



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Con fundamento en el numeral 6.3.3.1 de la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-2020, se publica el presente proyecto a efecto de que los interesados, a partir del 1º de mayo hasta el 30 de junio de 2026, lo analicen, evalúen y envíen sus observaciones o comentarios en idioma español y con el sustento técnico suficiente ante la CPFEUM, sita en Río Rhin número 57, colonia Cuauhtémoc, código postal 06500, Ciudad de México, o al correo electrónico: consultas@farmacopea.org.mx.

DATOS DEL PROMOVENTE

Nombre: _____
Institución o empresa: _____
Teléfono: _____

Cargo: _____
Dirección: _____
Correo electrónico: _____

MONOGRAFÍA NUEVA

Dice	Debe decir	Justificación*
MPB 0270. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA		
Electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)- Geles de porcentaje uniforme		
Introducción		
Alcance		
La electroforesis en gel de poliacrilamida es utilizada para la caracterización cualitativa de proteínas en preparaciones biológicas, para controles de pureza y para determinaciones cuantitativas.		
Propósito		
La electroforesis analítica en gel es un método apropiado con el que se identifica y evalúa la homogeneidad de las proteínas en las preparaciones farmacéuticas. El método se utiliza de manera rutinaria para la estimación de la masa molecular y la determinación de composición de subunidades de proteínas purificadas. Existen disponibles comercialmente geles y reactivos listos		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>para usarse, además de lo que se describe en este capítulo, que pueden ser utilizados siempre y cuando ofrezcan resultados equivalentes y cumplan con los requisitos de validez que se citan en <i>Validación de la Prueba</i>.</p>		
<p>Características de los geles de poliacrilamida</p>		
<p>Las propiedades de separación de los geles de poliacrilamida se establecen mediante la red tridimensional de fibras y poros que se forman cuando la bisacrilamida bifuncional se entrecruza en forma adyacente a las cadenas de poliacrilamida. La polimerización por lo regular se cataliza con un sistema generador de radicales-libres compuesto de persulfato de amonio y <i>N,N,N',N'</i>-tetrametiletilendiamina (TEMED).</p>		
<p>A medida que aumenta la concentración de acrilamida de un gel, disminuye el tamaño efectivo de sus poros. El tamaño efectivo del poro de un gel se define operacionalmente por sus propiedades de separación, es decir, por la resistencia que imparte a la migración de macromoléculas. Existen límites con respecto a las concentraciones de acrilamida que se pueden usar. En concentraciones altas de acrilamida, los geles se rompen con mucha más facilidad y son difíciles de manipular. A medida que disminuye el tamaño del poro de un gel, disminuye la velocidad de migración de una proteína a través del gel. Al ajustar el tamaño de poro, mediante la modificación de la concentración de acrilamida, se puede optimizar la resolución del método para un</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>producto proteico dado. Por lo tanto, un gel se caracteriza físicamente por su composición de acrilamida y bisacrilamida.</p>		
<p>Además de la composición del gel, el estado de la proteína es un factor importante de la movilidad electroforética. En el caso de las proteínas, la movilidad electroforética depende del valor pK de los grupos cargados y del tamaño de la molécula. Está influenciada por el tipo, la concentración y el pH de la solución amortiguadora; por la temperatura y la intensidad del campo; y por la naturaleza del material de soporte.</p>		
<p>Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida</p>		
<p>El método citado a manera de ejemplo se limita al análisis de polipéptidos monoméricos con un intervalo de masa de 14000 a –100000Da. Es posible ampliar este intervalo de masa mediante diversas técnicas (por ejemplo, sistemas de geles de gradiente o de soluciones amortiguadoras particulares). Por ejemplo, los geles de tricina–dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés) emplean tricina en lugar de glicina (en el método descrito en este capítulo) como el ion final en la solución amortiguadora de corrida para electroforesis, pueden separar proteínas muy pequeñas y péptidos por debajo de 10000–15000 Da.</p>		
<p>La electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida usando glicina SDS (SDS-PAGE) es el modo más común de electroforesis para evaluar</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>la calidad farmacéutica de productos proteicos y es el objeto de estudio del método de ejemplo. Típicamente, la electroforesis analítica de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida bajo condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales y que minimizan la aglomeración de estas subunidades. El detergente SDS fuertemente aniónico se usa más comúnmente en combinación con calor para disociar las proteínas antes de que se coloquen en el gel. Los polipéptidos desnaturalizados se unen al SDS, adquieren carga negativa y exhiben una relación carga-masa estable, sin importar el tipo de proteína.</p>		
<p>Como la cantidad de SDS unido casi siempre es proporcional a la masa molecular del polipéptido y es independiente de su secuencia, los complejos SDS-polipéptido migran a través de los geles de poliacrilamida cuyas moviidades dependen del tamaño del polipéptido.</p>		
