

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Desenvolvimento e validação de ensaio microbiológico para determinação de
ciprofloxacino em pomada oftálmica**

Andressa Santer

Porto Alegre, dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Desenvolvimento e validação de ensaio microbiológico para determinação de
ciprofloxacino em pomada oftálmica**

Andressa Santer

Prof. Dr. Tércio Paschke Oppe
Orientador

Me. Leticia Malgarim Cordenonsi
Coorientadora

Porto Alegre, dezembro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tércio Paschke Oppe, pela orientação, ensinamentos, confiança e dedicação excepcional em me auxiliar durante a realização do meu trabalho.

À Prof. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pelos conselhos, carinho e confiança no meu trabalho.

À minha coorientadora Leticia Malgarim Cordenonsi, pelos ensinamentos, auxílio, dedicação, amizade e confiança no meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade pela receptividade, carinho e amizade.

A todos os meus amigos pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao meu namorado Yuri, por todo incentivo e apoio durante a elaboração do meu trabalho, com muito carinho e amor.

Aos meus pais Dirlene e Juarez e minha irmã Danieli, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todos os momentos com muita paciência e amor.

**Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Química Nova
apresentadas em anexo.**

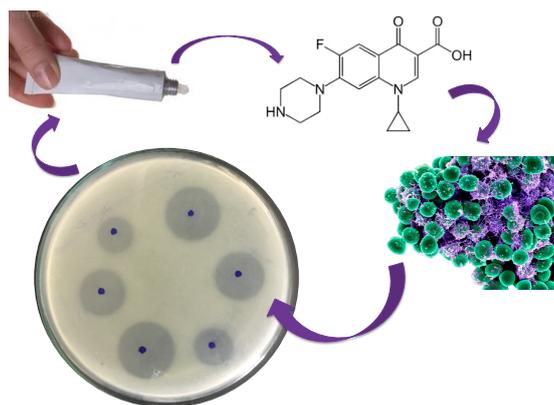
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE ENSAIO MICROBIOLÓGICO PARA DETERMINAÇÃO DE CIPROFLOXACINO EM POMADA OFTÁLMICA

Andressa Santer^{a,*}, Leticia Malgarim Cordenonsi^a, Elfrides Eva Scherman Schapoval^a, Tércio Paschke Oppe^a

^a Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000, Porto Alegre – RS, Brasil.

*e-mail: dessa_75@hotmail.com

Graphical abstract



Microbiological assay developed to quantify ciprofloxacin in ophthalmic ointment upon the strain of *Staphylococcus epidermidis*.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF MICROBIOLOGICAL ASSAY FOR DETERMINATION OF CIPROFLOXACIN IN OPHTHALMIC OINTMENT

Ciprofloxacin is a second generation fluoroquinolone antimicrobial with a wide spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. This paper describes the development and validation of a sensitive, accurate and reproducible microbiological assay, apply agar diffusion method for the determination of ciprofloxacin ophthalmic ointment. The assay is based on the inhibitory effect of ciprofloxacin upon the strain of *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 used as the test microorganism. The results were treated statistically by analysis of variance (ANOVA) and were found to be linear ($r = 0.9903$) in the selected range of 4.0 – 32.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, precise with relative standard deviation (RSD) of repeatability intraday = 0.27, intermediate precision RSD = 0.53, and accurate (101.38%). The results demonstrated the validity of the proposed bioassay, which allows reliable ciprofloxacin quantitation in pharmaceutical samples and therefore can be used for the drug analysis in routine quality control of ciprofloxacin.

Keywords: Ciprofloxacin; Microbiological assay; Agar diffusion method; Validation.

INTRODUÇÃO

Ciprofloxacino, ácido 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4 dihidroquinoleína-3-carboxílico, conforme demonstrado na Figura 1, é um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas de segunda geração apresentando amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.¹⁻³ O mecanismo de ação das quinolonas antibacterianas, como o ciprofloxacino, envolve a inibição da topoisomerase II bacteriana (DNA-girase) e topoisomerase IV, enzimas essenciais no processo de replicação, transcrição, recombinação e reparação do DNA bacteriano, atuando através de ação bactericida.²

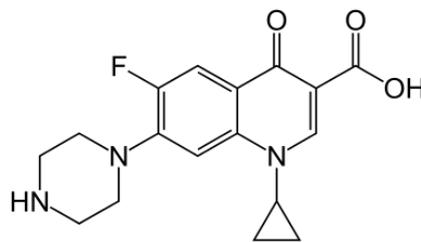


Figura 1. Estrutura química do ciprofloxacino

O cloridrato de ciprofloxacino, sal do ciprofloxacino utilizado na produção de pomadas oftálmicas, dentre os diversos usos clínicos, é indicado para tratamento de infecções oculares, como úlcera córnea e conjutivite bacteriana, causadas por microrganismos susceptíveis, tais como o microrganismo *Staphylococcus epidermidis*.³

O doseamento de fármacos através de ensaio microbiológico é um método que permite quantificar diretamente a atividade do antimicrobiano frente a uma cepa de microrganismo sensível, sob condições adequadas através do efeito inibitório no crescimento microbiano, indicando características e alterações na atividade antimicrobiana que podem não ser reveladas pelos métodos químicos.^{4,5} A literatura relata ensaios microbiológicos pelo método de difusão em ágar para determinação de ciprofloxacino em comprimidos,⁶ além outros fármacos quinolônicos, como gemifloxacino, moxifloxacino e levofloxacino,⁷⁻⁹ porém não há ensaio microbiológico descrito na literatura para determinação de ciprofloxacino em pomada oftálmica.

