

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

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO MICROBIOLÓGICO DE
DIFUSÃO EM ÁGAR – CILINDROS EM PLACAS PARA DOSEAMENTO DE
ANIDULAFUNGINA.**

Fernanda Battisti

Porto Alegre, 11 de junho de 2012.

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

**Desenvolvimento e validação de método microbiológico de difusão em ágar
– cilindros em placas para doseamento de anidulafungina.**

FERNANDA BATTISTI

Trabalho de Conclusão de Curso

ORIENTADORA: Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval
COORIENTADOR: Msc. Diogo dos Santos Miron

Porto Alegre, 11 de junho de 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, pelo conhecimento transmitido com muito empenho e dedicação. Em especial à Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela orientação e por ser um exemplo profissional a ser seguido.

À Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico por disponibilizar acesso ao conhecimento e infra-estrutura necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Diogo Miron pela coorientação, por ter sanado todas as minhas dúvidas durante todo este tempo de trabalho, e também por todo o apoio nos momentos difíceis.

À Magda Martins e ao LANAGRO/RS pelo auxílio nas análises com Espectrômetro de Massas.

Aos colegas de laboratório pelo auxílio e pelos momentos de descontração, em especial à Farmacêutica Mestranda Márcia pela ajuda e experiência na análise microbiológica.

Às amigas Alianise, Cristine, Cíntia e Fernanda por me darem amparo nos momentos de angústia.

Aos familiares, principalmente, meu pai, Arlindo, meu irmão, Gustavo, e minha cunhada, Elaine por me darem força e superarem comigo este momento.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| Abstract..... | 7 |
| 1 Introdução..... | 8 |
| 2 Parte Experimental..... | 10 |
| 2.1 Substâncias químicas | 10 |
| 2.2 Material e Equipamentos..... | 11 |
| 2.3 Purificação da Anidulafungina e Caracterização da Substância Química Caracterizada (SQC)..... | 11 |
| 2.4 Ensaio Microbiológico para antibióticos..... | 13 |
| 2.4.1 Preparo das soluções da substância caracterizada..... | 13 |
| 2.4.2 Preparo das soluções teste..... | 14 |
| 2.4.3 Microrganismo e preparação do inócuo..... | 14 |
| 2.4.4 Método de difusão em ágar..... | 15 |
| 2.5 Cálculos..... | 16 |
| 2.6 Validação..... | 16 |
| 2.6.1 Linearidade..... | 16 |
| 2.6.2 Precisão..... | 16 |
| 2.6.3 Exatidão..... | 17 |
| 2.6.4 Especificidade..... | 17 |
| 2.6.5 Estabilidade das soluções..... | 17 |
| 3 Resultados e discussão..... | 18 |
| 3.1 Linearidade..... | 22 |
| 3.2 Precisão..... | 23 |
| 3.3 Exatidão..... | 23 |
| 3.4 Especificidade..... | 23 |
| 3.5 Estabilidade..... | 24 |
| 4 Conclusão..... | 25 |
| Referências bibliográficas..... | 26 |
| Anexos..... | 32 |
| Anexo I – Normas para publicação da Revista Química Nova..... | 34 |

**Este manuscrito foi elaborado segundo as normas da Revista Química Nova,
apresentadas no Anexo 1.**

**Desenvolvimento e validação de método microbiológico de difusão em ágar
– cilindros em placas para doseamento de anidulafungina.**

Fernanda Battisti* (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Diogo S. Miron (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Elfrides E. S. Schapoval (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

*Autor para correspondência: Fernanda Battisti
E-mail: fernandabattisti@yahoo.com.br

Abstract

Equinocandins is a new class of antifungic used for systemic infection. The anidulafungin is a new equinocandin that has fungicide activity against *Candida spp.* and fungistatic activity against *Aspergillus spp.* There is not microbiological assay about the potency of anidulafungin in papers. The aim of this study is develop and validate a microbiological assay to determine the potency of anidulafungin. The parametres analyzed during the validation was linearity ($r=0.992$), precision (DPR < 5%), accuracy (99.4%) and specificity. The results show that the method is suitable to quality control.

Keywords: anidulafungin, microbiological assay, *Candida albicans*,

1 Introdução

A anidulafungina é um novo antifúngico que pertence à classe das equinocandinas, da qual também fazem parte a caspofungina e a micafungina, com grande potência fungicida contra *Candida spp.* e fungistática contra *Aspergillus spp.*, incluindo cepas resistentes aos antifúngicos azólicos e à anfotericina B.¹ A anidulafungina é um fármaco de primeira linha indicado para o tratamento da candidíase invasiva,² esta infecção causada pela levedura do gênero *Candida spp.* é uma das mais sérias e frequentes, principalmente, em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI).³ As equinocandinas são lipoexapeptídeos semissintéticos cíclicos com massas moleculares de aproximadamente 1200 Da., que eram originalmente derivadas de fungos,⁴ pois eram sintetizados a partir de um produto da fermentação do *Aspergillus nidulans*.⁵ A anidulafungina (Figura 1), inibe seletivamente a 1,3- β -D glucana sintase, uma enzima presente nas células fúngicas, mas não está presente nas células de mamíferos,⁶ tornando o fármaco mais seletivo, causando menos efeitos colaterais aos pacientes, com mínima toxicidade.⁷ A excelente potência antifúngica, único mecanismo de ação e a baixa toxicidade das equinocandinas fazem delas uma promessa para estudos de otimização voltados para o desenvolvimento de novos antifúngicos e agentes com índice terapêutico aumentado.⁸

Na literatura, encontram-se poucos trabalhos envolvendo estudos com a anidulafungina. Martens-Lobenhoffer e colaboradores (2011) desenvolveram método para detecção quantitativa da anidulafungina em plasma humano, no qual há uma comparação entre a característica da performance da detecção por UV e da detecção por espectrometria de massas.¹ Sutherland e colaboradores

(2011) descrevem método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação da anidulafungina em plasma humano e salina, visando futuros estudos farmacocinéticos e estudos *in vitro* de estabilidade.⁹ Método por UPLC-EMEM é descrito para análise simultânea de seis diferentes fármacos antifúngicos, dentre eles a anidulafungina.¹⁰ Na literatura pesquisada também foram encontrados dois estudos microbiológicos, dos quais um disserta sobre a adição de tensoativos para aumentar os halos de inibição no método de difusão em discos, sendo que a concentração de 0,1% de polissorbato 80 apresentou halos maiores.¹¹ O mesmo grupo de estudos fez um ensaio de controle de qualidade para discos de difusão com 2 µg de anidulafungina para avaliar a concentração inibitória mínima (MIC) para *Candida spp.*¹² Entretanto, não foram encontrados estudos com métodos microbiológicos para avaliar a potência da anidulafungina, fazendo-se necessário o desenvolvimento e a validação de um método.

