



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

**UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS FOTOLÍTICAS E FOTOCATALÍTICAS PARA
A REMOÇÃO DE CEFALEXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA**

Francielli De Bona Galvan

Toledo – Paraná – Brasil

2015



Estado do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - Unioeste
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

**UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS FOTOLÍTICAS E FOTOCATALÍTICAS PARA
A REMOÇÃO DE CEFALEXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA**

Francielli De Bona Galvan

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa

JULHO/2015

Toledo – PR

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G17u

Galvan, Francielli De Bona

Utilização de metodologias fotolíticas e fotocatalíticas para a remoção de cefalexina em solução aquosa. /Francielli De Bona Galvan.— Toledo, 2015.
44 p.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira da Rosa

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Pós-Graduação em Ciências Ambientais

1.Contaminantes emergentes. 2. Fármacos no meio ambiente. 3. Fotodegradação. I. Rosa, Mauricio Ferreira da. II.Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 21.ed. 574.5263

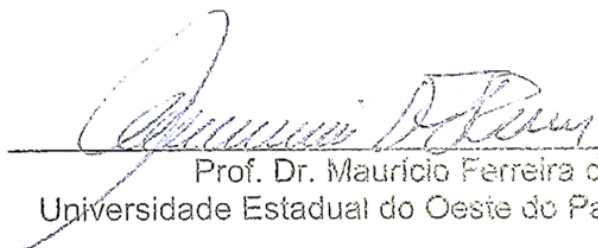
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

FRANCIELLI DE BONA GALVAN

“Utilização de metodologias fotolíticas e fotocatalíticas para remoção de cefalexina em solução aquosa.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais – Nível de Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

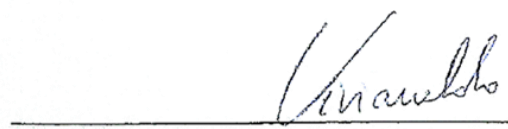
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Reinaldo Aparecido Bariccatti
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Profª. Drª. Viviane da Silva Lobo
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em: 28 de julho de 2015.

Local de defesa: Auditório do GERPEL – UNIOESTE/campus de Toledo.

SUMÁRIO

Introdução	8
Experimental	11
Produtos químicos e antibiótico.....	11
Métodos analíticos.....	11
Preparo de amostra	11
Ensaio de degradação do fármaco em solução aquosa por fotólise e fotocatalise homogênea.....	12
Ensaio de degradação do fármaco empregando diferentes pH's, H ₂ O ₂ , TiO ₂ /ZnO e luz UV como catalisadores (Método de Fotocatalise Heterogênea).....	13
<i>Planejamento experimental 2³</i>	14
Ensaio ecotoxicológico.....	16
<i>Toxicidade aguda utilizando Daphnia magna</i>	16
Resultados e discussão	17
Avaliação do processo de fotólise e a influência do pH.....	17
Avaliação do processo de fotodegradação utilizando H ₂ O ₂ , pH e luz UV	19
Planejamento experimental e análise estatística do processo de fotocatalise utilizando TiO ₂ , H ₂ O ₂ e pH.....	22
Planejamento experimental e análise estatística do processo de fotocatalise utilizando ZnO, H ₂ O ₂ e pH.....	26
Análise dos ensaios ecotoxicológicos.....	29
Conclusão	31
Agradecimentos	32
Referências	33
ANEXOS	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do antibiótico cefalexina.....	9
Figura 2: Esquema do foto-reator utilizado para as irradiações. A) Lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W; B) Béquer com a solução aquosa do fármaco; C) Parede interna do reator; D) Agitador magnético; E) Suporte de madeira para agitador.....	13
Figura 3: Ajustes lineares dos pontos do gráfico de $\ln(A_0/A)$ vs tempo para as amostras com diferentes valores de pH.....	18
Figura 4: Espectros de absorção da CFX em função do tempo de irradiação CFX 50 mg L ⁻¹ , H ₂ O ₂ de 1500 mg L ⁻¹ em pH 4.	21
Figura 5: Valores previstos para o processo de fotodegradação, com irradiação artificial, em função dos valores observados para a redução (%) da absorvância.....	23
Figura 6: Superfície de resposta mantendo-se fixa no ponto central (75,0 mg L ⁻¹) a variável TiO ₂	25
Figura 7: Valores previstos para o processo de fotodegradação utilizando ZnO, com irradiação artificial, em função dos valores observados para a redução (%) da absorvância.....	27
Figura 8: Gráfico de Pareto para a fotocatalise da CFX utilizando ZnO.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Níveis das variáveis (TiO ₂ /ZnO, H ₂ O ₂ e pH) utilizados no planejamento experimental.....	14
TABELA 2: Variações do três níveis de concentração dos reagentes e do pH.....	15
TABELA 3: Valores de percentual de redução da banda, constantes cinéticas e R ² para os experimentos de fotocatalise homogênea com H ₂ O ₂ em diferentes concentrações e pH's.....	19
TABELA 4: Resultados das análises da absorvância apresentados em (%) de redução.....	23
TABELA 5: Efeito das interações entre as variáveis do processo de foto degradação com irradiação artificial para redução da absorvância.....	24
TABELA 6: Teste de variância (ANOVA) do modelo previsto para o processo de fotodegradação na redução da absorvância.....	25
TABELA 7: Resultados das análises da absorvância apresentados em (%) de redução.....	27
TABELA 8: Efeito das interações entre as variáveis do processo de foto degradação com irradiação artificial para redução da absorvância.....	28

RESUMO

GALVAN, F. B. Utilização de metodologias fotolíticas e fotocatalíticas para a remoção de cefalexina em solução aquosa. 28 de julho de 2015. 44 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Toledo, 28 de julho de 2015.

A remoção de contaminantes nos ambientes aquáticos deve ser realizada por meio de processos de tratamento adequados, para garantir que os recursos hídricos não sejam comprometidos em virtude desta contaminação. Verifica-se que os processos que empregam luz têm apresentado bons resultados na degradação de poluentes emergentes. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo determinar as melhores condições de fotodegradação do antibiótico cefalexina (CFX) em solução aquosa, empregando-se Processos Oxidativos Avançados - POA (UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/TiO₂ e UV/H₂O₂/ZnO). Os experimentos foram acompanhados por espectrofotometria na região UV-VIS. Nos ensaios de fotocatalise, as variáveis foram organizadas em um planejamento experimental para verificar a influência de cada variável no processo de degradação, e os resultados experimentais foram avaliados empregando-se o *software* estatístico Statistica®. Observou-se pela análise dos resultados que as melhores condições para o processo de fotodegradação foram [H₂O₂] = 1000 mg L⁻¹ e [TiO₂] = 50 mg L⁻¹ em pH 4.

Palavras-chaves

Contaminantes emergentes, fármacos no meio ambiente, cefalexina, fotodegradação.

ABSTRACT

The removal of contaminants in aquatic environments must be performed by means of suitable treatment processes to ensure that water resources are not compromised because of this contamination. It is found that processes employing light have shown good results in the degradation of emergent contaminants. In this sense, this study aimed to determine the best photodegradation conditions of cephalexin antibiotic (CFX) in aqueous solution, using Advanced Oxidative Processes - AOP (UV, UV / H₂O₂, UV / H₂O₂ / TiO₂ and UV / H₂O₂ / ZnO). In photocatalysis tests, the variables were organized in an experimental design to verify the influence of each variable in the degradation process, and the experimental results were evaluated using the statistical software Statistica®. It was observed from the analysis of the results that the best conditions for the degradations process were [H₂O₂] = 1000 mg L⁻¹ and [TiO₂] = 50 mg L⁻¹ at pH 4 after two hours of irradiation.

Keywords

Cephalexin, pharmaceuticals in the environment, photodegradation, catalysts.

UTILIZAÇÃO DE METODOLOGIAS FOTOLÍTICAS E FOTOCATALÍTICAS PARA A REMOÇÃO DE CEFALEXINA EM SOLUÇÃO AQUOSA

*Francieli De Bona Galvan,^a Mauricio Ferreira da Rosa^{*b}*

^a franci.dbg@hotmail.com

^b mauricio_rosa@ymail.com

Resumo

A remoção de contaminantes nos ambientes aquáticos deve ser realizada por meio de processos de tratamento adequados, para garantir que os recursos hídricos não sejam comprometidos em virtude desta contaminação. Verifica-se que os processos que empregam luz têm apresentado bons resultados na degradação de poluentes emergentes. Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo determinar as melhores condições de fotodegradação do antibiótico cefalexina (CFX) em solução aquosa, empregando-se Processos Oxidativos Avançados - POA (UV, UV/H₂O₂, UV/H₂O₂/TiO₂ e UV/H₂O₂/ZnO). Os experimentos foram acompanhados por espectrofotometria na região UV-VIS. Nos ensaios de fotocatalise, as variáveis foram organizadas em um planejamento experimental para verificar a influência de cada variável no processo de degradação, e os resultados experimentais foram avaliados empregando-se o *software* estatístico Statistica®. Observou-se pela análise dos resultados que as melhores condições para o processo de fotodegradação foram [H₂O₂] = 1000 mg L⁻¹ e [TiO₂] = 50 mg L⁻¹ em pH 4.

Palavras-chaves

Contaminantes emergentes, fármacos no meio ambiente, cefalexina, fotodegradação.

Introdução

A contaminação de ambientes aquáticos causa efeitos indesejáveis à biota do ecossistema, prejudicando a qualidade da água e a abundância de alguns organismos. A fonte de poluição pode ser proveniente de diversas atividades antrópicas, as quais podem ser evidenciadas pela presença de contaminantes emergentes nos meios aquáticos. Os contaminantes emergentes são aqueles que apontam a recente detecção de produtos como, por exemplo, fármacos, produtos de higiene pessoal, plastificantes e agrotóxicos. Por se tratar de uma evidenciação recente elas não são abordadas nas legislações ambientais vigentes.

