

MARCELA SOUZA PERES

**PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA
REMOÇÃO DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE UMA SOLUÇÃO DE
OFLOXACINA**

**CAMPINAS
2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo

MARCELA SOUZA PERES

**PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA REMOÇÃO
DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
UMA SOLUÇÃO DE OFLOXACINA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Civil, na área de concentração de Saneamento e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Guimarães

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
MARCELA SOUZA PERES E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES.

ASSINATURA DO ORIENTADOR

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

P415p Peres, Marcela Souza, 1984-
Processo oxidativos avançados na remoção da toxicidade e da atividade antimicrobiana de uma solução de ofloxacina / Marcela Souza Peres. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Roberto Guimarães.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Fármacos. 2. Processos oxidativos avançados (POA). 3. Atividade antimicrobiana. I. Guimarães, José Roberto, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Advanced oxidation processes in toxicity and antimicrobial activity removal of an ofloxacin solution

Palavras-chave em inglês:

Drugs

Advanced oxidation process

Antimicrobial activity

Área de concentração: Saneamento e Ambiente

Titulação: Mestra em Engenharia Civil

Banca examinadora:

José Roberto Guimarães [Orientador]

Claudia Longo

Otidene Rossiter Sá da Rocha

Data de defesa: 21-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Civil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO**

**PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS NA REMOÇÃO
DA TOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
UMA SOLUÇÃO DE OFLOXACINA**

Marcela Souza Peres

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:



**Prof. Dr. José Roberto Guimarães
Presidente e Orientador/UNICAMP**



**Profa. Dra. Claudia Longo
UNICAMP**



**Profa. Dra. Otidene Rossiter Sá da Rocha
UFPE**

Campinas, 21 de março de 2014.

RESUMO

A ofloxacina é um antimicrobiano de amplo espectro frequentemente encontrado em concentrações significativas em efluentes e águas superficiais. A contínua introdução deste fármaco no meio ambiente constitui um risco potencial em longo prazo para os organismos não alvos ou para a saúde humana. Neste estudo foi avaliada a degradação da ofloxacina pelos processos oxidativos avançados (POA) peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H₂O₂) e fotocatalise (UV/TiO₂ e UV/TiO₂/H₂O₂). Foi avaliada também a atividade antimicrobiana residual do fármaco, utilizando a bactéria *E. coli*, e a toxicidade aguda (*Vibrio fischeri*). A concentração de ofloxacina foi monitorada utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos indicam que os POA aplicados foram eficientes para a degradação desse fármaco. O processo UV/H₂O₂ alcançou degradação de 99%, após 60 min de reação. Para o processo UV/TiO₂, a eficiência de degradação obtida foi de 89,3% após 60 min e a adição de peróxido de hidrogênio elevou a eficiência para 97,8%. A atividade antimicrobiana do fármaco foi reduzida consideravelmente, alcançando 95% de remoção com a aplicação do UV/H₂O₂ e 96% utilizando o processo UV/TiO₂/H₂O₂. A toxicidade das amostras não aumentou no decorrer da aplicação destes POA, indicando a potencial utilização destes processos para o tratamento de soluções aquosas contendo ofloxacina.

Palavras chave: ofloxacina, processos oxidativos avançados, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Ofloxacin is a broad-spectrum antimicrobial agent which is frequently found in significant concentrations in wastewater and surface water. Its continuous introduction into the environment constitutes a potential risk to non-target organisms or to human health. This study evaluated ofloxacin degradation by the UV/H₂O₂, UV/TiO₂ and UV/TiO₂/H₂O₂ advanced oxidation process (AOPs), residual antimicrobial activity (*E. coli*), and acute toxicity (*Vibrio fischeri*). Ofloxacin concentration was monitored with HPLC analyses. The results obtained shown that AOPs applied were efficient for ofloxacin degradation. For UV/H₂O₂, degradation efficiency was 99% in 60 min of reaction. For UV/TiO₂, degradation efficiency was 89.3% in 60 min of reaction when applied 128 mg L⁻¹ TiO₂. The addition of 1.68 mmol L⁻¹ of hydrogen peroxide increased the degradation to 97.8%. For both processes, the antimicrobial activity was considerably reduced throughout the reaction, reaching 95% removal when UV/H₂O₂ was applied and 96% using the UV/TiO₂/H₂O₂ process. The toxicity of the samples did not increase during AOP application, indicating the potential use of these processes for the treatment of aqueous solutions containing ofloxacin.

Keywords: Ofloxacin, advanced oxidation processes, antimicrobial activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1. OBJETIVOS GERAIS	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 QUINOLONAS	5
3.1.1 <i>Ofloxacina</i>	7
3.1.1.1 Propriedades	8
3.1.1.2 Atividade antimicrobiana.....	8
3.1.1.3 Ensaio de toxicidade empregando <i>Vibrio fischeri</i>	10
3.1.2 <i>Rotas de contaminação</i>	11
3.1.3 <i>Ocorrência no meio ambiente</i>	13
3.1.4 <i>Efeitos no meio ambiente</i>	14
3.2 METODOLOGIAS ANALÍTICAS	16
3.2.1 <i>Extração em fase sólida</i>	16
3.2.2 <i>Quantificação por CLAE</i>	18
3.2.3 <i>Varreduras UV-Vis</i>	18
3.2.4 <i>Espectrometria de Massas</i>	18
3.3 MÉTODOS DE REMOÇÃO	19
3.3.1 <i>Aplicação de processos oxidativos avançados na degradação de ofloxacina</i>	21
3.3.1.1. Peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H ₂ O ₂)	22
3.3.1.2 Fotocatálise com TiO ₂ em suspensão (UV/TiO ₂)	23
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 REAGENTES.....	26
4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE	26
4.3 PREPARO DA AMOSTRA	27
4.4 MÉTODO ANALÍTICO APLICADO	27
4.4.1 <i>Extração em fase sólida</i>	27
4.4.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	28
4.4.3 <i>Varreduras UV-visível</i>	28
4.4.4 <i>Espectrometria de massas</i>	29
4.5 ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO	30
4.5.1 <i>Sistema operacional</i>	30
4.6 QUANTIFICAÇÃO DO RESIDUAL DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	33
4.7 ENSAIOS DE TOXICIDADE.....	33
4.7.1 <i>Testes de toxicidade com Vibrio fischeri</i>	33