<p>Las moviidades electroforéticas de todos los complejos de detergente-polipéptido resultantes adoptan la misma relación funcional con sus masas moleculares. Los complejos SDS migran de modo previsible hacia el ánodo, observándose que los complejos de baja masa molecular migran más rápido que los complejos más grandes. La masa molecular de una proteína se puede estimar por su movilidad relativa en SDS-PAGE calibrada y la intensidad de una banda única con respecto a otras bandas no deseadas en un gel de este tipo puede ser una medición de la pureza.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Sin embargo, las modificaciones de la cadena polipeptídica, tales como la N-glicosilación o la O-glicosilación, pueden cambiar la masa molecular aparente de una proteína, debido a que el SDS no se une a un grupo glicosídico de la misma manera que a un polipéptido; por lo tanto, no se mantiene una relación entre masa y carga uniforme.		
Dependiendo del grado de glicosilación y de otras modificaciones postraduccionales, la masa molecular aparente de proteínas puede no reflejar con exactitud la masa de la cadena polipeptídica.		
Condiciones Reductoras		
Las subunidades de polipéptidos y la estructura tridimensional por lo general se mantienen en las proteínas mediante uniones disulfuro. Uno de los objetivos del análisis SDS-PAGE en condiciones reductoras es romper esta estructura por reducción de las uniones disulfuro. La desnaturalización y disociación completa de proteínas por tratamiento con 2-mercaptoetanol (2-ME) o ditioneitról (DTT) despliega el esqueleto polipeptídico, formándose luego un complejo con SDS. Con estas condiciones, la masa molecular de las subunidades de polipéptidos puede ser calculada de manera razonable por regresión lineal (o, de manera más cercana mediante regresión no lineal) en presencia de estándares adecuados de masa molecular.		
Condiciones No Reductoras		
Para algunos análisis, no es conveniente la disociación completa de la proteína en subunidades peptídicas. En ausencia de		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>tratamiento con agentes reductores tales como 2-ME o DTT, los enlaces disulfuro covalentes permanecen intactos, preservando la forma oligomérica de la proteína. Los complejos de SDS–proteína oligomérica migran más lentamente que sus subunidades SDS–polipéptido. Además, las proteínas no reducidas no se pueden saturar por completo con SDS y, por lo tanto, no pueden unirse al detergente en una relación de masa constante. Asimismo, las uniones disulfuro dentro de la cadena limitan la forma molecular generalmente de una manera que reduce el radio hidrodinámico (o radio de Stokes de la molécula (Rs)), reduciendo así la masa molecular aparente, M. Esto hace que las determinaciones de masa molecular de estas moléculas mediante SDS-PAGE sean menos sencillas que los análisis de polipéptidos completamente desnaturalizados, porque es necesario que las proteínas estándar y las proteínas desconocidas estén presentes en configuraciones similares para que las comparaciones sean válidas.</p>		
<p>Características de una electroforesis en gel con sistema amortiguador discontinuo</p>		
<p>El método electroforético más popular para la caracterización de mezclas complejas de proteínas usa un sistema amortiguador de pH discontinuo que incluye dos geles contiguos pero diferenciados: un gel de resolución o separador (inferior) y un gel concentrador (superior). Los dos geles están conformados con diferentes porosidades, pH y fuerzas iónicas. Además, se</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>usan distintos iones móviles en el gel y en los amortiguadores de pH de los electrodos. La discontinuidad del amortiguador actúa para concentrar muestras de gran volumen en el gel concentrador, mejorando así la resolución. Cuando se aplica electricidad, se produce una caída de voltaje a través de la solución de muestra que conduce a las proteínas hacia el gel concentrador. Los iones de glicinato del amortiguador de pH de los electrodos siguen a las proteínas hacia el gel concentrador. Se forma rápidamente un frente móvil con los iones de cloruro de alta movilidad adelante y los iones relativamente lentos de glicinato atrás. Se forma un gradiente de alto voltaje localizado entre los frentes de iones delanteros y traseros, haciendo que los complejos SDS–proteína se acumulen en una zona delgada (concentrado) y migren entre las fases de cloruro y glicinato. Dentro de un amplio límite, sin importar la altura de la muestra aplicada, todos los complejos SDS–proteína se condensan en una región muy estrecha e ingresan al gel separador como una zona delgada, bien definida, de alta densidad proteica. El gel concentrador, de grandes poros, no retrasa la migración de la mayoría de las proteínas y sirve principalmente como un medio anti convectivo. En la interfase de los geles concentrador y separador, las proteínas experimentan un marcado incremento en el retardo debido al tamaño restrictivo del poro del gel separador y a la discontinuidad de la solución amortiguadora, lo cual también contribuye al</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>enfoque de las proteínas. Una vez en el gel separador, las proteínas continúan siendo ralentizadas por la separación de la matriz. Los iones de glicinato sobrepasan a las proteínas, que se mueven entonces en un espacio de pH uniforme formado por tris(hidroximetil) aminometano (Tris) y glicina. El tamizado o separación molecular hace que los complejos SDS-polipéptido se separen según sus masas moleculares.</p>		
