

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Efeito de diferentes métodos de esterilização sobre nanofibras  
de PLGA produzidas por *Electrospinning***

Daikelly Iglesias Braghirolli

Porto Alegre, junho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Efeito de diferentes métodos de esterilização sobre nanofibras de  
PLGA produzidas por *Electrospinning*

Daikelly Iglesias Braghirolli

Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Profa. Dra. Patricia Pranke

Orientadora

Daniela Steffens

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2010.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Química Nova  
(Anexo I)

Efeito de diferentes métodos de esterilização sobre nanofibras de PLGA produzidas por *Electrospinning*

**Daikelly Iglesias Braghirolli<sup>1</sup>, Daniela Steffens<sup>1,4</sup>, Kerlin Quintiliano<sup>1</sup>, Gerson Acasigua<sup>1,2</sup>, Douglas Gamba<sup>3</sup>, César Petzhold<sup>3</sup>, Patrícia Pranke<sup>1,4,5\*</sup>**

**1 Laboratório de Hematologia e Células-tronco. Faculdade de Farmácia;  
2 Programa de Pós-graduação em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia  
3 Instituto de Química; 4 Programa de Pós-graduação em Ciencia dos Materiais;  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
5 Instituto de Pesquisa com Células-tronco**

\* [patriciapranke@ufrgs.br](mailto:patriciapranke@ufrgs.br)

## **The effect of different sterilization methods on PLGA nanofibers produced by electrospinning**

### **Abstract**

The effect of sterilization using ethanol, ultraviolet radiation (UVR) and antibiotic solution in PLGA scaffolds produced by electrospinning was evaluated. The properties of nanofibers and on the cellular adhesion were analysed. All methods generated sterile scaffolds but led to some kind of damage. Ethanol and antibiotics caused changes in morphology and dimensions of scaffolds, which was not observed when using UVR. On the other hand, UVR caused a greater reduction of molecular weight which increased with exposure time. Nanofibres sterilized with antibiotics showed greater cellular adhesion than the others methods, demonstrating their potentiality as a method to sterilize PLGA nanofibers.

*Keywords: Nanofibers, Electrospinning, Tissue engineering*

# Efeito de diferentes métodos de esterilização sobre nanofibras de PLGA produzidas por *Electrospinning*

## 1. Introdução

A Engenharia de Tecidos tem sido intensivamente investigada nos últimos anos como uma ferramenta na reconstituição de órgãos e tecidos. A técnica envolve o uso de biomateriais que atuam como moldes conhecidos como *scaffolds* ou matrizes onde células podem ser cultivadas a fim de auxiliar na regeneração ou construção de um novo tecido. Esses moldes devem ser desenvolvidos a partir de materiais biocompatíveis e biodegradáveis para que após sua aplicação, possam ser degradados à medida que ocorre a proliferação celular, dando espaço para o desenvolvimento tecidual, propiciando, dessa forma, a construção de um novo tecido.

A produção de um tecido *in vitro* requer *scaffolds* altamente especializados, que permitam que as células possam ancorar, migrar e proliferar tridimensionalmente, além de favorecer a infiltração e transporte de nutrientes e substâncias metabólicas.<sup>1,2</sup> Dentre diversas metodologias, a técnica de *electrospinning* ou eletrofiação tem como vantagem a formação de matrizes fibrosas que mimetizam, em estrutura e dimensões, as fibras de colágeno da matriz extracelular, característica almejada na área de bioengenharia. Nessa técnica, fibras com diâmetro variando de poucos micrometros até 100nm ou menos, são formadas a partir de soluções poliméricas sob aplicação de um campo elétrico.<sup>3</sup> As nanofibras produzidas por esse procedimento oferecem elevada área superficial em relação ao

volume produzido, sendo um aspecto favorável à adesão celular, além de também apresentarem elevado número de poros interconectados, proporcionando espaço para entrada de nutrientes, saída de metabólicos, bem como desenvolvimento e migração celular.<sup>4</sup>

Dentre os polímeros investigados para produção de matrizes pelo método de *electrospinning*, os poliésteres alifáticos têm sido extensivamente utilizados por serem biodegradáveis, apresentarem adequada biocompatibilidade e ainda permitirem o controle do perfil de degradação.<sup>5</sup>

Visando à utilização dessas matrizes em cultivos celulares, uma etapa bastante importante quanto à produção dos *scaffolds* é a esterilização desses moldes. Assim como dispositivos médicos destinados ao uso clínico, os *scaffolds* devem ser esterilizados e a eficiência desse processo precisa ser confirmada. Um aspecto que tem sido negligenciado é o efeito da esterilização sobre os moldes, a qual pode levar a alterações em sua degradabilidade, propriedades mecânicas e morfologia, podendo, assim, ocasionar mudanças na interação célula-*scaffold*. As técnicas comumente utilizadas em materiais médico hospitalares, tais como calor úmido e calor seco, mostram-se inadequadas para biomateriais produzidos a partir de poliésteres alifáticos, pois se aproximam ou excedem à temperatura de transição vítrea desses polímeros, acarretando mudanças em suas propriedades físicas e mecânicas.<sup>6</sup> Óxido de etileno e radiação- $\gamma$  são outros dois métodos frequentemente utilizados.<sup>7</sup> No entanto, esses métodos não são facilmente aplicáveis a *scaffolds* produzidos com os polímeros citados, uma vez que implicam em alterações em sua morfologia e dimensões, além de causar redução no peso molecular e acelerar o período de degradação dos mesmos, como demonstrado em estudo

conduzido por Holy et al.<sup>7</sup> Além disso, um outro problema causado pela esterilização química, utilizando óxido de etileno, é a difícil eliminação dos resíduos tóxicos do gás, os quais, podem ficar adsorvidos no material, levando à sensibilização *in vivo*, comprometendo a utilização clínica do biomaterial.<sup>6</sup>

Logo, esse estudo tem como propósito investigar os efeitos de diferentes métodos de esterilização sobre as propriedades de nanofibras de PLGA produzidas por *electrospinning* e examinar a resposta celular em termos de adesão aos *scaffolds*. Os tratamentos para esterilização compreendem: radiação ultravioleta, tratamento com etanol 70% e tratamento com solução antimicrobiana, contendo uma mistura de antibióticos e antifúngico: penicilina G, estreptomicina e fungizona.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Preparo dos scaffolds pelo método de electrospinning*

As matrizes, ou *scaffolds*, foram preparados utilizando-se poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (75:25) (PLGA) (P1941–Sigma Aldrich) (Figura 1). O polímero foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol (Sigma Aldrich) de modo que a concentração final da solução foi de 12% (m/v). A seguir, a solução foi mantida em agitador magnético durante 24 horas para completa homogeneização.