4.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
4.7.2.1 Preparação das soluções	34
4.7.2.2 Preparo da cultura de E. coli.....	34
4.7.2.3 Ensaio de atividade antimicrobiana.....	35
4.7.2.4 Análise dos Dados	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	38
5.1.1 Extração em fase sólida	38
5.1.2 Conformidade do Sistema	39
5.1.3 Validação	40
5.2 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DA OFLOXACINA.....	42
5.2.1 Degradação da ofloxacina por fotólise e peroxidação	42
5.2.2 Degradação por UV/H ₂ O ₂	44
5.2.3 Degradação por fotocatalise.....	46
5.2.3.1 Efeito do pH	47
5.2.3.2 Degradação por UV/TiO ₂ em pH 6	49
5.2.3.3 Efeito da adição de peróxido	51
5.2.4. Comparação entre os processos de degradação.....	52
5.2.5 Varreduras no UV-Vis.....	54
5.2.6 Testes biológicos.....	56
5.2.6.1 Atividade antimicrobiana.....	56
5.2.6.2 Avaliação da toxicidade utilizando Vibrio fischeri	61
5.3 AVALIAÇÃO DOS SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	62
6 CONCLUSÕES.....	68
7 REFERÊNCIAS	70

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Thiago, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial e aos meus pais Humberto e Márcia por me darem todo o suporte necessário e apoio nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar força e saúde para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Guimarães que me deu a oportunidade de ser sua aluna, me orientou e me deu todas as condições para realizar este estudo.

A Dra. Milena Guedes, que me recebeu no grupo de pesquisa orientando cada etapa do trabalho com paciência, persistência e companheirismo, se tornando uma grande amiga.

Ao Caio que me ajudou muito principalmente no início do trabalho, me ensinando o caminho das pedras e também nos momentos difíceis, dizendo que “para todo problema há sempre uma solução”.

A Profa. Dra. Otidene Rocha e Profa. Dra. Claudia Longo por fazer parte da banca examinadora e por suas importantes contribuições.

Ao Prof. Dr. Adriano Luiz Tonetti pela sua participação no exame de qualificação e por suas considerações valiosas.

A todos os amigos do grupo de pesquisa, Vanessa, Amanda, Luciane, Regiane, Gabi, Marina, pelo apoio e amizade.

Aos técnicos do Labsan Fernando, Lígia e Enelton pelo apoio operacional fundamental para a execução do trabalho, sempre muito solícitos e gentis.

Ao Giovani da FEAGRI por ter proporcionado a execução do ensaio Microtox.

A Priscila do laboratório de Espectrometria de massas do IQ-Unicamp, por sua atenção e disponibilidade.

A Lisandra, sempre muito solícita que disponibilizou a leitora de placas para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Saneamento e ambiente da FEC-UNICAMP que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

Aos amigos de pós-graduação Gabriela, Laís, Jenifer, Maiara, Denise entre tantos outros que foram muito importantes durante estes dois anos, sofrendo juntos nas disciplinas, na qualificação e pelas nossas conversas e momentos de descontração.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes emergentes (CE) são substâncias naturais ou sintéticas que possuem o potencial de causar efeitos adversos para o ecossistema e para a saúde humana, sendo a maioria deles não regulamentados. As principais fontes de CE são as plantas de tratamento de esgotos domésticos, águas residuárias provenientes de hospitais, indústrias químicas, pecuária e agricultura. O grupo dos contaminantes emergentes abrange fármacos de uso humano e veterinário, produtos de cuidado pessoal, surfactantes, plastificantes e vários aditivos utilizados na indústria (PETROVIC et al. 2003). Além disso, a completa remoção destas espécies não pode ser garantida por métodos convencionais de tratamento de efluentes, que utilizam processos biológicos, o que acarreta em bioacumulação e efeitos tóxicos em ecossistemas aquáticos e terrestres (PAL et al. 2010; SANTOS et al. 2010; KUSTER et al. 2008).

Muitos estudos têm relatado a presença de CE em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} em ambientes aquáticos no mundo todo (FATTA-KASSINOS et al. 2007). Os fármacos são considerados contaminantes ambientais pseudo-persistentes, uma vez que são continuamente introduzidos no meio aquático e são resistentes à degradação biológica e atenuação natural; portanto, permanecem no ambiente por muito tempo, ocasionando risco potencial para organismos aquáticos e terrestres (KLAVARIOTI et al. 2009). No entanto, não se sabe ao certo quais são os riscos a longo prazo para os organismos não alvos ou para a saúde humana (GROS et al. 2006). Estes fatos impulsionaram esforços significativos no sentido de desenvolver meios eficazes de minimizar a exposição acidental da microbiota presente no ambiente aos antimicrobianos.

Os fármacos comumente encontrados no ambiente incluem antimicrobianos, analgésicos, antipiréticos, drogas citostáticas, hormônios, entre outros (IKEHATA et al. 2006; NIKOLAOU et al. 2007). De maneira geral, os fármacos, dentre eles os antimicrobianos, são apenas parcialmente metabolizados no organismo, sendo excretados

por seres humanos e animais, na forma original ou como metabólitos, por meio das fezes e/ou urina.

A ofloxacina é um dos antimicrobianos da família das fluoroquinolonas mais utilizados mundialmente para tratamento de doenças infecciosas gastrointestinais, urinárias e pulmonares, devido à sua segurança, boa tolerância e ao seu amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ZIVANOVIC et al. 2006). Concentrações significativas de ofloxacina foram detectadas em águas residuárias que não passaram por tratamento e também em efluentes tratados em plantas que empregam tratamento convencional (HAPESHI et al. 2010; MIAO et al. 2004).

