

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DO GRUPAMENTO SALICILATO NA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE UM SAL IMIDAZÓLICO**

THAYSE VIANA DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2013

Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DO GRUPAMENTO SALICILATO NA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE UM SAL IMIDAZÓLICO**

Thayse Viana de Oliveira

Orientador Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Porto Alegre, Dezembro de 2013

**"Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem,
você continuará vivendo,
mas terá deixado de existir".**

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Alexandre M. Fuentefria pela oportunidade de orientação neste trabalho, pela paciência, atenção, dedicação e amizade.

À todo Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, especialmente a Bruna Pippi, Aline Dalla Lana, Vanessa Bergamo, Daiane Dalla Lana, Camila Hatwig e Renata Moraes, pelo companheirismo, amizade e por todos os ensinamentos.

Aos colegas, principalmente a Marcelle A. Carniél, que desde sempre esteve ao meu lado.

Aos meus pais pelo incentivo, carinho, força e apoio.

Ao meu querido namorado, pelo colo e compreensão, nos momentos ruins e pelos sorrisos e carinhos nos momentos bons, não necessariamente nesta ordem.

À UFRGS pelo ensino de excelência e oportunidade, e finalmente a PROPESQ pelo auxílio financeiro.

APRESENTAÇÃO

Os resultados deste estudo estão sob forma de artigo científico, ao qual contém os seguintes tópicos: Introdução, parte experimental, resultados, discussão conclusão e referências, e será submetido à revista Química Nova, após aprovação da banca avaliadora da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso. O trabalho está de acordo com as normas da revista à ser publicada (em anexo).

Os experimentos foram feitos no Laboratório de Micologia do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ARTIGO CIENTÍFICO

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DO GRUPAMENTO SALICILATO NA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE UM SAL IMIDAZÓLICO**

Artigo a ser submetido à revista Química Nova

**INFLUÊNCIA DA INCLUSÃO DO GRUPAMENTO SALICILATO NA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA DE UM SAL IMIDAZÓLICO**

Thayse Viana de Oliveira*, **Daiane Dalla Lana**, **Vanessa Bergamo**, **Alexandre M. Fuentefria**

Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90610-000 Porto Alegre – RS, Brasil.

Ricardo Keitel Donato

Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálises, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90650-000 Porto Alegre – RS, Brasil.

Marque uma das alternativas:

- Tenho apenas figuras em tons de cinza
- Tenho figuras coloridas e aceito custo da publicação impressa
- Tenho figuras coloridas, quero publicá-las coloridas apenas online e confirmo que a impressão dessas figuras em tons de cinza não prejudicará a compreensão

Marque uma das alternativas:

- Manuscrito com material suplementar
- Manuscrito sem material suplementar

* e-mail: thayseviana@ibest.com.br

INFLUENCE OF THE INCLUSION IN THE REVERSE SPLIT SALICYLATE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF AN IMIDAZOLIUM SALT

Abstract

Imidazolium Ionic Liquids (ILs) are organic salts with recognized biological activity over microorganisms. In this work, an IL presenting a salicylate group as anion ($C_{16}MImC_7H_6O_3$) was tested as for its antifungal activity against dermatophytes, filamentous fungi known to cause cutaneous mycoses (dermatophytosis); and *Candida non-albicans* specie, a type of yeast considered to be opportunistic and emergent. The minimum inhibitory concentration MIC of the substance was determined using *in vitro* susceptibility testing, recommended by the CLSI. It was found that the inclusion of this group with known anti-inflammatory activity does not affect the antifungal activity of IL.