O controle de qualidade de medicamentos é essencial para assegurar que o produto esteja dentro dos padrões de qualidade exigidos, através da execução de métodos analíticos eficazes e validados. A validação de metodologia analítica tem como objetivo demonstrar que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos.

A importância de desenvolver um método alternativo para doseamento do ciprofloxacino é justificada pelo seu potencial terapêutico, com grande emprego em terapias microbianas, evitando a baixa qualidade dos produtos anti-infecciosos, que está relacionada com o desenvolvimento de cepas resistentes, e conseqüentemente a administração de doses subterapêuticas.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um ensaio microbiológico específico, exato, preciso e reprodutível por difusão em ágar, aplicando o método de cilindros em placas, para a quantificação de ciprofloxacino em pomada oftálmica.

PARTE EXPERIMENTAL

Substâncias Químicas

A substância química de referência (SQR) de cloridrato de ciprofloxacino (pureza de 93,5%) foi adquirida da The United States Pharmacopeia (USA). Foram obtidas comercialmente pomadas oftálmicas estéreis contendo 3,5 mg g⁻¹ de cloridrato de ciprofloxacino (Maxiflox®-LatinoFarma, Brasil). Todos os reagentes usados foram de grau analítico. Foi utilizada água ultrapura (Milli-Q® apparatus, Millipore, USA) para preparação das soluções.

Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura Grove-Randall n° 11, constituinte das camadas base e inoculada, e Grove-Randall n° 1, para manutenção do microrganismo, obtidos da BD (USA) e Merck (Alemanha), respectivamente. Os meios foram preparados conforme a especificação do fabricante e esterilizados em autoclave (Webeco C) a 121,0 °C durante 15 minutos.

Microrganismo e inóculo

As culturas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 mostraram-se mais apropriadas como microrganismo teste devido a susceptibilidade do ciprofloxacino e a capacidade de formar halos de inibição definidos, permitindo a precisão nas medições. Culturas do microrganismo foram mantidas em meio inclinado Grove-Randall n° 11, e 24 horas antes do ensaio eram repicados para meio inclinado Grove-Randall n° 1 e mantido em estufa microbiológica (Biomatic) em temperatura de incubação de $32,5 \pm 2,5$ °C para o seu crescimento. O inóculo foi padronizado através da suspensão da cultura em cloreto de sódio 0,90%, com transmitância de $25 \pm 2\%$ a 580 nm, utilizando um espectrofotômetro (Analyser - 800M). Alíquota de 1,0 mL do inóculo foi adicionada a 100 mL de meio Grove-Randall n° 11, mantido à temperatura de $47,0 \pm 2,0$ °C em banho-maria (Biopar BMD01ESP), e utilizado imediatamente como camada inoculada.

Preparação das soluções referência

Pesou-se, com exatidão, o equivalente a 5,60 mg da SQR de cloridrato de ciprofloxacino (5,0 mg de ciprofloxacino), transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com solução de ácido clorídrico 0,1 M. A partir dessa solução padrão, foram transferidas alíquotas de 800, 1600 e 3200 µL para balões de 10 mL, completando o volume com tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 8,0,¹⁰ obtendo-se concentrações finais de 4,0; 8,0 e 16,0 µg mL⁻¹ de ciprofloxacino SQR (P1, P2 e P3, respectivamente).

Preparação das soluções amostra

Pesou-se, com exatidão, o equivalente a 0,555 mg de cloridrato de ciprofloxacino da amostra de pomada oftálmica (158,7 mg de pomada e 0,50 mg de ciprofloxacino), transferiu-se para tubo de ensaio com tampa, adicionou-se 5 mL de hexano e agitou-se vigorosamente até a total dispersão da pomada. Colocou-se a amostra em banho-maria a $60,0 \pm 1,0$ °C, com a tampa ligeiramente desenroscada, durante 15 minutos com agitação frequente. Após decorrido o tempo, retirou-se do banho-maria e adicionou-se 10 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M e agitou-se por 4 minutos em vórtex na velocidade máxima. A amostra foi mantida em repouso até a separação de fases e logo após, desprezou-se a camada orgânica. A partir da camada aquosa, denominada solução estoque amostra, foram transferidas alíquotas de 400, 800 e 1600 μL para balões volumétricos de 5 mL, completando o volume com tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 8,0,¹⁰ obtendo-se concentrações finais de 4,0; 8,0 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ciprofloxacino (A1, A2 e A3, respectivamente).