A resistência a antimicrobianos é um fenômeno alarmante e alguns estudos sugerem que as plantas de tratamento de esgotos municipais possam ser uma fonte potencial de entrada de microrganismos resistentes no ambiente (KÜMMERER e HENNINGER, 2003; LINDBERG et al. 2007). A necessidade da completa remoção destas substâncias das plantas de tratamento de esgotos municipais estimulou o desenvolvimento e aplicação dos processos oxidativos avançados (POA), considerados promissores para este propósito (MIRANDA-GARCÍA et al. 2011; SUKUL e SPITELLER, 2007; SUN et al. 2011).

Os processos oxidativos avançados são tecnologias de tratamento de água, solo e ar consideradas competitivas para a degradação de micropoluentes orgânicos, os quais não são removidos por tratamentos biológicos (OLLER et al. 2011; ESPLUGAS et al. 2007; HERRERA et al. 1998; PULGARIN e KIWI, 1996). Estes representam um grupo de processos caracterizados pela geração de radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$). Podem ser empregados em combinação com tratamentos biológicos, buscando uma oxidação parcial e o aumento da biodegradabilidade (BANDARA et al. 1997), e também como tratamento terciário para a degradação de compostos persistentes.

Apesar da importância de minimizar a ocorrência do fenômeno de resistência bacteriana, a maioria dos estudos relacionados à aplicação de POA para a degradação de antimicrobianos baseia-se apenas na avaliação da remoção do composto alvo. Os efeitos

biológicos que podem ocorrer devido à oxidação parcial e/ou formação de produtos de degradação são raramente discutidos (DE WITTE et al. 2011; FATTA-KASSINOS et al. 2011). Apenas VASQUEZ et al. (2013) avaliou a atividade antimicrobiana da ofloxacina em solução aquosa (20 mg L^{-1}) submetida aos processos de fotólise e fotocatalise, usando a bactéria *P. putida*.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Este estudo tem como objetivo a avaliação da degradação da ofloxacina em solução aquosa pelos processos fotolítico (UV), oxidativo (peroxidação- H_2O_2) e oxidativos avançados (peroxidação assistida por radiação ultravioleta-UV/ H_2O_2) e fotocatalise (UV/ TiO_2 e UV/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$), bem como avaliar a atividade antimicrobiana da solução durante os processos de degradação.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação da ofloxacina em matrizes aquosas, usando a cromatografia líquida de alta eficiência associada ao detector de UV;
- Avaliar a eficiência dos processos de degradação (fotólise (UV), peroxidação (H_2O_2), peroxidação assistida por radiação UV (UV/ H_2O_2) e fotocatalise (UV/ TiO_2 e UV/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$) na remoção da ofloxacina em solução aquosa;
- Investigar a influência do tempo de reação e das concentrações de peróxido de hidrogênio e de dióxido de titânio na degradação da ofloxacina e na formação de intermediários da degradação;
- Avaliar a toxicidade das amostras submetidas aos processos de degradação e a capacidade de remoção da atividade antimicrobiana da ofloxacina pelos processos propostos e avaliados;
- Investigar os intermediários formados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Quinolonas

As quinolonas são uma família de fármacos antimicrobianos sintéticos, muito utilizadas na medicina humana e veterinária devido ao seu amplo espectro de ação e disponibilidade para ser aplicado nas formas oral e intravenosa. O ácido nalidíxico foi a primeira quinolona a ser desenvolvida, em 1962, derivada do quinino. Com o passar do tempo, foram realizadas outras alterações no núcleo da quinolona, por meio da adição de diferentes substituintes nas posições N-1, C-6, C-7 e C-8 (Figura 3.1), originando os outros antimicrobianos dessa família de compostos (OWENS e AMBROSE, 2005).

A estrutura das quinolonas contém um grupo carboxílico, o qual torna todos estes compostos ácidos. A segunda geração de quinolonas conta com um grupo amina em um anel heterocíclico, chamado piperazínico. Dessa forma, as quinolonas podem ser divididas em dois grupos, de acordo com suas propriedades ácido-base: quinolonas ácidas e quinolonas piperazínicas com grupo heterocíclico. As quinolonas ácidas possuem apenas um grupo com valor de pK_a na faixa de 6,0 a 6,9. Em condições ácidas estas se apresentam na forma neutra. Já as quinolonas piperazínicas possuem dois valores de pK_a . Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} estão na faixa de 5,5-6,3 e 7,6-8,5, respectivamente, e a forma intermediária é a forma zwitteriônica, isto é, neutra (SEIFRTOVÁ et al. 2009).

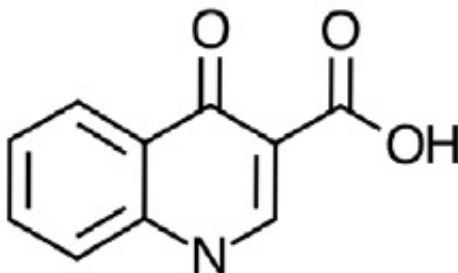


Figura 3.1: Núcleo principal das quinolonas.

A adição de um íon fluoreto na posição C-6 foi uma das primeiras alterações na estrutura inicial das quinolonas. As primeiras quinolonas, entre elas a ciprofloxacina, foram os primeiros compostos com alta atividade contra bacilos Gram-negativos, mas a sua utilidade contra importantes patógenos Gram-positivos era questionável. Com o passar dos anos, foram desenvolvidas novas fluoroquinolonas, entre elas a gatifloxacina, gemifloxacina, levofloxacina e moxifloxacina, as quais possuem maior potência contra organismos Gram-positivos e/ou anaeróbios mantendo também atividade contra os Gram-negativos (ZHANEL, et al. 2001).

De acordo com KING et al. (2000), a nova classificação dos antimicrobianos da família das quinolonas, apresentada no Quadro 3.1, é baseada na expansão do espectro de ação dos novos fármacos criados. Os fármacos de cada grupo possuem atividade antimicrobiana similar. Em cada nova geração, o espectro de ação foi ampliado e contemplou um novo grupo de patógenos.

Quadro 3.1: Classificação das quinolonas segundo seu espectro de ação antimicrobiana. Adaptado de: RODRIGUES-SILVA et al. (2014) e KING et al. (2000).