A solução de PLGA 12% (m/v) foi colocada em uma seringa de 1 mL equipada com agulha de diâmetro interno de 0,8 mm e então submetida ao

processo de *electrospinning*. Para tal, foi utilizada uma diferença de voltagem de 12 kV e vazão de 0,24 mL h<sup>-1</sup>. As matrizes foram formadas sobre lamínulas de vidro de 15mm de diâmetro, dispostas em placa coletora de alumínio, fixada a uma distância de 15 cm da agulha. O tempo de *electrospinning* foi de 3 horas. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente (~25°C) e com umidade relativa (UR) do ar em torno de 35%.

## 2.2. Esterilização

Matrizes de PLGA com 15 mm de diâmetro foram colocadas em placas de poliestireno de 24 poços (TPP) e então submetidas aos tratamentos de esterilização em estudo. Foram pesquisados três métodos de esterilização: tratamento com etanol 70%, exposição à radiação ultravioleta e tratamento com solução de antimicrobianos.

### 2.2.1. Esterilização com etanol 70%

Às amostras, foi adicionado 1 mL de solução de etanol a 70% (diluído a partir de etanol 96% (v/v) com água destilada). As amostras foram divididas em 3 grupos, conforme o tempo de tratamento: 30 minutos, 1 hora e 2 horas e, em seguida, lavadas três vezes com 1 mL de tampão de fosfato salino 1X (PBS).

### 2.2.2. Tratamento por radiação ultravioleta (UV)

As amostras foram colocadas a 60 cm de distância de lâmpada ultravioleta 30W (Phillips, comprimento de onda de 254 nm) e então expostas durante 30min, 1h e 2h. Esse procedimento foi realizado no interior de cabine de fluxo laminar vertical. Essas amostras não foram lavadas com PBS 1X, uma vez que as mesmas, não foram colocadas em contato com material líquido que pudesse deixar algum tipo de resíduo.

### *2.2.3. Tratamento com solução antimicrobiana*

Foi preparada uma solução de antibiótico/antifúngico contendo penicilina 100U/mL, sulfato de estreptomicina 100 µg/mL (Gibco) e 1% (v/v) de fungizona (anfotericina 250 µg/mL + desoxicolato sódico 250 µg/mL, Gibco) em PBS 1X. As nanofibras de PLGA foram incubadas com 1 mL dessa solução durante 1h, 2h, 4h e 6h a 4°C. A seguir, as amostras foram lavadas três vezes com 1mL de PBS 1X.

### *2.3. Teste de esterilidade*

Após terem sido submetidos aos procedimentos de esterilização, os *scaffolds* foram testados quando à sua esterilidade através do seu “cultivo” em caldo tioglicolato, meio para crescimento de bactérias; e, em ágar Sabouraud, meio para cultivo de fungos. O teste foi realizado em triplicata. Três amostras de cada grupo foram imersas em caldo tioglicolato e incubadas a 37°C, durante 48h. Outras três amostras foram incubadas em ágar Sabouraud, durante 10 dias, a 30°C. Os *scaffolds* que não foram submetidos a nenhuma técnica de

esterilização também foram “cultivados” nos respectivos meios, para serem utilizados como controle positivo. Para o controle negativo, foram incubados somente os meios de cultivo, sem nenhum tipo de amostra. Para fins de análise, após o período de incubação, a presença de turvação do caldo tioglicolato e o aparecimento de colônias no ágar Sabouraud indicam contaminação, demonstrando a ineficiência da esterilização. Por outro lado, a permanência da limpidez do caldo e a ausência de crescimento de colônias no ágar indicam uma esterilização eficiente, com obtenção de um produto estéril.

#### *2.4. Avaliação da morfologia, diâmetro de fibras e dimensões dos scaffolds*

A morfologia dos *scaffolds* de PLGA não estéreis e após a esterilização pelos diferentes métodos em estudo foi analisada em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6060). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10 kV, após as amostras terem sido metalizadas com camada de ouro. O diâmetro médio das fibras foi determinado utilizando o software ImageJ 1.38x, através da medida de 30 fibras de cada uma das imagens obtidas por MEV, ( $n=3$ ). A espessura dos scaffolds foi medida com Digimatic Micrometer MDC-25MY (Mitutoyo).

## 2.5. Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

A avaliação de mudanças no peso molecular polimérico foi determinada utilizando cromatografia de exclusão por tamanho (SEC) (GPCmax VE2001) equipado com detector de índice de refração. Os *scaffolds* submetidos aos diferentes tipos de esterilização e a amostra controle (*scaffold* não submetido a nenhum procedimento de esterilização) foram dissolvidos em tetrahydrofurano, filtrados com filtros de PVDF com poros de 0,45 µm e, então eluídos em coluna HR Waters 4E, 4, 3, 2 a uma vazão de 1 mL/min, a 45°C. Um padrão de poliestireno foi utilizado para a obtenção da curva de calibração primária.

## 2.6. Teste de adesão

Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical (CTMCU) foram utilizadas para o ensaio de adesão celular. As células foram isoladas e caracterizadas conforme descrito por Secco e colaboradores<sup>8</sup> e o cultivo foi realizado em meio DMEM/Hepes (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina (Gibco) e 0,45 µg/mL de gentamicina. Quando as células atingiram 90% de confluência na 5ª passagem, as mesmas foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,5%-Sigma Aldrich) e sua viabilidade avaliada com Azul de Tripán 4% (Gibco).

Logo após, procedeu-se com o cultivo das mesmas sobre os *scaffolds* previamente submetidos às técnicas de esterilização em estudo. As CTMCU foram semeadas nos *scaffolds* a uma densidade de  $2,8 \times 10^4$  células

viáveis/cm<sup>2</sup> e então incubadas a 37°C com atmosfera umidificada a 5% CO<sub>2</sub>. Após 6h de cultivo, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X para retirada das células não aderidas. As células aderidas foram então fixadas com paraformaldeído 4%, por 20 min. Em seguida, foi realizada a coloração com 0,5 µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), um marcador de núcleo celular. De cada amostra (n=3) foram obtidas nove imagens (Olympus CX50, magnificação de 400x) correspondendo a nove campos diferentes distribuídos aleatoriamente. Assim, foi possível quantificar o número de células aderidas através da relação número de células/campo.

### *2.7. Análise estatística*

A Análise de Variância (Anova), com o teste de complementação de Tukey foi utilizada para determinar se ocorreu diferença significativa entre os diâmetros das fibras antes e após os tratamentos de esterilização. Para comparação das análises de adesão celular, foi implementado o teste de Análise de Kruskal-Wallis (K-W). Para critérios de decisão foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Teste de esterilidade

A eficácia dos tratamentos de esterilização em estudo foi verificada pela ausência de turvação do meio caldo tioglicolato, após 48h e pelo não desenvolvimento de colônias em ágar Sabouraud, após 10 dias de incubação. As matrizes que não foram submetidas a nenhum procedimento de esterilização serviram como controle positivo, nas quais foram observadas, em todas, contaminação. Os meios de cultivo sem amostras mantiveram-se estéreis, corroborando com o achado esperado no controle negativo. Os meios com as amostras tratadas também não apresentaram desenvolvimento de microorganismos (Tabela 1), demonstrando que todos os tipos e tempos de tratamentos mostraram-se eficazes.