Ensaio microbiológico – método de difusão em ágar - cilindros em placas

Foram utilizadas seis placas de Petri previamente esterilizadas (20,0 mm de altura x 100,0 mm de diâmetro) para cada ensaio, adicionadas de 20 mL de meio Grove-Randall n° 11 liquefeito como camada base. Após a solidificação, em cada placa foram adicionados 5 mL de meio Grove-Randall n° 11 com inóculo a 1,0% de concentração. Foram distribuídos seis cilindros de aço inoxidável (6,0 mm de diâmetro interno x 8,0 mm de diâmetro externo x 10 mm de altura) mantendo distância equivalente entre eles. Adicionou-se o volume de 200,0 μL das soluções amostra (A1, A2 e A3) e SQR (P1, P2 e P3), com auxílio de micropipeta automática, nos cilindros demarcados. As placas foram armazenadas em estufa microbiológica (Biomatic) a temperatura $32,5 \pm 2,5$ °C durante 16 a 18 horas. Após o respectivo tempo, os diâmetros dos halos foram medidos com auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo®, Toquio, Japão).

Validação do método

Linearidade

A curva de calibração foi obtida a partir da média de curvas obtidas em três dias, cada uma com dez determinações de cada concentração da SQR, 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (P1, P2, P3 e P4). Os dados obtidos foram avaliados por regressão linear, a validação dos dados foi feita através da análise de variância (ANOVA) e a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados.

Precisão

A precisão do ensaio foi determinada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), por meio de ensaios realizados com três concentrações diferentes (4,0; 8,0 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de 3 amostras diferentes durante três dias, cada ensaio com seis determinações. Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo (DPR) dos valores de atividade percentual de ciprofloxacino.

Exatidão

A exatidão do ensaio foi determinada através do teste de recuperação, adicionando-se alíquotas de solução de ciprofloxacino SQR nas soluções amostras, a fim de obter resultados 10% acima da concentração teste. Preparou-se solução padrão reforçada contendo 5,60 mg da SQR de cloridrato de ciprofloxacino e 10 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 M, obtendo concentração de 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 100,0 μL dessa solução padrão reforçada foram transferidas para tubo de ensaio contendo a amostra antes de iniciar o processo de extração da pomada, obtendo uma solução amostra na concentração de 55,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após realizar a extração do fármaco, foram transferidas alíquotas de 400, 800 e 1600 μL para balões volumétricos de 5 mL e completando os volumes com tampão fosfato de potássio 0,1 M, estéril, pH 8,0,¹⁰ obtendo-se soluções de concentrações finais de 4,4; 8,8 e 17,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Realizou-se o ensaio e os resultados obtidos foram expressos pelo percentual de recuperação da SQR.

Especificidade

A especificidade do método foi determinada a partir da análise dos excipientes da formulação da pomada de cloridrato de ciprofloxacino e da amostra quando mantida a

temperatura ambiente por 24 horas, verificando se os mesmos não interferiam na determinação de ciprofloxacino.

Robustez

Avaliou-se a robustez do método através da variação da concentração do meio inoculado de 1,0% para 0,8% e 1,2% no ensaio microbiológico, com a finalidade de avaliação de interferência dessa modificação nos resultados de doseamento de ciprofloxacino.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inexistência de ensaio microbiológico de difusão em ágar aplicando o método de cilindros em placas para a determinação do ciprofloxacino em compêndios oficiais demonstra a relevância do estudo desenvolvido. Optou-se por realizar ensaio microbiológico segundo o delineamento 3x3, com três níveis de concentração de soluções referência e amostra, com razões idênticas em uma mesma placa.¹⁰

As condições experimentais do método microbiológico proposto foram otimizadas para determinar com exatidão e precisão o desempenho do ensaio, conforme demonstrado na Tabela 1. A atividade do ciprofloxacino foi testada contra *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Kochuria rhizophila* ATCC 9341, ambos apresentaram sensibilidade ao ciprofloxacino, nas diferentes concentrações de inóculo de 1 e 2%. Entretanto, o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 mostrou ser mais apropriado como microrganismo teste devido à capacidade de formar zonas de inibição de crescimento bem definidas, e escolheu-se a concentração de 1% do inóculo por permitir medições mais precisas dos halos, como é demonstrado na Figura 2. Diferentes concentrações das soluções foram testadas na faixa de 1 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ciprofloxacino, escolhendo-se para a realização dos ensaios as concentrações de 4,0; 8,0 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que estabeleceram melhores resultados de relação direta entre o diâmetro do halo de inibição e a dose aplicada, não apresentando risco de colapamento dos halos.