Keywords: Imidazole, dermatophytes, *Candida non-albicans*

INTRODUÇÃO

Atualmente infecções causadas por fungos leveduriformes emergentes e dermatófitos estão cada vez mais comuns e são de difícil diagnóstico. A população de pacientes imunossuprimidos vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Isso resulta em diagnósticos cada vez mais frequentes de infecções fúngicas causadas especialmente por espécies de *Candida não-albicans*,³ leveduras que até pouco tempo eram consideradas saprófitas do ambiente mas que cada vez mais vem sendo isoladas de pacientes com micoses oportunistas.⁴ O uso indiscriminado de medicamentos para tais infecções induz ao aparecimento de organismos resistentes ou tolerantes.⁵ Dermatófitos são fungos filamentosos responsáveis por causar micoses cutâneas (dermatofitoses) em aproximadamente 40% da população mundial.⁶ É bastante problemático o manejo terapêutico dessas micoses, pois além dos antifúngicos de uso comum possuírem um número restrito de alvos celulares,⁷ os antifúngicos sistêmicos causam vários efeitos adversos e interações com outros fármacos, tornando o tratamento das dermatofitoses bastante limitado, longo e muitas vezes oneroso.²

A síntese orgânica de substâncias medicinais possui grande vantagem, pois acelera o processo da descoberta de drogas potencialmente ativas, além de permitir modificações estruturais e assim identificar os possíveis candidatos biologicamente interessantes.⁸ Estudos comprovam a importância de prospectar substâncias sintéticas novas com atividade antifúngica e anti-inflamatória. Infecções microbianas causam ativação do sistema imunológico do hospedeiro, como importante forma de defesa. Nas fases iniciais da infecção, os neutrófilos e monócitos são recrutados pelos mediadores pró-inflamatórios.⁹ A resposta inflamatória exacerbada resultante da infecção pode causar danos nos tecidos e aumentar a suscetibilidade a patógenos oportunistas.¹⁰ Substâncias como os derivados de *b*-clorovinil calconas⁸ e benzo [b] tiofeno¹¹ são exemplos de

compostos sintetizados e modificados por métodos químicos que possuem atividade antifúngica e anti-inflamatória, resultando em uma ação sinérgica interessante para o tratamento de micoses.

Os líquidos iônicos (LIs) pertencem a uma classe de sais orgânicos que geralmente possuem baixa volatilidade e toxicidade, alta condutividade iônica e estabilidade química sendo considerados solventes *verdes* ecologicamente mais aceitáveis que os solventes orgânicos convencionais.¹²

Recentes estudos ressaltam que a atividade biológica dos LIs está intimamente ligada à sua estrutura química, sendo maior conforme aumenta a cadeia alquila do cátion e quando o substituinte for, por exemplo, piridínio, imidazol ou sal de amônio quaternário. Por possuírem considerável estabilidade química e facilidade de síntese, os derivados imidazólicos são os LIs mais bem estudados e caracterizados.¹⁵ Estudos também demonstraram sua significativa atividade antimicrobiana contra fungos e cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da inclusão de um grupamento funcional com reconhecida atividade anti-inflamatória sobre a capacidade antifúngica de um sal imidazólico.

PARTE EXPERIMENTAL

Cepas selecionadas para o estudo

Foram selecionados isolados clínicos de dermatófitos distribuídos nas espécies *Microsporum canis* (MCA 32 e MCA 38), *M. gypseum* (MGY 52 e MGY 53), *Trichophyton mentagrophytes* (TME 38 e TME 46) e *T. rubrum* (TRU 49 e TRU 54). Também isolados clínicos das espécies de *Candida* não-*albicans*: *C. tropicalis* (RL 18 e 72P), *C. parapsilosis* (RL 36 e RL 13) e *C. krusei* (CK01 e CK 02). Todos os isolados estão depositados na micoteca do Grupo de Pesquisa em Micologia

Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As cepas estão conservadas em tubos com tampa, contendo ágar Sabouraud com dextrose, à temperatura ambiente.

Sal imidazólico contendo um ânion salicilato

Os LIs foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob coordenação do Prof. Dr. Henri S. Schrekker.