O tratamento com radiação ultravioleta e com o etanol 70% são as técnicas mais utilizadas para obtenção de *scaffolds* poliméricos estéreis devido a sua facilidade de execução. No entanto, de acordo com a literatura, têm-se observado que o tempo de tratamento, ao qual o *scaffold* é submetido, é bastante variável.<sup>9,10,11</sup> No presente estudo, foi possível obter um produto estéril utilizando tempos de tratamento iguais ou inferiores aos encontrados na literatura. Embora o tratamento com etanol tenha sido eficaz, esse agente é classificado como um desinfetante químico ao invés de um agente esterilizante. O etanol nas concentrações entre 60-80% (v/v), tem se mostrado efetivo na eliminação de bactérias gram-positivas, gram-negativas, ácido-resistentes e vírus lipofílicos. Todavia, vírus hidrofílicos e esporos bacterianos são

resistentes a esse agente, conforme literatura.<sup>7</sup> Dessa forma, o seu uso tem sido limitado a procedimentos realizados *in vitro*.

### 3.2. Caracterização dos scaffolds

Os *scaffolds* foram produzidos com sucesso pelo procedimento de *electrospinning* utilizando os parâmetros anteriormente citados. A concentração da solução polimérica de 12% m/v foi escolhida, pois, ao se trabalhar com concentrações superiores, as fibras se formaram com uma maior dificuldade. Já, ao se utilizar soluções poliméricas com menores concentrações, é sabido que uma instabilidade do cone de Taylor é criada em função do baixo enovelamento entre as cadeias poliméricas.<sup>2</sup> Através das imagens do controle, obtidas por MEV (Fig. 2A), pode-se observar que as fibras formadas distribuíram-se de maneira aleatória por toda a estrutura do *scaffold*, o qual apresentou um grande número de poros interconectados. As fibras apresentaram superfície lisa e diâmetro médio de  $315,9 \pm 70,2$  nanômetros (Tabela 2 - controle). Através da análise da espessura dos *scaffolds*, verificou-se que os mesmos encontravam-se com espessura de  $37 \pm 5,3$   $\mu\text{m}$ . Também foi observada a presença de *beads* nas nanofibras.

A morfologia das nanofibras é resultado da combinação de vários fatores, incluindo propriedades intrínsecas da solução, tais como: tipo de polímero, concentração, elasticidade, condutividade da solução e tipo de solvente. Além disso, a morfologia das nanofibras também é influenciada por condições relacionadas à técnica de *electrospinning*, tais como: corrente elétrica, vazão e distância entre a agulha e placa coletora. A produção de fibras

com *beads* está fortemente relacionada à concentração da solução, sendo que essas estruturas são frequentemente observadas em nanofibras produzidas a partir de soluções poliméricas de mais baixas concentrações. Supõe-se que a formação de *beads* ocorra devido à competição entre a viscosidade e a tensão superficial da solução, a qual tenta reduzir a superfície por unidade de massa, convertendo o jato líquido em uma ou mais gotas esféricas.<sup>2</sup> Ainda não existe uma definição quanto aos efeitos biológicos dessas estruturas, quanto à adesão, crescimento e proliferação celular. No entanto, acredita-se que os *beads* possam ser úteis como reservatórios de princípios ativos que favoreçam o desenvolvimento celular.<sup>12</sup> Outros autores sugerem que os *beads* possam auxiliar na migração da célula tridimensionalmente pelo *scaffold*, por favorecer o espaçamento entre as nanofibras.

### 3.3. Efeito dos diferentes tratamentos de esterilização sobre a estrutura dos scaffolds

#### 3.3.1. Morfologia e diâmetro

As imagens obtidas por MEV (Fig. 2) indicam que as nanofibras de PLGA reagiram de maneira diferente às três técnicas de esterilização estudadas.

Após diferentes períodos de exposição à radiação ultravioleta ( $\lambda = 254\text{nm}$ ), as amostras não exibiram mudanças aparentes em sua morfologia (Fig.2 B, C, D). Em contraste, o tratamento com solução antimicrobiana (penicilina, estreptomicina e fungizona) levou a alterações na estrutura das

amostras, sendo essas mais significativas nas matrizes deixadas em contato por períodos de 4 e 6h com a solução de antibióticos (Fig.2 I, J, K, L). Esse método levou à deformação dos *beads* que tiveram redução de seu volume e perda de sua forma globular.

Os *scaffolds* submetidos à assepsia por etanol 70% apresentaram alterações bastante pronunciadas em sua morfologia (Fig. 2 E, F, G, H). Esse método causou, em todas as amostras, a deformação dos *beads* de forma bem mais expressiva do que ocorreu no tratamento por solução antimicrobiana. Nos *scaffolds* deixados em contato com etanol durante 1 e 2 horas, essa deformação foi proporcionalmente ainda mais acentuada, assemelhando-se a um derretimento das fibras nas áreas onde antes existiam *beads*. Ainda, as mesmas amostras exibiram pequenos nódulos na superfície das fibras, principalmente no local de encontro dessas.

Na literatura, não existe um consenso em relação ao efeito do etanol sobre a morfologia de *scaffolds* poliméricos. Holy et al. utilizaram a desinfecção com etanol 70% por 30 minutos como controle na comparação entre a esterilização por radiação- $\gamma$  e a por plasma RFGD de *scaffolds* de PLGA “tipo espuma”. Os autores descreveram o etanol como um agente que não resulta em prejuízos sobre a morfologia ou propriedades químicas de *scaffolds* de poliésteres. Por outro lado, Shearer e colaboradores, ao submeterem *flat-sheet scaffolds* (*scaffolds* não rugosos) de PLGA ao tratamento com etanol, durante 30 minutos, observaram aumento da rugosidade e redução da porosidade dos *scaffolds*. Assim, pode-se inferir que o efeito do etanol e de outros tratamentos é dependente do tipo de *scaffold*. As matrizes produzidas por *electrospinning*

apresentam pequena espessura, estrutura bastante aberta e fibras de diâmetro nanométrico, o que deve torná-las mais suscetíveis aos efeitos do etanol.

Nenhuma das combinações de tratamento e tempo de duração implicou mudanças significativas do diâmetro médio das fibras (Tabela 2). Contudo, apesar da média manter-se inalterada, a distribuição dos diâmetros das fibras foi diferente do inicial (controle). Para as amostras submetidas aos tratamentos por Etanol e Antibióticos (Fig. 3, 4), observou-se uma maior frequência de fibras com diâmetro menor que 200nm e menor quantidade de fibras apresentando diâmetro maior que 400nm, indicando a ocorrência de uma redução do diâmetro das nanofibras. Já para as amostras submetidas à radiação UV, o inverso foi observado, ou seja, uma maior frequência de fibras com diâmetro maior que 400 nm (Fig. 5).