O primeiro ensaio de difusão em ágar foi desenvolvido na Universidade de Oxford, em 1940, por um bioquímico chamado Heatley para a recém descoberta penicilina.¹³ Era um método de certa forma precário, já que não havia muito conhecimento sobre o assunto, porém com o aumento do número de antibióticos a técnica foi aprimorada, como por exemplo, pelo emprego de meios de cultura adequados para cada microrganismo. O método atual de difusão em ágar com cilindros em placas se caracteriza por ser um método na qual uma zona de inibição é formada através da interação entre a substância inibidora de crescimento que difunde pelo ágar e o crescimento da população de microrganismos sensíveis que foi inoculada previamente no gel de ágar.¹³ Esta técnica caracteriza-se por ser simples, necessitando de pequeno preparo

técnico, é também, considerado um método não oneroso, pois não necessita de equipamentos e solventes de elevados custos que muitas vezes os laboratórios de controle de qualidade podem não dispor. Portanto, este ensaio microbiológico para se determinar a potência de fármacos torna-se uma alternativa de grande valia, trazendo resultados seguros e confiáveis.

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método microbiológico de difusão em ágar - cilindros em placas, visando fornecer à comunidade científica uma nova alternativa para se avaliar a potência do fármaco anidulafungina em sua forma farmacêutica - pó liofilizado de uso hospitalar.

2 Parte experimental

2.1 Substâncias químicas

As substâncias químicas foram adquiridas comercialmente. Frascos do medicamento Ecalta[®], do Laboratório Farmacêutico Pfizer, foram utilizados no presente estudo, cada frasco contendo o equivalente a 100 mg de anidulafungina apresentada na forma de pó liofilizado para infusão intravenosa. As amostras foram identificadas pelo lote 0BKDH, validade 2013. A formulação é constituída por anidulafungina e seus excipientes: ácido tartárico, frutose, manitol e polissorbato 80. Amostras foram utilizadas para se obter a substância química caracterizada, e outras foram utilizadas como amostras teste para determinação da potência e validação do método proposto.

A água purificada utilizada para os experimentos foi obtida usando equipamento Milli-Q Plus[®] (Millipore, Bedford, EUA) e, posteriormente, esterilizada em autoclave. O cloreto de sódio foi obtido da Quimex (Rio de Janeiro, Brasil) e o meio Sabouraud dextrose (AES Laboratoire - França).

2.2 Material e equipamentos

A esterilização dos materiais e meio de cultura foi realizada em autoclave Webeco[®] Modelo C (Farjestaden, Suécia). Os tubos de ensaio, pipetas e placas de Petry foram esterilizados em estufa (Nova Ética[®] Modelo 400D300) a 200 °C por 90 min.

Para purificação e quantificação da anidulafungina foi utilizado cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent[®] (Santa Clara, EUA), equipado com um sistema de bombas quaternárias modelo Q 1311A, auto-amostrador ALS-G1329A, forno TCC-G1316A, detector de fotodiodos G1315B e para controlar e analisar os dados foi empregado o software ChemStation Manager[®].

A transmitância do inóculo foi medida em espectrofotômetro Analyser[®] (São Paulo, Brasil). O diâmetro dos halos de inibição foi medido com paquímetro digital Mitutoyo[®] (Tóquio, Japão).

2.3 Purificação da Anidulafungina e Caracterização da Substância Química Caracterizada (SQC)

Para purificação da anidulafungina a partir do pó liofilizado foi empregado um sistema de gradiente com Coluna Betabasi C-8 (250 x 4,6 mm; 5,0 μm), vazão de 1,2 ml/min, tempo de corrida de 35 minutos, comprimento de onda de análise 305 nm e temperatura 25 °C. Nos primeiros 10 minutos a fase móvel utilizada foi água e metanol (60:40, v/v), na segunda etapa do gradiente, aumentou-se a porcentagem de metanol ficando, água e metanol (20:80, v/v) e na terceira etapa utilizou-se água e metanol (5:95). A anidulafungina foi coletada na etapa dois do gradiente a partir do momento que o sinal em 305 nm apresentava acréscimo acentuado. Posteriormente, adicionou-se água à fração coletada e efetuou-se a extração da anidulafungina com acetato de etila. Após, centrifugação para separação das fases, a fase orgânica contendo acetato de etila e anidulafungina foi evaporada. O resíduo sólido foi coletado e armazenado em geladeira (2 - 8 °C) e, posteriormente, foi caracterizado por CLAE-UV e análise por espectrometria de massas.

A análise por espectrometria de massas foi realizada em Espectrômetro de Massas Micromass[®] modelo Quattro LC (Montreal, PQ, Canadá) equipado com ionização por *electrospray* com fonte operando no modo positivo e os sinais obtidos foram controlados pelo Programa MassLynx[®] (version 3.5). As condições de análise foram otimizadas para inserção direta com a anidulafungina em concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ com diluente composto por metanol e ácido fórmico 0,1%. O fluxo empregado foi de 10 $\mu\text{L/min}$. As análises foram realizadas com voltagem do capilar, voltagem do extrator, voltagem das lentes *RF*, temperatura da fonte, temperatura da sonda do *electrospray*, voltagem do cone, fluxo de gás de dessolvatação e do cone iguais a 3 kV, 3 V, 0,3 V, 120 °C, 350 °C, 40 V, 400 L/h e 50 L/h, respectivamente.