<p>Preparación de geles verticales de SDS-poliacrilamida con sistema amortiguador discontinuo</p>		
<p>Esta sección describe la preparación de geles usando instrumentación particular. Esto no se aplica a los geles preformados. En el caso de los geles preformados u otros equipos disponibles comercialmente, se deben seguir las instrucciones del fabricante.</p>		
<p>Se recomienda el uso de reactivos comerciales que se hayan purificado en solución. Cuando este no sea el caso, y cuando la pureza de los reactivos no sea suficiente, se aplica un pretratamiento. Por ejemplo, cualquier solución suficientemente impura que requiera filtración, debería también desionizarse con una resina de lecho mixto (intercambio aniónico-catiónico) para eliminar el ácido acrílico y otros productos de degradación. Cuando se almacenan de acuerdo con las recomendaciones, las soluciones de acrilamida /bisacrilamida y persulfato sólido se mantienen estables durante periodos prolongados.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Ensamble del Casete para formación del Gel</p>		
<p>Considerar las necesidades particulares en la selección del método de electroforesis apropiado, la selección de la instrumentación dependerá del volumen y número de muestras, la solución deseada y el rendimiento.</p>		
<p>A continuación, se describe un caso, que podrá variar dependiendo del proveedor.</p>		
<p>Limpia las dos placas de vidrio (con un tamaño de, p. ej., 10 cm × 8 cm), el peine de politetrafluoroetileno, los dos espaciadores y el soporte de caucho de silicona (p. ej., 0,6 mm de diámetro × 35 cm largo) con detergente suave; enjuagar minuciosamente con agua, seguida de alcohol deshidratado y dejar que las placas se sequen a temperatura ambiente. Lubricar los espaciadores y el soporte con grasa no siliconada. Colocar los espaciadores a lo largo de los dos lados cortos de la placa de vidrio, a 2 mm de los bordes y a 2 mm del lado largo correspondiente a la parte inferior del gel. Comenzar a colocar el soporte sobre la placa de vidrio, utilizando un espaciador como guía. Cuidadosamente doblar el soporte de caucho por debajo del espaciador y seguir el lado largo de la placa de vidrio. Mientras se sostiene el soporte con un dedo por el lado largo, doblar nuevamente y colocarlo sobre el segundo lado corto de la placa de vidrio, usando el espaciador como guía. Colocar la segunda placa de vidrio perfectamente alineada y mantener unido el molde haciendo presión con la mano.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Colocar dos pinzas en cada uno de los dos lados cortos del molde. Colocar cuidadosamente cuatro pinzas sobre el lado largo del molde para el gel, formando así su parte inferior. Verificar que el soporte corra a lo largo del borde de las placas de vidrio y que no se haya salido al momento de colocar las pinzas. El molde del gel está ahora listo para el vertido del gel.		
Soluciones de partida para preparación del gel		
Solución de acrilamida–bisacrilamida al 30% (29:1)¹		
Preparar una solución que contenga 290 g de acrilamida y 10 g de metilen-bisacrilamida por litro de agua. Filtrar. Almacenar a 4°C en oscuridad.		
Solución amortiguadora 1,5 M (pH 8.8)²		
Disolver 90,8 g de Tris en 400 mL de agua. Ajustar el pH a 8,8 con ácido clorhídrico y diluir hasta 500.0 mL con agua destilada.		
Solución de SDS al 10% (dodecil sulfato)³		
Preparar una solución de 100 g de SDS de grado electroforético en 1.0 litro de agua destilada.		
Solución de APS (persulfato de amonio)⁴		
Preparar una pequeña cantidad de solución, con una concentración de 100 g/L de persulfato de amonio en agua destilada. [Nota—El persulfato de amonio proporciona los radicales libres que impulsan la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. Debido a que el persulfato de amonio se descompone rápidamente, se deben preparar nuevas soluciones el día de uso.]		
TEMED (tetrametiletilendiamina)⁵		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Usar un reactivo de grado electroforético.		
Solución amortiguadora 1.0 M (pH 6.8)⁶		
Disolver 60,6 g de Tris en 400 mL de agua. Ajustar el pH a 6,8 con ácido clorhídrico y diluir hasta 500.0 mL con agua.		
Solución saturada de n-butanol		
Medir 50 mL de n-butanol y agregar 5.0 mL de agua destilada. Almacene a temperatura ambiente.		
Preparación del Gel		
En un sistema de gel de SDS-poliacrilamida con sistema amortiguador discontinuo, se recomienda verter el gel separador, dejar que solidifique, y luego verter el gel concentrador, debido a que los geles tienen diferente composición de acrilamida-bisacrilamida, solución amortiguadora y pH.		
Preparación del gel separador.		
En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución que contenga la concentración deseada de acrilamida para el gel separador usando los valores proporcionados según se indica en la Tabla 1. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Cuando corresponda, antes de agregar la Solución de Persulfato de Amonio y el TEMED, filtrar la solución si fuera necesario al vacío a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa (con un diámetro de poro de 0,45 µm). Mantener la solución al vacío mientras se agita la unidad de filtración por rotación suave hasta que no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de Solución de Persulfato		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>de Amonio y de TEMED, según se indica en la Tabla 1; agitar por rotación suave y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde. Dejar espacio suficiente para el gel concentrador (el largo de los dientes del peine más 1 cm). Con una pipeta de vidrio cónico, cubrir cuidadosamente la solución con isobutanol saturado con agua. Dejar el gel en posición vertical, a temperatura ambiente, para permitir la polimerización.</p>		