Quanto às dimensões dos *scaffolds*, a exposição à luz ultravioleta não ocasionou mudanças significativas em sua área e espessura (Tabela 3, Figura 6). Entretanto, o contato com etanol e solução de antibióticos levou ao enrugamento das matrizes, gerando uma grande redução no diâmetro e aumento da espessura das mesmas (Tab. 3, Fig. 6).

### 3.3.2. *Peso molecular*

As amostras esterilizadas por UV, etanol 70% e antibióticos foram comparadas em termos de mudança de peso molecular, determinado através de SEC. Todas as amostras tratadas, em relação ao controle, apresentaram redução do peso molecular ponderal (Mw), peso molecular numérico (Mn) e polidispersão (Mw/Mn) (Tabela 4). Os tratamentos com etanol 70% e com

antibióticos levaram a uma queda brusca do peso molecular logo após o primeiro tempo de tratamento estudado. Após 30 min de contato com o etanol e 1h de contato com a solução de antibióticos, o Mw do PLGA foi reduzido em aproximadamente 25% e 27% respectivamente. Para essas duas técnicas, o aumento do período de tratamento não ocasionou perdas significativas do Mw e esse se manteve constante (Fig. 7). Ao contrário do que ocorreu na morfologia, onde a exposição à radiação ultravioleta não resultou em mudanças aparentes na estrutura dos *scaffolds*, essa técnica foi a que ocasionou maiores mudanças no peso molecular. Com apenas 30 minutos de exposição, o peso molecular polimérico apresentou queda de 34,2%. O Mw foi reduzido de maneira inversamente proporcional à duração do tratamento com UV, apresentando redução de 41,6% e 48,8%, após exposição por 1 e 2 horas, respectivamente (Fig. 7).

Os resultados encontrados no presente estudo são corroborados por estudo anterior, que demonstrou que nanofibras de PLGA apresentaram redução do peso molecular numérico e resistência mecânica, apesar de não mostrarem alterações aparentes em sua morfologia após 2 horas de exposição à radiação UV.<sup>13</sup> A radiação ultravioleta com comprimento de onda em torno de 250nm leva à clivagem de ligações ésteres causando o encurtamento da cadeia polimérica o que é demonstrado pela análise de SEC através da queda da massa pico (Mp), maior cadeia polimérica detectada.<sup>13</sup> O peso molecular e a estrutura química dos materiais poliméricos são os principais responsáveis pelas suas propriedades, e assim, pela sua utilização em inúmeras aplicações. Materiais poliméricos de baixo peso molecular apresentam menor resistência química e mecânica em relação ao mesmo material de alto peso molecular.<sup>14</sup> O

peso molecular é um dos fatores que influencia a biodegradação do PLGA e é o parâmetro de maior importância para monitorar sua degradação.<sup>15</sup> Assim, a radiação UV, ao reduzir o Mw, das amostras pode estar causando comprometimento de suas propriedades mecânicas e acelerando sua degradação; para isso é importante a realização de estudos de degradação *in vitro*.

#### 3.4. Ensaio de adesão

Para o sucesso da aplicação dos *scaffolds* na engenharia de tecidos, uma característica crucial é que as matrizes promovam a adesão celular. A adesão celular é mediada, primeiramente, pela adsorção de proteínas da matriz extracelular à superfície do *scaffold*. Em seguida, vias de sinalização celular são ativadas e ocorre a adesão das células aos moldes através de receptores integrina. Logo, o acomodamento e comportamento celular são bastante afetados pela morfologia e topografia dos *scaffolds*.<sup>16</sup> Por esse motivo, realizou-se o ensaio de adesão celular.

Para esse estudo, as CTMCU foram semeadas e cultivadas durante 6h sobre os *scaffolds* submetidos aos tratamentos de esterilização. Após esse período de incubação, o meio de cultivo foi retirado e prosseguiu-se a fixação das células aos *scaffolds* com paraformaldeído 4%, durante 20 minutos. O procedimento de fixação causou grandes danos à estrutura da matriz, ocasionando seu enrugamento e a consequente redução de suas dimensões, prejudicando a análise. Apesar da análise de adesão ter sido dificultada, através da coloração dos núcleos celulares com DAPI, foi possível verificar que

as células foram capazes de se aderir a todos os *scaffolds* em estudo. Como pode ser verificado na figura 8, as amostras tratadas com solução antimicrobiana apresentaram um número maior de células aderidas por campo, quando comparadas às matrizes submetidas aos demais tratamentos. Essa relação foi maior com a redução do período de tratamento ao qual as nanofibras foram submetidas. Não foi possível comparar a adesão celular aos *scaffolds* tratados com solução antimicrobiana durante 6h devido ao alto desvio padrão apresentado.

#### **4. Conclusões**

Esse estudo demonstrou que os métodos avaliados para esterilização de nanofibras de PLGA, etanol, solução antimicrobiana e exposição à radiação ultravioleta, foram eficazes em seu propósito. No entanto, todos os métodos acarretaram alterações nas propriedades dos *scaffolds*.

A radiação ultravioleta, apesar de não ocasionar mudanças na morfologia e dimensões dos *scaffolds*, foi o método que levou à maior perda do peso molecular do polímero. A esterilização com etanol foi o método que mais danificou a morfologia das nanofibras e alterou as dimensões das matrizes.

O tratamento com solução antimicrobiana mostrou ser um método simples e eficaz para descontaminação dos *scaffolds*. Assim como o etanol, essa técnica causou redução de peso molecular, porém consideravelmente inferior à redução causada pela radiação UV. Para os tempos de 1 e 2 horas, as alterações na morfologia das fibras, deixadas em contato com a solução

antimicrobiana, foram pouco pronunciadas e ainda, essas amostras foram as que apresentaram uma maior número de células/campo no ensaio de adesão celular. Além disso, o uso da solução antimicrobiana elimina o tratamento do *scaffold* entre a esterilização e seu uso para o cultivo celular, não necessitando a etapa adicional de umectação como os outros métodos. Mostra-se, assim, uma técnica conveniente para esterilização desse tipo de material.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem o CNPq pelo apoio financeiro na execução do presente estudo.

## **Referências Bibliográficas**

1. Shearer, H.; Ellis, J. M.; Perera, S. P.; Chaughuri, J. B.; *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2717.
2. Zhao, L.; He, C.; Gao, Y.; Cen, L.; Cui, L.; Cao, Y.; *J. Biomed. Mater. Res., B: Appl. Biomater.* **2008**, *87*, 26
3. Kwon, K. I.; Kidoaki, S.; Matsuda, T.; *Biomaterials.* **2005**, *26*, 3929.
4. Lim, S. H.; Mao, H. Q.; *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2009**, *61*, 1084.
5. Nair, L. S.; Laurencin, C. T.; *Progr. Polym. Sci.*, **2007**, *32*, 762.
6. Athanasiou, K. A.; Niederaurer, G. G.; Agrawal, C. M.; *Biomaterials*, **1996**, *17*, 93.