Tabela 1. Parâmetros utilizados no ensaio microbiológico de determinação de ciprofloxacino em pomada oftálmica

Parâmetros	Descrição
Microrganismo	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228
Meio de cultura (camada base e inóculo)	Meio Grove-Randall n° 11
Meio de cultura (repique)	Meio Grove-Randall n° 1
Solução diluente	Água estéril
Concentrações avaliadas no ensaio	4,0; 8,0 e 16,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Concentração do inóculo	1%
Tempo de incubação das placas	16 – 18 horas
Temperatura de incubação	35,0 \pm 2,0 °C

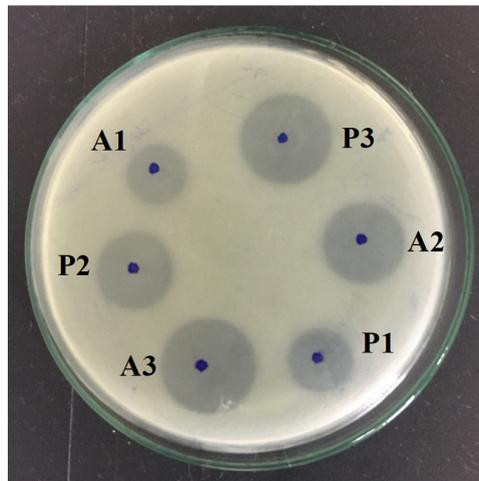


Figura 2. Ensaio microbiológico de difusão em ágar – cilindros em placas usando o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Concentrações das soluções referência de ciprofloxacino: 4,0 (P1), 8,0 (P2), e 16,0 (P3) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Concentrações das soluções amostras: 4,0 (A1), 8,0 (A2), e 16,0 (A3) $\mu\text{g mL}^{-1}$

A fim de demonstrar a especificidade do método microbiológico desenvolvido, solução placebo foi utilizada para avaliar a possível interferência dos excipientes da formulação da pomada oftálmica de ciprofloxacino. Os resultados demonstram que a solução placebo não apresentou halos de inibição quando comparado com a amostra de ciprofloxacino.

Para determinar uma possível degradação da amostra, a solução estoque amostra foi mantida a temperatura ambiente, em frasco de vidro transparente e em frasco âmbar, por 24 horas, após esse tempo realizou-se o ensaio. Os resultados obtidos foram de 97,45%, quando a amostra foi armazenada em frasco de vidro transparente, e 107,38%, quando armazenadas em frasco âmbar, demonstrando que a amostra sofreu degradação fotolítica ao ser expostas nas condições mencionadas. Esse fato já foi mencionado em outros trabalhos,^{6,11,12} mostrando que o ciprofloxacino apresenta estabilidade térmica, porém pode ser alterado por fotólise, sofrendo reações de degradação de descarboxilação ou abertura do ciclopropano da sua estrutura química.¹²

O ensaio microbiológico foi desenvolvido segundo o delineamento 3x3, que permite estabelecer uma relação direta entre o diâmetro do halo de inibição observado e o logaritmo da dose aplicada no experimento. Os diâmetros médios correspondentes às soluções referência estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição utilizados na curva de calibração padrão de ciprofloxacino pelo método microbiológico

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Diâmetro dos halos (mm)*	Diâmetro médio (mm)	DPR (%)
4,0	15,22	15,03	2,10
	15,20		
	14,67		
8,0	19,82	19,26	3,77
	19,51		
	18,44		
16,0	23,70	22,95	3,84
	23,17		
	21,98		
32,0	27,62	26,75	3,20
	26,71		
	25,91		

* Cada valor corresponde à média de dez determinações

A curva de calibração para ciprofloxacino foi construída plotando-se o log da concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) versus o diâmetro médio do halo de inibição (mm), mostrando boa linearidade na faixa de 4,0 - 32,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Escolheu-se essa faixa de concentração ampliada com a finalidade de garantir que os resultados do teste de recuperação estivessem contemplados na faixa estabelecida pela linearidade. A equação linear representativa foi $y = 12,902x + 7,401$, onde x é o log da concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e y é o diâmetro médio do halo de inibição (mm). O coeficiente de correlação ($r = 0,9903$), conforme demonstrado na Figura 3, foi altamente significativo para o método.