<p>Tabla 1. Preparación del gel separador *(Ver anexo 1)</p>		
<p>Preparación del gel concentrador. Tabla 2</p>		
<p>Una vez finalizada la polimerización (aproximadamente 30 minutos), retirar el isobutanol y lavar la superficie del gel varias veces con agua para quitar la capa de isobutanol y toda la acrilamida no polimerizada. Drenar tanto líquido como sea posible de la parte superior del gel y luego quitar el agua remanente usando el borde de una toalla de papel. En un matraz Erlenmeyer, preparar el volumen adecuado de solución con la concentración deseada de acrilamida, usando los valores proporcionados en la Tabla 2. Mezclar los componentes en el orden que se muestra. Cuando corresponda, antes de agregar la solución de persulfato de amonio y el TEMED, filtrar la solución si fuera necesario al vacío a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa (con un diámetro de poro de 0,45 µm). Mantener la solución al vacío mientras se agita la unidad de filtración por</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>rotación suave hasta que no se formen más burbujas en la solución. Agregar cantidades adecuadas de solución de persulfato de amonio y de TEMED, según se indica en la Tabla 2. Agitar por rotación suave y verter inmediatamente en el espacio entre las dos placas de vidrio del molde, directamente sobre la superficie del gel separador polimerizado. Introducir inmediatamente un peine de politetrafluoroetileno limpio en la solución de gel concentrador, con cuidado para no atrapar burbujas de aire. Agregar más solución de gel concentrador para llenar completamente los espacios del peine. Colocar el gel en posición vertical y dejar polimerizar a temperatura ambiente.</p>		
<p>Tabla 2. Preparación del gel concentrador *(Ver anexo 1)</p>		
<p>Solución amortiguadora de muestra SDS-PAGE (concentrada)</p>		
<p>Disolver 1,89 g de Tris, 5,0 g de lauril sulfato de sodio y 50 mg de azul de bromofenol en agua. Agregar 25,0 mL de glicerol y diluir hasta 100 mL con agua. Ajustar el pH a 6,8 con ácido clorhídrico y diluir hasta 125 mL con agua.</p>		
<p>Solución amortiguadora de muestra SDS-PAGE para condiciones reductoras (concentrada)</p>		
<p>Disolver 3,78 g de Tris, 10,0 g de SDS y 100 mg de azul de bromofenol en agua. Agregar 50,0 mL de glicerol y diluir hasta 200 mL con agua. Agregar 25,0 mL de 2-ME. Ajustar a un pH de 6,8 con ácido clorhídrico y diluir hasta 250,0 mL con agua. Alternativamente, se puede usar DTT como agente</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>reductor en lugar de 2-ME. En este caso, preparar la solución amortiguadora de muestra según se indica a continuación: Disolver 3,78 g de Tris, 10,0 g de SDS y 100 mg de azul de bromofenol en agua. Agregar 50,0 mL de glicerol y diluir hasta 200 mL con agua. Ajustar a un pH de 6,8 con ácido clorhídrico y diluir hasta 250,0 mL con agua. Inmediatamente antes de usar, agregar DTT hasta una concentración final 100 mM.</p>		
<p>Solución amortiguadora de corrida para SDS-PAGE</p>		
<p>Disolver 151,4 g de Tris, 721,0 g de glicina y 50,0 g de lauril sulfato de sodio en agua, y diluir hasta 5000 mL con el mismo disolvente. Inmediatamente, antes de usar diluir 10 veces su volumen con agua y mezclar. Medir el pH de la solución diluida. El pH estará comprendido entre 8,1 y 8,8.</p>		
<p>Preparación de las muestras. Salvo que se indique lo contrario en la monografía específica, las muestras pueden prepararse de la siguiente manera:</p>		
<p>Preparación de las muestras (condiciones no reductoras). Mezcle volúmenes iguales de una mezcla compuesta por agua más la preparación a examinar o la preparación de referencia, y solución amortiguadora de muestra de SDS-PAGE concentrada.</p>		
<p>Preparación de las muestras (condiciones reductoras). Mezcle volúmenes iguales de una mezcla compuesta por agua más la preparación a examinar o la preparación de referencia, y solución</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>amortiguadora de muestra SDS-PAGE concentrada para condiciones reductoras que contenga 2-ME (o DTT) como agente reductor.</p>		
<p>La concentración descrita en la monografía puede variar en función de la proteína y el método de tinción.</p>		
<p>Tratamiento de la muestra: mantener durante 5 minutos en un baño de agua o en un calentador de bloque a 100 °C y luego enfriar. La temperatura y el tiempo indicados en la monografía pueden variar, ya que puede producirse una escisión de la proteína durante el tratamiento térmico.</p>		
<p>Montaje del gel en el aparato de electroforesis y separación electroforética.</p>		