O início da síntese ocorre com a reação de um álcool (hexadecanol) com ácido metanossulfônico, obtendo-se o hexadecilsulfonato que através de uma reação de alquilação, reage com metilimidazol, à temperatura ambiente, gerando o LI 1- hexadecil-3-metilimidazólio metanosulfonato ($C_{16}MImMeS$).

Para a obtenção do LI salicilato de 1- hexadecil-3-metilimidazólio ($C_{16}MImC_7H_6O_3$) utilizou-se o LI $C_{16}MImMeS$, onde o sal de troca foi o salicilato de sódio. Neste caso o sal residual foi o NaCl que pode ser removido por purificação com diclorometano, no qual o produto é solúvel e NaCl completamente insolúvel.¹⁷

Avaliação da atividade antifúngica do sal imidazólico contendo um ânion salicilato

Preparação do inóculo fúngico dermatofítico

Utilizando o método de microdiluição em caldo, segundo as recomendações do Clinical Laboratory Standart Institute, documento M38-A2¹⁸ com algumas alterações, como referência, os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. Após a incubação em estufa a 32 °C, durante um período de 7 dias, as colônias foram cobertas com aproximadamente 4 mL de salina estéril e raspadas cuidadosamente com o auxílio de uma alça. Essa suspensão

contendo conídios e fragmentos de hifas foi aspirada com pipeta automática e transferida para um tubo estéril. As estruturas fúngicas mais pesadas foram descartadas durante repouso de 15 a 20 min e a parte superior da suspensão foi transferida para um novo tubo estéril. As leituras de densidade ótica destas suspensões foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm, obtendo-se leituras de transmissão entre 80 e 82% para cada isolado testado. A partir desta suspensão, foi preparada uma diluição de 1/100 em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EUA) tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS (Sigma) de modo a obter uma concentração final de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 células/mL.

Preparação do inóculo fúngico leveduriforme

Utilizando o método de microdiluição, segundo as recomendações do documento M27-A3 da CLSI,¹⁸ as amostras de levedura foram cultivadas em placas de Petri estéreis contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol a 32 °C por 24 h. Em seguida, com o auxílio de uma alça, tocou-se na superfície de 2 a 4 colônias com a mesma morfologia e suspendeu-se em solução estéril de salina a 0,9%. A suspensão fúngica apresentou turbidez equivalente à solução sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland (90% de transmitância) equivalente a 10^6 UFC/mL. Posteriormente, foi preparada uma diluição 1:50 em salina estéril e, a partir desta, diluiu-se 1:20 em RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo L-glutamina, sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 mol/L de tampão MOPS) para obter-se um inóculo de 1×10^3 a 5×10^3 células/mL (2x concentrado). Este último foi o inóculo usado nos experimentos.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para verificar a suscetibilidade das substâncias em teste, utilizou-se o teste de microdiluição em caldo seguindo o método proposto e padronizado pelo CLSI para quantificar a CIM. Para o ensaio de suscetibilidade foram utilizadas placas de microdiluição (microplacas) de 96 poços, com fundo

em forma de “U”, com tampa (ALAMAR®, Diadema, São Paulo, Brasil). As substâncias teste foram diluídas para obter concentrações na faixa de 250 a 0,24 µg/mL. Uma alíquota de 200 µL da substância na maior concentração foi adicionada na 1ª fileira da microplaca. Procedeu-se a diluição, com transferência de 100 µl da 1ª fileira para a 2ª; da 2ª para a 3ª e assim por diante até a 10ª fileira. Após, foram adicionados 100 µL do inóculo previamente preparado em RPMI. Foi também incluído no ensaio o controle positivo (somente o inóculo e meio de cultura) e o controle negativo (somente o meio de cultura).

As microplacas foram incubadas durante 7 dias a 32 ° C para dermatófitos e durante 48 h, na mesma temperatura, para leveduras. A leitura para determinação da CIM da substância sobre as cepas foi feita a partir do método visual, sendo considerada a formação ou não de aglomerados de células (“botão”) no fundo da cavidade da placa. Dessa forma, foi considerada como CIM a menor concentração da substância em teste capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento das cepas testadas no ensaio. Todos os isolados foram testados em duplicata.