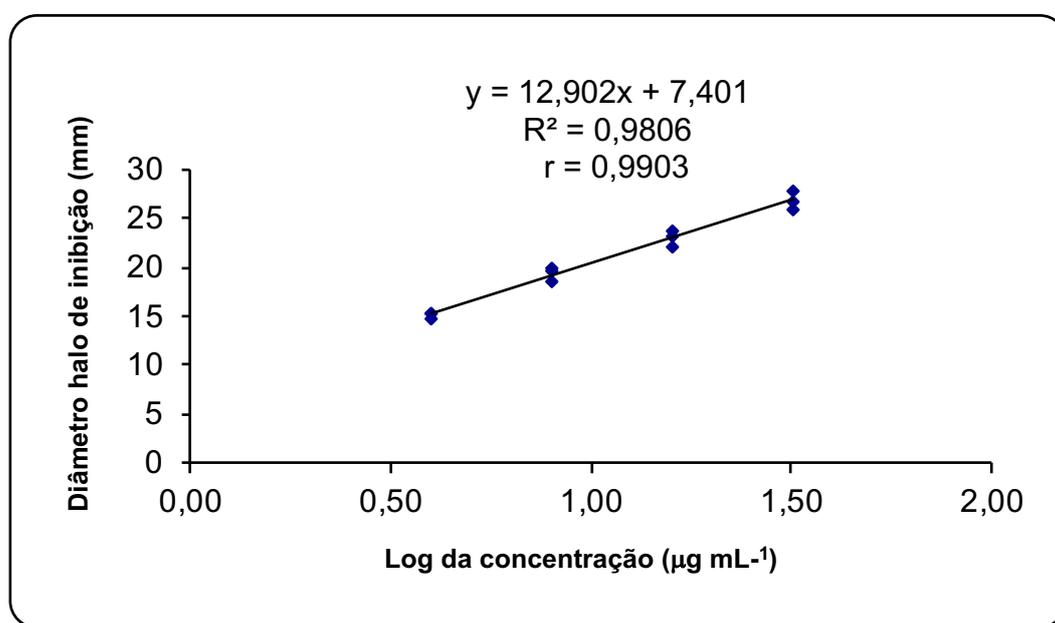


Figura 3. Curva de calibração do ciprofloxacino obtida pelo ensaio microbiológico de difusão em ágar – cilindros em placa

A avaliação da linearidade foi verificada por meio da análise de variância (ANOVA), conforme demonstrada na Tabela 3. Os resultados demonstraram pelos valores obtidos na curva, regressão linear significativa (F calculado $>$ F tabelado) e desvio da linearidade não significativo (F calculado $<$ F tabelado) para $p = 0,05$.

Tabela 3. Análise de variância dos halos de inibição determinados na obtenção da curva de calibração do ciprofloxacino em pomada oftálmica pelo método microbiológico de difusão em ágar

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	Fcal	Ftab
Entre doses	3	226,48	75,49	141,26	2,89
Regressão linear	1	226,28	226,28	423,42 ^a	4,10
Desvio linearidade	1	0,20	0,20	0,37 ^b	4,10
Dentro	8	4,28	0,53		
Total	11	230,76			

^a Significativo para $p = 0,05$

^b Significativo para $p = 0,05$

Os valores obtidos na determinação de ciprofloxacino nas amostras estão demonstrados na Tabela 4. A precisão do método foi determinada pela repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias), expressas como DPR de uma série de medidas. Os resultados obtidos demonstraram teor médio de 107,96% e DPR de 0,53%, abaixo de 5,0%, como preconizado na RE 899,¹³ indicando boa precisão do método.

Tabela 4. Resultados da precisão intermediária e repetibilidade na determinação de ciprofloxacino em pomada oftálmica pelo método microbiológico

Dia	Amostra	Teor encontrado ^a (%)	Teor médio ± DPR (%)
1	1	107,86	108,20 ± 0,27
	2	108,40	
	3	108,33	
2	4	107,96	107,66 ± 0,57
	5	108,06	
	6	106,95	

3	7	108,78	108,03 ± 0,73
	8	108,12	
	9	107,20	
	Precisão intermediária	107,96 ± 0,53	

^a Cada valor corresponde à média de seis determinações.

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação, cujos resultados obtidos foram de 99,87 a 101,38%, conforme demonstrado na Tabela 5. Os valores obtidos foram próximos ao ideal (100%), comprovando a exatidão do método desenvolvido por doseamento microbiológico.

Tabela 5. Resultados obtidos no teste de recuperação para ciprofloxacino em pomada oftálmica pelo método microbiológico

Quantidade de ciprofloxacino SQR adicionada (µg)	Quantidade de ciprofloxacino recuperada (µg)	Percentual recuperado ^a
50,0	50,64	100,85%
50,0	50,91	101,38%
50,0	50,15	99,87%
50,0	50,45	100,46%
50,0	50,81	101,18%
50,0	50,87	101,31%

^a Cada valor corresponde à média de seis determinações.

Na avaliação da robustez do método, os resultados encontrados variando a concentração do inóculo (0,8 e 1,2%) foram de 106,91% e 107,09%, respectivamente. Quando comparados estatisticamente como os resultados obtidos na precisão (107,96%), demonstraram a robustez do método, porque o fator em estudo não teve efeito significativo da determinação de ciprofloxacino.

CONCLUSÃO

O ensaio microbiológico realizado pelo método de difusão em ágar-cilindros em placa, nas condições experimentais estabelecidas, foi validado adequadamente de acordo com os guias oficiais, demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto para quantificar ciprofloxacino em pomada oftálmica. Dessa forma, podendo ser um método alternativo eficaz, até então não proposto nos compêndios oficiais, para o controle de qualidade rotineiro de ciprofloxacino em pomada oftálmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campoli Richards, D. M.; Monk, P. J.; Price, A.; *Drugs* **1988**, 35, 4, 373–447.
2. Andriole, V. T.; *Clinical Infectious Diseases* **2005**, Supplement 2, 41, S113-S119.
3. Silva, P.; *Farmacologia*, 6th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
4. The United States Pharmacopeia, 40th ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2017.
5. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Pinto, A. F.; *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*, 3th ed., São Paulo: Atheneu Editora, 2010.
6. Fratini, L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 1993.
7. Paim, C. S.; *Talanta* **2011**, 83.5, 1774-1779.
8. Abdelaziz, A. A., Tarek E. E., Noha M. G.; *Brazilian Journal of Microbiology* **2012**, 43.4, 1291-1301.
9. Dafale, Nishant A., et al.; *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2015**, 5.1, 18-26.
10. Farmacopéia Brasileira, 5th ed., *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*: Brasília, 2010.
11. Parasrampur, J.; Gupta, V. D.; *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1990**, 16(9), 1597-1604.
12. Nudelman, N. E. S.; *Estabilidad de Medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.
13. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC nº 899 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.

