juan	Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	Color	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo
	Olor	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro
	Cloro activo	0,87 ±0,02 ^{b,I}	0,86 ±0,03 ^I	0,84 ±0,02 ^I	0,84 ±0,03 ^I	0,84 ±0,02 ^I
	Alcalinidad (gL ⁻¹)	1,06	1,06	1,06	1,10	1,15
	pH	11,18 ±0,05 ^{d,II}	11,31 ±0,04 ^{II}	11,28 ±0,01 ^{II}	11,61 ±0,03 ^{III}	11,86 ±0,00 ^{IV}
Parada	Aspecto	Turbio con sedimento	Turbio con sedimento	Turbio con sedimento	Turbio con sedimento	Turbio con sedimento
	Color	No característico, marrón	No característico, marrón	No característico, marrón	No característico, marrón	No característico, marrón
	Olor	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro
	Cloro activo	0,86 ±0,06 ^{b,I}	0,87 ±0,02 ^I	0,86 ±0,06 ^I	0,83 ±0,03 ^I	0,81 ±0,03 ^I
	Alcalinidad (gL ⁻¹)	1,06	1,06	1,06	0,95	1,10
	pH	11,38 ±0,03 ^{c,II}	11,30 ±0,00 ^I	11,45 ±0,02 ^{III}	11,71 ±0,03 ^{IV}	11,87 ±0,05 ^V
Red Hidráulica	Aspecto	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
	Color	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente amarillo	Ligeramente Amarillo	Ligeramente Amarillo
	Olor	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro	Característico a cloro
	Cloro activo	0,90 ±0,06 ^{a,b,I}	0,87 ±0,02 ^I	0,87 ±0,02 ^I	0,86 ±0,06 ^I	0,87 ±0,02 ^I
	Alcalinidad (gL ⁻¹)	1,10	1,10	1,06	1,06	1,06
	pH	11,68 ±0,02 ^{b,I}	11,69 ±0,02 ^I	11,66 ±0,01 ^I	11,82 ±0,05 ^{II}	11,86 ±0,01 ^{II}

Legenda: supraíndices con letras diferentes implican diferencias estadísticamente significativas entre las columnas o fuentes de agua. Números romanos diferentes implican diferencias estadísticamente significativas dentro las filas o días. Test LSD Tukey p-valor = 0,05

Como se observa, las características organolépticas de cuatro de las cinco formulaciones son iguales. Solamente la formulación elaborada con agua de la fuente Parada resulta incompatible con el principio activo, generando un líquido turbio y de color diferente a las restantes y con sedimentos en el frasco contenedor. Ello implica que la formulación obtenida por esta vía carece de calidad farmacéutica y evidencia que, aunque la formulación tiene la finalidad de actuar como desinfectante del agua a beber por la población, el agua que se debe utilizar para la preparación de la misma debe cumplir, de todas formas, con los mínimos requisitos de calidad. Por otra parte, cabe señalar que la presencia de materia orgánica interfiere en la efectividad de la solución [10].

El análisis de las correlaciones de Pearson muestran que existe una fuerte relación inversa entre la salinidad (-0,955) y la conductividad del agua (-0,958) con la alcalinidad de la formulación. Los parámetros de calidad de agua, sólidos totales disueltos y dureza total también tienen correlaciones superiores a 0,83 pero sin significación estadística. Considerando que el grado de alcalinidad de la solución de hipoclorito es vital para la estabilidad del producto farmacéutico, se infiere que mientras mayor conductividad/salinidad presente el agua con que se prepara la formulación, menor valor de alcalinidad tendrá y con ello, se introduce un factor de riesgo que podría atentar contra la estabilidad en el tiempo de la formulación [23].

