

PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS A ÁCIDOS NUCLEICOS POR *ASPERGILLUS NIGER* EM MEIOS COMPLEXOS

Alírio de Carvalho *
Wagner Sita **
Rubens Molinari *

CARVALHO, A. de; SITA, W. & MOLINARI, R. — Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios complexos. Ecl. Quím., São Paulo, 5:63-70, 1980.

RESUMO: Estudou-se a produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos pelo *Aspergillus niger* em meio de cultura quimicamente definido, enriquecido com os nutrientes complexos: farinha de soja, extrato de levedo, água de milho, farelo de algodão e farelo de amendoim, adicionados isoladamente e em combinações variadas.

Os meios mais produtivos foram obtidos com a água de milho, como único aditivo, e em combinações desta com os demais nutrientes complexos. Os farelos de algodão e de amendoim, isoladamente ou associados a outros, também estimulam a produção.

Quando isolados, a farinha de soja é ineficiente e o extrato de levedo prejudicial à produção do material, embora em algumas combinações ambos forneçam meios adequados.

Os melhores resultados decorreram dos ajustes da melhor concentração da água de milho e melhor volume de inóculo por frasco de fermentação, quando a produção obtida correspondeu a cerca de 2,4 vezes a do meio básico.

Os resultados obtidos, ao se relacionar a produção aos volumes de meio e de inóculo, mostram a importância fundamental da aeração, indicando tratar-se de processo ativo de secreção do material e não de degradação de ácidos nucleicos pré-formados, processo este que não depende de oxigênio.

UNITERMOS: *Aspergillus niger*. Substâncias relacionadas a ácidos nucleicos.

INTRODUÇÃO

A produção microbiana de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos tem sido intensivamente investigada (1-8).

CARVALHO, FARIA & MOLINARI (9) verificaram que o *Aspergillus niger*, quando cultivado em meios quimicamente definidos, acumulava, nos caldos fermentados, tais substâncias e estudaram também as condições de cultivo para a produção máxima destas, ficando a mesma demonstrada como um processo onde o crescimento do microorganismo e o

* Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação — Instituto de Química — UNESP — "Campus" de Araraquara.

** Monografista do Instituto de Química — UNESP — "Campus" de Araraquara.

acúmulo do material ocorrem simultaneamente.

O objetivo deste trabalho foi estudar a adição de nutrientes complexos ao meio básico, quimicamente definido, e o efeito correspondente na produção das substâncias citadas. Foi também estudada a influência do volume de meio e do volume de inóculo na produção do referido material.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio Básico

A composição do meio básico quimicamente definido foi, por litro, a seguinte: 50 g de sacarose; 3,96 g (30 mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,306 g (7,5 mM) de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 5 mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Inóculo

Preparou-se uma suspensão de esporos da cultura utilizada (*Aspergillus niger*, linhagem NRRL — 337) pela adição de 8 ml de água destilada esterilizada a um tubo da cultura na forma de agar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio com uma espátula esterilizada.

Inoculou-se 4 frascos de Roux, contendo 200 ml do meio básico solidificado com 1,75% de agar, com 1,5 ml da suspensão de esporos acima, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio de cultura e os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 27 dias.

Adicionou-se, então 130 ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi preparada da forma já descrita. A suspensão foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 30 ml, para frascos estéreis de 50 ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, foram prontamente congelados por imersão em banho refrigerante de etanol-gelo seco e conservados em congelador (-30°C) até serem usados.

A esporulação pode ser acelerada reduzindo-se as concentrações da fonte de carbono e/ou nitrogênio do meio básico. Quando se usa sacarose (15 g/l) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 mM) obtem-se esporulação máxima em 10 dias.

Determinação do número de esporos

A contagem do número de esporos por mililitro de inóculo foi feita por diluição do inóculo obtido com água destilada e estéril e plaqueamento no meio básico solidificado com 1,75% de agar.

Foram feitas quatro determinações e verificou-se que o inóculo usado continha, em média, 287780 esporos por mililitro.

Esterilização dos meios de Cultura

A esterilização dos meios foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 120°C durante 30 minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

final do caldo fermentado em relação ao volume inicial (20 ml).