Classificação	Fármaco	Espectro antimicrobiano
Primeira geração	Ácido nalidíxico, Ácido Oxolínico, Ácido Pipemídico, Ácido Piromídico.	Organismos Gram-negativos aeróbios (exceto <i>Pseudomonas</i>)
Segunda geração	Flumequina, Fleroxacina Pefloxacina, Difloxacina, Marbofloxacina, Sarafloxacina, Norfloxacina, Lomefloxacina, Enoxacina, Ofloxacina, Ciprofloxacina.	Organismos Gram-negativos (incluindo <i>Pseudomonas</i>), alguns organismos Gram-positivos (incluindo <i>Staphylococcus aureus</i> mas não <i>Streptococcus pneumoniae</i>) e alguns patógenos atípicos.

Continuação **Quadro 3.1:**

Terceira geração	Balofloxacin, Temafloxacin, Danofloxacin, Tosufloxacin, Grepafloxacin, Pazufloxacin, Levofloxacin, Sparfloxacin.	Os mesmos patógenos da segunda geração mais a ampliação do espectro para os organismos Gram-positivos (sensíveis a penicillina e resistentes a penicillina-S. <i>Pneumoniae</i>). Atividade contra patógenos atípicos expandida.
Quarta geração	Clinafloxacin, Gemifloxacin, Gatifloxacin ,Moxifloxacin.	Mesmos da terceira geração mais os organismos anaeróbios.

3.1.1 Ofloxacin

A ofloxacin ($C_{18}H_{20}FN_3O_4$) é um antimicrobiano totalmente sintético, da família das fluoroquinolonas. Sua estrutura molecular é apresentada na Figura 3.2. Possui em sua molécula um anel piperazínico na posição C-7 e um grupo carboxila (-COOH) ligado ao carbono na posição 3. Possui um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como outros patógenos, como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e *Legionella* (CHENG et al. 2002). É utilizada em seres humanos e também na medicina veterinária (ALDER et al. 2001) para o tratamento de infecções gastrointestinais, infecções pulmonares, urinárias, bem como para a prevenção de infecção em paciente imunocomprometido (DOLLERY et al.1999). O mecanismo de ação bactericida da ofloxacin é baseado na inibição da enzima DNA girase da bactéria, a qual é responsável pela atividade biológica da célula, bloqueando, deste modo, a multiplicação celular (SHEN et al.1989).

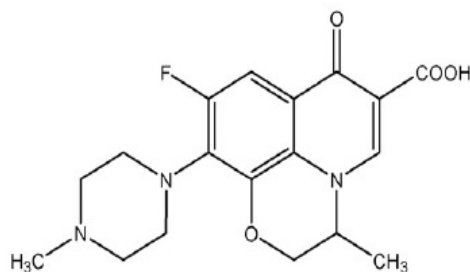


Figura 3.2: Estrutura química da ofloxacin

Entre os fármacos existentes, os antimicrobianos pertencentes ao grupo das quinolonas, incluindo as fluoroquinolonas, são de particular preocupação ambiental, devido ao seu grande consumo mundial e por sua presença em efluentes domésticos tratados e no meio ambiente. Estes têm sido amplamente utilizados na Europa e nos Estados Unidos (GOLET et al. 2002). Em 2010, as vendas do fármaco ofloxacina representaram 1,4 bilhão de dólares apenas nos Estados Unidos (JOHNSON & JOHNSON, 2010).

3.1.1.1 Propriedades

A solubilidade da ofloxacina é dependente do pH. Sua solubilidade em água é de 60 g L⁻¹ na faixa de pH entre 2 e 5, caindo para 4 g L⁻¹ em pH 7. Portanto, é mais solúvel em meio ácido e menos solúvel em condições neutras ou básicas (PATIL *et al.* 2011). No Quadro 3.2 são reunidas as principais características físico-químicas da ofloxacina.

3.1.1.2 Atividade antimicrobiana

As fluoroquinolonas não são completamente metabolizadas pelo corpo humano e uma fração significativa (de 20 a 80%) destes fármacos é excretada na forma farmacologicamente ativa (GERDING et al. 1996); portanto, estes fármacos atingem o esgoto doméstico. Concentrações residuais de fluoroquinolonas e de outros agentes antimicrobianos nos efluentes podem ser prejudiciais para os organismos presentes nos corpos receptores (WILSON et al. 2003), além de favorecer o aumento da resistência das bactérias a estes fármacos. Diante disto, surge a necessidade da utilização de tecnologias de tratamento capazes de remover a atividade antimicrobiana residual destes compostos.

Quadro 3.2: Características físico-químicas da ofloxacina (Adaptado de MICHAEL et al. 2010).

Principais características físico-químicas da ofloxacina	
Grupo terapêutico	Antimicrobiano (fluoroquinolona)
Fórmula química	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$
Massa molar ($g\ mol^{-1}$)	361,4
Ponto de fusão ($^{\circ}C$)	270-273
Solubilidade ($g\ L^{-1}$)	60 (pH 2-5), 4 (pH 7)
Coefficiente de partição octanol/água ($\log K_o/w$)	0,41 (pH 7) 0,33 (pH 7,2) 0,28 (pH 7,3)
Constante isoelétrica (pKa)	$pK_{a1} = 6,05$, $pK_{a2} = 8,22$
Pressão de vapor (mmHg)	$1,55 \times 10^{-13}$
Constante de Henry a $25^{\circ}C$ ($atm\ m^{-3}\ mol^{-1}$)	$4,98 \times 10^{-20}$
Parâmetros farmacocinéticos	Tempo de meia-vida (h) = 5- 7,4 Excreção na urina (%) = 80

O grau de inativação biológica que pode ser alcançado com a aplicação de diferentes processos oxidativos avançados é um importante critério para determinar a eficiência global destes processos. Os efeitos destes processos na atividade antimicrobiana de soluções de fluoroquinolonas são avaliados na maioria das vezes de maneira qualitativa ou semi quantitativa em um limitado número de estudos (CALZA et al. 2008; PALOMINOS et al. 2008; PHILLIPS et al. 1990; SUNDERLAND et al. 2001). O ensaio de atividade antimicrobiana por microdiluição (PAUL et al. 2010), permite a avaliação

quantitativa das mudanças no potencial antimicrobiano do fármaco decorrentes da aplicação de diferentes processos. Este é baseado na turbidez das amostras obtidas após período de incubação das bactérias, convertida em resultados de inibição de crescimento.