Nos estudos para caracterizar a SQC, avaliar a estabilidade e a degradação forçada das soluções em teste, o seguinte método foi utilizado: coluna Betabasi[®] C-8 (250 mm x 4,6 mm; 5,0 µm), fase móvel água e acetonitrila (52:48, v/v), volume de injeção 20 µl, vazão 1,2 mL/min, tempo de corrida de 15 min, comprimento de onda de análise 305 nm e temperatura do forno de 25 °C.

2.4 Ensaio microbiológico

2.4.1 Preparo das soluções da substância química caracterizada

O equivalente a 10 mg de anidulafungina SQC foi pesado e transferido, quantitativamente, para um balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e agitado até completa dissolução do fármaco. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de solução contendo 50 mg de polissorbato 80 em meio aquoso. Finalmente, o volume foi completado, vagarosamente, com água ultrapura, de maneira a se obter solução com concentração de 200 µg/mL. Esta solução recebeu o código de *P1*, a partir desta foram retirados 3 mL, transferidos para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com diluente (DMSO 4% e polissorbato 80 0,1%), obtendo-se *P2* com concentração de 60 µg/mL. Paralelamente, foi retirada uma alíquota de 1 mL de *P1* e transferido para balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com o diluente, tendo-se *P3* com concentração de 18 µg/mL.

2.4.2 Preparo das soluções teste

Foi pesado da amostra teste de pó liofilizado o equivalente a 4 mg de anidulafungina e transferiu-se, quantitativamente, para balão volumétrico de 20 mL com auxílio de 10 mL de solução previamente preparada de DMSO 4% e polissorbato 80 0,1% (diluyente). A amostra foi mantida em ultrassom por 10 minutos e o volume foi completado com o diluyente, obtendo-se uma solução de concentração teórica de 200 µg/mL, esta foi utilizada como o ponto mais alto do ensaio. Alíquotas de 3 mL e 1mL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com diluyente. Foram obtidas concentrações de 60 µg/mL e 18 µg/mL, respectivamente. Portanto as concentrações teóricas utilizadas foram de 200 µg/mL, 60 µg/mL e 18 µg/mL (denominadas A1, A2 e A3).

2.4.3 Micro-organismo e preparação do inóculo

A cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 foi obtida do INCQS (Rio de Janeiro, Brasil) e o micro-organismo, após reconstituição, foi mantido em meio Sabouraud Dextrose. O procedimento de preparo do inóculo foi realizado conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira (FB5, 2010). O microrganismo foi repicado para tubo, contendo meio Sabouraud Dextrose inclinado, 48 horas antes do ensaio e mantido a 25 ± 2 °C. Durante o ensaio foi preparada suspensão com este microrganismo em solução estéril de cloreto de sódio 0,9%. Para padronizar a quantidade de micro-organismo, foi medida a transmitância da suspensão, utilizando espectrofotômetro ajustado com branco de solução estéril de cloreto de sódio 0,9%, em 580 nm e caminho óptico de 10

mm, até que a transmitância atingisse $25 \pm 2\%$. Desta solução salina inoculada, foi retirado 1,0 ml para cada 100 ml de meio Sabouraud Dextrose, mantido em banho de aquecimento a $47\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtendo-se inóculo a 1% para ser aplicado sobre a camada base.

2.4.4 Método de difusão em ágar

O método desenvolvido neste trabalho seguiu o delineamento 3 X 3. Cada ensaio foi realizado utilizando seis placas. A camada base, composta de 20 mL de meio Sabouraud Dextrose, foi adicionada em placa de Petry de 100 mm x 20 mm. Após solidificação, foram adicionados 5 mL de meio Sabouraud Dextrose, inoculado com o micro-organismo *Candida albicans*, sobre a camada base. Deixou-se em repouso até solidificar esta camada e após colocou-se os cilindros. A cada cilindro foram adicionados 200 μL das soluções padrão e teste de forma a ficarem alternados.

As placas foram incubadas à $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa Heraeus Modelo B5042 (Alemanha), por 24 horas. Após o tempo de incubação, os halos de inibição do crescimento microbiano foram, cuidadosamente, medidos com o auxílio de paquímetro. Todos os experimentos foram realizados em sala de temperatura ambiente de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ com cabine de fluxo laminar Veco Modelo HFLS-12 M (São Paulo, Brasil), e os materiais em contato com o micro-organismo foram descontaminados em autoclave e descartados, conforme Plano de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

2.5 Cálculos

Elaborou-se gráfico de logaritmo da concentração *versus* o diâmetro do halo de inibição para obtenção da curva padrão e equação da reta. A análise estatística dos resultados foi feita por meio da análise da variância (ANOVA), avaliando-se a regressão, paralelismo e a linearidade de cada ensaio. A potência do liofilizado de anidulafungina para infusão intravenosa foi estatisticamente calculada pelo método de linhas paralelas (delineamento 3X3).

2.6 Validação

A validação do método foi realizada de acordo com a RE 899/03¹⁵ e o ICH¹⁶, e os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, precisão, exatidão e especificidade.

2.6.1 Linearidade

Foram desenvolvidas nove curvas padrão, três por dia do ensaio de precisão, com três níveis de concentração cada uma. A equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) foram calculados.

2.6.2 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e precisão intermediária, e expressa como desvio padrão relativo (DPR). A repetibilidade foi avaliada com três réplicas realizadas em um mesmo dia sob as mesmas condições, e a precisão intermediária pela análise em três dias diferentes.

2.6.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação da substância química caracterizada (SQC), onde se adicionou quantidades da mesma no branco, composto pelos excipientes. As quantidades avaliadas foram de 80%, 100% e 120%, respectivamente.

2.6.4 Especificidade

A especificidade do método foi avaliada através da verificação da interferência dos excipientes presentes na solução amostra. Foi preparada uma solução branco contendo todos os excipientes, foi ajustado o pH de acordo com a solução amostra (pH 5,6). Essa solução branco foi confrontada com a solução contendo a substância química caracterizada na mesma placa do ensaio.