La concentración de cloro activo es el parámetro de mayor importancia para evaluar la calidad de las formulaciones, ya que de ella dependerá la acción de la misma. Para la formulación elaborada con agua destilada el cloro activo es 1 %, concentración teórica que debe tener; sin embargo, en el resto de las formulaciones las concentraciones son inferiores. De manera general, se puede plantear que entre las muestras procedentes de Quintero, red hidráulica, Parada y San Juan no presentan diferencias significativas entre ellas; aunque vale señalar que entre las dos últimas y el control si existen diferencias significativas como se observa en la tabla 4. El análisis de las correlaciones de Pearson (tabla 3) muestra que el cloro activo en las formulaciones se correlaciona con el pH (-0,904), la salinidad (-0,878), la conductividad (-0,886) y la dureza total (-0,887) de las aguas empleadas en su formulación, siendo estos los factores del agua destilada que mayor influencia tendrán en la concentración de cloro final a la hora de realizar las formulaciones, lo que refuta algunas referencias divulgativas de la red de redes sobre la no influencia de la dureza en la calidad de la solución [5, 10].

Estos valores diferentes del valor teórico a obtener (1 %) permiten inferir que parte del hipoclorito de sodio concentrado (materia prima) añadido es “neutralizado o consumido” rápidamente por aquellas sales minerales que se encuentran en el agua y que son responsables de la dureza, conductividad, salinidad y pH de la misma, por lo que para poder obtener una formulación con valores cercanos a la unidad deberá de establecerse un patrón de corrección el cual podría ser calculado si se lograra establecer una relación matemática que describa la reacción de “neutralización” del cloro activo.

Con estos fines, se realizaron modelos de regresión lineal múltiples, encontrándose una ecuación matemática de elevada significación estadística (p -valor = 0,002 4) y que logra describir prácticamente el 100 % ($R^2 = 99,76$ %) del fenómeno de “neutralización” del hipoclorito de sodio concentrado por las sales que componen al agua no destilada y que considera las variables conductividad y pH del agua.

El empleo de ecuaciones matemáticas para la predicción de parámetros de calidad ha sido frecuentemente empleado en diversos contextos [24, 25]. Dicha función matemática se presenta en la ecuación 1.

$$\text{Cloro Activo} = 1,252\ 02 - 0,000\ 088 \times \text{Conductividad} - 0,043\ 939\ 8 \times \text{pH} \quad (1)$$

$$F\text{-valor} = 419,68 \quad P\text{-valor} = 0,002\ 4$$

Considerando las significaciones estadísticas de cada uno de los elementos de la función, la elevada capacidad de la misma para describir el fenómeno en estudio y el hecho de que el valor teórico en cada una de las formulaciones a preparar (independientemente de la naturaleza del agua) es siempre el 1 %; es posible obtener una función de corrección de la concentración a preparar para lograr una concentración aproximada al valor teórico, que es lo establecido para la formulación deseada. Este factor de corrección viene descrito por la ecuación 2.

$$\text{Concentración a preparar} = 1 + 0,000\ 088 \times \text{Conductividad} + 0,043\ 939\ 8 \times \text{pH} \quad (2)$$

donde: 1 es el valor teórico deseado

De lo que se infiere que son la Conductividad y el pH los parámetros que definen la formulación.

La nueva concentración calculada será la que debe ser empleada en la ecuación fundamental de la volumetría en lugar del valor teórico de 1 %. Adicionalmente y considerando que cuando se formule bajo estas condiciones de agua “no destilada” habrá implícita una reacción química y consumo de cloro activo, se sugiere que el

período de reposo de la formulación sea incrementado (1 h es lo establecido en la NC) según la naturaleza del agua. Transcurrido ese tiempo para la estabilización de la formulación, se deberá filtrar, para poder así descartar la formación de turbulencia y/o sedimentos que indiquen desestabilización farmacéutica de la formulación.

Relativo a la estabilidad de la formulación (tabla 4), las características organolépticas permanecen estables aun cuando, como se declaró anteriormente, el agua de Parada resulta no apta para la formulación por su carga contaminante orgánica y las limitaciones que presenta el producto final respecto a su calidad farmacéutica.