PAUL et al. (2010) investigaram os efeitos da fotólise e fotocatalise na remoção da atividade antimicrobiana de soluções de ciprofloxacina ($33,1 \text{ mg L}^{-1}$) e concluíram que o emprego do processo fotocatalítico foi eficaz para reduzir a atividade antimicrobiana a níveis insignificantes, quando comparado ao fármaco original.

3.1.1.3 Ensaio de toxicidade empregando *Vibrio fischeri*

O ensaio de toxicidade aguda utilizando a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*, conhecido como Microtox®, é um dos bioensaios mais largamente utilizados para determinar a toxicidade do meio aquático causado por substâncias químicas. Neste ensaio, o equipamento utilizado mede a emissão da luz da bactéria antes e após esta ter contato com a amostra cuja toxicidade se pretende avaliar. A diferença entre a emissão inicial e final (indicação da inibição metabólica nos organismos do ensaio) indica a toxicidade da amostra. O resultado é expresso como porcentagem de inibição de luminescência. Este procedimento é possível pois o metabolismo da bactéria luminescente é sensível a baixas concentrações de compostos tóxicos, afetando a intensidade de luz emitida.

CALZA et al. (2008) avaliaram a toxidade aguda de soluções aquosas de ofloxacina e ciprofloxacina (ambas de 15 mg L^{-1}) submetidas ao processo UV/TiO₂ ($UV_{340 \text{ nm}} = 1500 \text{ W}$, $C_{TiO_2} = 200 \text{ mg L}^{-1}$). As soluções iniciais dos fármacos eram não tóxicas (porcentagem de inibição praticamente nula). A toxidade das soluções de ciprofloxacina e ofloxacina, coletadas em diferentes tempos de irradiação, foram medidas após 15 min de incubação com a bactéria. Para as amostras de ofloxacina submetidas à irradiação por até 10 min, houve um aumento na toxicidade das amostras, indicando geração de subprodutos tóxicos. Já para as amostras submetidas à irradiação por 15 a 120 min, houve decréscimo da toxicidade e, após 240 min, a toxicidade alcançou um valor final menor que 1%, indicando

a eficiência do processo fotocatalítico na redução da toxicidade das soluções. Em contraste com estes resultados, as amostras de ciprofloxacina submetidas aos processos de degradação, avaliadas em diferentes tempos de irradiação, não apresentaram toxicidade, indicando que a fotodegradação deste fármaco não gerou subprodutos tóxicos.

3.1.2 Rotas de contaminação

Todos os tipos de descargas de águas residuárias urbanas e práticas de reuso, incluindo irrigação em áreas de agricultura, recargas de aquíferos, descargas em águas superficiais interiores ou nos oceanos, causam a liberação de substâncias orgânicas xenobióticas no ambiente. Corpos d'água superficiais são frequentemente usados tanto para receber efluentes tratados, quanto como manancial de abastecimento de água potável. Desta forma, muitos destes compostos orgânicos, incluindo os fármacos, os quais constituem uma das classes de substâncias químicas que possuem maior número e diversidade de compostos, encontram seu caminho no ciclo urbano das águas (FATTA-KASSINOS et al. 2011).

As principais rotas de contaminação dos meios aquáticos por quinolonas estão relacionadas com a aplicação destes antimicrobianos tanto na medicina humana quanto na veterinária.

Segundo RODRIGUES-SILVA et al. (2014), de maneira geral, os fármacos, dentre eles os antimicrobianos, são apenas parcialmente metabolizados no organismo, sendo excretados por seres humanos e animais, na forma original ou como metabólitos, por meio das fezes e urina. Ressalta-se ainda que as fluoroquinolonas não sofrem alterações em sua estrutura química quando submetidas à aeração, sob variação de temperatura (KEMPER, 2008; LAI e LIN, 2009) ou mesmo durante o processo de compostagem, e dessa forma, esses fármacos se espalham pelo meio ambiente em sua forma inalterada. Na Figura 3.3 são

apresentadas as principais rotas de introdução dos fármacos no meio ambiente, usados na medicina humana e veterinária.

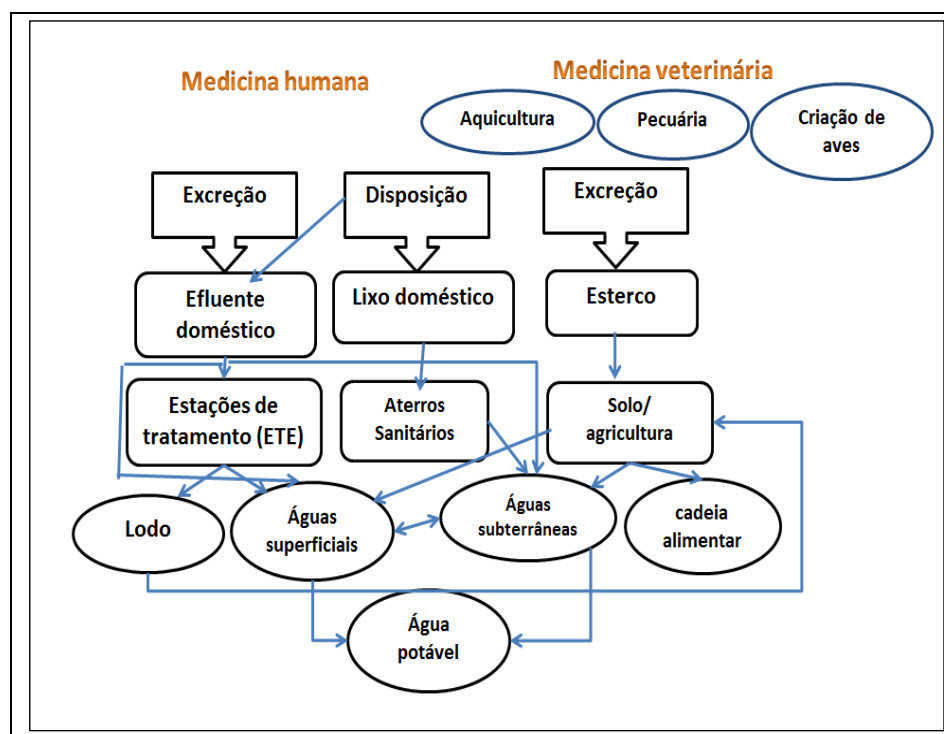


Figura 3.3: Rota dos fármacos no ambiente (adaptado de Diaz Cruz *et al.* 2003).