2.6.5 Estabilidade das soluções teste

Para se avaliar a estabilidade em ácido e base da solução teste pesou-se duas amostras de 40 mg de liofilizado equivalentes a 4 mg de anidulafungina, e procedeu-se conforme o preparo das soluções teste (item 2.4.2). Porém, ao invés de diluente utilizou-se solução 0,01 M de HCl ou 0,01 M de NaOH. Essas soluções foram deixadas em repouso em temperatura

ambiente, durante 48 horas e depois procedeu-se às análises por CLAE-UV e ensaio microbiológico.

3 Resultados e discussão

Para obtenção da Substância Química Caracterizada (SQC), utilizada como padrão, foi desenvolvido método de purificação da amostra comercial e posterior caracterização para avaliação da pureza do fármaco obtido. A Farmacopeia Brasileira (2010) descreve que não havendo uma substância química de referência, pode ser utilizada uma SQC desde que seja realizada por ensaios químicos adequados.¹⁷

A purificação deu-se por cromatografia a líquido de alta eficiência, por meio de um método por gradiente, conforme descrito no item 2.3. Assim, foi possível separar cada fração com os diferentes excipientes, permitindo a separação destes da anidulafungina. Na primeira fase do método foi inserida em uma das bombas do cromatógrafo uma solução superconcentrada, contendo aproximadamente 50mg de anidulafungina, com a amostra dissolvida em metanol 40%, esta solução foi rapidamente levada para dentro da coluna e continuou-se utilizando metanol 40% na fase móvel. Como a frutose, o manitol e o ácido tartárico têm pouca afinidade pela coluna, estes rapidamente coeluíram juntamente com a fase móvel. Como se esperava, o problema seria separar a anidulafungina do polissorbato 80, pois são moléculas pesadas e lipofílicas e provavelmente demorariam para sair da coluna. Por isso, desenvolveu-se um gradiente que possibilitasse a separação dos dois compostos. Previamente foram feitos diversos testes, assim identificando que

em metanol 80% o pico da anidulafungina tem um tempo de retenção de 4,5 minutos, enquanto que o polissorbato 80 tem um tempo de retenção de 15 minutos, aproximadamente. Dessa maneira, foi planejado que após 10 minutos de metanol 40% fosse aumentada a proporção para 80% do mesmo, então as moléculas de anidulafungina que estavam aderidas à coluna começariam a fluir. A partir deste momento, em torno de cinco minutos após a troca de fase móvel, iniciou-se a saída da anidulafungina. Procedeu-se a coleta do fármaco e, após transcorridos 25 minutos de corrida, mudou-se a proporção de metanol para 95% para que o polissorbato 80 também eluisse da coluna, deixando-a limpa. A corrida se estendeu a 35 min para garantir a saída total do polissorbato 80. Analisou-se a porção coletada de anidulafungina em espectrofotômetro Shimadzu® Modelo UV-160A (Tóquio, Japão) através da realização de varredura na faixa de 200–400 nm, na qual foi verificada a presença do fármaco (comprimento de onda máximo em 305 nm). O procedimento seguinte foi o de precipitar a anidulafungina através da adição de água para posterior extração com acetato de etila. A porção contendo anidulafungina foi evaporada, obtendo-se um pó branco, cristalino, com rendimento de aproximadamente 50%.

A Figura 2.a apresenta o cromatograma em 200 nm da anidulafungina purificada. O fármaco apresenta pico em torno de 10,6 min, com índice de pureza do pico igual a 1,000. Neste caso, a linha de base é estável e verifica-se, além do pico do fármaco, pico intenso do solvente DMSO próximo ao *volume morto*. Os cromatogramas obtidos para amostra de pó liofilizado (Figura 2.b) também apresentam o pico da anidulafungina (~10,6 min), porém se verifica que a linha de base se altera significativamente entre os tempos 3,0 e

9,0 min, possivelmente devido a presença dos excipientes que não possuem absorção significativa em 200 nm, porém alteram a linha de base significativamente. A comparação dos cromatogramas permite inferir que os excipientes verificados na amostra de pó liofilizados não encontram-se presentes na anidulafungina purificada. A Figura 2.c apresenta os espectros UV sobrepostos da anidulafungina purificada e amostra do pó liofilizado. Como os tempos de retenção e os espectros das duas amostras são semelhantes e não se verificaram picos adicionais no cromatograma da anidulafungina purificada, pode-se inferir que o processo de purificação foi capaz de isolar a anidulafungina sem que ocorresse a degradação do fármaco.

A Figura 3 apresenta os espectros de massas obtidos por inserção direta para anidulafungina purificada e pó liofilizado. Além da anidulafungina que possui peso molecular de 1140 g/mol, o pó liofilizado possui também o polissorbato 80 com alto peso molecular (aproximadamente 1310 g/mol). A comparação dos espectros de massas das Figuras 3.a e 3.c permite verificar claramente que a anidulafungina purificada apresenta menor quantidade de quebras e menor abundância dos íons fragmentados em relação ao pó liofilizado que contém o polissorbato 80. Além disso, as Figuras 3.b e 3.d demonstram novamente que a amostra da anidulafungina purificada apresenta espectro dos íons fragmentados com menor frequência em relação à amostra de pó liofilizado. Estes resultados são indicativos de que o processo de purificação foi capaz de separar satisfatoriamente a anidulafungina e o polissorbato 80.

Com as análises por CLAE-UV e espectrometria de massas foi possível caracterizar a anidulafungina purificada e utilizá-la com SQC.

A anidulafungina é um fármaco com pouca solubilidade em água, por isso um de seus componentes em formulação é um tensoativo, o polissorbato 80. A partir do momento que foi retirado o polissorbato 80 da amostra, houve uma grande dificuldade de se encontrar uma maneira de dissolver o fármaco sem prejudicar o ensaio microbiológico. Na literatura, existe um estudo que relata a adição de polissorbato 80 e DMSO.¹¹ Após diversas tentativas, foi possível a dissolução da substância química caracterizada de maneira que a composição final do solvente consiste em DMSO 4% e polissorbato 80 0,1% em meio aquoso. Foi verificado que as substâncias utilizadas como diluente não influenciaram os halos de inibição, através de ensaio com três placas incubadas com a solução diluente em placas contendo a *C. albicans*. A confirmação da não interferência se comprovou pelo crescimento microbiano sem halos de inibição onde havia a solução branco (excipientes + diluente). Então, procedeu-se a validação do método.