7. Holy, C. E.; Cheng, C.; Davies, J. E.; Shoichet, M. S.; *Biomaterials*, **2001**, 22, 25.
8. Secco, M.; Zucconi, E.; Vieira, N. M.; Fogaça, L. L. Q.; Cerqueira, A.; Carvalho, M. D. F.; Jazedje, T.; Okamoto, O. K.; Muotri, R.; Zatz, M.; *Stem Cells*, **2008**, 26, 146.
9. Powell, H. M.; Supp, D. M.; Boyce, S. T.; *Biomaterials*, **2008**, 29, 834.
10. Inanc, B.; Arslan, Y. E.; Seker, S.; Elçin, A. E.; Elçin, Y. M.; *J. Biomed. Mater. Res., Part A*, **2009**, 90, 186.
11. Jeong, S. I.; Jun, I. D.; Choi, M. J.; Nho, Y. C.; Lee, Y. M.; Shin, H.; *Macromol. Biosci.*, **2008**, 8, 627.
12. Lannutti, J.; Reneker, D.; Tomasko, D.; Farson, D.; *Mater. Sci. Eng., C*, **2007**, 27, 504.
13. Yixiang, D.; Yong, T.; Liao, S.; Chan, C. K.; Ramakrishna, S.; *Tissue Eng., Part A*, **2008**, 14, 1321.
14. Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E.; *Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica*. 1ª ed, e-papers, Rio de Janeiro, 2001, cap. 7
15. Çatiker, E.; Gümüsderelioglu, M.; Güner, A.; *Polym. Int.*, **2000**, 49, 728.
16. Andrews, K. D.; Hunt, J. A.; Black, R. A.; *Biomaterials*, **2007**, 28, 1014.

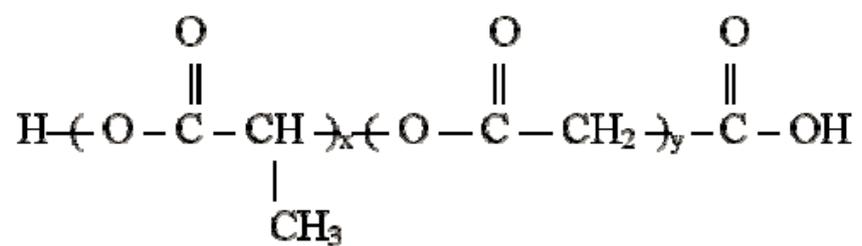
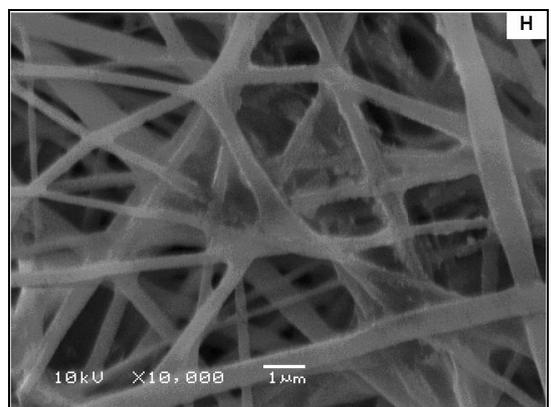
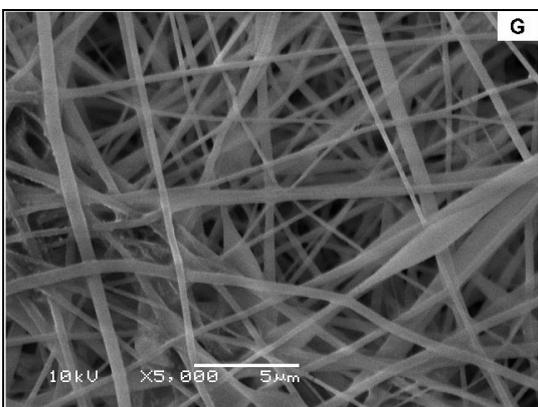
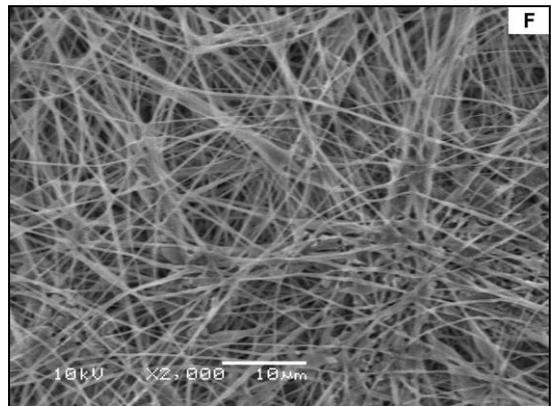
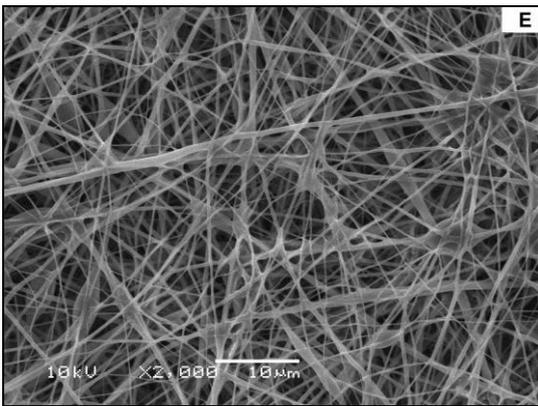
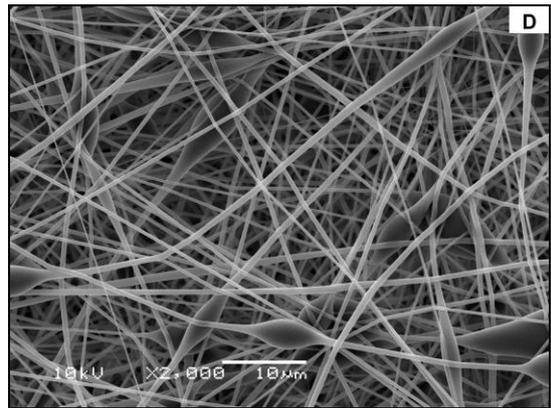
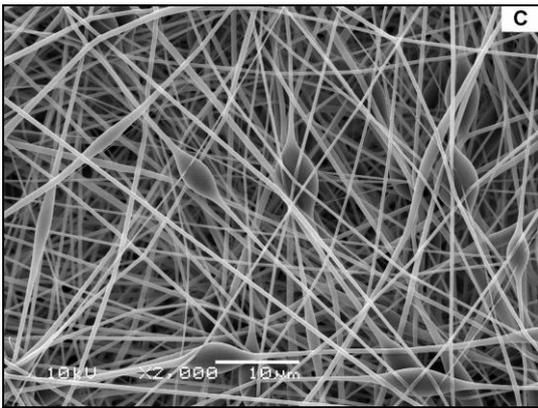
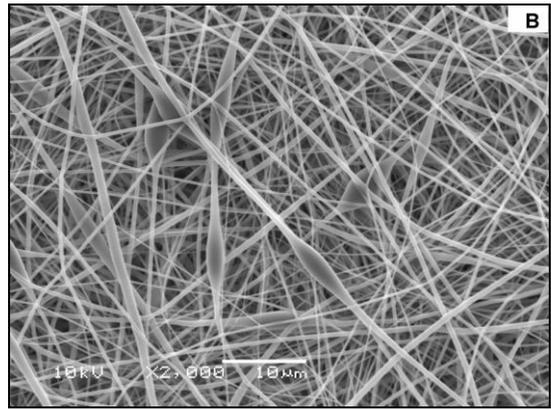
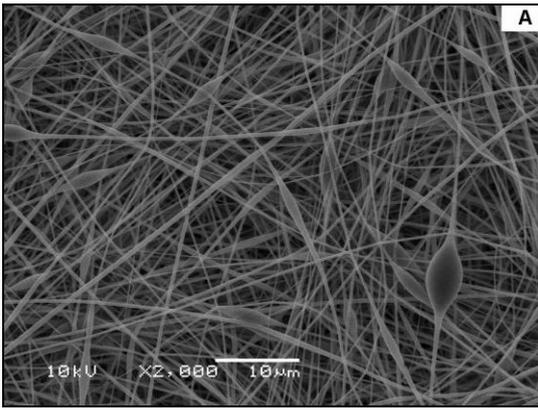