Segundo DIAZ-CRUZ *et al.* (2003), as formas mais importantes de introdução destes fármacos no ambiente são por meio de efluentes de processos de fabricação de medicamentos, excreção humana e animal, disposição inadequada de medicamentos vencidos ou não utilizados e derramamentos acidentais durante a fabricação ou distribuição. Dentre esses, a excreção animal e a aplicação de fármacos na aquicultura são os meios majoritários de disseminação das quinolonas no meio ambiente aquático (KEMPER *et al.* 2008). Quando o esterco é disposto no solo, fármacos não metabolizados e metabólitos ativos podem contaminar a água subterrânea, dependendo de sua mobilidade no solo, e afetar organismos terrestres e aquáticos devido à lixiviação destes resíduos no solo.

A mesma situação ocorre quando lodos provenientes de plantas de tratamento de efluentes são utilizados para fertilizar o solo. Fármacos usados por humanos são lançados

nos esgotos por meio da urina e fezes e chegam até as estações de tratamento. Durante o tratamento do efluente, é provável que muitos compostos orgânicos, particularmente os hidrofóbicos, se adsorvam no lodo, elevando sua concentração em ordens de magnitude muito superiores às encontradas no efluente do qual este lodo teve origem (DIAZ-CRUZ et al. 2003). A elevada concentração das quinolonas em amostras de lodo de ETE está associada à adsorção do fármaco no lodo durante as diversas etapas do tratamento biológico (JIA et al. 2012).

Tendo em vista que os fármacos da família das fluoroquinolonas não são completamente degradados ou removidos nas estações de tratamento de água e esgoto (FENT et al. 2006; NIETO et al. 2008; WANG et al. 2010), esses efluentes com traços de antimicrobianos acabam sendo descarregados nas águas superficiais, resultando na contaminação de rios, lagos, estuários e, possivelmente, atingindo o lençol freático e águas destinadas ao abastecimento público.

3.1.3 Ocorrência no meio ambiente

No Quadro 3.3 são apresentados dados sobre a ocorrência do fármaco ofloxacina no ambiente. A ofloxacina foi detectada em concentrações que variaram na ordem de ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$ em diferentes matrizes aquosas, como água superficial, efluente hospitalar, água para abastecimento público e em estações de tratamento de esgoto.

Em águas superficiais, a ofloxacina foi detectada em concentrações na faixa de 32,6 a 400 ng L^{-1} . Em amostras de estações de tratamento de esgoto, a ofloxacina foi detectada em concentrações de 204 a 4249 ng L^{-1} , fato que pode estar relacionado ao intenso uso desta quinolona na medicina humana. Uma concentração ainda maior deste fármaco em efluente hospitalar foi detectada no estudo de BROWN et al. (2006), atingindo 35.500 ng L^{-1} .

Quadro 3.3: Ocorrência da ofloxacina em matrizes aquosas.

Quinolona	Concentração (ng L ⁻¹)	Matriz	Região	Referência
Ofloxacina	50	Água superficial	Holanda/Espanha	Pozo <i>et al.</i> (2006)
	10-55	Água superficial	França	Tamtam <i>et al.</i> (2008)
	149-535	Água superficial	China	Xiao <i>et al.</i> (2008)
	17-182	Água superficial	EUA/Arkansas	Massey <i>et al.</i> (2010)
	74	Água superficial	China/Chongqing	Chang <i>et al.</i> (2010)
	400	Água superficial	Espanha/Castellon-Valencia	Gracia-lor <i>et al.</i> (2011)
	32,6	Água superficial	China/Baiyangdian	Li <i>et al.</i> (2012)
	2-2,5	Água subterrânea de região pecuária	China	Tong <i>et al.</i> (2009)
	1800	ETE	Espanha/Madrid	Muñoz <i>et al.</i> (2008)
	100-204	ETE	EUA	Nakata <i>et al.</i> (2005)
	110	ETE	EUA/New Mexico	Brown <i>et al.</i> (2006)
	503	ETE	China	Xiao <i>et al.</i> (2008)
	53-991	ETE	Taiwan	Lin <i>et al.</i> (2009)
	1.287	ETE	China/Beijing	Jia <i>et al.</i> (2012)
	4.249	ETE	China/Chongqing	Chang <i>et al.</i> (2010)
	510	ETE	França	Andreozzi <i>et al.</i> (2003)
	460	ETE	Grécia	Andreozzi <i>et al.</i> (2003)
	580	ETE	Itália	Andreozzi <i>et al.</i> (2003)
	120	ETE	Suécia	Andreozzi <i>et al.</i> (2003)
	925	ETE	Espanha/Castellon-Valencia	Gracia-lor <i>et al.</i> (2011)
	200-1.700	ETE	Espanha/Granada	Dorival-García <i>et al.</i> (2012)
	25.500-35.500	Efluente hospitalar	EUA/New Mexico	Brown <i>et al.</i> (2006)
	100-5.000	Efluente pecuário	China	Tong <i>et al.</i> (2009)

Fonte: RODRIGUES-SILVA et al. (2014).

3.1.4 Efeitos no meio ambiente

A introdução contínua desses compostos no ambiente por fontes, como as plantas de tratamento de efluentes domésticos e hospitalares, resulta no aumento da resistência de microrganismos aos antimicrobianos (HIRSCH et al. 1999; DIAZ-CRUZ et al. 2003; BROWN et al. 2006; KUMMERER, 2009; CZEKALSKI et al. 2012).