Produtos farmacêuticos são amplamente utilizados na medicina humana e veterinária. A presença destes em águas superficiais e subterrâneas representa um fator de grande preocupação na poluição ambiental, pois podem comprometer a qualidade dos recursos hídricos em virtude da persistência, da bioacumulação e da toxicidade destes compostos.^{1,2}

Os resíduos de fármacos podem apresentar fontes distintas, sejam provenientes dos efluentes de indústrias farmacêuticas, dos efluentes rurais, do descarte inadequado dos medicamentos após a data de vencimento, devido ao uso veterinário e, principalmente, em virtude do esgoto doméstico lançado em meios hídricos.^{3,4}

Os fármacos residuais podem apresentar propriedades antimicrobianas ou ainda estruturas complexas não passíveis de biodegradação. O processo convencional de tratamento de efluentes industriais e domésticos, baseado na degradação biológica, possibilita a remoção parcial destes poluentes, ocasionando assim, a contaminação das águas superficiais, subterrâneas e dos sedimentos.^{5,6}

Estudos revelam que, dentre contaminantes de origem farmacológica, aproximadamente 15% dos fármacos detectados no meio ambiente são da classe dos antibióticos.⁷ As concentrações destes fármacos encontradas nos corpos d'água são

consideravelmente menores que as consumidas intencionalmente e variam na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} .³ No entanto, uma exposição prolongada, bem como, a combinação destes fármacos com outros poluentes, pode se tornar um risco potencial para os organismos aquáticos e terrestres.⁸ Estas concentrações, geralmente, não são suficientes para inibir ou matar todas as bactérias sensíveis ao antibiótico, de modo que, pode ocorrer ainda o desenvolvimento de bactérias mais resistentes a estes compostos.⁴

Portanto, a presença de antibióticos no ambiente aquático durante um longo período de tempo, mesmo que em baixas concentrações, resultam em diferentes efeitos que podem prejudicar o equilíbrio ambiental. Desta forma, estudos se fazem necessários para conhecer os possíveis efeitos sobre a biota. Um método empregado na avaliação destes efeitos biológicos são os ensaios ecotoxicológicos.⁹ Estes ensaios constituem-se basicamente na exposição de organismos-testes a diferentes concentrações de amostra, buscando detectar seus efeitos letais e/ou subletais.^{10, 11}

A cefalexina (CFX), apresentada na Figura 1, é um antibiótico β -lactâmico, cefalosporínico de primeira geração, de amplo espectro na medicina humana e animal.¹² As cefalosporinas são responsáveis por interromper a síntese da parede celular bacteriana, impedindo assim o crescimento de bactérias.¹³

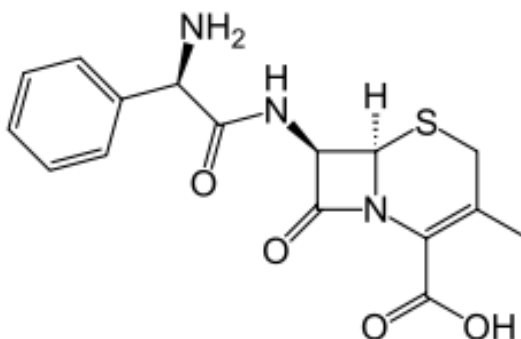


Figura 1: Fórmula estrutural do antibiótico cefalexina.

A fim de obter tratamentos mais eficientes, processos fotolíticos e fotocatalíticos são estudados para que sejam aplicados aos métodos convencionais. Os processos fotolíticos empregam a luz, artificial ou natural, como única fonte de degradação e, geralmente, apresentam baixa eficiência, uma vez que, algumas espécies orgânicas não são degradadas de forma rápida e eficiente com esta técnica.¹⁴ Os processos fotocatalíticos baseiam-se na utilização de luz juntamente com catalisadores homogêneos ou heterogêneos, ou ainda a combinação de ambos, para o aumento da velocidade da reação.¹⁵

As técnicas que utilizam catalisadores como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) são caracterizadas pela formação de radicais hidroxila ($HO\cdot$), que são altamente reativos com compostos orgânicos e desta forma, são denominadas Processos Oxidativos Avançados (POA),¹⁶ estes, quando submetidos à irradiação ultravioleta (UV) e na presença de catalisadores (íons metálicos, semicondutores), tem sua eficiência aumentada.^{17, 18}

Estudos apontam que a fotocatalise heterogênea na presença de dióxido de titânio (TiO_2) é uma técnica importante de oxidação avançada na eliminação de contaminantes em baixa concentração, em virtude de seu baixo custo, disponibilidade comercial, não toxicidade e estabilidade fotoquímica. Apesar de o óxido de zinco (ZnO) ser pouco estudado, também apresenta resultados promissores pois, apresenta como vantagem uma alta atividade fotocatalítica,⁶ enquanto que dentre suas desvantagens estão a fotocorrosão devido à irradiação UV e a perda de atividade fotocatalítica em pHs ácidos.^{19,20}

A fim de minimizar os efeitos ambientais citados, a remoção de contaminantes deve ser realizada por meio de processos de tratamento adequados e, neste sentido, propõe-se no presente estudo a utilização de metodologias fotolíticas e fotocatalíticas na degradação do antibiótico cefalexina, de modo a provocar a aceleração nas reações empregando-se catalisadores e luz UV.

Experimental

Produtos químicos e antibiótico

O dióxido de titânio foi obtido junto a Sigma-Aldrich (teor de 99,9%) e o óxido de zinco de Labsynth (teor de 99%). A cefalexina, grau farmacêutico (teor de 99,44%), foi adquirida no comércio local. O hidróxido de sódio (NaOH) (FMAIA), ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (Anidrol), todos grau P.A. foram utilizados sem purificação adicional.

Métodos analíticos

Os experimentos foram acompanhados por espectrofotometria de UV-VIS utilizando-se para tal um espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC. Varreu-se na região de 220 a 390 nm, obtendo-se espectros de absorção em intervalos de tempo previamente estabelecidos.

O peróxido de hidrogênio foi dosado anteriormente a cada adição, utilizando a técnica de titulação permanganométrica, como descrita na literatura.²¹

Preparo de amostra

A solução estoque de CFX foi preparada dissolvendo-se 0,2 g do princípio ativo em 100 mL de água destilada obtendo-se uma solução de concentração equivalente a 2,0 g L⁻¹. A solução foi submetida ao ultrassom por 40 minutos a fim de garantir a solubilidade total da CFX e a eliminação de bolhas de ar. Por meio da curva de calibração, foi determinada a concentração da solução de CFX a ser irradiada. Para tal, foram preparadas diluições a partir

da solução estoque de CFX obtendo-se dez pontos distintos entre $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $50,0 \text{ mg L}^{-1}$. Foi determinado o coeficiente de absorção molar e verificou a semelhança no comportamento das bandas de absorção em virtude da concentração.

Para cada um dos experimentos do presente trabalho, foi utilizado um volume de solução de 200 mL, os quais foram irradiados durante 120 minutos em foto-reator, sendo coletadas alíquotas de aproximadamente 3,0 mL, em intervalos de tempo previamente estabelecidos, para a realização de leituras espectrais utilizadas no acompanhamento cinético da reação.

Para a construção dos gráficos de $\ln(A_0/A)$ *versus* tempo de irradiação, em minutos, foram empregados os valores do máximo de absorção localizado no comprimento de onda de 262 nm, onde A_0 representa absorvância inicial e A representa a absorvância no tempo t.

Os gráficos foram traçados empregando-se a planilha eletrônica Microsoft Excel® e OriginPro 8®, e o tratamento estatístico foi realizado por meio do *software* estatístico Statistica®.

Ensaio de degradação do fármaco em solução aquosa por fotólise e fotocatalise homogênea

Para os experimentos de fotólise e fotocatalise foi utilizado um foto-reator *lab-made*²², representado na Figura 2, equipado com uma lâmpada de vapor de mercúrio (Hg) de alta pressão de 125 W de potência, que emite luz em todo o espectro Ultravioleta-Visível (UV-Vis), A lâmpada de vapor de Hg foi instalada a uma distância de 11 cm da amostra e seu bulbo externo foi removido para evitar o efeito de filtro da radiação UV.

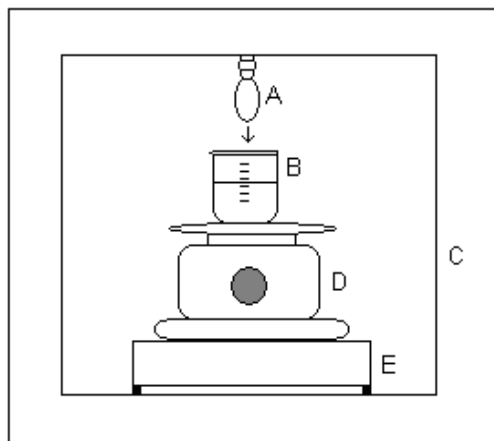


Figura 2: Esquema do foto-reator utilizado para as irradiações.

- A) Lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W; B) Béquero com a solução aquosa do fármaco;
C) Parede interna do reator; D) Agitador magnético; E) Suporte de madeira para agitador.

Para ambos as técnicas, as amostras tiveram seus valores de pH ajustados em 4, 7 e 10, empregando-se soluções de HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. O pH inicial das soluções foi determinado empregando-se um eletrodo de vidro combinado universal (BNC Eltex) e um pHmetro (Quimis/Q.400.A).

Na fotocatalise homogênea foram investigadas as variáveis H_2O_2 e pH, para tal, foram empregadas concentrações de 500 mg L^{-1} , 1000 mg L^{-1} e 1500 mg L^{-1} de H_2O_2 e para cada uma das adições foram testados os pH's 4, 7 e 10, totalizando, portanto, nove experimentos distintos.

Ensaio de degradação do fármaco empregando diferentes pH's, H_2O_2 , TiO_2/ZnO e luz UV como catalisadores (Método de Fotocatalise Heterogênea)

Foram preparadas soluções aquosas de CFX (50 mg L^{-1}) contendo quantidade necessária de TiO_2/ZnO para a obtenção das concentrações definidas no planejamento

experimental (Tabela 2). Os catalisadores heterogêneos TiO_2 e ZnO foram testados a fim de verificar a eficiência de cada um no processo de fotodegradação.