Um ensaio biológico é definido como “um procedimento prático através do qual a potência de um material de potência desconhecida é estimada por uma comparação dos seus efeitos no sistema biológico com aquele com um padrão de referência de potência conhecida ou definidos”.¹³ A potência ou atividade de um produto que contenha antibiótico pode ser determinada comparando a dose que inibe o crescimento de um micro-organismo em relação à dose de uma substância de referência do antibiótico que produz inibição similar.^{17,18} Para tanto, o método de difusão é largamente utilizado para determinação da potência de antimicrobianos, pois é um método simples e com custos bem acessíveis.

A Farmacopeia Brasileira (2010) descreve o delineamento 2X2, 3X3 e 5X1 para o método de difusão em ágar. O delineamento de escolha foi o 3X3, onde se dispõem três concentrações diferentes da amostra versus padrão concomitantemente, na mesma placa, nas concentrações baixa, média e alta. A potência real da amostra é revelada pela distância entre as retas paralelas, sendo calculada a partir de valores médios de seis doses, consideradas as réplicas efetuadas.¹⁴ Para o ensaio, foram utilizadas as concentrações de 200, 60 e 18 µg /mL, tanto para a amostra como para o padrão. Utilizando assim o fator de diluição igual a 3,33, obedecendo uma progressão geométrica para as concentrações usadas na curva de dosagem.

3.1 Linearidade

Para ser calculada a linearidade assume-se que a medida da zona de inibição é diretamente proporcional ao logaritmo da concentração (Figura 4.a). A equação da reta encontrada através da análise de regressão linear para a anidulafungina foi $y = 3,2831x + 10,49$, com coeficiente de determinação de 0,992 (Figura 5). A análise da variância demonstrou que o método não apresenta desvio de linearidade e de paralelismo ($p > 5\%$) e que há regressão linear significativa ($p < 5\%$) em todos os ensaios realizados durante a validação do método analítico. Portanto, o método demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra.

3.2 Precisão

Os resultados da análise da precisão foram expressos como DPR dos valores obtidos pela repetibilidade e precisão intermediária na determinação da anidulafungina. A repetibilidade foi verificada por meio de três ensaios em um mesmo dia, sob as mesmas condições, e a precisão intermediária teve seu DPR calculado com os resultados obtidos em três diferentes dias de análise. Os valores de DPR encontrados para repetibilidade e precisão intermediária foram inferiores a 5%, indicando a precisão do método, conforme a RE 899/03.¹⁵ Por consequência, a precisão foi demonstrada pelo ensaio, os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1.

3.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através da recuperação da SQC adicionada numa solução branco contendo os excipientes. Foram feitos três ensaios cada um contendo o equivalente a 80,0%, 100,0% e 120,0% da SQC. As percentagens encontradas foram de 82,8%, 97,0% e 117,23% que representam recuperação de 103,5%, 97,0% e 97,7%, respectivamente. A recuperação média foi de 99,4%, mostrando que há uma relação entre a quantidade de analito adicionada com a potência calculada.

3.4 Especificidade

Utilizaram-se excipientes e diluentes da formulação para análise de especificidade. Não houve formação de halos de inibição nas condições de

estudos utilizando o branco (Figura 4.b), revelando que não há interferência dos excipientes da amostra nos resultados obtidos.

Foi feita a degradação forçada por hidrólise ácida e básica. Após deixar o fármaco em contato por 48 horas em solução ácida de HCl 0,01M e básica de NaOH 0,01M, observou-se a degradação total do fármaco em solução básica, não havendo formação de halos no ensaio microbiológico, enquanto que em solução ácida o fármaco permaneceu estável não havendo uma degradação significativa, produzindo halos semelhantes aos da amostra não degradada no ensaio microbiológico.

Em análise por CLAE-UV foi constatado o quase total desaparecimento do pico da anidulafungina em meio básico após exposição de 150 minutos em solução básica (Figura 6.a) e o total desaparecimento do pico da anidulafungina quando exposta por 48 horas. Assim, é possível concluir que os produtos de degradação formados não influenciam no ensaio microbiológico, já que eles não formaram halos de inibição, tornando o método específico para a anidulafungina.

3.5 Estabilidade

No estudo de estabilidade em meio ácido e básico, observou-se a degradação do fármaco com a solução básica como pode ser observado na análise por CLAE-UV de diferentes amostras no tempo 150 min (Figura 6.a-d). A degradação da anidulafungina em NaOH 0,01M é rápida e mesmo no tempo zero já se verifica degradação do fármaco (Figura 7.a). Após 150 min é observada a degradação quase que total da anidulafungina (Figura 7.b).

Ressalta-se que em meio ácido não houve degradação da molécula, permanecendo estável e com a potência inalterada.

4. Conclusão

No controle de qualidade é importante que existam métodos validados que possam fornecer resultados confiáveis. Portanto, conclui-se que o método microbiológico de difusão em ágar – cilindros em placas desenvolvido para anidulafungina, pó liofilizado para infusão intravenosa, é linear, preciso, exato e específico, desta forma contribuindo com método alternativo para análise quantitativa do fármaco. Além disso, a anidulafungina mostrou-se extremamente suscetível a degradação no meio básico avaliado (NaOH 0,01 M) e estável em meio ácido (HCl 0,01 M).