A presença de antimicrobianos no ambiente em níveis de concentração relevantes tem sido associada à toxicidade crônica e a existência de espécies bacterianas resistentes a esses compostos (SCHWARTZ et al. 2006; KUMMERER, 2009). Por conseguinte, a utilização extensiva de antimicrobianos tem contribuído para a redução do potencial terapêutico destes contra patógenos de humanos e de outros animais (KEMPER, 2008). As consequências são particularmente preocupantes tendo em vista que as bactérias no ambiente aquático podem ser continuamente expostas à presença de resíduos de antimicrobianos (ROSAL et al. 2010).

Além da resistência, uma redução da população de micro-organismos foi observada em sistemas de tratamento de esgoto, quando aplicadas concentrações de antimicrobianos comumente presentes em efluentes hospitalares (AL-AHMAD et al. 2008; KUMMERER et al. 2000). As quinolonas possuem potencial para afetar a comunidade microbiana, podendo afetar seriamente o processo de degradação da matéria orgânica (RODRIGUES-SILVA et al. 2014).

A disposição contínua no meio ambiente desperta a preocupação quanto à possibilidade de bioacumulação e persistência, devido às características recalcitrantes das quinolonas (KUMMERER et al. 2000). Estudos de degradação de antimicrobianos são importantes para avaliar a eficácia das tecnologias de tratamento disponíveis.

Quanto aos efeitos da OFX no ambiente, KUMMERER et al. (2000) determinaram que a OFX é genotóxica em concentrações ambientalmente relevantes de poucos $\mu\text{g L}^{-1}$ e ISIDORI et al. (2005) encontraram mutagenicidade (Teste de Ames, TA98) em concentrações maiores que $300 \mu\text{g L}^{-1}$. Em um estudo recente, OFX foi classificada como de alto risco para o meio aquático devido ao reuso de biossólidos na agricultura (LANGDON et al. 2010).

3.2 Metodologias analíticas

3.2.1 Extração em fase sólida

Tendo em vista que os fármacos, entre eles a ofloxacina, estão presentes no ambiente em teores de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} , faz-se necessária a utilização de técnicas visando à concentração do analito de interesse para viabilizar a quantificação destes por cromatografia líquida de alta eficiência. Dentre as técnicas mais comumente usadas para a concentração dos analitos, pode-se citar a extração em fase sólida (EFS). No Quadro 3.4 são apresentados dados sobre a utilização da técnica EFS para concentração da ofloxacina. O pH da amostra influencia significativamente a forma química dos analitos presentes na amostra, sua estabilidade e a interação com o material empacotado do cartucho de EFS. Por isso, é necessário saber os valores do pKa do analito. Os antimicrobianos da família das fluoroquinolonas possuem grupos funcionais ácidos e/ou básicos e, portanto, sua ionização é controlada pelo valor do pH da solução.

A maioria dos antimicrobianos são substâncias ácidas. Dessa forma, a acidificação das soluções aquosas contendo o analito abaixo do seu respectivo valor de pKa resulta em amostras contendo apenas o analito em sua forma ácida, permitindo assim a retenção destas substâncias em adsorventes poliméricos, como exemplo, os cartuchos Oasis HLB (SEIFRTOVÁ et al. 2009).

Conforme apresentado no Quadro 3.2, a ofloxacina possui dois valores de pKa. Sendo assim, a OFX apresenta-se na forma catiônica em valores de pH inferiores ao pKa_1 (devido à presença do nitrogênio na posição 4 do anel piperazínico), aniônica em valores de pH acima do pKa_2 (devido ao grupo carboxila na posição 6), e possui caráter neutro entre pKa_1 e pKa_2 (HAPESHI et al. 2010). Em condições ácidas, a OFX está em sua forma catiônica, o que é importante para a sua retenção durante o processo de extração. Em condições básicas, sua forma aniônica apresenta menor retenção no cartucho HLB Oasis, em comparação com a forma catiônica e neutra (SEIFRTOVÁ et al. 2009).

Quadro 3.4: Extração em fase sólida para concentração de ofloxacina.

Cartucho	Condicionamento	Eluição	Recuperação (%)	Referências
Cartucho de troca aniônica+ Oasis HLB	6 mL MeOH +6 mL 4,38mM H ₃ PO ₄ (pH 2,5)	10 mL 95% MeOH +5% H ₃ PO ₄ 4,38 mM	101–129	Renew <i>et al.</i> (2004)
Oasis HLB	6 mL acetona + 6 mL MeOH + 6 mL EDTA 50 mM (pH 3)	3× 2 mL MeOH	95	Miao <i>et al.</i> (2004)
Oasis HLB	2 mL n-hexano +2 mL acetona +10 mL MeOH +10 mL água subterrânea não contaminada (pH 10)	4× 1 mL MeOH	84-108	Vieno <i>et al.</i> (2006)
Oasis HLB	5 mL MeOH +5 mL Água ultrapura	2 × 4 mL MeOH	93-106	Gros <i>et al.</i> (2006)
Oasis HLB+SDB-2	6 ml MeOH +3x6 ml água ultrapura	4× 1 mL MeOH, 4×1 mL MeOH-FAc	62–68	Christian <i>et al.</i> (2003)
ENV+	5 mL MeOH +5 mL 50:50 v/v MeOH/ Água ultrapura +5 mL Água ultrapura (pH 3)	2 mL MeOH, 5 mL 5%TEA/MeOH	80	Lindberg <i>et al.</i> (2007)
Oasis HLB	5 ml MeOH +5 mL água ultrapura	2× 4 mL MeOH	90	Petrovic <i>et al.</i> (2006)
MCP	8 mL MeOH +8 mLÁgua ultrapura (pH 3)	4 mL 5%amônia/MeOH	87	Nakata <i>et al.</i> (2005)
Oasis WCX	4 mL MeOH + 10 mLÁgua ultrapura (pH 3)	10 mL MeOH/ACN/FAc (20/75/5, v/v/v)	87–94	Lee <i>et al.</i> (2007)
SAX, Oasis HLB	2 mL MeOH +2 mL ácido cítrico (pH 4,0)	4 mL MeOH	96-114	Seifrtová <i>et al.</i> (2008)

3.2.2 Quantificação por CLAE

A investigação de micropoluentes depende de técnicas de detecção avançadas (FENT et al. 2006). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica que possibilita quantificar e detectar compostos orgânicos em baixas concentrações. Existem na literatura diversos estudos que utilizam CLAE associada a detectores UV, de arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massa, para a detecção e quantificação da ofloxacina em amostras aquosas (PENG et al. 2006; JIA et al. 2012; GAO et al. 2012). Antes de se iniciar a análise quantitativa por CLAE, é necessário o desenvolvimento da validação do método analítico a ser empregado no estudo, com o intuito de garantir uma boa confiabilidade dos resultados.