ANEXO

NORMAS DA REVISTA QUÍMICA NOVA

1. GERAL

Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos em Português, Inglês e Espanhol, que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico (clique [aqui](#) para acessar as normas de restrição). Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais: refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos sobre Educação: trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de graduação em Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, e outros elementos.

Notas Técnicas: trabalhos de comunicação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito, desde que apresentem acentuado conteúdo químico. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo as seções *Introdução, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências*, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc.

Assuntos Gerais: abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química, etc.

Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Artigos de Revisão: destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas e outros elementos.

Para submeter um artigo de Revisão, é imprescindível que o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação na referida área. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, para quimicanova@sbq.org.br, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho e lista de publicações do autor na área em que pretende publicar. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores. O aceite da submissão não garante a publicação do manuscrito, que passará pelo processo formal de avaliação equivalente ao das outras modalidades.

2. ANTES DA SUBMISSÃO

2.1 Direitos autorais

Ao submeter um manuscrito à revista Química Nova, assume-se que ele não foi publicado previamente, que não está sob processo de avaliação por outra entidade e que não será publicado simultaneamente em outro veículo de divulgação, no mesmo formato, sem a permissão por escrito dos Editores. Além disso, subentende-se que o autor responsável pela submissão tem o consentimento de todos os outros autores. Os autores também concordam que os direitos autorais do manuscrito serão transferidos para a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), caso o manuscrito seja aceito para publicação. Manuscritos aceitos e ilustrações se tornarão propriedades da SBQ.

2.2 Organização do manuscrito

Os manuscritos deverão apresentar clareza e concisão. A seção *Introdução* deverá identificar de forma clara e breve, utilizando-se de referências relevantes, a natureza do problema sob investigação e o conhecimento prévio a respeito dele. Revisões extensas da literatura não serão aceitas.

A seção *Parte Experimental* pode preceder ou vir após a seção *Resultados e Discussão*, mas devem ser necessariamente separadas. A seção *Conclusões*, que resumirá brevemente as principais conclusões do trabalho, deverá ser disposta logo após a seção *Resultados e Discussão*.

A parte experimental do manuscrito deve descrever os experimentos de maneira suficientemente detalhada para que outros pesquisadores possam reproduzi-los. O grau de pureza dos materiais utilizados deve ser fornecido, bem como todas as quantidades utilizadas. A descrição de procedimentos já estabelecidos não é necessária. A instrumentação utilizada só deve ser descrita caso não seja padrão. Deve-se referir a instrumentos disponíveis comercialmente a partir de suas marcas e modelos.

Todos os compostos novos devem ser completamente caracterizados, incluindo dados espectroscópicos e análises elementares. Espectros de massas de alta resolução poderão substituir análises elementares caso sejam acompanhados de provas inquestionáveis da pureza da amostra (pontos de fusão, cópias dos espectros RMN, etc.). Para compostos sintetizados em formas enantiomericamente puras ou enantiomericamente enriquecidas, sua rotação específica deverá ser fornecida. Nos casos em que o excesso enantiomérico for determinado por técnicas cromatográficas e/ou espectroscópicas, as cópias dos cromatogramas e/ou espectros devem ser incluídas no Material Suplementar (ver seção *Material Suplementar*).

Muitas publicações de Química Teórica e/ou Computacional utilizam rotinas baseadas em métodos bem documentados, sejam semi-empíricos ou *ab initio*. Neste caso é suficiente citar a variante utilizada, referindo-se a publicações importantes nas quais os métodos foram desenvolvidos, e o programa de computador utilizado, indicando brevemente as modificações realizadas pelo autor.

É de responsabilidade dos autores a obtenção de permissões para reprodução de gráficos e imagens retiradas de outros periódicos. Essas permissões para reprodução devem ser enviadas no momento da submissão, juntamente com os outros arquivos do manuscrito. A reprodução deve também ser informada nas respectivas legendas.

Os Editores poderão solicitar a revisão do idioma do manuscrito em qualquer etapa do processo de avaliação do manuscrito. Neste caso, os autores deverão apresentar um certificado de revisão por empresa/profissional especializado, que deve ser submetido pela plataforma ScholarOne no momento da submissão da versão revisada do manuscrito.

2.3 Preparo dos manuscritos

Geral

Deve-se utilizar a fonte Times New Roman, tamanho de 12 pt e cor preta. O espaçamento entre linhas deve ser de 1,5×. As páginas devem ser numeradas consecutivamente, no canto inferior direito. As linhas e os títulos e subtítulos das seções não devem ser enumerados. Os títulos das seções devem ser escritos em negrito e caixa alta, os subtítulos apenas em negrito e os subsubtítulos apenas em itálico.