Figura 1. Estrutura química de uma cadeia polimérica de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)



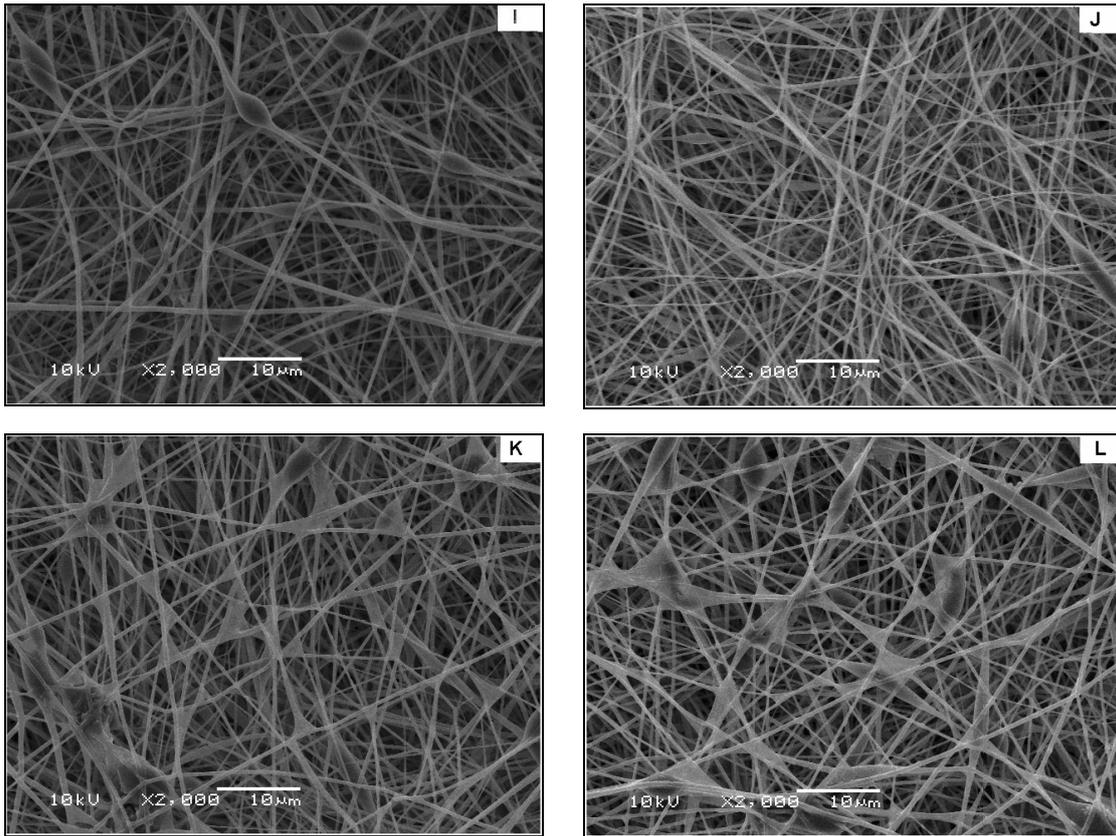


Figura 2. Imagens obtidas por MEV: (A) controle – scaffold não estéril; (B) scaffold esterilizado durante 30min com UV; (C) scaffold esterilizado durante 1h com UV; (D) scaffold esterilizado durante 2h com UV; (E) scaffold esterilizado durante 30min com Etanol 70%; (F) scaffold esterilizado durante 1h com Etanol 70%; (G, H) scaffold esterilizado durante 2h com Etanol 70%; (I) scaffold esterilizado durante 1h com solução antimicrobiana; (J) scaffold esterilizado durante 2h com solução antimicrobiana; (K) scaffold esterilizado durante 4h com solução antimicro; (L) scaffold esterilizado durante 6h com solução de antibióticos

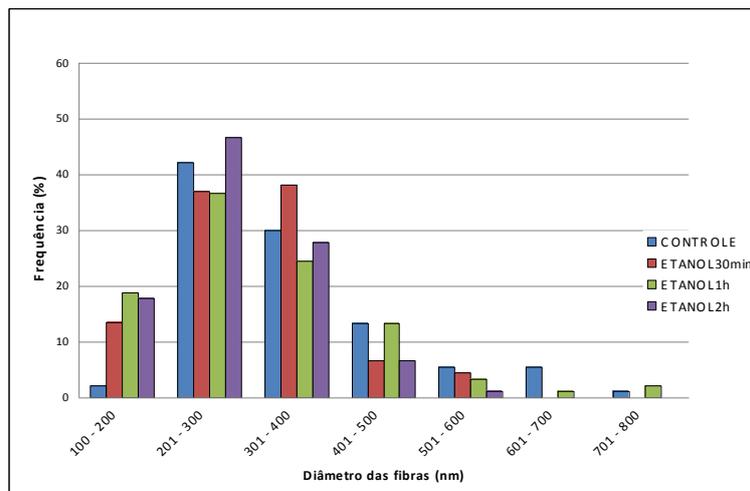


Figura 3. Comparação da distribuição do diâmetro das fibras: scaffolds submetidos à esterilização por etanol 70% e controle