Si se fueran a establecer parámetros de exclusión para estas reformulaciones a partir del agua (no destilada), habría que considerar parámetros como la turbidez, los valores de clorofila A y el pH. Al realizar un análisis del pH en las muestras de agua, definitivamente las provenientes de Parada no resultan elegibles para realizar una formulación de hipoclorito. Lo que se refleja en las mediciones de este parámetro en la formulación. Algo similar ocurre con los valores de pH de la formulación proveniente de los pozos de San Juan. Por su parte, la formulación con agua destilada pierde su estabilidad (según este parámetro) a partir del día 21, mientras que las de Quintero y red hidráulica lo hacen a partir del día 15. Resulta claro entonces que el parámetro de mayor importancia para evaluar el producto final es la concentración del principio activo que en este caso se evalúa como cloro activo. De la inspección de la tabla 4 se deduce que para ninguna de las muestras se presentan cambios estadísticamente significativos. En la figura 2, se muestra el comportamiento de la estabilidad.

En el caso de la formulación realizada con el agua de Parada la tendencia es a disminuir progresivamente en el tiempo, denotando la pérdida del principio activo y por ende, de la calidad farmacéutica. Comportamiento contrario al que ocurre para la formulación realizada a partir del agua destilada, de Quintero y de la red hidráulica, donde los valores oscilan sin definir una tendencia, confirmando la aplicabilidad de las mismas para reformular el hipoclorito de sodio al 1 %.

La formulación realizada con el agua proveniente de San Juan decrece en sus valores hasta estabilizarse al día 14 en un 0,84 %, sugiriendo que la neutralización del cloro activo por parte de las sales que componen esta fuente de agua ocurre bajo una cinética de reacción lenta. Este hecho de cierta forma invalida su uso para preparar formulaciones de hipoclorito de sodio, pues es reconocida la corta durabilidad de la formulación (máxima de 30 días) en condiciones ideales: agua destilada,

almacenamiento en frascos ámbar, bien llenos y con retapa. Aunque no se especifica en la Norma, el hipoclorito de sodio también se muestra inestable a temperaturas sobre los 35 °C, otro aspecto que puede impactar en la vida media de esta formulación farmacéutica [26].