Análise Estatística

Foi empregado o teste t de Student, utilizando o software Microsoft Office Excel 2007. Considerou-se um nível de confiança de 95%. Com a análise estatística, foram avaliadas as diferenças entre as CIM dos diferentes LIs ($C_{16}MImCl$ e $C_{16}MImC_7H_6O_3$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na síntese dos LIs, o método de alquilação tem inúmeras vantagens, entre elas: o processo é realizado à temperatura ambiente, sem a utilização de solventes, os produtos são sólidos cristalinos

e alguns podem ser purificados por simples recristalização em acetona. Os ânions alcanosulfonados podem ser facilmente substituídos por uma série de outros ânions (como Cl^- , NO_3^- , BF_4^-) por reação de troca iônica, em água, à temperatura ambiente.

O grau de pureza (> 99%) destes LIs pôde ser determinada por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , usando a intensidade dos satélites ^{13}C do grupo imidazólio do *N*-metilo como padrão interno.¹⁷

Concentração inibitória mínima

Como resultados do presente estudo, os isolados clínicos testados foram sensíveis ao LI $\text{C}_{16}\text{MImC}_7\text{H}_6\text{O}_3$, observando-se a inibição completa do crescimento fúngico em uma faixa de 7,81-125 $\mu\text{g/mL}$ para dermatófitos, e 7,81-62,5 $\mu\text{g/mL}$ para os isolados leveduriformes. Estes resultados foram comparados com as CIM resultantes dos ensaios feitos pelo grupo de pesquisa para o LI metilimidazol cloreto ($\text{C}_{16}\text{MImCl}$), este foi o LI escolhido para a comparação pois demonstrou pronunciada atividade antifúngica. (tabela 1).

Tabela 1: Comparação entre as CIM dos LIs $\text{C}_{16}\text{MImCl}$ e $\text{C}_{16}\text{MImC}_7\text{H}_6\text{O}_3$

Isolados	$\text{C}_{16}\text{MImC}_7\text{H}_6\text{O}_3$	$\text{C}_{16}\text{MImCl}$	Valor de <i>p</i>
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
Dermatófitos			
MCA 32	15,67	0,48	<i>P</i> > 0,05
MCA 38	31,25	0,48	<i>P</i> > 0,05
MGY 52	125	7,8	<i>P</i> > 0,05
MGY 53	7,81	1,9	<i>P</i> > 0,05
TME 38	15,67	0,48	<i>P</i> > 0,05
TME 46	62,5	0,48	<i>P</i> > 0,05
TRU 49	15,67	1,9	<i>P</i> > 0,05
TRU 54	62,67	0,48	<i>P</i> > 0,05

Leveduras			
RL 18	62,5	0,97	$P > 0,05$
72P	31,25	0,97	$P > 0,05$
RL 36	7,81	0,97	$P > 0,05$
RL 13	15,67	0,97	$P > 0,05$
CK 01	7,81	0,97	$P > 0,05$
CK 02	31,25	0,97	$P > 0,05$

Através da análise estatística, observou-se que as CIM para ambos os LIs não são significativamente diferentes ($P > 0,05$), demonstrando que a concentração do LI $C_{16}MImC_7H_6O_3$ necessária para inibir o crescimento fúngico é maior, quando comparado com o LI $C_{16}MImCl$, mas este aumento não é significativo, ou seja, a troca do ânion cloreto pelo salicilato não altera a atividade antifúngica do sal imidazólico.