O pH foi ajustado para os valores desejados e a mistura foi mantida ao abrigo da luz, com agitação constante, durante 30 minutos, até que o equilíbrio de adsorção fosse atingido. Foi adicionado o volume de H_2O_2 necessário e, em seguida, a amostra foi submetida à irradiação UV, coletando-se alíquotas da solução irradiada em intervalos de 15 minutos. Para a realização das leituras espectrais, a amostra foi filtrada em filtros-seringa com poros de $0,2\mu\text{m}$ (Chromafil PVDF-20/15 MS), sendo transferida, em seguida, para um cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

Planejamento experimental 2^3

No teste estatístico foi avaliada a importância dos parâmetros operacionais do processo de fotodegradação, de modo que, as concentrações dos catalisadores e o pH inicial, bem como a interação entre estes, puderam ser melhor avaliados no planejamento experimental 2^3 , como descrito na literatura.²³ Os parâmetros estudados ($[\text{TiO}_2/\text{ZnO}]$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$, e pH inicial) são apresentados na Tabela 2.

TABELA 1: Níveis das variáveis (TiO_2/ZnO , H_2O_2 e pH) utilizados no planejamento experimental.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
TiO_2/ZnO (mg L^{-1})	50	75	100
H_2O_2 (mg L^{-1})	500	750	1000
pH	4	7	10

Os três parâmetros dos processos variaram entre si em dois níveis (-1 e +1), gerando assim 8 experimentos para cada catalisador heterogêneo, denominados P1 a P8 para o TiO₂ e E1 a E8 para o ZnO. Com objetivo de aumentar o grau de liberdade do modelo foi realizada uma triplicata no ponto central (P9 a P11 e E9 a E11, respectivamente), conforme apresentados pela Tabela 3.

TABELA 2: Variações do três níveis de concentração dos reagentes e do pH.

Experimentos	Condições experimentais		
	pH	H ₂ O ₂	TiO ₂ /ZnO
P1/E1	1	1	1
P2/E2	-1	1	1
P3/E3	1	-1	1
P4/E4	-1	-1	1
P5/E5	1	1	-1
P6/E6	-1	1	-1
P7/E7	1	-1	-1
P8/E8	-1	-1	-1
P9/E9	0	0	0
P10/E10	0	0	0
P11/E11	0	0	0

Os resultados dos experimentos obtidos no planejamento experimental foram avaliados por meio do *software* estatístico Statistica® (Statsoft, Inc), no modo “*experimental design*”, para dois níveis de variação, sendo realizadas análises dos efeitos, interações, superfície de resposta e análise de variância (ANOVA).

Ensaio ecotoxicológico

Toxicidade aguda utilizando Daphnia magna

Os ensaios ecotoxicológicos são utilizados para o monitoramento e avaliação da qualidade da água. Os testes agudos fornecem uma resposta dos efeitos deletérios ocasionados aos organismos testes por uma exposição de curto período de tempo (24-48 horas) aos compostos de interesse. Para avaliar estes efeitos observa-se a concentração efetiva (CE_{50}), ou seja, a concentração de agente tóxico presente no ambiente aquático que causa 50% de letalidade, ou outro efeito, à espécie teste.²⁴

Os testes de toxicidade aguda da cefalexina (CFX), utilizando o bioindicador *Daphnia magna*, foram realizados conforme metodologia descrita na NBR 12713 da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) de 2009.²⁵ Os organismos de *Daphnia magna* foram obtidos do cultivo-estoque do laboratório, utilizando para os testes, neonatos entre 6 e 24 horas de vida. O cultivo dos indivíduos foi realizado dentro de câmaras incubadoras BOD (Marconi), sob temperatura controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo escuro ou 12 horas a 16 horas de luz.

Inicialmente foram realizados testes preliminares, a fim de determinar as faixas de concentração letal da CFX, ou seja, as maiores concentrações não letais e as menores concentrações letais aos organismos testes. Neste estudo, foi utilizada uma solução aquosa de CFX na concentração de 50 mg L^{-1} sem tratamento, denominada solução estoque I, e outra solução de CFX após tratamento, seguindo as melhores condições de fotodegradação obtidas nos ensaios anteriores, utilizando-se, portanto, uma solução aquosa de CFX de 50 mg L^{-1} na presença de 50 mg L^{-1} de TiO_2 e 1000 mg L^{-1} de H_2O_2 em pH 4, sendo esta, denominada solução estoque II.

Com base nas concentrações obtidas nos testes preliminares foram executados, em duplicata, os testes definitivos, em que os organismos neonatos foram expostos a concentrações crescentes do antibiótico. As diluições foram realizadas a partir das soluções estoques I e II, de modo a obter diluições de 1:1, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:96, além da solução de controle, totalizando um volume final de 50 mL. Em seguida, dez organismos neonatos foram adicionados em cada frasco. Os indivíduos foram mantidos sem alimentação durante 24 e 48 horas e após estes períodos foi registrado o número de organismos imóveis ou mortos.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda foram utilizados para o cálculo do parâmetro de concentração efetiva média (CE_{50}), utilizando-se para tal o programa estatístico Trimmed Spearman – Karber.

Resultados e discussão

Avaliação do processo de fotólise e a influência do pH

Por meio da curva de calibração determinou-se a concentração da solução de trabalho, equivalente a 50 mg L^{-1} , visto que nesta concentração a absorvância aproximou-se de 1,0. A curva de calibração apresentou bom ajuste linear no intervalo estudado ($R^2 = 0,9961$).

O espectro de absorção da CFX não apresentou modificação em seu comportamento espectral em função do pH do meio, apresentando seu máximo de absorção (λ_{max}) centrado em 262 nm.

Inicialmente, foi investigada a influência do pH no processo de fotólise do fármaco CFX. Para isto, foram preparadas soluções aquosas de CFX na concentração de 50 mg L^{-1} nos pH's 4, 7 e 10. Foram acompanhados os espectros de absorção em intervalos de 15 minutos e,

após 120 minutos, foi calculado o percentual de redução da intensidade da banda em 262 nm, conforme a Equação 1, sendo que este valor de percentual foi considerado como o parâmetro para a degradação da amostra.

$$\% \text{ redução de Absorvância} = \left(1 - \left(\frac{Abs_{final}}{Abs_{inicial}} \right) \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Todos os ensaios apresentaram comportamento espectrofotométrico muito semelhante, diferindo-se apenas pelos valores de percentual de redução de absorvância, que foram de 10,63%, 10,18% e 9,28% para os pH's 4, 7 e 10, respectivamente.

Na Figura 3 estão representados os gráficos de $\ln(A_0/A)$ em função do tempo para os três experimentos.

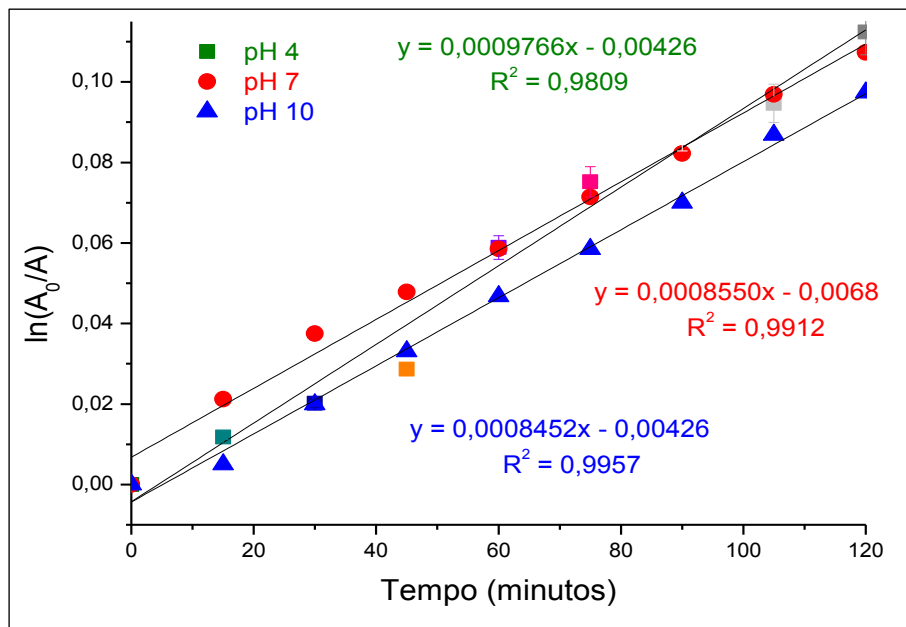


Figura 3: Ajustes lineares dos pontos do gráfico de $\ln(A_0/A)$ vs tempo (min) para as amostras em pH 4 ($\delta = 5,1530 \times 10^{-5}$), pH 7 ($\delta = 3,0458 \times 10^{-5}$) e pH 10 ($\delta = 2,0897 \times 10^{-5}$).

É possível verificar que o ensaio em pH 4 é o que apresenta maior valor de k ($k = 9,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$), o que significa que a CFX é degradada mais rapidamente neste pH do que nos demais. Os valores de coeficiente de correlação (R^2) foram calculados para os experimentos de pH 4, 7, 10, apresentando ajustes de 0,9809, 0,9912 e 0,9957 respectivamente, desta forma, é possível afirmar que as relações lineares entre $\ln(A_0/A)$ versus o tempo seguem uma cinética de primeira ordem (pseudo primeira ordem) até 120 minutos de reação.

Avaliação do processo de fotodegradação utilizando H_2O_2 , pH e luz UV

A adição do catalisador H_2O_2 , nas concentrações de 500, 1000 e 1500 mg L^{-1} , foi efetuada em soluções de CFX previamente ajustadas nos pH's 4, 7 e 10. A Tabela 3 apresenta os valores de percentual de redução da absorbância para cada um dos experimentos realizados com a adição de H_2O_2 , além dos valores resultantes da fotólise. Para a determinação das constantes de velocidade (k), segundo uma cinética de primeira ordem (ou pseudoprimeira ordem), foram traçados os gráficos de $\ln(A_0/A)$ em função do tempo para todos os experimentos realizados, acompanhando-se o comportamento da banda em 262 nm.