O Material Suplementar deve ser o último elemento do manuscrito, e deve conter informações relevantes e complementares àquelas já apresentadas no manuscrito (ver seção Material Suplementar).

Detalhes

A primeira página deverá conter o *graphical abstract* (ver seção *Graphical Abstract*), título do trabalho, em negrito e caixa alta, nome dos autores em negrito e endereço. Se o endereço onde o trabalho foi conduzido é diferente do endereço atual de qualquer um dos autores, uma nota de rodapé indicando a posição atual pode ser incluída. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão ser listados em sequência e indicados utilizando-se letras sequenciais.

Um exemplo:

José A. Benício^a, Maria C. Cavalcante^b e João D. de Almeida^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá -

PR,

Brasil

^bDepartamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo - SP, Brasil

*e-mail: jalmeida@dq.uem.br

Como mostra o exemplo, o autor para correspondência deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado logo abaixo dos endereços. A menor unidade do endereço deve ser o departamento. Em seguida devem ser indicados a faculdade/instituto, a universidade, o CEP, a cidade, o estado e o país. Laboratórios, programas de pós-graduação e cursos não devem ser inclusos no endereço. A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho, ambos em inglês, com no máximo 200 (duzentas) palavras, e a indicação de 3 a 5 palavras-chave (keywords), também em inglês. O texto deve se iniciar a partir da terceira página do manuscrito. Ao longo do texto, o autor deve se atentar às seguintes regras:

- Palavras em língua estrangeira (inglês, francês, latim, etc.) deverão ser escritas em itálico.
- Nomes científicos de espécies devem ser escritos em itálico, com a primeira letra do nome em caixa alta.

Alguns exemplos:

... os experimentos foram realizados *in situ*;
A bactéria *Escherichia coli*...;

O tratamento dos dados foi realizado a partir do *software* Origin;

- Todas as unidades devem ser separadas dos valores por um espaço simples (inclusive o grau Celsius). A mesma regra é válida para o caso de unidades em sequência.

Alguns exemplos:

10 °C;
15 mg L⁻¹ (evitar mg/L);
10 m s⁻² (evitar m/s²);

Atenção: Toda a nomenclatura utilizada deverá ser consistente, clara e de acordo com as regras estabelecidas por entidades apropriadas, como IUPAC, *International Union of Biochemistry, Abstracts Service, Nomenclature Committee of the American Chemical Society*, entre outras. Símbolos e unidades deverão seguir as recomendações da IUPAC. Os autores devem evitar o uso de unidades que não fazem parte do SI.

Normas para elementos gráficos e tabelas

Gráficos e Figuras: textos, nomes dos eixos e quaisquer outros elementos textuais que acompanham os elementos gráficos devem ser consistentes ao longo de todo o trabalho em relação à fonte, ao tamanho da fonte, ao espaçamento e à cor. Para elementos gerados por computador, deve-se evitar planos de fundo ou sombreamento.

Fórmulas estruturais e equações químicas: todas as estruturas químicas ou equações devem ser escritas utilizando a mesma fonte ao longo do manuscrito.

Equações: as equações devem ser escritas utilizando-se um editor de equações (MathType, Equation, entre outros) e devem ser numeradas sequencialmente ao longo do manuscrito.

Fotografias: As fotografias devem apresentar contraste e não devem ser montagens. Caso haja necessidade de uma escala, ela deve ser desenhada sobre a figura e não abaixo. Não serão aceitas fotografias de equipamentos comerciais.

Tabelas: as tabelas devem ser formatadas de modo a fornecer informações diretas ao leitor. Sombreamentos e negritos devem ser evitados. Qualquer informação extra deve vir abaixo da tabela, na forma de nota de rodapé, utilizando-se as letras a, b, c e assim por diante.

Graphical abstract (em inglês): O *graphical abstract* deve resumir o conteúdo do trabalho de forma concisa e dedicada a capturar a atenção de um público amplo. O autor deve apresentar uma figura nova, usando como parâmetro uma estrutura chave, uma reação, uma equação, um conceito, um gráfico, um teorema, entre outras

possibilidades. Recomenda-se que seja de caráter artístico e possua cores diversas. Não serão aceitas fotos de equipamentos comerciais.

Atenção: a imagem deve possuir alta resolução (em formato .tiff, .jpg ou qualquer outro de ampla utilização que possa ser editado) e tamanho de 4 cm de altura por 8 cm de largura [**os elementos textuais devem ser legíveis nessas dimensões**]. Junto com o *graphical abstract*, o autor deverá enviar um texto explicativo em inglês (em arquivo .txt, .rtf ou .doc) de, no máximo, 3 linhas.

Normas para citações e lista de referências

Os elementos gráficos e as tabelas devem ser numeradas e citadas no texto, utilizando-se a primeira letra em caixa alta. Não se deve abreviar as citações.