Por analogia com o sistema utilizado por BENDICH (10) definiu-se uma unidade de material (S_{260}) como a quantidade de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos contida em 1 ml de solução, cuja densidade óptica a 260 nm é 1.0 medida em cuba de 1 cm.

RESULTADOS

Os meios de cultura foram ensaiados pela adição, ao meio básico (9), dos nutrientes complexos, isoladamente e em combinações variadas, em experiências de 110 horas de agitação.

Os resultados obtidos estão descritos na Tabela I.

Esta Tabela mostra que a produção do material (S_{260}) pode ser aumentada em até 80% pela adição de nutrientes complexos ao meio básico, sendo, entre eles, a água de milho (produto da Companhia Refinações de Milho Brasil, contendo 0,52 g/ml de sólidos totais determinados como massa seca) e o farelo de amendoim os mais eficientes.

A Tabela I mostra também que a água de milho, individualmente, é a que mais estimula a produção, seguindo-se o farelo de algodão e o farelo de amendoim. Meios contendo combinações destes três nutrientes permitem a obtenção de bons resultados.

Esta Tabela mostra ainda que, individualmente, a farinha de soja é ineficiente e o extrato de levedo prejudicial à produção do material, embora em algumas combinações forneçam meios mais produtivos que o básico.

O pH dos meios, após a esterilização, foi ajustado, quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio diluídos e esterilizados, de modo a obter-se pH entre 6,8 — 7,2.

Fermentação

O processo empregado para permitir o crescimento do microrganismo, em condições de produzir as substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, foi o de "frascos agitados". Com tal técnica a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação. Foram utilizados frascos de 125 ml, contendo 20 ml de meio de cultura e 1,0 ml de inóculo, colocados na plataforma oscilante da máquina agitadora, onde descreviam círculos de 3 cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1 cm, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C, em experiências de 110 horas.

As experiências foram sempre consituídas por duplicatas, ou seja, cada resultado deriva de par de frascos preparados e analisados paralelamente.

Método Analítico

A produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (S_{260}) foi determinada pela densidade óptica, arbitrariamente medida a 260 nm, do caldo fermentado filtrado (A_{260}). Foram feitas correções nos valores obtidos em função da densidade óptica do caldo de cultura esterilizado ("Branco") e do volume

TABELA 1

Efeito da adição de nutrientes complexos na produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (S_{260}) pelo *A. niger*.

Composição dos meios em nutrientes complexos

Far. Soja	Extr. Lev.	Água de Milho	Far. de Algodão	Far. de Amendoim	pH Final	A_{260} Final	Produção Relativa
-	-	+	-	-	6,0	30,9	1,82
-	-	+	-	+	4,7	27,0	1,59
+	-	+	-	+	3,8	25,7	1,51
-	+	+	-	+	3,6	25,1	1,48
+	+	+	+	+	3,2	24,9	1,46
-	-	+	+	-	3,1	24,3	1,43
+	-	+	-	-	2,7	24,1	1,42
-	-	-	+	-	2,4	23,2	1,36
-	-	-	+	+	2,5	23,2	1,36
+	+	+	-	-	3,3	23,2	1,36
-	-	+	+	+	3,5	22,4	1,32
+	-	-	+	+	2,6	22,4	1,32
-	-	-	-	+	2,4	22,0	1,29
+	-	-	-	+	2,6	21,6	1,27
+	+	-	-	+	2,7	21,6	1,27
-	+	+	+	-	3,5	21,2	1,25
-	+	+	-	-	4,0	20,8	1,22
+	-	-	+	-	2,3	20,5	1,21
+	+	-	+	-	2,6	20,3	1,19
+	-	-	-	-	2,4	18,6	1,09
-	+	-	+	-	2,3	18,0	1,06
+	-	+	+	-	3,4	18,0	1,06
-	+	-	+	+	2,6	17,8	1,05
-	-	-	-	-	2,1	17,0	1,00
-	+	-	-	+	2,7	17,0	1,00
+	+	-	-	-	2,5	9,7	0,57
-	+	-	-	-	2,5	3,9	0,23

O sinal (-) indica a ausência do nutriente complexo e o sinal (+) indica a presença do nutriente na concentração de 20,0 ml/l para a água de milho e 5,0 g/l para os demais.

* Meio básico.

TABELA III

Produção do material (S_{260}) em função da concentração inicial de farelo de algodão como único aditivo ao meio básico.