TABELA 3: Valores de percentual de redução da banda, constantes cinéticas e R^2 para os experimentos de fotocatalise homogênea com H_2O_2 em diferentes concentrações e pH's.

	$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mg L^{-1})	% redução da banda em 262 nm	k (min^{-1})	R^2
pH 4	0	10,63	$9,8 \times 10^{-4}$	0,9809
	500	31,58	$30,8 \times 10^{-4}$	0,9922
	1000	29,33	$28,3 \times 10^{-4}$	0,9922
	1500	33,29	$34,1 \times 10^{-4}$	0,9941

pH 7	0	10,18	$8,6 \times 10^{-4}$	0,9912
	500	27,08	$26,0 \times 10^{-4}$	0,9915
	1000	26,05	$25,9 \times 10^{-4}$	0,9965
	1500	24,57	$22,5 \times 10^{-4}$	0,9799
pH 10	0	9,28	$8,4 \times 10^{-4}$	0,9957
	500	15,50	$15,7 \times 10^{-4}$	0,9967
	1000	27,11	$28,0 \times 10^{-4}$	0,9995
	1500	21,51	$20,9 \times 10^{-4}$	0,9756

Como podem ser observados na Tabela 3, os experimentos apresentaram bom ajuste linear dos pontos experimentais, expresso pelos valores de R^2 . Para todos os experimentos, ocorre um aumento significativo do percentual de redução da banda quando comparado os valores de fotólise e de fotocatalise empregando H_2O_2 . Isto ocorre em virtude da produção de radicais hidroxilas altamente reativos que aceleram o processo de degradação.²⁶ Comparando-se os experimentos, verifica-se que a cinética de degradação da amostra com a presença de 1500 mg L^{-1} de H_2O_2 possui k da ordem de $34,1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$, valor aproximadamente 3,5 vezes superior ao processo fotolítico em $\text{pH} = 4$ ($k = 9,8 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$). Assim, é possível evidenciar uma maior eficiência de degradação com a presença de H_2O_2 no processo.

Ainda por meio da Tabela 4, nota-se que para cada valor de pH utilizado, uma diferente concentração de H_2O_2 apresentou maior percentual de degradação. Desta forma, pode-se afirmar que, o parâmetro concentração de H_2O_2 não apresentou resultados expressivos no processo de degradação, uma vez que, ocorre pouca variação no percentual de redução da banda quando a concentração deste catalisador é alterada. Em pH ácido tem-se uma melhor eficiência do processo de fotodegradação, pois em valores elevados de pH ocorre a influência de forças de repulsão entre a superfície negativa do catalisador e os elétrons livres

do grupamento amina presentes na molécula de CFX, podendo reduzir a eficiência da degradação.²⁷

A Figura 4 mostra o resultado dos experimentos de fotocatalise utilizando-se uma concentração de H_2O_2 de 1500 mg L^{-1} e pH 4.

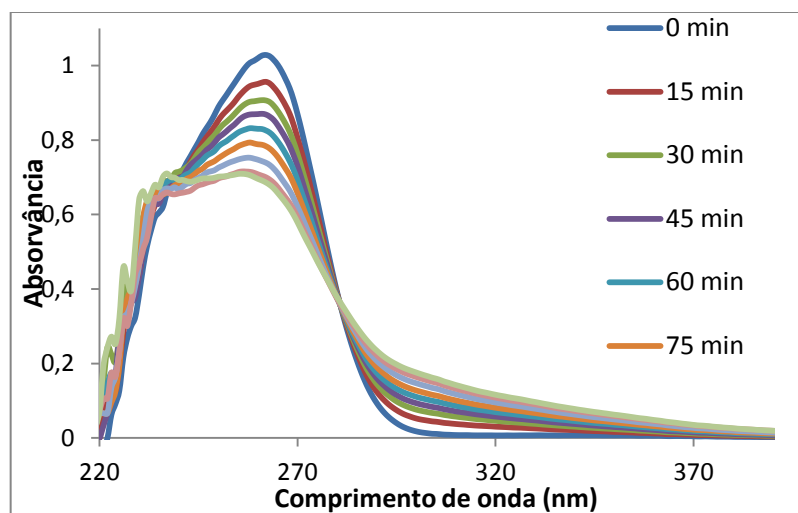


Figura 4: Espectros de absorção da CFX em função do tempo de irradiação CFX 50 mg L^{-1} , H_2O_2 de 1500 mg L^{-1} em pH 4.

É possível observar na Figura 4 a existência de um ponto isobéptico centrado em aproximadamente 280 nm, indicativo de que há a conversão de uma estrutura em outra sem a presença de uma terceira forma.

Planejamento experimental e análise estatística do processo de fotocatalise utilizando TiO_2 , H_2O_2 e pH

Com a adição do catalisador TiO_2 houve um aumento no percentual de degradação, no entanto, concentrações mais elevadas deste catalisador não produzem melhorias na degradação do antibiótico, uma vez que, diminui a penetração da luz, aumentando a dispersão da luz, além de ocasionar a sedimentação do TiO_2 .²⁸

Para analisar a eficiência do processo de fotodegradação com irradiação artificial foi avaliada a eficiência na redução da absorvância. Os resultados obtidos apresentaram variações na redução da absorvância de 22,6% a 42,0%, conforme apresentados na Tabela 5.

TABELA 4: Resultados das análises da absorvância apresentados em (%) de redução.

Experimento	pH	H_2O_2 (mg L^{-1})	TiO_2 (mg L^{-1})	% Redução de Abs.
P1	10 (1)	1000 (1)	100 (1)	28,24
P2	4 (-1)	1000 (1)	100 (1)	41,02
P3	10 (1)	500 (-1)	100 (1)	30,57
P4	4 (-1)	500 (-1)	100 (1)	35,98
P5	10 (1)	1000 (1)	50 (-1)	33,49
P6	4 (-1)	1000 (1)	50 (-1)	41,96
P7	10 (1)	500 (-1)	50 (-1)	22,62
P8	4 (-1)	500 (-1)	50 (-1)	34,32
P9	7 (0)	750 (0)	75 (0)	36,07
P10	7 (0)	750 (0)	75 (0)	33,96
P11	7 (0)	750 (0)	75 (0)	32,52

O modelo estatístico gerado apresentou boa correlação entre valores previstos pelo modelo em função dos valores observados, para a redução absorvância, conforme apresentados pela Figura 5.

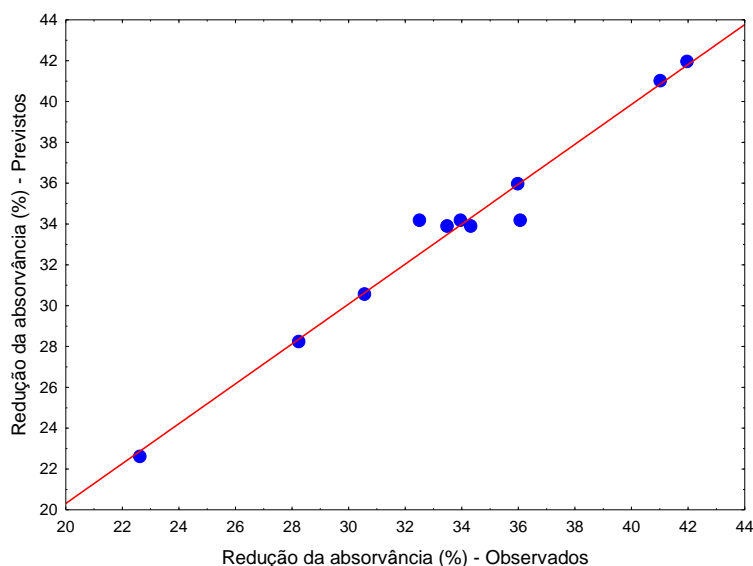


Figura 5: Valores previstos para o processo de foto degradação, com irradiação artificial, em função dos valores observados para a redução (%) da absorvância.

As respostas experimentais baseadas nos valores de redução da absorvância no planejamento experimental permitiram o desenvolvimento de um modelo estatístico, com ajuste linear, dos efeitos das interações entre os coeficientes associados às variáveis utilizados no processo de degradação, conforme apresentados na Tabela 5.

TABELA 5: Efeito das interações entre as variáveis do processo de foto degradação com irradiação artificial para redução da absorvância

Variáveis e interações	Efeito da Variável	Coefficiente do modelo	Erro padrão do coeficiente	t_{exp} (4)	p -valor
Intercepto	33,049	33,049	0,694	47,638	0,000
pH	-7,583	-3,792	0,804	-4,715	0,009

H ₂ O ₂	7,315	3,658	0,804	4,548	0,010
TiO ₂	2,656	1,328	0,867	1,531	0,200
pH com H ₂ O ₂	-2,838	-1,419	0,867	-1,636	0,177
pH com TiO ₂	-1,512	-0,756	0,804	-0,940	0,400
H ₂ O ₂ com TiO ₂	-5,959	-2,980	0,804	-3,705	0,021

$r^2 = 0,95463$

Observando os dados expressos pela Tabela 5, é possível concluir que, ao nível de significância de 95% (p -valor < 0,05), os parâmetros pH, H₂O₂, assim como a interação entre os parâmetros H₂O₂ e TiO₂ são significativos para o processo. Através dos valores de t_{exp} , com grau de liberdade 4, as variáveis pH e H₂O₂, apresentam um grau de influência muito próximo, porém em sentido inverso. Para a variável pH, o decréscimo do nível 1 para o -1 provocará o aumento do percentual de redução da absorvância, enquanto que, para a variável H₂O₂, o decréscimo de seu valor acarretará a diminuição da resposta. Avaliando a interação entre fatores H₂O₂ e TiO₂, conclui-se que o aumento da interação provoca a diminuição do valor de resposta, de forma menos acentuada que os fatores independentes.