Referências bibliográficas

1. Martens-Lobenhoffer, J.; Rupprecht, V.; Bode-Boger, S. M.; J. Chromatogr., B 2011, 879, 2051– 2056.
2. www.pfizer.com.br/arquivoPDF.aspx?161.pdf Acessado em junho de 2012.
3. Mensa, J.; Pitart, C.; Marco, F.; Int. J. Antimicrob. Agents 2008, v. 32, nº 2, p. 93–97.
4. Dennin, D. W.; Hope, W. W.; Trends Microbiol. 2010, V.18, nº. 5, p. 195 – 204.
5. Cross, D. M.; Chmielewski, G.; Lewis, E. M.; Liu, L.; Modesitt, M. S.; Ripp, S. L.; Sawaryn, C. M.; Bowman, C. J.; Plan. Regul. Toxicol. and Pharmacol. 2012,v. 63, p. 29–39.
6. Castro, T. L.; Coutinho, H. D. M; Gedeon,C. C.; Dos Santos, J. M.; De Santana, W. J.; De Souza, L. B. S.; Infarma 2006, v.18, nº 9 - 10, p. 30 – 35.
7. Quindós, G.; Eraso, E.; Revista Iberoam Micol 2008 v. 25, p. 83-91.
8. Yao, J.; Liu, H.; Zhou, T.; Chen, H.; Miao, Z.; Dong, G.; Wang, S.; Sheng, C.; Zhang, W.; Tetrahedron 2012,v. 68, p. 3074-3085.
9. Sutherland, C. A.; Nicolau, D. P.; Kuti, J. L.; J. Chromatogr. Sci. 2011, V. 49, p. 397-400.
10. Decosterd, L. A.; Rochat, B.; Pesse, B.; Mercier, T.; Tissot, F.; Widmer, N.; Bille, J.; Calandra, T.;Zanolari, B.; Marchetti, O.; Antimicrob. Agents Chemother. 2010, v. 54, nº 12, p. 5303–5315.
11. Jones, R. N.; Kirby, J. T.; Messer, S. A.; Sheehan, D. J.; Diag. Microbiol. and Infec. Dis. 2007, v. 58, p.371–374.
12. Jones, R. N.; Ross, J. E.; Sheehan, D.J.; Diag. Microbiol. and Infec. Dis. 2008, v. 62, p. 474–477.
13. Hewitt, W.; Microbiological Assay for Pharmaceutical Analysis: a Rational Approach, Interpharm, Boca Raton, 2003.
14. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Pinto, A. F. Controle de qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos 3ª ed. Atheneu Editora São Paulo, 2010. Cap. 12, pág.634.
15. ANVISA. Resolução nº899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, 2003.
16. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use: Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology — Q2(R1), 2005.
17. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. Brasília, 2010. Volume 1, 5.5.3.3.
18. Paim, C. S.; Führ, F.; Bartha, A. B.; Gonçalves, C. E. I.; Nardi, N.; Steppe, M.; Schapoval, E. E. S.; Talanta 2011, v. 83, p. 1774-1779.

Figura 1. Estrutura química da anidulafungina. Fonte: Merck, 2009.

Figura 2. Cromatogramas em 200 nm da anidulafungina a) purificada; b) pó liofilizado; c) sobreposição dos espectros da anidulafungina purificada e pó liofilizado.

Figura 3. Espectro de Massas da anidulafungina obtido por inserção direta. a) purificado; b) *filho* do íon molecular (1140 m/z) do purificado; c) pó liofilizado; d) *filho* do íon molecular (1140 m/z) do pó liofilizado.

Figura 4. Fotografia dos halos de inibição obtidos na análise de (a) anidulafungina SQC na concentração de 18 $\mu\text{g/ml}$ (P1), 60 $\mu\text{g/ml}$ (P2) e 200 $\mu\text{g/ml}$ (P3) e de anidulafungina pó liofilizado para infusão na concentração de 18 $\mu\text{g/ml}$ (B1), 60 $\mu\text{g/ml}$ (B2) e 200 $\mu\text{g/ml}$ (B3) e (b) fotografia do halo de inibição formado pelo padrão no ponto médio (P2) e o total crescimento onde havia a solução branco (diluyente + excipientes).

Figura 5. Curva padrão da anidulafungina obtida pelo ensaio microbiológico – método de difusão em ágar / cilindros em placas.

Figura 6. Cromatogramas das amostras de anidulafungina em 305 nm após 48 h em solução (a) em meio básico, (b) amostra teste, (c) SQC e (d) em meio ácido.

Figura 7. Cromatogramas em 305 nm da anidulafungina diluída em solução de NaOH 0,01 M (a) tempo zero, (b) tempo 150 minutos.

Tabela 1. Dados de precisão para o bioensaio do pó liofilizado para infusão intravenosa de anidulafungina.