Farelo de Algodão (g/l)	A_{260} Final	Produção Relativa
0	15,3	1,00
2	18,8	1,23
4	24,5	1,60
6	21,8	1,42
10	13,9	0,91
12	13,9	0,91
14	9,2	0,60
16	7,5	0,49

* Meio básico.

A Tabela III mostra também que o farelo de algodão, quando presente em concentrações acima de 10 g/l, deixa de estimular a produção do material S_{260} passando a inibi-la.

TABELA IV

Produção do material (S_{260}) em função da concentração inicial de farelo de amendoim como único aditivo ao meio básico.

Farelo de amendoim (g/l)	A_{260} Final	Produção Relativa
0	18,9	1,00
2	31,8	1,68
4	25,5	1,35
8	23,8	1,26
10	21,8	1,15
12	23,1	1,22
14	23,8	1,26
16	24,6	1,30
18	20,9	1,11

* Meio básico.

As Tabelas II, III e IV mostram os resultados obtidos ao se estudar a produção do material (S_{260}) em função, respectivamente, das concentrações da água de milho, farelo de algodão e farelo de amendoim.

TABELA II

Produção do material (S_{260}) em função da concentração inicial de água de milho como único aditivo ao meio básico.

Água de Milho (ml/l)	A_{260} Final	Produção Relativa
0	15,8	1,00
5	23,1	1,46
10	29,3	1,85
15	38,3	2,42
20	30,9	1,96
25	31,2	1,97
30	31,4	1,99
35	31,4	1,99
40	30,1	1,91
45	28,8	1,82
50	27,5	1,74
60	22,5	1,42
70	25,9	1,64
80	23,6	1,49

* Meio básico.

Observa-se na Tabela II que a concentração inicial de 15 ml/l é a mais eficiente, permitindo aumento de 142% em relação ao meio básico.

A Tabela III mostra que, entre as concentrações usadas, a concentração inicial de 4 g/l é a mais eficiente, permitindo aumento de 60% em relação ao meio básico.

A Tabela IV mostra que, entre as concentrações usadas, a concentração inicial de 2 g/l é a melhor, permitindo aumento de 68% em relação ao meio básico.

TABELA V

Influência do volume de meio na produção do material (S₂₆₀), quando se usa água de milho (15 ml/l) como único aditivo ao meio básico.

Volume Inicial de Meio (ml)	pH Final	A ₂₆₀ Final
15,0	6,3	36,3
20,0	6,1	39,1
25,0	5,7	35,5
30,0	4,4	23,4
35,0	2,8	23,1
40,0	3,2	22,1

Inóculo: 1 ml de inóculo contendo 287780 esporos por mililitro.

A Tabela V mostra os resultados obtidos ao se estudar a influência do volume de meio por frasco, quando se usa água de milho (15 ml/l) como único aditivo ao meio básico.

Esta Tabela mostra que 20,0 ml de meio por frasco é o melhor volume inicial para a produção do material, o qual já vinha sendo utilizado, pois permite obter a maior produção por litro de caldo fermentado.

TABELA VI

Influência do volume de inóculo na produção do material (S₂₆₀), quando se usa água de milho (15 ml/l) como único aditivo ao meio básico.

Volume Inicial de Inóculo (ml)	A ₂₆₀ Final
0,6	35,7
0,8	41,4
1,0	38,1
1,2	32,0
1,4	25,9

A Tabela VI mostra os resultados obtidos ao se estudar a influência do volume de inóculo por frasco, quando se usa frascos com 20,0 ml de meio básico contendo água de milho (15 ml/l).

A Tabela VI mostra que, entre os volumes de inóculo estudados, o de 0,8 ml por frasco é o que permite maior produção do material S₂₆₀.

DISCUSSÃO

É pouco comum a utilização industrial de meios de cultivo quimicamente definidos para a produção de substâncias úteis por fermentação. São utilizados, de preferência, meios contendo materiais complexos, geralmente subprodutos ou resíduos da indústria agropecuária, por serem econômicos e eficientes (11).

Assim, neste trabalho, procurou-se enriquecer o meio quimicamente definido utilizado anteriormente (9) pela adição dos 5 nutrientes complexos indicados na Tabela I.