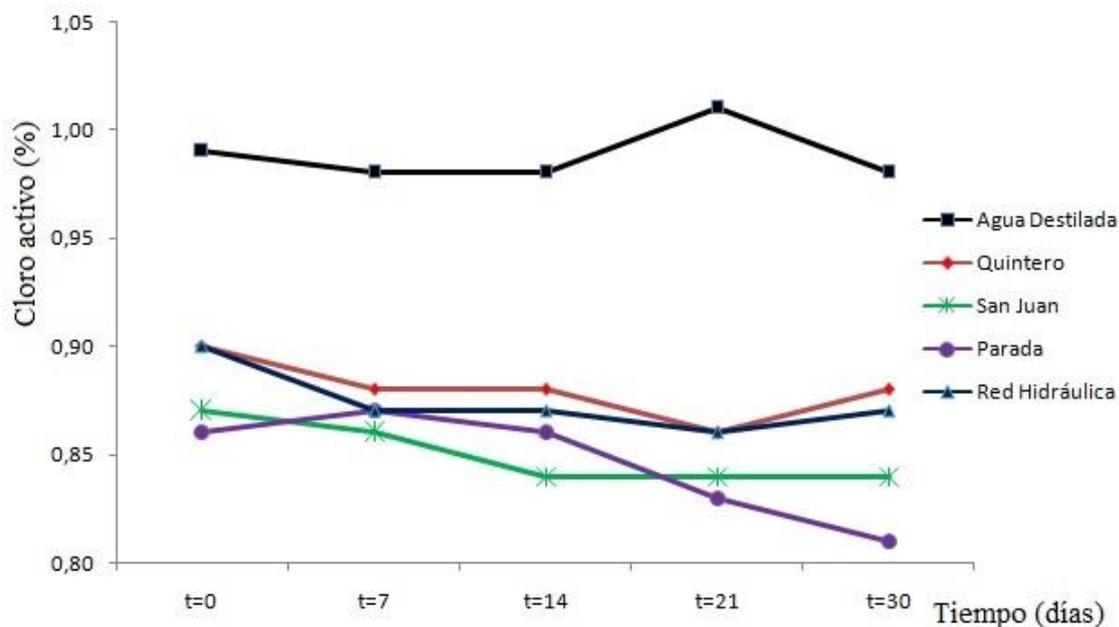


Fig. 2. Comportamiento de la estabilidad de las formulaciones de hipoclorito de sodio
Los experimentos realizados conducen a formular criterios de selección
para la reformulación propuesta

Conclusiones

Las evidencias experimentales demuestran las diferencias en los parámetros de calidad de las aguas potables que se distribuyen en la ciudad de Santiago de Cuba, encontrándose que la procedente de la potabilizadora de Quintero es aquella que más se acerca a las características del agua destilada, convirtiéndola en una fuente alternativa para la preparación del hipoclorito de sodio al 1 % en tiempos de contingencia. Se demuestra además que la distribución de la misma a través de las redes hidráulicas hasta el CPL de Martí y Reloj no altera su calidad y con ello su capacidad de ser empleada en la preparación de dichas formulaciones. Se sugiere un factor matemático de corrección y modificaciones en el protocolo de formulación del hipoclorito de sodio con vistas a lograr una formulación con calidad farmacéutica y estabilidad aceptable, así como considerar los criterios de selección evaluados para el desarrollo de reformulaciones con aguas no destiladas.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a los directivos de las instituciones involucradas: OPTIMED, ENAST, Universidad de Oriente y CNEA, así como al proyecto VLIR-IUC UOs entre el consejo de Universidades flamengas y la Universidad de Oriente.

Referencias bibliográficas

1. COLECTIVO DE AUTORES. *Preparación para la defensa. Organización, higiene y epidemiología, y protección contra las armas en situación de contingencia. Tomo I*. La Habana: Editorial ECIMED, 2001. ISBN: 959-7132-60-5
2. GÓMEZ LUNA, L. M.; ÁLAMO, B.; RODRÍGUEZ TITO, J. C. “Riesgo de contaminación con cianobacterias en tres embalses de agua de Santiago de Cuba”. *Medisan*. 2010, **14** (2), 37-48. ISSN 1029-3019
3. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Anuario Estadístico de Salud 2012. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. 2013. ISSN: 1561-4425
4. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. Anuario Estadístico de Salud 2016. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. 2017. ISSN: 1561-44334.
5. OXYCHEM SODIUM HYPOCHLORITE HANDBOOK. Occidental Chemical Corporation, Dallas, TX. USA, 2000: 3-4
6. RODRÍGUEZ TITO, J. C.; PÉREZ SILVA, R. M.; GÓMEZ LUNA, L. M.; ÁLVAREZ HUBERT, I. “Evaluación química analítica y microbiológica de los embalses Chalons y Parada de Santiago de Cuba”. *Revista Cubana de Química*. 2017, **29** (3), 418-435. e-ISSN: 2224-5421
7. MOHSIN, M.; SAFDAR, S.; ASGHAR, F.; JAMAL, F. “Assessment of Drinking Water Quality and its Impact on Residents Health in Bahawalpur City”. *International Journal of Humanities and Social Science*. 2013, **3** (15), 114-128. ISSN: 2221-0989.
8. WHO/UNICEF. Core questions on drinking-water, sanitation and hygiene for household surveys. Geneva, 2006.