Figura 1

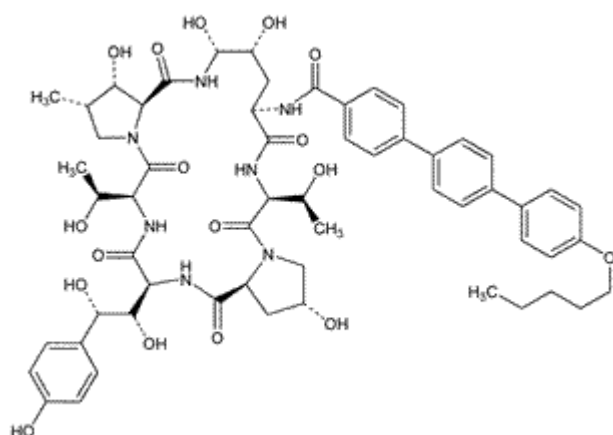


Figura 2

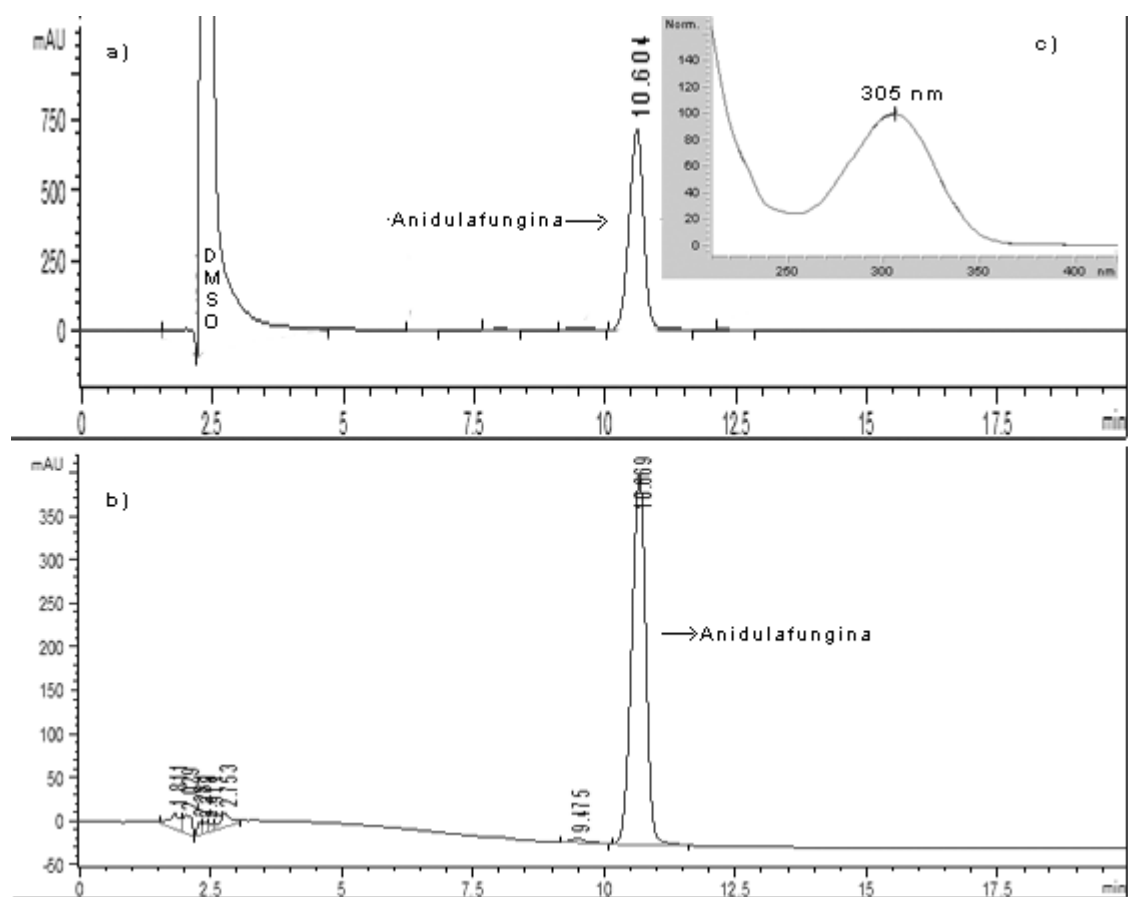


Figura 3

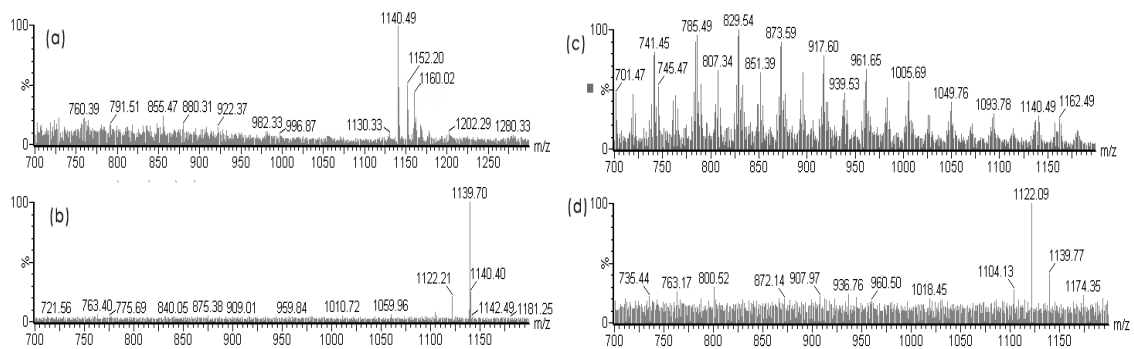


Figura 4

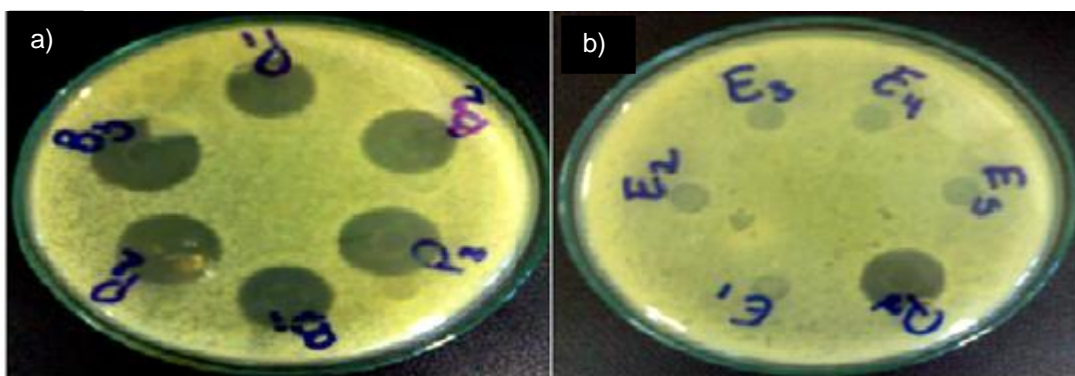


Figura 5

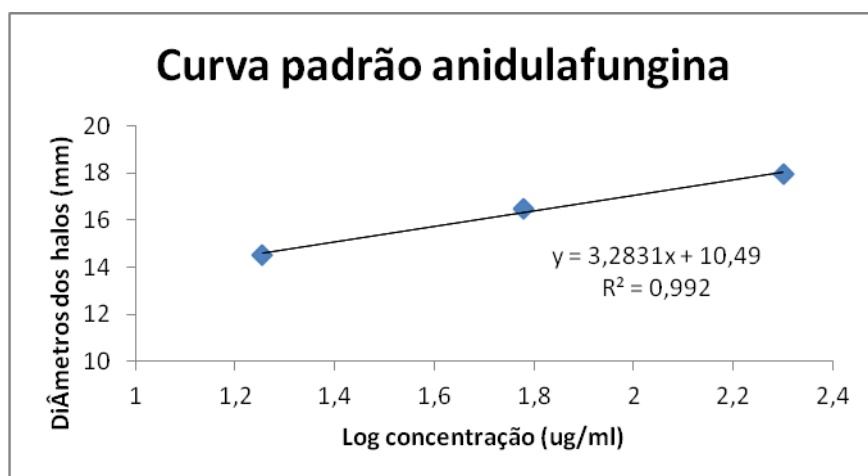


Figura 6

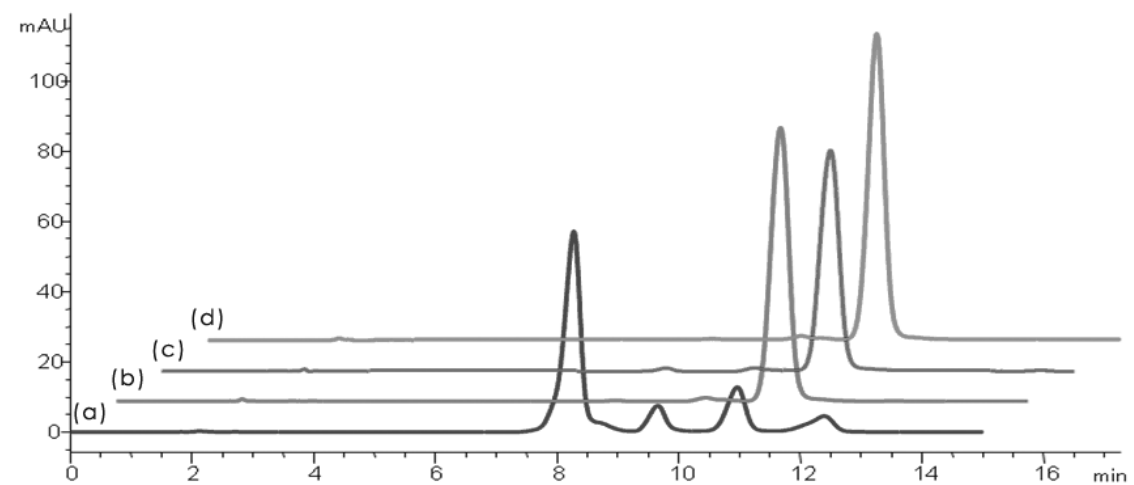


Figura 7

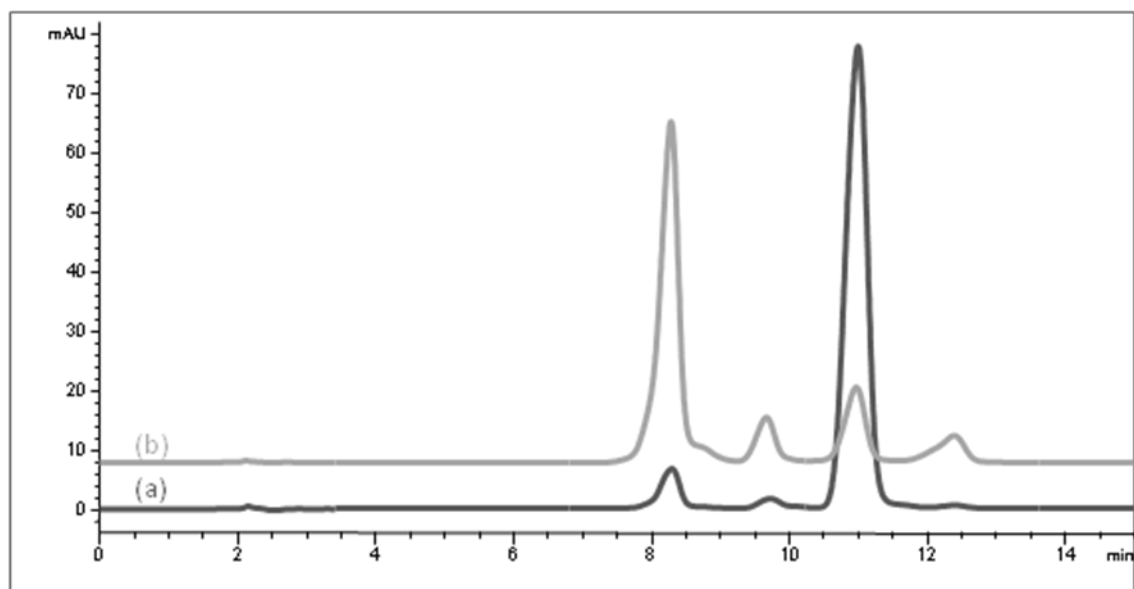


Tabela 1

| Amostra | Dia | Potência encontrada (%)* | Média (%) | DPR (%) |
|-------------------------------|------------|---------------------------------|------------------|----------------|
| 1 | 1 | 107,8 | 107,4 | 0,51 |
| 2 | | 107,7 | | |
| 3 | | 106,8 | | |
| 4 | 2 | 107,8 | 108,0 | 0,76 |
| 5 | | 107,3 | | |
| 6 | | 108,9 | | |
| 7 | 3 | 107,3 | 106,8 | 1,28 |
| 8 | | 107,9 | | |
| 9 | | 105,3 | | |
| Precisão intermediária | | | 107,4 | 0,99 |

*Cada valor representa a média de seis placas

ANEXOS

ANEXO 1 – Normas de publicação da Revista Química Nova

NORMAS DE PUBLICAÇÃO

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos 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. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): 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, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. 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 Corpo Editorial de *QN* poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): 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 etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS - Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser

submetido através do sistema *on line de QN*. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

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 ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*).. 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. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando

o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de *QN* junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). 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.

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. Zaved.; 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.

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:

4. 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.sbq.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.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

SUBMISSÃO DOS ARTIGOS – A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.s bq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato *.pdf*. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo *.pdf*, a partir de arquivo *.doc* ou *.rtf*, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de

5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar – Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento *.pdf*, incluindo o material suplementar.

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

MANUSCRITOS REVISADOS – Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de trinta dias

ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão *on line* de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL – Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos

(texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 *dpi/bitmap para traços*) com extensão *tif* ou *jpg*, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 *dpi/grayscale*) deverão ser enviadas com extensão *tif/jpg*, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: *cdr, eps, cdx ou opj*. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

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 será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2010 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O

copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.