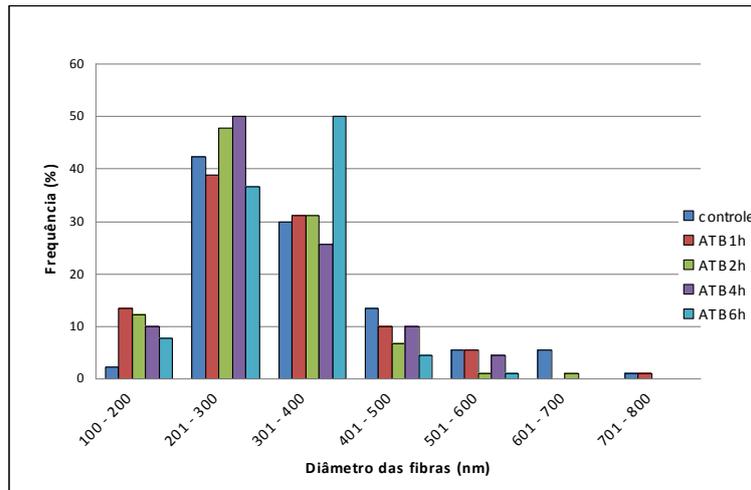


Figura 4. Comparação da distribuição do diâmetro das fibras: scaffolds submetidos à esterilização por solução antimicrobiana e controle

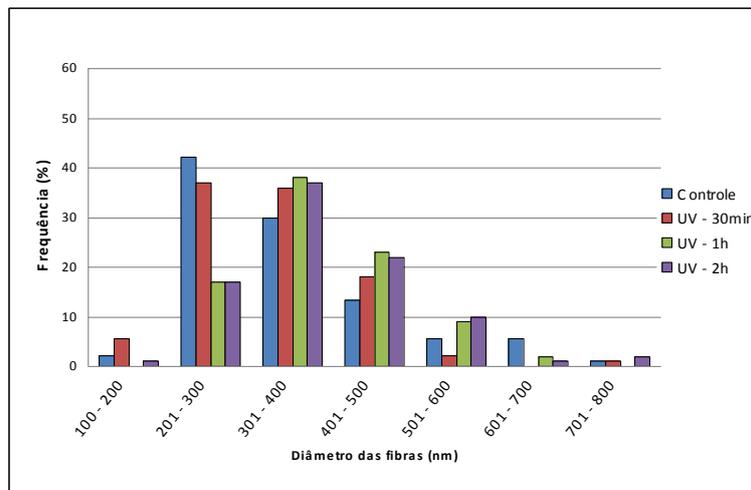


Figura 5. Comparação da distribuição do diâmetro das fibras: scaffolds submetidos à esterilização por radiação ultravioleta e controle

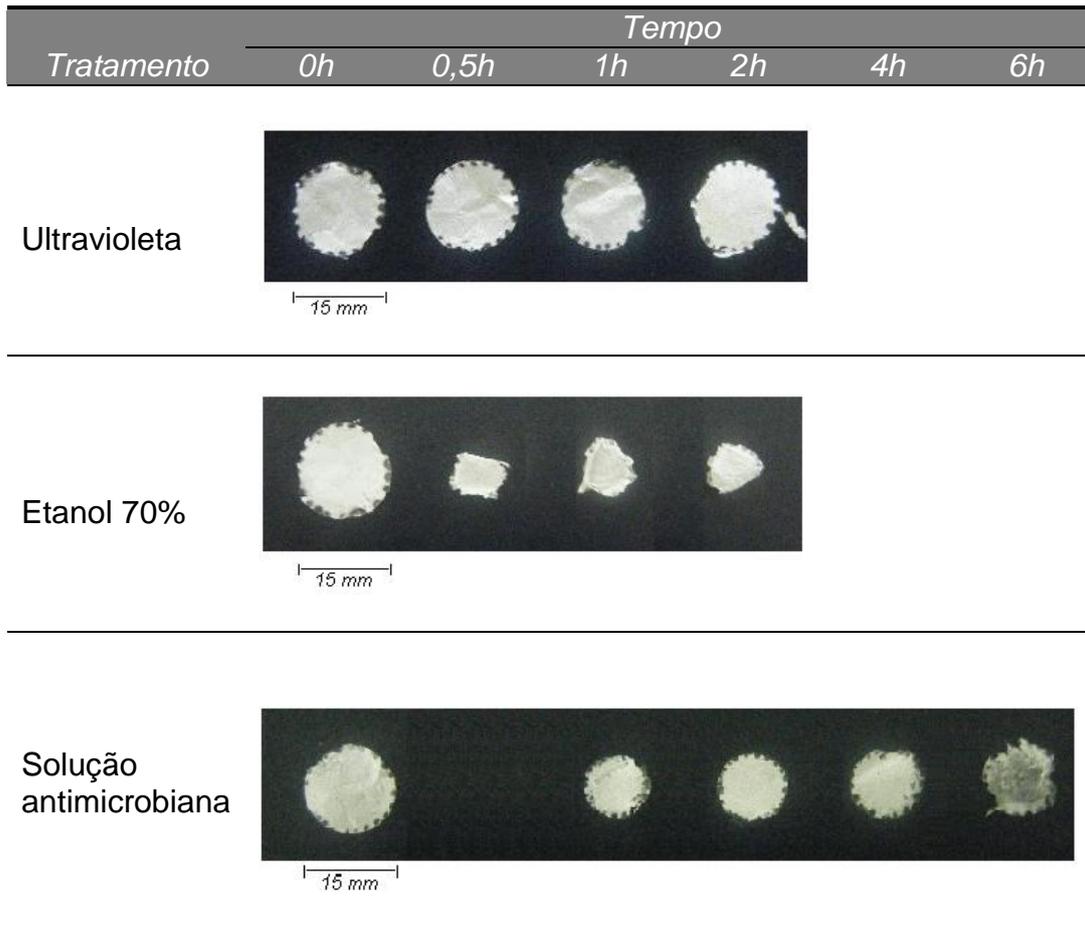


Figura 6: Efeito dos diferentes tratamentos de esterilização sobre as dimensões dos scaffolds de PLGA

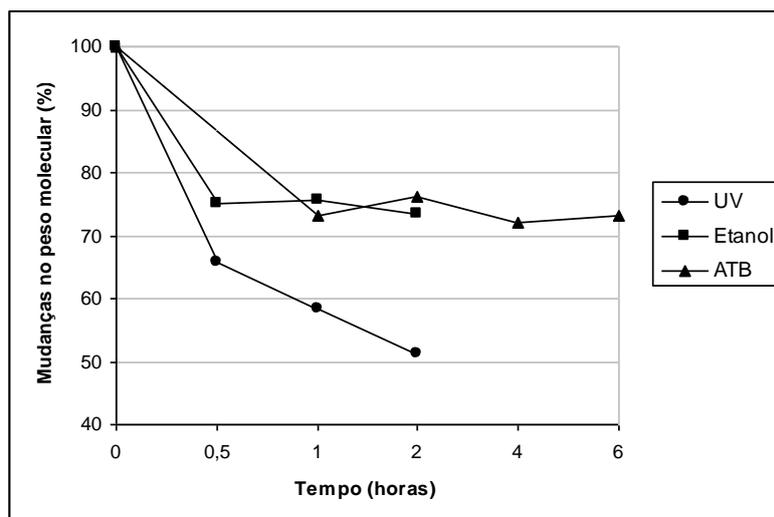


Figura 7: Mudanças no peso molecular do PLGA ocasionadas pelos tratamentos de esterilização em estudo