<p>Una vez completada la polimerización (aproximadamente 30 min), retire cuidadosamente el peine de politetrafluoroetileno. Enjuague los pocillos inmediatamente con agua o con la solución amortiguadora de corrida para SDS-PAGE para eliminar toda la acrilamida no polimerizada. Si es necesario, enderezar los dientes del gel concentrador con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa. Retirar las pinzas de uno de los lados cortos, retirar con cuidado el soporte de caucho de silicona y vuelva a colocar las pinzas. Proceda de forma similar en el otro lado corto. Retire el soporte de caucho de silicona de la parte inferior del gel. Monte el gel en el aparato de electroforesis.</p>		
<p>Agregar la solución amortiguadora para electroforesis a los recipientes superior e inferior.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Quitar cualquier burbuja que haya quedado atrapada en el fondo del gel, entre las placas de vidrio. Esta eliminación se realiza mejor con una aguja hipodérmica roma conectada a una jeringa. Nunca se debe correr previamente el gel antes de cargar las muestras porque esto destruiría la discontinuidad de los sistemas amortiguadores de pH. Antes de cargar la muestra, enjuagar cuidadosamente cada pocillo con solución amortiguadora de corrida SDS-PAGE. Preparar las muestras de prueba y de referencia en la solución amortiguadora para muestra recomendada y tratar según se indica en la monografía individual. Aplicar el volumen adecuado de cada muestra a los pocillos de gel concentrador.</p>		
<p>Comenzar la electroforesis usando las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo. Los fabricantes de equipos para SDS-PAGE pueden proveer geles de diferentes áreas y espesores, el tiempo de corrida y la corriente o el voltaje de la electroforesis pueden variar para lograr la separación óptima. Verificar que el frente de tinción se mueva hacia el gel separador. Detener la electroforesis cuando el colorante esté cerca del fondo del gel. Retirar el gel del aparato y separar cuidadosamente las placas de vidrio. Quitar los espaciadores, cortar y desechar el gel concentrador y proceder de inmediato con la tinción.</p>		
<p>Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio—geles en gradiente de concentración</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Los geles de gradiente (geles separadores) se preparan con una concentración creciente de acrilamida desde la parte superior hacia la parte inferior. La preparación de los geles en gradiente requiere de un aparato de formación de gradiente. Se encuentran disponibles comercialmente geles en gradiente listos para usarse con protocolos recomendados específicos.</p>		
<p>Los geles en gradiente ofrecen algunas ventajas sobre los geles de concentración fija. Algunas proteínas que comigran en los geles de concentración fija pueden resolverse dentro de los geles en gradiente. Durante la electroforesis las proteínas migran hasta que el tamaño de poro detiene su avance y, por ende, se presenta un efecto concentrador, lo que resulta en bandas más pronunciadas. De acuerdo con la Tabla 3, los geles en gradiente también permiten la separación de un rango más amplio de masas moleculares de proteína que los geles de concentración fija.</p>		
<p>Como se muestra en la <i>Tabla 3</i>, los geles de gradiente también permiten la separación de proteínas con un rango más amplio de masas moleculares en comparación con un gel de concentración fija única.</p>		
<p>La tabla presenta composiciones sugeridas para el gradiente lineal, relacionando el rango de concentraciones de acrilamida con los rangos apropiados de masa molecular de la proteína. Cabe destacar que se pueden preparar otras</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*										
<p>formas de gradiente (por ejemplo, cóncavas) para aplicaciones específicas.</p>												
<p><i>Tabla 3 Concentraciones de acrilamida para geles en gradiente</i></p>												
<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="128 451 426 521">Acrilamida (%)</th> <th data-bbox="426 451 724 521">Rango de proteínas (kDa)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="128 521 426 565">5 - 15</td> <td data-bbox="426 521 724 565">20 - 250</td> </tr> <tr> <td data-bbox="128 565 426 609">5 - 20</td> <td data-bbox="426 565 724 609">10 - 200</td> </tr> <tr> <td data-bbox="128 609 426 652">10 - 20</td> <td data-bbox="426 609 724 652">10 - 150</td> </tr> <tr> <td data-bbox="128 652 426 691">8 - 20</td> <td data-bbox="426 652 724 691">8 - 150</td> </tr> </tbody> </table>	Acrilamida (%)	Rango de proteínas (kDa)	5 - 15	20 - 250	5 - 20	10 - 200	10 - 20	10 - 150	8 - 20	8 - 150		
Acrilamida (%)	Rango de proteínas (kDa)											
5 - 15	20 - 250											
5 - 20	10 - 200											
10 - 20	10 - 150											
8 - 20	8 - 150											
<p>Los geles en gradiente también se usan para la determinación de masas moleculares y la determinación de pureza de las proteínas.</p>												
<p>Detección de proteínas en geles</p>												
<p>La tinción con Coomassie y la tinción con plata son los métodos de tinción de proteínas más comunes y se describen con más detalle a continuación.</p>												
<p>Existen otras tinciones, métodos de detección y kits comerciales disponibles. Por ejemplo, las tinciones fluorescentes se visualizan mediante un generador de imágenes fluorescente y suelen proporcionar una respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones de proteínas, a menudo de varios órdenes de magnitud, dependiendo de la proteína.</p>												
<p>La tinción con Coomassie tiene un nivel de detección de proteínas de aproximadamente 1 µg a 10 µg de proteína por banda. La tinción con plata es el método más sensible para teñir proteínas en</p>												