Do elevado número de combinações utilizadas verificou-se que nem todos os meios enriquecidos nutricionalmente foram favoráveis ao aumento da produção, o que confirma trabalho anterior (8) e sugere novamente que a produção das substâncias relacionadas a ácidos nucleicos (S₂₆₀) parece não estar relacionada com o teor de nutrientes dos meios, mas depender particularmente de alguns componentes como mostra a Tabela I, sendo afetada particularmente pelo teor de fósforo dos meios (7).

Entre os nutrientes complexos utilizados, a água de milho se destaca como a mais eficiente para o enriquecimento do meio básico. Sua associação com outros nutrientes permite a obtenção de meios produtivos os quais, entretanto não são superiores aos meios contendo-a como único aditivo.

Outros nutrientes também ativos isoladamente são os farelos de amendoim e algodão.

Com relação aos outros nutrientes complexos, a Tabela I mostra que, individualmente, a farinha de soja é ineficiente e o extrato de levedo prejudicial à produção do material S₂₆₀, embora em algumas combinações forneçam meios produtivos. Os resultados relativos à utilização do extrato de levedo confirmam plenamente trabalhos anteriores (7 e 8), pois tratando-se de componente rico em fosfato tem certamente efeito inibidor na produção do material S₂₆₀.

As Tabelas II, III e IV mostram os efeitos das concentrações de nutriente sobre o acúmulo dos produtos da fermentação. Tipicamente, a água de milho, o farelo de algodão e o farelo de amendoim, mostram aumento da produção por concentrações baixas do nutriente, atingindo-se um valor ótimo seguido de inibição da produção por excesso de nutriente (7, 8 e 12).

O melhor meio estabelecido neste trabalho foi o meio básico enriquecido com água de milho (15 ml/l), como único aditivo, que permitiu aumento de 142% na produção do meio básico. Este aditivo é o melhor não somente pela sua eficácia como pelo seu custo relativamente baixo. Assim temos um meio barato e tão produtivo quanto o melhor dos meios quimicamente definidos desenvolvidos anteriormente (9).

Ao se estudar as influências dos volumes de meio de cultura e de inóculo usados por frasco (Tabelas V e VI) observou-se que as maiores produções são obtidas com 20,0 ml de meio e 0,8 ml de inóculo. O decréscimo da produtividade para valores de meios inoculados acima de 20 ml indica, fortemente, a dependência do processo à aeração, que é função da geometria do frasco, da velocidade de rotação e, especialmente, do volume de líquido.

Este fato confirma resultados anteriores (7 e 9) e sugere novamente que o material S₂₆₀ formado não provem da degradação enzimática de ácidos nucleicos pré-formados, processo este que não depende de oxigênio.

CARVALHO, A. de; SITA, W. & MOLINARI, R. — Production of nucleic acid related substances by *Aspergillus niger* in complex media. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 5:63-70, 1980.

ABSTRACT: The accumulation of nucleic acid-related substances, previously studied in chemically defined media (9), was further investigated in complex media, obtained by the addition of complex nutrients to a defined basic medium. The following materials have been used: soybean flour, yeast extract, corn steep liquor, cotton seed meal and peanut meal. These ingredients were treid alone or in combinations as enrichment nutrients.

Media with good production were obtained with corn steep liquor alone or in mixtures with some of the other complex nutrients.

Beyond corn steep liquor, cotton seed and peanut meals were also active when used either alone or in combinations, soybean flour alone was found inactive and yeast extract inhibitory to the production. Nevertheless, in some combinations, they are not ineffective, giving productive media.

The best medium was obtained with corn steep liquor in its most effective concentration, using the most adequate medium volume per flask with the most active secretion rather than preformed nucleic acid hydrolysis, as mechanism of medium production by a factor of about 2,4 to 2,5 times.

Here also the process was found highly dependent on oxygen suggesting an active secretion rather than preformed nucleic acid hydrolysis, as mechanism of the accumulation of the nucleic acid-related compounds.