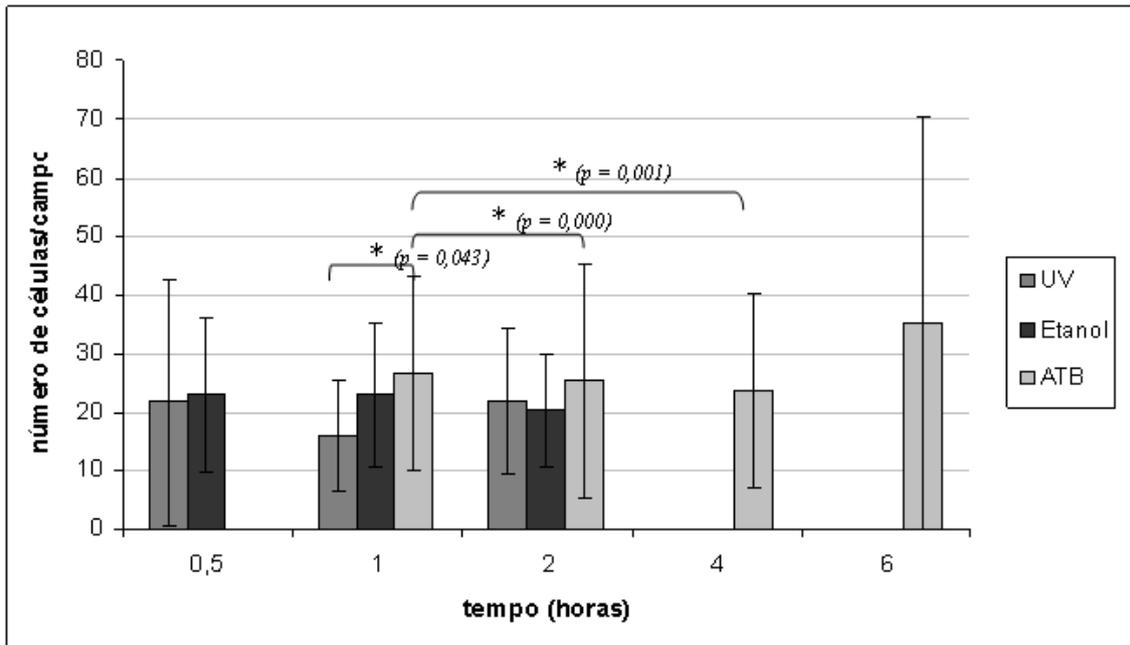


Figura 8. Influência dos diferentes tratamentos de esterilização sobre a adesão celular nos scaffolds de PLGA ; (\* indica que ocorreu diferença significativa entre as amostras,  $p < 0,05$ )

Tabela 1. Eficácia das combinações dos diferentes métodos e tempos de duração de esterilização para scaffolds de PLGA

Tratamento	Tempo de tratamento											
	Caldo Tioglicolato						Agar Sabouraud					
	0h	0,5h	1h	2h	4h	6h	0h	0,5h	1h	2h	4h	6h
Controle negativo	x	—	—	—	—	—	x	—	—	—	—	—
Controle positivo	✓	—	—	—	—	—	✓	—	—	—	—	—
Etanol 70%	—	x	x	x	—	—	—	x	x	x	—	—
Luz Ultravioleta	—	x	x	x	—	—	—	x	x	x	—	—
Solução antimicrobiana	—	—	x	x	x	x	—	—	x	x	x	x

✓ indica contaminação dos meios de cultivo após o período de análise

x indica que os meios de cultivo não mostraram sinais de infecção durante o período de análise.

— indica que a combinação de método de esterilização e duração deste não foi testada

Tabela 2. Análise do diâmetro das nanofibras de PLGA 12%

Duração do tratamento	Diâmetro médio (nm)			
	Controle	Luz Ultravioleta	Antibióticos	Etanol 70%
0h	315,9 ± 70,2	—	—	—
30 minutos	—	334,0 ± 107,4	—	312,9 ± 114,8
1 hora	—	390,6 ± 111,1	377,9 ± 113,9	304,5 ± 129,8
2 horas	—	390,7 ± 105,4	289,4 ± 85,4	277,3 ± 88,0
4 horas	—	—	301,9 ± 95,3	—
6 horas	—	—	307,3 ± 69,4	—

Tabela 3. Efeitos dos tratamentos de esterilização em estudo sobre as dimensões dos scaffolds.

Tratamento	Tempo (h)	Mudança no diâmetro dos scaffolds	Mudança na espessura dos scaffolds
Ultravioleta	0,5	—	—
	1	—	—
	2	—	—
Etanol 70%	0,5	- 47%	+ 431%
	1	- 42%	+ 382%
	2	- 42%	+ 378%
Antibióticos	1	- 27%	+ 150%
	2	- 25%	+ 152%
	4	- 20%	+ 141%
	6	- 28%	+ 174%

- indica redução da variável

+ indica aumento da variável

— indica que não houve variação da variável

*Tabela 4.* Efeito dos diferentes métodos de esterilização sobre o peso molecular polimérico dos *scaffolds* de poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (75:25)

<i>Tratamento</i>	<i>Tempo (h)</i>	<i>Mn (Da)</i>	<i>Mw (Da)</i>	<i>Mp (Da)</i>	<i>Mw/Mn</i>
Controle	0	49,903	117,882	101,850	2,362
Ultravioleta	0,5	46,575	77,557	76,505	1,665
	1	36,920	68,828	66,686	1,864
	2	30,341	60,371	55,244	1,990
Etanol 70%	0,5	46,387	88,632	98,060	1,905
	1	47,522	89,171	95,167	1,876
	2	43,617	86,461	87,807	1,982
Antibióticos	1	46,442	86,367	86,029	1,860
	2	48,460	89,625	93,520	1,849
	4	46,552	84,968	83,462	1,825
	6	45,498	86,360	82,843	1,898

\*(Mn) peso molecular numérico; (Mw) peso molecular ponderal; (Mp) massa de pico; (Mw/Mn) polidispersão

## Anexo I

### NORMAS DE PUBLICAÇÃO 2010 – Revista Química Nova

**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.; Beillis, 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*, 5<sup>th</sup> 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.sbgq.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.sbgq.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 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.