9. FERRARI, P. H.; CAI, S.; BOMBANA A. C. “Effects of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections”. *International Endodontic Journal*. 2005, **38**, 372-380. ISSN: 0143-2885
10. SODIUM HYPOCHLORITE MANUAL. Olin Chlor Alkali Products. Olin Corporation. Cleveland, TN. USA, 2016: 38-40.
11. GARIMA, V.; MISHRA, M. K. Pharmaceutical Preformulation Studies in Formulation and Development of New Dosage Form: A Review. *International Journal of Pharma Research & Review*. 2016, **5** (10), 12-20. ISSN: 2278-6074.
12. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN. NC/CTN 3 DE GESTIÓN AMBIENTAL. Agua potable. Requisitos sanitarios, NC 827:2012. 2^{da} Edición. La Habana, Cuba, 2012.
13. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN. NC/CTN 3 DE GESTIÓN AMBIENTAL. *Fuentes de abastecimiento de agua*, NC 1021: La Habana, Cuba, 2014.
14. HEALTH CANADA *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document—Chlorine*. Ottawa, Ontario. Canadá, 2009. ISBN: 978-1-100-13416-1
15. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Microbiología del agua. Detección y enumeración de coliformes. Técnica del número más probable. (NMP), NC 1095:2015. La Habana, Cuba, 2015.
16. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Productos químicos para uso industrial. Hipoclorito de sodio. Requisitos y métodos de ensayos. NC 385:2015. La Habana, Cuba, 2015.
17. NORMA ESPAÑOLA. Productos químicos utilizados en el tratamiento del agua destinada al consumo humano. Hipoclorito de sodio. UNE-EN 901. 2007
18. TAMBEKAR, P.; MOREY, P.; BATRA, R.J.; WEGINWAR, R. G. “Quality assessment of drinking water: A case study of Chandrapur District (M.S.)”. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2012, **4** (5), 2564-2570. ISSN: 0975-7384
19. BOUGEARD, C. M.; GOSLAN, E. H.; JEFFERSON, B.; PARSON. “Comparison of the disinfection by-product formation potential of treated waters

- exposed to chlorine and monochloramine”. *Water Research*. 2010, **44** (3), 729-740. ISSN: 0043-1354
20. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Guías para la calidad del agua potable. Volumen 1: Recomendaciones*. 3^{ra} Edición. Génova, Suiza, 2006. ISBN 92-4-154696-4
21. RODRÍGUEZ, J. “Parámetros fisicoquímicos de dureza total en calcio y magnesio, pH, conductividad y temperatura del agua potable analizados en conjunto con las Asociaciones Administradoras del Acueducto, (ASADAS), de cada distrito de Grecia, cantón de Alajuela, noviembre del 2008”. *Revista Pensamiento Actual*. 2009, **9** (12-13), 125 - 134. ISSN 1409-0112
22. ANTUNES, J. T.; LEÃO, P. N.; VASCONCELOS, V. M. “Cylindrospermopsis raciborskii: review of the distribution, phylogeography, and ecophysiology of a global invasive species”. *Frontiers in Microbiology*. 2015, **6**, 473. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00473. Electronic ISSN: 1664-302X
23. REGULATION EUROPEAN UNION: 528/2012. Making available on the market and use of biocidal products. Active chlorine released from sodium hypochlorite. Assessment Report, 2017
24. CHOWDHURY, S.; CHAMPAGNE, P.; MCLELLAN, P. J. “Models for predicting disinfection byproduct (DBP) formation in drinking waters: a chronological review”. *Science of the Total Environment*. 2009, **407** (14), 4189-206. ISSN: 0048-9697
25. NICOLETTI, M. A.; SIQUEIRA, E. L.; BOMBANA, A.C.; OLIVEIRA, G. G. “Shelf-Life of a 2,5 % Sodium Hypochlorite Solution as Determined by Arrhenius Equation”. *Brazilian Dentology Journal*. 2009, **20** (1), 27-31. ISSN 0103-6440
26. FRAIS, S.; NG, Y. L.; GULABIVALA, K. “Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite”. *International Endodontic Journal*. 2001, **34**, 206–215. ISSN: 1365-2591