UNITERMS: *Aspergillus niger*. Nucleic acid-related substances.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAWAMOTO, I.; NARA, T.; MISAWA, M. & KINOSHITA, S. *Agr. Biol. Chem.*, 1970, 34(8):1142-49.
2. AKIYA, T.; MIDORIKAWA, Y.; KUNINAKA, A.; YOSHINO, H. & IKEDA, Y. *Agr. Biol. Chem.*, 1972, 36(2):227-33.
3. DEMAIN, A. L.; JACKSON, M.; VITALI, R.A.; HENDLIN, D. & JACOB, T. A. *Appl. Microbiol.*, 1966, 14(5):821-25.
4. FURUYA, A.; ARAKI, K.; NOHARA, M.; ABE, S. & KINOSHITA, S. *Amino Acid Nucleid Acid*, 1964, 9: 24-30.
5. SCHWARTZ, J. & MARGALITH, P. *Biotechnol. Bioeng.*, 1973, 15(1):85-91.
6. SIMUTH, J. & ZELINKA, J. *J. Antibiotic*, 1970, 23(5):242-9.
7. CARVALHO, A. & MOLINARI, R. *Rev. Bras. Technol.*, 1976, 7(3):289-96.
8. CARVALHO, A.; OLIVEIRA, P. L. C. & MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, 1977, 2:47-60.
9. CARVALHO, A.; FARIA, C. R. & MOLINARI, R. *Ecl. Quím.*, 1978, 3: 55-67.
10. BENDICH, A. Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. *Methods in enzymology*, Academic Press, New York, 1957, V. 3, p. 715-23.
11. LIMA, U. A.; AQUARONE, E. & BORTAZANI, W. *Biotechnologia: tecnologia das fermentações*, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1975, V. 1.
12. RAINBOW, C. & ROSE, A. H. *Biochemistry of industrial micro-organisms*. Academic Press, London, 1963.

Recebido em 15-7-80

ÍNDICE DE ASSUNTOS
V. 5

Al — Mg (LIGAS)	defeitos puntuais (em)	recuperação (de)	solução sólida (de), p. 29
ÁCIDOS NUCLEICOS	produção (por)	<i>Aspergillus niger</i> , p. 63	
ADUTOS	(com) ácidos inorgânicos (e)	Aminóxido (trimetil)	Arsinóxido (trifenil)
	Fosfinóxido (trifenil)	Fosfinóxido (tribenzil)	Pirazol (1 fenil - 3,5 dimetil)
	Piridina N óxido, p. 17		
AMINOXIDO (TRIMETIL)	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
ARGILAS	mineralogia (de)	microestrutura (de), p. 7	
ARSINÓXIDO (TRIFENIL)	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
ASPERGILLUS NIGER	produção (de)	substâncias	relacionadas (a)
	ácidos nucleicos, p. 63		
CALOR DE NEUTRALIZAÇÃO	técnica, p. 39		
CALORIMETRIA EM SOLUÇÃO	técnica, p. 39		
CALORIMETROS	construção, p. 39		
COBALTO (II)	cristalografia (de)	diidrato bis (dibenzilfenilfosfinóxido)	dióxido bis (benzilfenilfosfinóxido), p. 59
COMPLEXOS	cristalografia, p. 59		
FOSFINÓXIDO	dióxido bis (benzilfenil -)	dinitrato bis (benzilfenil -)	cobalto (II)
	cristalografia, p. 59		
FOSFINÓXIDO (TRIBENZIL)	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
FOSFINÓXIDO (TRIFENIL)	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
LECITHIS PISONIS	composição química (da)	semente	morfologia, p. 51
LIGAS DE AL-ME	defeitos puntuais (em)	recuperação (de)	solução sólida (de), p. 29
PAVIMENTAÇÃO	microestrutura de solos (em), p. 7		
PIRAZOL (1 FENIL - 3,5 DIMETIL)	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
PIRIDINA N ÓXIDO	adutos (com)	ácidos inorgânicos, p. 17	
TITULAÇÕES ENTÁLPICAS	técnica, p. 39		