O valor de R^2 de 0,95463 indica que cerca de 95% da variabilidade na resposta pode ser explicada por meio do modelo calculado.

O ajuste de um modelo linear, considerando apenas os parâmetros significativos do processo, dados retirados da Tabela 5, resulta na Equação 2, que descreve os valores das variáveis codificadas.

$$\% \text{ Red Abs.} = 33,049 - 3,792 \cdot \text{pH} + 3,658 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] - 2,98 \cdot [\text{H}_2\text{O}_2] \cdot [\text{TiO}_2] \quad \text{Equação 2}$$

A significância dos efeitos das variáveis significativas operacionais e suas possíveis ações combinadas são verificadas aplicando a análise de variâncias (ANOVA), utilizando o *software* Statistica®, como apresentado na Tabela 6.

TABELA 6: Teste de variância (ANOVA) do modelo previsto para o processo de fotodegradação na redução da absorvância.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática	F	p-valor
pH	162,672	1	162,672	45,008	0,000
H₂O₂	60,555	1	60,555	16,755	0,005
H₂O₂ com TiO₂	34,957	1	34,957	9,672	0,017
Erro Padrão	25,300	7	3,614		
Total	297,029	10			

Nas condições propostas, o F_{Cal} (24,14) é maior que o F_{Tab} (3; 7; 0,05 = 4,35), portanto, o modelo é válido para o intervalo de confiança de 95%. Os resultados experimentais obtidos no planejamento e a análise dos parâmetros operacionais do reator de fotodegradação podem ser melhores visualizados no gráfico N-Dimensional da superfície de resposta, representado na Figura 6.

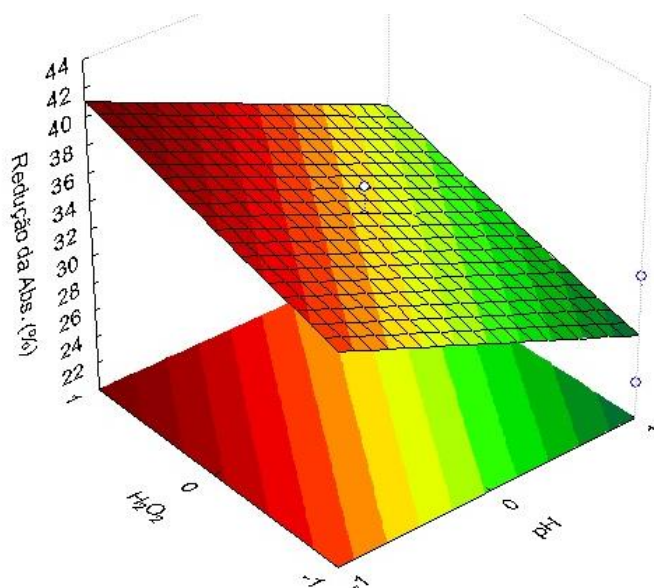


Figura 6: Superfície de resposta mantendo-se fixa no ponto central ($75,0 \text{ mg L}^{-1}$) a variável TiO_2 .

Na Figura 6 foi analisada o efeitos das duas variáveis significativas (pH e H_2O_2) do processo, mantendo a terceira variável (TiO_2) fixa no ponto central estabelecido no planejamento. Observa-se que em pH ácido (4,0) obtém-se uma melhor eficiência do processo de fotodegradação. O resultado tende a ser ainda melhor quando aproximamos a variável H_2O_2 do nível 1, onde foi utilizada a concentração de 1000 mg L^{-1} do composto.

Planejamento experimental e análise estatística do processo de fotocatalise utilizando ZnO , H_2O_2 e pH

Os resultados obtidos para os experimentos com a adição do catalisador ZnO , seguindo um planejamento 2^3 , estão dispostos na Tabela 7, em que pode-se verificar que os percentuais de redução de absorvância variaram entre 21,56 e 32,65%.

TABELA 7: Resultados das análises da absorvância apresentados em (%) de redução.

Experimento	pH	H₂O₂ (mg L⁻¹)	ZnO (mg L⁻¹)	% Redução de Abs.
E1	10 (1)	1000 (1)	100 (1)	26,35
E2	4 (-1)	1000 (1)	100 (1)	27,28
E3	10 (1)	500 (-1)	100 (1)	30,89
E4	4 (-1)	500 (-1)	100 (1)	21,77
E5	10 (1)	1000 (1)	50 (-1)	27,16
E6	4 (-1)	1000 (1)	50 (-1)	27,14
E7	10 (1)	500 (-1)	50 (-1)	21,56
E8	4 (-1)	500 (-1)	50 (-1)	32,65
E9	7 (0)	750 (0)	75 (0)	24,69
E10	7 (0)	750 (0)	75 (0)	30,95
E11	7 (0)	750 (0)	75 (0)	26,35

Não foi possível representar os dados experimentais por meio de um modelo estatístico, de modo que, os valores previstos pelo modelo em função valores observados apresentaram uma distribuição aleatória, conforme mostrado na Figura 7.

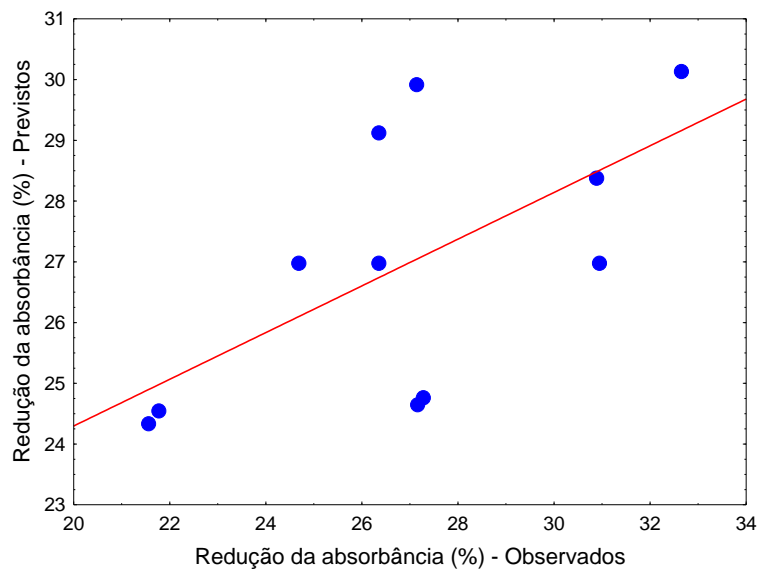


Figura 7: Valores previstos para o processo de fotodegradação utilizando ZnO, com irradiação artificial, em função dos valores observados para a redução (%) da absorvância.

O tratamento estatístico dos valores referentes aos percentuais de redução da banda em 262 nm após 120 minutos de radiação UV demonstrou que todas as variáveis (pH, ZnO e H₂O₂, bem como a interação entre elas) não apresentaram significância sobre o processo de fotodegradação, dentro do intervalo de confiança de 95%, como pode-se verificar na Tabela 8.

TABELA 8: Efeito das interações entre as variáveis do processo de foto degradação com irradiação artificial para redução da absorvância

Variáveis e interações	Efeito da Variável	Coefficiente do modelo	Erro padrão do coeficiente	t _{exp} (4)	p-valor
Intercepto	26,981	26,9809	1,327	20,329	0,000035
pH	-0,720	-0,3600	1,556	-0,231	0,828418
H ₂ O ₂	0,265	0,1325	1,556	0,085	0,936242
ZnO	-0,555	-0,2775	1,556	-0,178	0,867147
pH com H ₂ O ₂	0,265	0,1325	1,556	0,085	0,936242

pH com ZnO	4,815	2,4075	1,556	1,547	0,196782
H ₂ O ₂ com ZnO	0,220	0,1100	1,556	0,071	0,947044

$r^2 = 0,38441$

Esta análise pode ser realizada ainda de forma gráfica por meio do Diagrama de Pareto, Figura 8, que mostra em ordem decrescente os efeitos dos fatores sobre a resposta. É possível observar que nenhuma das variáveis exerce influência significativa sobre a fotodegradação da cefalexina utilizando ZnO.

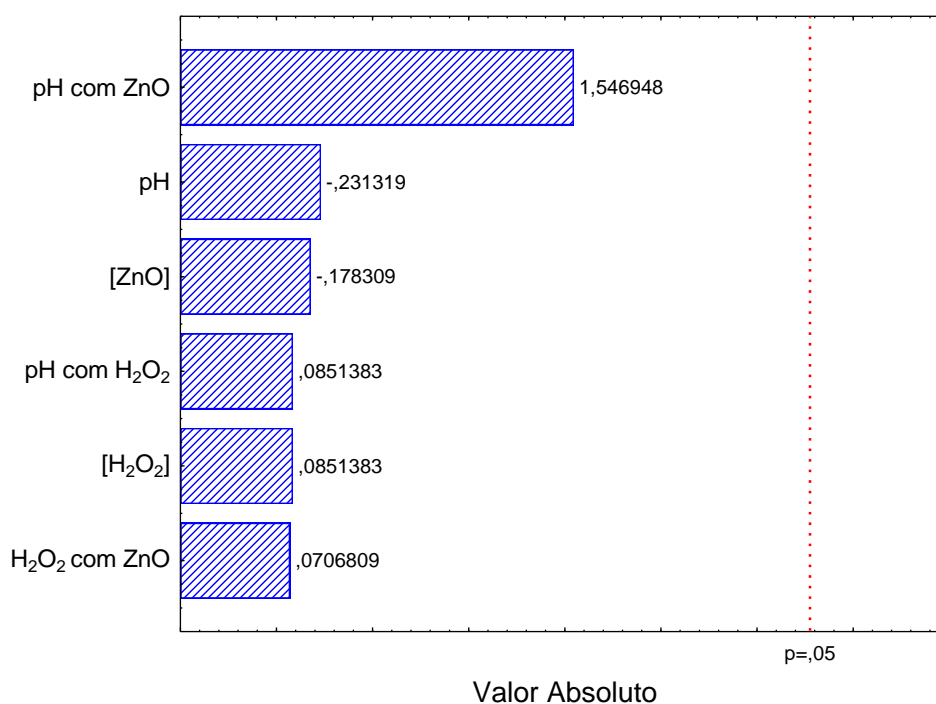


Figura 8: Gráfico de Pareto para a fotocatalise da CFX utilizando ZnO.