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
geles y puede detectarse una banda que contiene de 10 ng a 100 ng.		
Estas cifras se consideran robustas en el contexto de estos geles. En la literatura se ha descrito ocasionalmente una sensibilidad mejorada de 1 o 2 órdenes de magnitud.		
La tinción con Coomassie responde de forma más lineal que la tinción con plata; sin embargo, la respuesta y el rango dependen de la proteína y del tiempo de revelado. Tanto la tinción con Coomassie como la tinción con plata pueden ser menos reproducibles si la tinción se detiene de forma subjetiva, es decir, en el punto en el que la tinción se considera satisfactoria. El uso de rangos dinámicos de proteínas de referencia es muy importante, ya que ayudan a evaluar la sensibilidad y la linealidad intra experimentales. Todos los pasos de tinción en gel se realizan con guantes, a temperatura ambiente, agitando suavemente (por ejemplo, en una plataforma de agitación orbital) y utilizando un recipiente adecuado.		
Reactivos para Tinción		
Solución decolorante		
Preparar una mezcla de 1 volumen de ácido acético glacial, 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua.		
Solución de tinción de Coomassie		
Preparar una solución de 1,25 g/L de azul ácido 83 en Solución de decoloración. Filtrar.		
Solución fijadora		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
Agregar 0,27 mL de formaldehído a 250 mL de metanol y diluir con agua hasta 500 mL.		
Reactivo de nitrato de plata		
Agregar gota a gota y mezclando, 8 mL de una solución de 200 g/L de nitrato de plata a una mezcla de 3 mL de amoníaco concentrado y 40 mL de hidróxido de sodio 1 M. Diluir hasta 200 mL con agua.		
Solución reveladora		
Diluir 2,5 mL de una solución de 20 g/L de ácido cítrico y 0,27 mL de formaldehído hasta 500 mL con agua.		
Solución de bloqueo		
Preparar una solución de ácido acético al 10% (v/v).		
Tinción de Coomassie		
Sumergir el gel en un exceso de solución de Tinción de Coomassie y dejar en reposo durante al menos 1 hora. Retirar la solución de tinción.		
Decolorar el gel con un exceso considerable de solución decolorante.		
Cambiar la solución decolorante varias veces hasta que las bandas de proteína teñidas se distingan claramente sobre un fondo claro. Cuanto más minuciosamente se decolore el gel, menor será la cantidad de proteína que se puede detectar con este método. La decoloración se puede acelerar añadiendo unos gramos de resina de intercambio aniónico o una esponja pequeña a la solución decolorante.		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>NOTA: Las soluciones ácido-alcohólicas utilizadas en este procedimiento no fijan completamente las proteínas en el gel. Esto puede provocar la pérdida de algunas proteínas de bajo peso molecular durante la tinción y decoloración de geles delgados. La fijación permanente se puede obtener dejando el gel en una mezcla de 1 volumen de ácido tricloroacético, 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de agua durante 1 h antes de sumergirlo en la solución de tinción de Coomassie.</p>		
<p>Tinción con plata.</p>		
<p>Sumergir el gel en un exceso de solución fijadora y dejarlo reposar durante 1 h. Retirar la solución fijadora, añadir solución nueva e incubar durante al menos 1 h o durante la noche, si es conveniente. Desechar la solución fijadora y lavar el gel en un exceso abundante de agua durante 1 h. Sumergir el gel durante 15 min en una solución de glutaraldehído al 1 % v/v. Lavar el gel dos veces durante 15 min en un exceso abundante de agua. Sumergir el gel en reactivo de nitrato de plata nuevo durante 15 min, en oscuridad. Lavar el gel tres veces durante 5 min en abundante agua. Sumergir el gel durante aproximadamente 1 min en la solución reveladora hasta obtener una tinción satisfactoria. Detener el revelado incubando en la solución de bloqueo durante 15 min. Enjuagar el gel con agua.</p>		
<p>Registro de resultados</p>		
<p>Los geles se fotografían o escanean mientras aún están húmedos o después de un proceso de</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>secado adecuado. Actualmente, existen sistemas de escaneo de geles con software de análisis de datos disponibles comercialmente para fotografiar y analizar inmediatamente el gel húmedo.</p>		