SUBJECT INDEX

V. 5

- AL - Mg (ALLOYS)
 - point defects (in)
 - recovery (of)
 - solid solution (in), p. 29
- ADDDUCTS
 - (with) inorganic acids (and)
 - Amineoxide (trimethyl)
 - Arsineoxide (triphenyl)
 - Phosphineoxide (tribenzil)
 - Phosphineoxide (triphenil)
 - Pyrazole (1 phenyl - 3,5 dimethyl)
 - Pyridine N oxide, p. 17
- ALLOYS (AL - Mg)
 - point defects (in)
 - recovery (of)
 - solid solution (in) p. 29
- AMINEOXIDE (TRIMETHYL)
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- ARSINEOXIDE (TRIPHENYL)
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- ASPERGILLUS NIGER
 - production (of)
 - nucleic acid-related substances, p. 63
- CALORIMETER
 - construction (of), p. 39
- CALORIMETRY IN SOLUTION
 - technique, p. 39
- COBALT (II)
 - crystallography (of)
 - dinitrate bis (dibenzylphenylphosphi-
neoxide)
 - diiodo bis (benzylphenylphosphineoxi-
de), p. 59
- COMPLEXES
 - crystallography, p. 59
- ENTHALPIC TITRATION
 - technique, p. 39
- HEAT OF NEUTRALIZATION
 - technique, p. 39
- LECYTHIS PISONIS
 - chemical composition (of the)
 - seed
 - morphology, p. 51
- NUCLEIC ACIDS
 - production (by)
 - Aspergillus niger*, p. 63
- PHOSPHINEOXIDE
 - diiodo bis (benzylphenyl -)
 - dinitrate bis (benzylphenyl -)
 - cobalt (II)
 - crystallography, p. 59
- PHOSPHINEOXIDE (TRIBENZYL)
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- PHOSPHINEOXIDE (TRIPHENYL)
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- PYRAZOLE (1 phenyl - 3,5 dimethyl)
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- PYRIDINE N OXIDE
 - adducts (with)
 - inorganic acids, p. 17
- ROAD FOUNDATION
 - microstructure of soils (in), p. 7
- SOILS
 - mineralogy (of)
 - microstructure (of), p. 7

ÍNDICE DE AUTORES
AUTHOR INDEX

ANGELIS, D. F. de	p. 51
BARELLI, N.	p. 7
BEATRICE, C. R. S.	p. 29
BENEDETTI, A. V.	p. 39
BRANDT NETO, M.	p. 7
CARVALHO, A. de	p. 63
CILENSE, M.	p. 29, 39
DE MARTIN, V. de F.	p. 59
DERBLI PINTO, A.	p. 17
FIGUEIREDO, I. B.	p. 51
GÄRLIPP, W.	p. 29
MASSABNI, A. C.	p. 17, 59
MOLINARI, R.	p. 63
PICCOLO, A. L. G.	p. 51
SITA, W.	p. 63
THOMAZINI, L. I.	p. 51
TOMITA, K.	p. 59

NORMAS

1. A revista "ECLÉTICA QUÍMICA" publica artigos originais e notas prévias escritas num dos seguintes idiomas: português, inglês, francês nas áreas de Química, Física e Matemática.
2. Os artigos originais não poderão exceder 15 folhas datilografadas (25 linhas de 60 espaços) com margem de 3 cm de ambos os lados.
3. As notas prévias não poderão exceder 4 folhas datilografadas nas mesmas condições.
4. Os manuscritos deverão ser enviados em 3 exemplares à

"Revista ECLÉTICA QUÍMICA"
Instituto de Química — UNESP
C.P. 174 — 14800 — Araraquara (SP)
5. A apresentação dos originais obedecerá a seguinte ordem:
 - a) Título no idioma do artigo e em inglês.
 - b) Nome e sobrenome do(s) autor(es) assinalando com asterisco o autor principal para o qual serão mandadas provas e separatas.
 - c) Nome e endereço do laboratório.
 - d) Resumo de até 200 palavras e sua tradução em inglês.
 - e) Os unitermos e suas traduções em inglês.
 - f) O texto do trabalho.
 - g) Bibliografia obedecendo as leis da IUPAC.
 - h) Tabelas, gráficos e fotografias branco e preto, num total geral de 5 por artigo. As despesas referentes às tabelas, gráficos e fotografias excedentes assim como as ilustrações a cores correrão por conta dos autores. Os gráficos serão desenhados em papel vegetal e suas legendas serão datilografadas em folha separada.
6. Todo manuscrito será submetido ao Departamento Científico que analisará o valor do trabalho podendo recusá-lo, sugerir modificações ou pedir informações ao(s) autor(es).
7. O relatório do Departamento Científico será anônimo e comunicado aos autores.