Estudos prévios feitos pelo grupo sugerem que o mecanismo de ação dos LIs ocorre em dois passos²⁰. Primeiramente, o LI permeia a membrana da célula fúngica, onde se destaca a importância do cátion orgânico e do ânion inorgânico presente na estrutura dos LIs. O $C_{16}MImCl$ (figura 1) é uma molécula anfifílica, semelhante à bicamada lipídica da membrana das células, sendo sua penetração facilitada.²⁰ Possivelmente, esta seja a causa do aumento da CIM do LI $C_{16}MImC_7H_6O_3$ (figura 1). O salicilato é um grupamento volumoso e pode interferir na passagem da substância pela membrana.

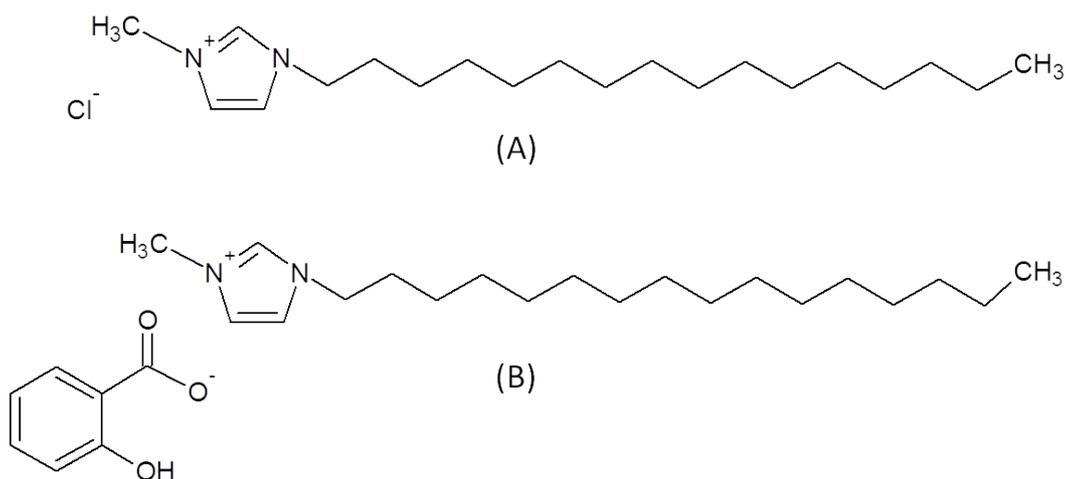


Figura 1. Fórmula estrutural dos LIs $C_{16}MImCl$ (A) e $C_{16}MImC_7H_6O_3$ (B)

O segundo passo do mecanismo de ação dos LIs é a inibição do Citocromo P450 fúngico, enzima envolvida na 14α - demetilação do lanosterol,²¹ essencial na conversão do lanosterol em ergosterol, um esterol específico que mantém as funções da membrana da célula fúngica.^{20,22}

Os LIs, assim como os antifúngicos imidazólicos comerciais, apresentam uma unidade imidazólica, como por exemplo o cetoconazol. Este antifúngico age através da ligação do nitrogênio do anel imidazólico com o ferro heme do citocromo P450, inibindo a enzima. Levando ao acúmulo de substâncias tóxicas, bem como a depleção do ergosterol. Estes efeitos causam uma perturbação das funções da membrana fúngica, destruindo a célula.²³

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, o presente estudo constatou que a troca do ânion cloreto pelo salicilato não altera a atividade antifúngica do LI. O salicilato é um grupamento com reconhecida atividade anti-inflamatória, por tanto pode ajudar no tratamento das micoses, pois a infecção

causada pela colonização dos dermatófitos e leveduras sobre o hospedeiro piora a patologia da doença.⁹

A atividade anti-inflamatória do LI C₁₆MImC₇H₆O₃ deve ser confirmada, pois em uma infecção fúngica, ter o controle do processo inflamatório pode potencializar o sucesso da terapia.