<p>Dependiendo del método de tinción utilizado, los geles se tratan de forma ligeramente diferente. Para la tinción con Coomassie, después del paso de decoloración, dejar reposar el gel en una solución de glicerol a una concentración de 100 g/L durante al menos 2 h (es posible la incubación durante toda la noche).</p>		
<p>Para la tinción con plata, añadir al enjuague final un paso de 5 min en una solución de glicerol a una concentración de 20 g/L.</p>		
<p>El secado de geles de poliacrilamida SDS teñidos es uno de los métodos utilizados para obtener documentación permanente. Este método frecuentemente provoca el agrietamiento del gel durante el secado entre las películas de celulosa.</p>		
<p>Sumergir dos láminas de película de celulosa porosa en agua e incubar de 5 a 10 minutos. Colocar una de las láminas en un marco de secado. Levantar con cuidado el gel y colocarlo sobre la película de celulosa. Eliminar las burbujas de aire atrapadas y vertir unos mililitros de agua alrededor de los bordes del gel. Colocar la segunda lámina encima y eliminar las burbujas de aire atrapadas.</p>		
<p>Completar el montaje del marco de secado. Colocarlo en un horno o dejarlo a temperatura ambiente hasta que se seque.</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>Determinación de la masa molecular</p>		
<p>Las masas moleculares de las proteínas se determinan comparando su movilidad con la de varias proteínas del marcador de peso molecular conocido. Para calibrar geles, se ofrecen mezclas de proteínas preteñidas y no teñidas, con masas moleculares conocidas con precisión, combinadas para una tinción uniforme. Están disponibles en varios rangos de masa molecular.</p>		
<p>Las soluciones madre concentradas de proteínas de masa molecular conocida se diluyen en el tampón de muestra adecuado y se cargan en el mismo gel que la muestra de proteína que se va a examinar.</p>		
<p>Inmediatamente después de analizar el gel, se marca la posición del colorante de rastreo azul de bromofenol para identificar el borde delantero del frente iónico electroforético. Esto se puede hacer cortando muescas en los bordes del gel o insertando una aguja empapada en tinta china en el gel, en el frente del colorante.</p>		
<p>Después de la tinción, se miden las distancias de migración de cada banda de proteína (del marcador y desconocidas) desde la parte superior del gel de resolución. Divida la distancia de migración de cada proteína entre la distancia recorrida por el colorante de seguimiento. Las distancias de migración normalizadas se denominan movilidades relativas de las proteínas (relativas al frente del colorante) o RF. Construir un gráfico del logaritmo de las masas moleculares</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>relativas (Mr) de los estándares de proteína en función de los valores de RF. Las masas moleculares desconocidas pueden estimarse mediante análisis de regresión lineal (o, más precisamente, mediante análisis de regresión no lineal) o interpolación de las curvas de log Mr frente a RF si los valores obtenidos para las muestras desconocidas se ubican a lo largo de la parte aproximadamente lineal del gráfico.</p>		
<p>Validación de la prueba</p>		
<p>La prueba no es válida a menos que el rango de resolución objetivo del gel se haya demostrado mediante la distribución de marcadores de masa molecular apropiados, por ejemplo, a lo largo del 80 % de la longitud del gel. La separación obtenida para las proteínas esperadas debe mostrar una relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular y el RF. Si la gráfica tiene forma sigmoidea, solo se podrán utilizar en los cálculos los datos de la región lineal de la curva. Los requisitos de validación adicionales con respecto a la muestra de prueba pueden especificarse en monografías individuales.</p>		
<p>La sensibilidad también debe validarse. Un control de proteína de referencia correspondiente al límite de concentración deseado, ejecutado en paralelo con las muestras de prueba, puede servir para determinar la idoneidad del sistema.</p>		
<p>Cuantificación de impurezas</p>		
<p>La SDS-PAGE se utiliza a menudo como prueba límite para impurezas. Cuando las impurezas se</p>		