Análise dos ensaios ecotoxicológicos

Foram realizadas leituras de pH e oxigênio dissolvido (OD) da solução controle ao início dos ensaios, obtendo-se valores de 7,2 e 7,4 mg L⁻¹, respectivamente, atendendo, portanto, os valores previstos pela metodologia utilizada.

Os ensaios ecotoxicológicos foram realizados seguindo as melhores condições obtidas experimentalmente nos processos de fotodegração. Desta forma, utilizou-se a CFX em pH 4 na concentração de 50 mg L⁻¹ juntamente com 1000 mg L⁻¹ de H₂O₂ e 50 mg L⁻¹ de TiO₂.

Os resultados obtidos neste estudo, utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*, demonstram que a CFX com tratamento fotocatalítico apresentou grau de toxicidade maior que a de CFX sem tratamento. Os valores de CE₅₀ estimados estatisticamente após o período de 48 horas foi de 3,59 mg L⁻¹ para a CFX com tratamento, enquanto que, a CFX sem tratamento apresentou inibição da capacidade natatória inferior a 10%, ou seja, não apresentou toxicidade ao organismo teste.

Os valores de CE₅₀ obtidos para cada solução estoque de CFX foram utilizados para classificar as soluções quanto ao potencial tóxico, de acordo com as classes toxicológicas encontradas na literatura.²⁹ As classes de toxicidade aguda são classificadas como: extremamente tóxico (CL₅₀ ou CE₅₀ < 0,1 mg L⁻¹), altamente tóxico (0,1 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 1 mg L⁻¹), moderadamente tóxico (1,0 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 10 mg L⁻¹), pouco tóxicos (10 < CL₅₀ ou CE₅₀ < 100 mg L⁻¹), e praticamente não tóxico (CL₅₀ ou CE₅₀ > 100 mg L⁻¹). Conforme as classes de toxicidade aguda, a solução de CFX com tratamento fotocatalítico foi classificada como moderadamente tóxica, enquanto que a solução de CFX sem tratamento não foi considerada tóxica para *Daphnia magna*.

Não foram encontrados relatos de toxicidade aguda para a CFX em estudos que utilizam *Daphnia magna* ou outros bioindicadores. Estudos apontam valores de CE₅₀ para outros antibióticos beta-lactâmicos: amoxicilina apresentou CE₅₀ de 3,7 µg L⁻¹ após 72 horas de exposição utilizando o bioindicador *Algae M. aeruginosa*; ampicilina apresentou CE₅₀ de 2627 mg L⁻¹, após 15 minutos de exposição utilizando a bactéria *Vibrio fischeri*.¹¹

Conclusão

No estudo de fotocatalise homogênea utilizando H_2O_2 observou-se que o antibiótico CFX apresentou maior percentual de degradação na presença de 1500 mg L^{-1} de H_2O_2 e em pH 4, de modo que, no processo os pontos experimentais se ajustam a uma cinética de pseudo-primeira ordem, obtendo-se o valor de k equivalente a $34,1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$. Esta constante foi superior àquela determinada para o processo fotolítico em pH = 4 sem adição do catalisador.

Nos ensaios de fotocatalise utilizando a combinação de H_2O_2 , TiO_2 e diferentes valores de pH, pôde-se verificar, por meio do planejamento experimental 2^3 , que os parâmetros pH, H_2O_2 , assim como a interação entre os parâmetros H_2O_2 e TiO_2 são significativos para o processo, de modo que o decréscimo da variável pH provoca o aumento do percentual de redução da absorvância, enquanto que, para a variável H_2O_2 , o decréscimo de seu valor acarreta na diminuição da resposta. No que se refere da interação entre fatores H_2O_2 e TiO_2 , conclui-se que o aumento da interação provoca a diminuição do valor de resposta, de forma menos acentuada que os fatores independentes.

O tratamento estatístico do processo que utiliza o ZnO como catalisador heterogêneo, demonstrou que todas as variáveis (pH, ZnO e H_2O_2 , bem como a interação entre elas) não apresentaram significância sobre o processo de fotodegradação, desta forma, o método não pôde ser validado estatisticamente.

No que se refere aos ensaios ecotoxicológicos, verifica-se que a toxicidade aguda da solução de CFX com tratamento fotocatalítico foi classificada como moderadamente tóxica, enquanto que a solução de CFX sem tratamento não foi considerada tóxica para *Daphnia magna*. Entretanto, é importante ressaltar que a solução utilizada para o ensaio

ecotoxicológico do produto degradado ainda havia a presença de H_2O_2 , que pode ter influenciado na toxicidade observada para a amostra.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e à Fundação Araucária pelo auxílio financeiro concedido.

Referências

1. Ay, F.; Kargi, F. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *179*, 622.
2. Khetan, S. K.; Collins, T. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2319.
3. Bila, D. M.; Dezotti, M. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 523.
4. Kümmerer, K. *J. Environ. Manag.* **2009**, *90*, 2354.
5. Nogueira, R. F. P.; Melo, S. A. S.; Trovo, A. G. *J. Photochem. Photobiol., A* **2008**, *198*, 215.
6. Palominos, R. A.; *et al.* *Catal. Today* **2009**, *144*, 100.
7. Araujo, A. N. *et al.* *J. Hazard. Mater.* **2010**, *175*, 45.
8. Abellán, M. N.; Giménez, J.; Esplugas S. *Catal. Today* **2009**, *144*, 131.
9. Zaldívar, J. M.; Baraibar, J. *Chemosphere*, **2010**, *82*, 1547.
10. Lu, G.; Liu, J.; Sun, L.; Yuan, L. *Water Sci. Eng.* **2015**, *8*, 40.
11. Barmantlo, S. H.; Stel, J. M.; Van Doorn, M.; Eschauzier, C.; Voogt, ; Kraak, M. H. S. *Environ. Pollut.* **2015**, *198*, 47.

12. Reynoso, E.; Nesci, A.; Allegretti, P.; Criado, S.; Biasutti, M. *Redox Rep.* **2012**, *17*, 275.
13. Wang, X.; Lin, A. Y. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 12417.
14. Yuan, F.; Hu, C.; Hu, X.; Wei, D.; Chen, Y.; Qu, J. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1256.
15. Guimarães, J. R.; Silva, C. R.; Maniero, M. G.; Peres, M. *Quím. Nova* **2014**, *37*, 868.
16. Suzuki, H.; Araki, S.; Yamamoto, H. J. *Water Process Eng.* **2015**, *7*, 54.
17. Melo, S. A. S.; Trovó, A. G.; Bautitz, I. R.; Nogueira, R. F. P. *Quím. Nova* **2009**, *32*, 188.
18. Utrilla, J. R.; Polo, M. S.; García, M. A. F.; Joya, G. P.; Pérez, R. O. *Chemosphere.* **2013**, *93*, 1268.
19. Dijken, A.V.; Janssen, A.H.; Smitsmans, M.H.P.; Meijerink, A. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 3513.
20. Daneshvar, N.; Salari, D.; Khataee, A. R. *J. Photochem. Photobiol. A* **2004**, *162*, 317.
22. Vogel, A. I. *Análise Química Quantitativa*. 5th ed.; JC Editora: Rio de Janeiro, Brasil, 1992.
22. Schneider, M. V.; *et al.* *Eng. Sanit. Amb.* **2014**, *19*, 61.

23. Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 3th ed.; Editora da UNICAMP: Campinas, Brasil, 2007.
24. Costa, C. R.; Olivi, P. *Quim. Nova*, **2008**, *31*, 1820.
25. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); Norma Técnica NBR 12713, *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*, Rio de Janeiro, 2009.
26. Kim, I.; Yamashita, N.; Tanaka, H. *Chemosphere*, **2009**, *77*, 518.
27. Ajoudanian, N.; Nezamzadeh-Ejhieh, A. *Mater. Sci. Semicond. Process*, **2015**, *36*, 162.
28. Elmolla, E. S.; Chaudhuri, M. *Desalination* **2010**, *252*, 46.
29. Zucker, E. *Standard evaluation procedure acute toxicity test for freshwater fish*. Hazard Evaluation Division of USEPA: Washington, 1985.

ANEXOS

Anexo A: Normas para publicação da Revista “Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)”

1. Introduction

The *Journal of the Brazilian Chemical Society (JBCS)* embraces all aspects of chemistry except education, philosophy and history. It is a medium for reporting selected original and significant contributions to new chemical knowledge. The Journal publishes **Articles, Communications, Short Reports, Reviews, Accounts and Letters**.

The reproduction of figures, schemes and photos already published in other publications, even if these materials have been published by the same authors, requires the copyright permission given by the editor house allowing the publication of the article in the *JBCS*.

1.1 Manuscript types

Article should be comprehensive and critical accounts of a work in a given area. Although short articles are acceptable, the Editors strongly discourage fragmentation of a substantial body of work into a number of short publications.

Communication should be restricted to reports of **unusual urgency and significance or interest**. They should be submitted with a **statement** from the authors as to **why the manuscript meets these criteria**. A manuscript will not be accepted if, in the opinion of the Editors, the principal content has previously been released or published in any other medium. The communication should not exceed 1500 words or occupy more than 3 pages of the Journal. To estimate the length of a communication, an average sized figure is counted as 100 words and separate formulae and lines of a table are counted as 8 words per line, including headings and horizontal rulings. Title, authors' names and literature references are not counted.

Short Report is meant to be a concise terminal report of studies of limited scope. Manuscripts submitted as articles or communications may, in some cases, be accepted as short reports. The standard of quality expected in short reports is the same as in articles.

Review is normally invited by the Editors. However, the Editors welcome suggestions for reviews considered suitable for the Journal. Be aware that the **topics** (items) in the **Reviews** must be **numbered** with Arabic numerals.