Alguns exemplos:

... como pode ser verificado na Tabela 1.
A Figura 3 mostra o sistema utilizado...
(*Tab. 1, Fig. 1 e quaisquer outras abreviações dos títulos dos elementos não devem ser utilizadas*)

As citações de referências devem ser feitas de forma consecutiva, na forma numérica sobrescrita (sem parênteses ou colchetes), sempre após a pontuação, quando houver. Citações de duas ou mais referências devem ser separadas por vírgulas. Citações de três ou mais referências consecutivas devem ser agrupadas, utilizando-se o hífen (-). Não utilizar espaços entre as citações ou entre a citação e o caractere sobre o qual está posicionada.

A Química Nova não publica notas de rodapé. Quaisquer notas do autor devem ser incluídas na lista de referências e, no texto, devem seguir o mesmo padrão das citações, mantendo inclusive a sequência numérica.

Alguns exemplos:

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.^{3,7,8}
Existe extensa literatura a respeito do sistema utilizado,⁹⁻¹² bem como das propriedades dos materiais empregados.¹³
salicilato de sódio,¹⁻³
Nishide *et al.*⁴

... pela redução do ácido crômico,^{4-8,12}
(Três ou mais referências consecutivas devem ser citadas utilizando-se o hífen)

Na seção Referências, as abreviações dos títulos de periódicos devem estar de acordo com as definidas no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://cassi.cas.org>). Caso o periódico não esteja listado no CASSI, o título deve ser escrito por extenso.

As normas para o ano, o volume e as páginas seguem abaixo para diversos tipos de literaturas. A pontuação, os espaçamentos, os negritos e os itálicos devem ser verificados com atenção. Manuscritos com referências fora das normas da revista serão reenviados ao autor até que os erros sejam verificados e corrigidos.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:
Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).
3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar DOI da seguinte maneira:
Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.
4. É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:
Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, *147*, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**.(CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988. (CA 110:P23729y)*
7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T.; *Br PI 9.604.468-3,1999.*

Livros:

com _____ *editor(es):*

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem _____ *editor(es):*

9. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.s bq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo.
Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido.
Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Resultados

não publicados só poderão ser citados com a permissão explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Manuscritos contendo RMN, IV, espectros de massas, etc.

Sempre que um composto é sintetizado ou identificado (novo ou conhecido previamente), é obrigatório o envio de todos os dados espectrais (dados e espectros) como Material Suplementar (ver seção Material Suplementar) no momento da submissão do manuscrito.

Material Suplementar

Esta modalidade foi criada para que o texto principal seja objetivo e contenha o número estritamente necessário de Figuras e Tabelas.

O conteúdo do Material Suplementar (MS) deverá ser colocado no final do trabalho, após a seção REFERÊNCIAS. Quando houver MS, deve ser criada uma seção MATERIAL SUPLEMENTAR, logo após a seção CONCLUSÃO, com a descrição de seu conteúdo. O texto deve também indicar o acesso livre ao MS a partir do website da revista Química Nova (<http://quimicanova.sbq.org.br/>).

Elementos gráficos e Tabelas do Material Suplementar devem ser numeradas sequencialmente, com a letra S após a numeração. Ex: Figura 1S, Tabela 4S, etc.

Apesar de complementar a informação do manuscrito, o MS deve ser um documento completo. Caso sejam usadas referências, elas devem ser listadas ao final do próprio MS e numeradas na forma 1S, 2S, ...

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

3. DURANTE A SUBMISSÃO

A QN oferece aos autores apenas submissão on line.

Todos os autores devem ter seus nomes introduzidos na plataforma, portanto, durante a submissão, preencha os campos necessários informando o endereço de e-mails dos coautores.

Na plataforma ScholarOne-QN é necessário fazer o *upload*, SEPARADAMENTE, dos seguintes materiais:

1. *Main document* (full.doc), incluindo todas as figuras, tabelas e respectivas legendas, as quais devem ser inseridas após a primeira citação. Esse arquivo deve ser feito utilizando, necessariamente, o modelodisponível para *download*. No caso do manuscrito conter Material Suplementar, esse deve ser adicionado no final do *main document*.
2. Todos os arquivos originais de figuras, incluindo o *graphical abstract*, em jpg, tiff, opj, xls, cdx, etc. Por exemplo, se o manuscrito contiver 6 figuras, é necessário fazer o upload dos 6 arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.) e também o *main document* com as figuras inclusas.

Observação:

- No caso da figura ser um arquivo de imagem, esse precisa ter alta resolução (mínimo de 300 dpi);
- Por favor, não envie as figuras inseridas num arquivo .doc, envie todos os arquivos originais (opj, xls, tiff, etc.). Isso irá acelerar a avaliação de seu manuscrito e o processo de publicação, no caso de o manuscrito ser aceito.

Atenção: apesar de a versão online da revista ser colorida, as impressões são feitas em preto e branco (exceto pelos *graphical abstracts*). Ao produzir as figuras, os autores devem ter em mente que estas serão convertidas no momento da impressão, evitando assim possível perda de informações baseadas unicamente nas cores.

3. Um único arquivo .doc ou .docx contendo todas as tabelas;
4. Arquivos originais das figuras do Material Suplementar.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho poderá ser atestada por consultor(es) ad hoc, indicados pela Editoria.