“2026, Año de Margarita Maza Parada”

Dice	Debe decir	Justificación*
<p>cuantifican mediante la normalización a la banda principal utilizando un densitómetro integrador o análisis de imagen, es necesario validar la linealidad de las respuestas. Considerar que, según el método de detección y la proteína, el rango lineal puede variar, pero puede evaluarse en cada análisis utilizando una o más muestras de control que contengan un rango adecuado de concentración de proteína.</p>		
<p>Cuando el límite de impurezas se especifique en la monografía individual, se debe preparar una solución de referencia correspondiente a ese nivel de impureza diluyendo la solución de prueba.</p>		
<p>Por ejemplo, si el límite es del 5 %, la solución de referencia sería una dilución 1:20 de la solución de prueba.</p>		
<p>Ninguna impureza (banda distinta a la principal) en el electroferograma obtenido con la solución de prueba puede ser más intensa que la banda principal obtenida con la solución de referencia.</p>		
<p>En condiciones validadas, las impurezas pueden cuantificarse mediante la normalización con respecto a la banda principal utilizando un densitómetro integrador o mediante análisis de imagen.</p>		

*Para una mejor comprensión de su solicitud adjunte bibliografía u otros documentos que sustenten sus comentarios.

“2026, Año de Margarita Maza Parad

Anexo 1

Tabla 1. Preparación del gel separador

Componentes de solución	Volumen de componentes (mL) por volumen del molde de gel indicado							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Acrilamida 6%								
Agua	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
Solución de acrilamida ¹	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ⁵	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
Acrilamida 8%								
Agua	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
Solución de acrilamida ¹	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ⁵	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
Acrilamida 10%								
Agua	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
Solución de acrilamida ¹	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ⁵	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
Acrilamida 12%								
Agua	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
Solución de acrilamida ¹	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5



“2026, Año de Margarita Maza Parad

TEMED ⁵	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
Acrilamida 14%								
Agua	1.4	2.7	3.9	5.3	6.6	8.0	10.6	13.8
Solución de acrilamida ¹	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ⁵	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
Acrilamida 15%								
Agua	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
Solución de acrilamida ¹	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
Tris 1.5 M (pH 8.8) ²	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
SDS 100 g/L ³	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
APS 100 g/L ⁴	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED ⁵	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Tabla 2. Preparación del gel concentrador

Componentes de solución	Volumen de componentes (mL) por volumen del molde de gel indicado							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Agua	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
Solución de acrilamida ¹	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
Tris 1.0 M (pH 6.8) ⁶	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
SDS 100 g/L ³	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
APS 100 g/L ⁴	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED ⁵	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01