1.2 Before Beginning the Submission

Copyright License

The submission of a manuscript implies that it has not been previously published, that it is not under consideration for publication elsewhere or that it will not be simultaneously published elsewhere in the same format without the written permission of the Editors. Additionally, it implies that the submitting author has the consent of all authors. By submitting a manuscript, the authors agree that their paper's copyright is transferred to the Brazilian Chemical Society (*Sociedade Brasileira de Química, SBQ*) if and when the manuscript is accepted for publication. Accepted manuscripts and illustrations become the property of the SBQ.

Manuscript Organization

Authors should present their materials with the utmost conciseness and clarity. The **Introduction** should clearly and briefly identify, with relevant references, both the nature

of the problem under investigation and its background. Extensive reviews of the literature cannot be accepted.

In **Articles** and **Short Reports**, the **Experimental** section may precede or follow the **Results and Discussion** section, but should be separated from it. The addition of a final section at the end of the manuscript, which briefly summarizes the main **Conclusions** of the work, is recommended and needs to be just after the **Results and Discussion** section.

Descriptions of experiments should be given in sufficient details to enable other researchers to repeat them. The degree of purity of materials should be given, as well as all quantities used. Descriptions of established procedures are unnecessary. Standard techniques and methods used throughout the work should be stated at the beginning of the section in a **Materials and/or Methods** subsection, in the **Experimental** section. Apparatus should be described only if it is non-standard. Commercially available instruments should be referred to by their suppliers and models.

All **new compounds** should be fully characterized, which includes spectroscopic data and elemental analyses. High-resolution mass spectra may substitute for elemental analyses if accompanied by unequivocal proof of sample purity (melting points, copies of NMR spectra, etc.). For compounds prepared in enantiomerically pure or enantiomerically enriched form, specific optical rotation must be given. In cases where enantiomeric excess is determined by chromatographic and/or spectroscopic techniques, copies of the appropriate chromatograms and/or spectra should be included as Supplementary Information upon submission of the manuscript. Data associated with specific compounds should be listed after the name of the compound concerned, followed by the description of the preparation, or else presented in tabular form in the **Results and Discussion** section. All spectra must be included in the **Supplementary Information (SI)**, see Section 8).

Many theoretical and computational papers use a routine procedure based on a well-documented method, being it semi-empirical or *ab initio*. It is then sufficient to name the particular variant, referring to key papers, in which the method has been developed, to cite the computer program used and to indicate briefly any modification made by the author.

Complementary data meant to support the analysis of **Communications** should be included as **Supplementary Information**.

It is the **authors' responsibility** to obtain permission from other publishers for the reproduction of artwork from other journals in the reviews or in any other type of publication. Such specific **Copyright Permissions** should be sent to the **JBCS** Editorial Manager. Suitable acknowledgement of reproduction must be given in the captions.

2. Preparation of Manuscripts

General Overview:

Font: Times New Roman

Font Size: 12

Font Color: Black

Spacing: double spaced

Pages: numbered consecutively

Tables, Schemes, Figures and captions: placed in the text, as close as possible to the first citation.

Figures: numbered with Arabic numerals. For full manuscripts containing material previously published in preliminary form, a copy of the previous communication is required and should be included at the end of the manuscript.

Maps: insert as **Supplementary Information**

Main sections (Introduction, Experimental, Results and Discussion, Conclusion section) of the manuscript should NOT be numbered, EXCEPT for Account and Review.

Supplementary Information (SI): needs to be included at the end of manuscript, after the **Conclusions** section.

It should contain RELEVANT and COMPLEMENTARY DATA to those presented in the manuscript. If new compounds are identified or characterized, **all spectra** should be included (see Section 8).

Graphics/Figures/Schemes: send them in the original program FILES: it is important that the files are editable to correct any minor mistake.

Structures in: *.cdx (ChemDraw);

Graphics in: *.opj/org (Origin); *.xls/xlsx (Excel);

Others in: *.cdr (CorelDraw);

We do not accept graphs and chemical structures as image files.

Details:

First Page

- **Graphical Abstract (GA)** (see Section 5)

Second Page

- **Title**

- **Authors' names:** full given name, followed by the middle name initial(s) and then by the full last name.

An asterisk (*) should follow the name of the corresponding author.

- **Addresses:** Authors are asked to provide full addresses for correspondence. The e-mail address of the corresponding author should be given as a footnote. If the address where the work was carried out is different from the present address of any of the authors, a footnote indicating the current position can be included. Each address should have a correspondent letter. As for instance:

*Jailson B. de Andrade,^{*a} Marta V. Andrade^b and Heloisa L. C. Pinheiro^c*

Third Page

Abstracts: maximum of 150 words for Articles, Accounts and Reviews and 50 words for Short Reports and Communications.

Keywords: a minimum of three and maximum of five. Broad-sense words such as "water" should be avoided.

The text should start from the third page of the manuscript.

Attention: all nomenclature should be consistent, clear, unambiguous and in accordance with the nomenclature rules established by the IUPAC, the International Union of Biochemistry, the Abstracts Service (see Index Guide to Chemical Abstracts, 1987 and <http://jbc.sbc.org.br/iupac.html>), the Nomenclature Committee of the American Chemical Society or any other appropriate bodies. Units and symbols should follow IUPAC recommendations. Authors will not be denied any reasonable usage, but if non-SI units are used for critical data or for quantities measured to a high degree of accuracy, final numerical values should also be expressed in SI units. Be sure that all abbreviations are once specified (as near as possible of their first citation).

3. Language, Style and Format

- **Language**

Only manuscripts written in **English** will be considered. Standard English and American English spellings are allowed but consistency should be maintained within the manuscript.

From now on, all authors are expected to send along with their manuscript a statement from a specialized company (or person), attesting that the text was submitted to **formal English**

review. Otherwise, the Editor can, at any time, ask for such procedure to warrant the English precision, conciseness and understanding of the manuscript.

- **Style and Format**

- **Main Sections:** First initial with capital letter, bold, no final full stop. Should not be numbered, except for Reviews and Accounts:

- **Introduction**

- **Experimental** (or **Methodology** in case of theoretical and computational papers)

- **Results and Discussion** or **Results** then **Discussion** (alternatively, Experimental may follow Results and Discussion)

- **Conclusions**

- **Supplementary Information** (if you have): include the following text just to mention (not to add graphs and data here) the existence of the supplementary data, see the example:

Supplementary Information

Supplementary data are available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file.

- **Acknowledgments**

- **References**

- **Sub-Sections:** first initial with capital letter, no final full stop. Examples:

Reagents and equipments

X-ray data

- **Formulae (compounds):** should be numbered with bold Arabic numerals.

- **Structural or displayed formulae** must be accurately drawn and inserted in the text. All captions should be typed below the structural or displayed formulae, together with it, in the right position.

4. Guidelines for Illustrations

General Size

The authors should think about the illustration size for double column (172 mm) of the journal. But, the font type size of text must be consistent with the illustration since it can be reduced during preparation of the Galley Proof. This is important when choosing symbols for graphics, drawings, charts, photos, etc., be consistent, make your manuscript look nicer: use the same size and same font type in graphics, schemes, etc.

4.1 Graphs and Figures (also see Section 2)

Lines and Lettering: Lines should be black and of an adequate and even thickness. Solid, broke, dotted and dot-dash lines should be used in graphics. Particular care should be taken to ensure that the lines in a spectrum are of adequate thickness. Lettering should not be smaller than 7 pt (Times New Roman) and lines not thinner than 0.5 pt. Lettering and lines should be of uniform density throughout the figures.

Labeled atoms in ORTEP (or any other) diagrams should have atom numbers in parenthesis, e.g., Fe(1), C(44).

Symbols representing physical quantities should be given in italics, e.g., J (Hz), δ (ppm), m/z , etc.

Units should be expressed in the appropriate form, e.g., g cm^{-3} or mol L^{-1} , rather than g/cm^3 or mol/L (see Section 4.5)

Graphs

- **Scales:** graphs should have only the minimum necessary scale divisions marked by numerals.

- **Axis labels** should use SI units, separated from quantities (see details in the green book

<http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>):

For graphs, use slashes in X and Y axes to separate axes names from units. For example: 20 / degree; Temperature / °C; time / min; Size range / mm; Wavenumber / cm⁻¹. Use parentheses only to group a set of units, e.g., Concentration / (mol L⁻¹); 10³ (T/K)⁻¹, etc.

Pay close attention to the way decimal values are expressed in English. Employ dots instead of commas.

Figures must have a high quality in order to be well reproduced. Use at least a 900 dpi resolution. If necessary, resize to a smaller size to get higher quality.

Curves should be labeled (a), (b), (c) etc. and further information be given in the figure legend/caption.

Data Points must be shown sufficiently large to be distinguishable. Whenever possible, they should be marked with the following symbols (use alternated full and open symbols):

●, ○, ■, □, ▲, △, ◆, ◇

Graphs/Figures should be pasted from their original files (Origin, ChemDraw, Corel etc.) and have an excellent quality. If you have to digitalize (scan) the figures (photos, for instance), choose the following scan options: black & white (B&W), no background and minimum of 300 dpi. If you wish them to be published online in color, send both the colored and B&W versions to the Editorial Office, matching the captions of the figures to accommodate the alternatives.

For computer-generated artwork, background or shadings should be avoided.

4.2 Structural Formulae

Figures, schemes and structures should be drawn to fit single or double-column widths. They should look proportional in case they are reduced.

Structures should be numbered with bold Arabic numerals, e.g., **1**, **2**.

All chemical structures included in the manuscript should be drawn using the same letter type (Times New Roman or Arial), size of cyclic groups, size and thickness of chemical bonds, and, the most important, authors should use the same standard throughout the work, including all figures, schemes, etc.

The following organic group abbreviations may be used: Me, Et, ⁿPr, ⁿBu, ^sBu, ^tBu, Ph, CO²R, CO²H, ⁱPrOH.

One variable univalent substituent is indicated by R. When more than one independent variable general substituent is present, R¹, R², R³, etc. should be used.