REFERÊNCIAS

- 1 Shao, P. L.; Huang, L. M.; Hsueh, P. R.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2007**, *30*, 487.
- 2 Palacio, A.; Garau, M.; Al., E.; *Rev. Iberoam. Micol.* **1999**, *16*, 101.
- 3 Miceli, M. H.; Díaz, J. A.; Lee, S. A.; *The Lancet Infect. Diseases* **2011**, *11*, 142.
- 4 Gullo, A.; *Drugs* **2009**, *69*, 8.
- 5 Chen, S. C. A.; Playford, E. G.; Sorrell, T. C.; *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 522.
- 6 Moriello, K. A.; Newbury, S.; *Veterin. Clin. of North America: Small Animal Practice* **2006**, *36*, 89.
- 7 Martinez-Rossi, N. M.; Peres, N. T. A.; Rossi, A.; *Mycopathol.* **2008**, *166*, 369.
- 8 Bandgar, B. P.; Gawande, S. S.; *Bioorganic & Med. Chem.* **2010**, *18*, 2060.
- 9 Garcia-Vidal, C.; Carratalà, J.; *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2012**, *30*, 151.
- 10 Kumamoto, C.; *Curr Opin Microbiol* **2011**, *14*, 386.
- 11 Isloor, A. M.; Kalluraya, B.; Sridhar Pai, K.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 825.
- 12 Zhao, H.; *Chem. Eng. Comm* **2006**, *193*, 1660.
- 13 Pernak, J.; Skrzypczak, A.; *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 901.
- 14 Petrović, Z. D.; Čomić, L.; Stefanović, O.; Simijonović, D.; Petrović, V. P.; *J. Mol. Liq.* **2012**, *170*, 61.
- 15 Markiewicz, M.; *Tese de Doutorado*, Chemical Faculty Department of Chemical Technology 2012.
- 16 Jastorff, B.; St'Ormann, R.; Al., E.; *Green Chem.* **2003**, *5*, 6.
- 17 Cassol, C. C.; Ebeling, G.; Ferrera, B.; Duponta, J.; *Adv. Synth. Catal* **2006**, *348*, 243
- 18 Rex, J. H.; Alexander, B. D.; Andes, D.; Arthingtin-Skaggs, B.; *CLSI - M38-A2* **2008**, *28*,
- 19 Huddleston, J. G.; Willauer, H. D.; Swatloski, R. P.; *Chem. Commun* **1998**, 1765
- 20 Schrekker, H. S.; Donato, R. K.; Fuentesfria, A. M.; Bergamo, V.; Oliveira, L. F.; Machado, M. M.; *Med. Chem. Comm.* **2013**, *4*, 1457.
- 21 Mellado, E.; Diaz-Guerra, T. M.; Cuenca-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J. L.; *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 2431.
- 22 Odds, F. C.; *Mycol.* **2003**, *17*, 51.
- 23 Musiol, R.; Kowalczyk, W.; *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1378.

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA QUÍMICA NOVA

**A REAÇÃO DE METÁTESE DE OLEFINAS: REORGANIZAÇÃO E CICLIZAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS** *título: todas as letras maiúsculas*

José A. Benício e Maria C. Cavalcante* *marcar com asterisco o autor que submeteu o artigo*

Aqui vai o endereço. Lembre-se de que a menor unidade usada deve ser o departamento (não citar laboratório, grupo, etc), depois instituto (se houver), depois universidade. Sempre tudo por extenso. Exemplo: Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

João D. de Almeida

Caso haja autores de outro instituto, separar os autores por endereço, como foi feito aqui. Nesse caso, aqui entra o endereço do João D. de Almeida

-----*marque as alternativas, não apague o texto em azul*-----

Marque uma das alternativas:

- Tenho apenas figuras em tons de cinza
- Tenho figuras coloridas e aceito custo da publicação impressa
- Tenho figuras coloridas, quero publicá-las coloridas apenas online e confirmo que a impressão dessas figuras em tons de cinza não prejudicará a compreensão

Marque uma das alternativas:

- Manuscrito com material suplementar
- Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: mcavalcante@servidor.com *email do autor que submeteu o artigo*

THE OLEFIN METATHESIS REACTION: REORGANIZATION AND CICLIZATION OF ORGANIC COMPOUNDS **título em inglês do seu manuscrito, com todas as letras maiúsculas e sem negrito**

Aqui deve ser escrito o abstract do seu artigo, não se esqueça de que ele deve apresentar no máximo 100 palavras.