A variable metal may be indicated by M and variable ligands by L¹, L², L³ or L1, L2, L3, etc.

4.3 Photographs

Photographs should be highly contrasted, positive and not mounted. When necessary, the scale should be drawn on the photograph itself and not below. Color prints are rarely reproduced satisfactorily in black and white. Original B&W photographs are preferred to report experimental results, such as electron micrographs or to illustrate special equipment adaptations.

4.4 Colored Illustrations

Printed Version

Black & White (B&W) illustrations are free of charge. If color figures are presented in your Manuscript (Ms), they will automatically be converted into black-and-white (except GA).

4.5 Tables, Data and Units

Tables

Format your table to give straightforward information to the reader. Do not use shades or bold lettering. Indicate any extra information as a footnote with letters, e.g., a, b, c, etc. For examples, see any "PDF" files in: http://jbc.sbj.org.br/forthcoming_papers.asp.

Data

For negative numbers, ions and equations in text and tables use – (negative symbol) instead of - (hyphen). Examples: Cl^- , -0.40 , $y = ax - b$.

Units

Use International System Units (SI), e.g., m, s, kg, Pa, mol L^{-1} , etc, separated from quantities with a blank space. Example: 300 K, not 300K. See: <http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>.

Note: Molar (M) is no longer a valid concentration expression for IUPAC; it is suggested mol L^{-1} or mol dm^{-3} , but be consistent throughout your manuscript. For examples, see any "PDF" files in: http://jbc.sbj.org.br/forthcoming_papers.asp

5. Graphical Abstract (GA) and Text for GA

Concerning the *JBCS* Table of Contents, it is expected from authors careful with their **Graphical Abstract (GA)** proposition. This way, the figure should summarize the content of the manuscript in a concise, pictorial form, designed to capture the attention of a wide readership. The author should present a new figure, using as an idea a key structure, a reaction, an equation, a concept, a graphic, a theorem, etc. It should use colors as much as possible and have an artistic and imaginative idea. Short movies are also welcome (as supplementary information (SI)). It is not acceptable photos of commercial equipment in GA or in the text of the manuscripts.

Pay Attention: the image should have a 900 dpi resolution (*.tiff / *.jpg or any other image file that can be edited and be 8 cm wide and 4 cm high). Along with the GA figure, insert a short explanatory text about it below (three lines at the most). Take a look at our recent publications whose Table of Contents presents Graphical Abstracts (<http://jbc.sbj.org.br>). Therefore, be smart to advertise your manuscript: send a beautiful and appealing graphical image.

6. Equations

When writing equations, use the Word editing equation option or any other equation editor. Equation cannot be added in the main text as image format.

7. Reference Citation rules

- **Reference numbers**

Reference numbers in the text should be typed consecutively as superscripts after punctuation, without

parentheses or brackets. Examples:

sodium salicylate,¹⁻³

Nishide *et al.*,⁴

by reduction of chromic acid.^{4-8,12}

The cited literature should be listed on a separate page (double-spaced) in the same order it appears in the text.

- **Journal Titles**

Journal title abbreviations are those defined in the Chemical Abstracts Service Source Index (see

<http://www.cas.org/content/references/corejournals>). If an authoritative abbreviation for a Journal cannot be located or if the abbreviation is not obvious, the full Journal title should be cited.

- **Style Rules for Year, Volume and Page**

#. Author, A. C.; Author B.; Author C. F.; *Abbreviation of the Journal* **Year**, *Volume*, Page.

1. Author, A. C.; Author, B.; Author, C. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 77.

- Author initials should be separated from each other, e.g., Author, A. C.;

- Use semi-colons to separate different author's names. No "and" is necessary in any case.

- *Journal Abbreviations* should come in *Italics*: *J. Braz. Chem. Soc.*

- **Years** - bold font: **2010**

- *Volume* - Italic style: *21*

- Page - only the initial page, followed by dot: 77.

Examples:

2. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.

In case the journal is not easily accessible, the best choice is to quote its Chemical Abstracts number, as follows

3. 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).

Pay attention to the connection words in the names, as for instance: da Silva, M. A. or Silva, M. da, as follows:

4. Pinto, A. C.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **1999**, *22*, 448.

- **Composite References**

They should be used whenever possible, rather than a series of individual references, without letters (a), (b), (c), etc. Use only a semi-colon to separate them. The style for composite references is as follows:

5. 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.

- **Books**

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

Chapter in a book: only the main title should be given, with the chapter author's name and the editor's name after the title (this in *italic*):

10. Regitz, M. In *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, Germany, 1990, ch. 2.

- **Software**

11. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen, Germany, 1993.

- **Web Pages**

12. <http://www.s bq.org.br/jbcs>, accessed in June 2013.

- **Unpublished material Reference**

For material **accepted** for publication: in this case, the DOI number should be provided by the authors.

13. Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, DOI xx.

For other reference examples, see "PDF" files in: http://jbcs.s bq.org.br/forthcoming_papers.asp

- **Dissertation/Thesis:** do not use as bibliographic reference. Include only the articles that were produced from that research work.

8. Supplementary Information (SI)

This material will be available online in the *JBCS* Page as PDF file. It should contain relevant and complementary data to those presented in the manuscript. Their format can be: tables, graphs, spectra, films and so on. Any synthesized or identified compound must be accompanied by the spectra used for such identification. This is especially important for Natural Products, Organic and Inorganic Chemistry manuscripts in which the characterization/identification techniques are part of the work.

8.1 Manuscripts including crystallographic data

Deposition of Crystallographic Data

Prior to the submission of the typescript including crystallographic data, the author(s) should deposit, in the relevant Data Center, the data corresponding to each structure to be reported.

Data for **organometallic, organic and coordination (Werner-type) compounds** should be sent to the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) by e-mail, in CIF format. More information and a checklist of data items to be included in the deposit can be obtained from the CCDC homepage: <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>.

Data for inorganic compounds should be sent to Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ) by e-mail: crysdata@FIZ-Karlsruhe.de.

Deposition Codes

The Data Centers will provide deposition codes for each data set, which should be quoted in the typescript under a Supplementary Information heading before the Acknowledgements.

Standard text for CCDC: Crystallographic data (excluding structure factors) for the structures in this work were deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC XXXXXX. Copies of the data can be obtained, free of charge, via www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033. E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk.

Discussion of the Structure

It must include a labeled diagram of the structure, a list of relevant geometric parameters - interatomic bond distances and angles, torsion angles, hydrogen bond parameters, etc. Data of less important parts of the structure, such as ligand sub-groups (phenyl rings, etc.) should be omitted.

8.2 Manuscripts including NMR, IR, mass spectra, etc.

Whenever a compound is synthesized or identified (new or already known), it is imperative to send all spectral data (data and spectra) as Supplementary Information (SI) along with your submission, at the end of your doc file.

A brief mention to the existence of complementary data should be included in the Supplementary Information topic before the **Acknowledgments** section. Example:

Supplementary Information

Supplementary information (Figure S1-S4, Table S1) is available free of charge at <http://jbc.org.br> as PDF file.

How to send this type of information:

Join all spectra in one SI file. Do not forget to add captions to each one of them, identifying each individual spectrum (e.g., Figure S1. ¹H NMR Spectrum of...; Figure S2. IR Spectrum of...; Figure S3. ¹³C{¹H} Spectrum of...; Table S1. Data for...). If the spectra will be

digitalized (scanned), choose options: black&white, without background and 300 dpi at least. Add this file to the end of your manuscript, which should then comprehend one single doc file, containing GA, text with tables and figures, and SI.

9. Procedure for Manuscript Submission

9.1 Manuscript to be Evaluated for the First Time

The **JBCS** submission offers only online submission. The submissions are made using the ScholarOne^{TR}-

JBCS system by clicking the link “Submission online (ScholarOne)” at our website (<http://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo>).

- All the authors must have their names introduced in the platform, so fill this part and inform the correct co-authors' e-mail addresses in the system.
- In the ScholarOne-JBCS system, all files need to be uploaded individually:
 - (i) Main manuscript: as full.doc, not as full.pdf and
 - (ii) Figures/Schemes (just the ones from the main document), including GA image: as jpg, tiff, opj, xls, etc (not as individual doc files or grouped in a doc file).
Figures built using Excel/Origin programs provide pictures higher quality in the final work (proof), so upload preferentially original xls/opj files.
- In the main document (full.doc): also keep tables/figures/schemes/equations and their legends as close as possible of their first citation.

9.2 Manuscript already Evaluated (Resubmission: Reject and Reject&Resubmission)

In cases that the manuscript has already received a decision from JBCS Editor like Reject and Reject&Resubmission some specific requirements are necessary:

- (1) Main document: the modifications need to be highlighted with a different color guiding Editor/Reviewers with changes made in relation to the original version (do not use the track changes mode in MS Word).
- (2) Be sure that the Response Letter, in the place of the cover letter, itemizes each comment addressed, as well as any changes made, of all Referee(s) and Editor (if so). Write a very convincing text explaining the points that were introduced/removed, new experiments that were used. Add, please: “Response Letter for ID JBCHS-201x-0xxx (previous ID): ...”
- (3) Replace all the files that were modified uploading with the new files.

For Reject&Resubmission decision, Authors may access the previous ID (one that received the decision) in the Author Center at the JBCS-ScholarOne submission site (<http://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo> at the link "Manuscripts with Decisions") and then in "create a resubmission" to resubmit the manuscript.

With the resubmission, the manuscript will receive a new ID. The use of this link will accelerate the evaluation since the system will keep all the decisions for the previous ID linked to the new ID.

All these actions for an already evaluated manuscript will expedite the assessment.

10. Galley Proofs - GP

The **JBCS** Journal Publishing Staff will contact you in the near future regarding your manuscript page proofs (GP). The proofs are provided for the correction of printing errors only, i.e., the proof correction should not be used for language or content improvement. If considered excessive, the change costs will be charged to the author(s).

Corrected galley proofs should be returned as soon as possible (within 72 h or in 3 business days).

Your manuscript will be published on the web only after you approve your page proofs.