Keywords: keyword1; keyword2; keyword3.

INTRODUÇÃO

Os títulos da seção são escritos com todas as letras maiúsculas e em negrito. Deve haver espaçamento antes e depois do título da seção.

Subtítulo1 subtítulo– Apenas a 1ª letra maiúscula, em negrito. Deve haver espaçamento antes e depois do subtítulo

Aqui entra o seu texto. Caso haja alguma citação a ser feita, ela deve seguir este padrão.¹ Caso queira citar um intervalo de três ou mais referências em sequência, use dessa forma.²⁻⁴ Quando forem apenas duas ou não estiverem em sequência, usar a vírgula.^{1,3,5} Repare que todas elas aparecem logo após a pontuação e não apresentam espaços.

Como pode perceber, os parágrafos não apresentam tabulações. Favor manter esse padrão durante todo o texto. Caso queira inserir uma figura, seguir o padrão como na Figura 1.

[INSERIR FIGURA 1]

Todas as figuras devem ter suas posições indicadas como feito anteriormente. Tabelas também são indicadas como mostra a Tabela 1.

[INSERIR TABELA 1]

Deve haver espaço entre número e unidade (por exemplo, 1 h) e as unidades devem ser abreviadas.

Termos ou expressões em inglês ou em latim – em itálico

Subtítulo2

Sub-subtítulo Sub-subtítulo de seção só a 1a em maiúscula e em itálico. Deve haver espaçamento apenas antes do sub-subtítulo.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior, utilizar o Material Suplementar. A resolução mínima é de 300 dpi. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica

Outro subtítulo do trabalho

Outro sub-subtítulo do trabalho

PARTE EXPERIMENTAL

Primeiro subtítulo da parte experimental

Primeiro sub-subtítulo da parte experimental

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiro subtítulo dos resultados e discussão

Primeiro sub-subtítulo dos resultados e discussão

CONCLUSÃO

MATERIAL SUPLEMENTAR

Quando houver material suplementar, ele deve ser indicado aqui, com a descrição do material, similar a: Algumas imagens dos sistemas utilizados neste trabalho estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos vão aqui. Caso queira agradecer a uma pessoa, apenas o último sobrenome deve ser por extenso, por exemplo A. B. Cardoso.

REFERÊNCIAS

Artigo:

1. Tavares, L. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 631.

Artigo de uma revista de difícil acesso – deve-se citar o número de Chemical Abstract

2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708. (CA 85:78051s).

Artigo com doi, mas sem a referência completa:

3. 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.

Patentes - na medida do possível o número do Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses:

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

5. Kadin, S.B.; *US pat. 4,730,004 1988*. (CA 110:P23729y)

6. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI 9.604.468-3, 1999*.

Livro com editor(es):

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

Livro sem editor(es):

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

Programas de computação (Softwares):

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

Teses:

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

Material apresentado em Congressos:

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

Páginas Internet:

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

P.S.: os títulos dos periódicos devem ser abreviados. Antes da submissão do trabalho, por favor, confira se as abreviaturas estão corretas no website: <http://www.cas.org/content/references/corejournals>. Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

Se a referência for livro, lembre-se de que é necessário indicar editora, cidade e ano de publicação.

Legendas de Figuras

Figura 1. *A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Figura 2. *A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Figura 3. *A descrição da figura deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Esquema 1. *A descrição do esquema deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Esquema 2. *A descrição do esquema deve ter esse formato. Em itálico e sem ponto final*

Tabelas

Tabela 1. Siga esse padrão. O título em negrito e a descrição do título sem negrito ou itálico. Não colocar ponto final

Ao final do rodapé das tabelas: deve ter ponto final.