3.2.3 Varreduras UV-Vis

A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma técnica analítica amplamente empregada, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, a qual relaciona a absorção de radiação por amostras nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho, do espectro eletromagnético, com a concentração do analito de interesse presente na amostra (ROCHA et al. 2004). MICHAEL et al. (2012) utilizaram esta técnica para monitorar a conversão da ofloxacina em amostras submetidas a foto-Fenton e fotocatalise.

3.2.4 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma ferramenta versátil e amplamente utilizada para identificar os elementos presentes em amostras de interesse e para determinar suas

concentrações. Uma análise por espectrometria de massas envolve as etapas de atomização, geração de íons, separação destes íons formados de acordo com suas razões massa/carga (m/z) e contagem do número de íons de cada tipo gerados ou medida da corrente iônica produzida (HOLLER et al. 2009). O computador apresenta graficamente os sinais obtidos como um espectro de massas, mostrando a abundância relativa dos sinais, de acordo com a relação m/z (HO et al. 2003). A técnica utilizada neste estudo foi a espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (ESI), onde a amostra em estado líquido é convertida diretamente em íons gasosos (dessorção). Esta tem se destacado nas últimas décadas como uma técnica importante para análise de contaminantes ambientais, devido sua sensibilidade e robustez. HAPESHI et al. (2013) empregaram a espectrometria de massas para determinação dos subprodutos da ofloxacina gerados durante os processos de sonólise, sonocatálise e fotocatálise.

3.3 Métodos de remoção

A ocorrência de quinolonas, entre elas a ofloxacina, em amostras de efluentes tratados, bem como em amostras de águas para abastecimento público, demonstra que as estações convencionais de tratamento de água e esgoto não são projetadas para promover a total remoção e/ou degradação desses compostos recalcitrantes, contribuindo para o lançamento contínuo destes fármacos no ambiente. No Quadro 3.5 são apresentados dados da aplicação de métodos convencionais de tratamento e a eficiência de remoção de ofloxacina obtida.

A remoção de ciprofloxacina, norfloxacina e ofloxacina foi avaliada por VIENO et al. (2007) em uma estação piloto de tratamento de água. Os pesquisadores observaram que os processos de coagulação, floculação e sedimentação removeram juntos, apenas 3% da concentração dos fármacos presentes no efluente (com exceção da ciprofloxacina: 30% de remoção). A filtração apresentou um índice de remoção de 10% dos compostos avaliados. Essa baixa remoção deve-se ao fato das etapas de coagulação, floculação e sedimentação

empregarem reagentes químicos para promover a aglutinação e precipitação dos poluentes presentes no efluente e não a oxidação dos mesmos (RODRIGUES-SILVA et al. 2014).

Quadro 3.5: Aplicação de tratamentos convencionais para remoção de ofloxacina em meio aquoso.

Concentração inicial (mg L ⁻¹)	Matriz	Condições	Resultados	Referência
20	Água ultrapura	UV150W- média pressão, 32 min	100% de degradação e 31% de mineralização, redução de 85% da atividade antimicrobiana (bactéria <i>P.putida</i>), redução de 87% da toxicidade (<i>Vibrio fischeri</i>)	Vasquez <i>et al.</i> (2013)
4,1 x 10 ⁻⁵	ETE (Lausanne, Suíça)	UV 254nm, 25 W, 10 min	65% de degradação	De La Cruz <i>et al.</i> (2012)
10	Água ultrapura	UV 350-400nm, 9 W, 240 min	40% de degradação, 30% de mineralização e 0% redução da toxicidade (<i>Daphnia magna</i>)	Hapeshi <i>et al.</i> (2010)
0,1	Efluente de ETE (Universidade do Chipre)	UV 290-800nm, 30 W/m ² , 54 min	17,7% de degradação e 21% de mineralização	Michael <i>et al.</i> (2010)
5,2 x 10 ⁻³	Afluente de ETE (Madrid, Espanha)	Lodos ativados, Q = 3000 m ³ /h	Redução de 64,1%	Rosal <i>et al.</i> (2010)
0,29 – 0,96 x 10 ⁻³	Efluente doméstico e industrial (Castellon, Espanha).	Lodos Ativados 1500 m ³ /h	Redução de 42%	Gracia-Lor <i>et al.</i> (2012)
0,44 - 3,1x10 ⁻³	Efluente doméstico (Pequim, China)	Lodos ativados	Redução de 50%	Gao <i>et al.</i> (2012)
0,45–2,2x10 ⁻³	Efluente hospitalar	Lodos ativados com desinfecção por NaClO	Redução de 61%	Verlicchi <i>et al.</i> (2012)
0,361	(A) água superficial (B) efluente de ETE (Sudeste dos EUA)	Cloração: C _{ClO2} = 1 mg L ⁻¹ , 30 min	(A) = 80% e (B) = 100% de degradação	Wang <i>et al.</i> (2010)

Fonte: RODRIGUES-SILVA et al. (2014).

A presença e a remoção de fármacos (inclusive a ofloxacina) em estações de tratamento de esgoto foram avaliadas por LIN et al. (2009). Mesmo atingindo índice de

remoção de 88% para ofloxacina, o estudo mostra que a eficiência de remoção de fármacos pelo processo de lodos ativados foi muito inconstante. Desta forma, os valores de remoção de fármacos obtidos do efluente da estação de tratamento não indicam, necessariamente, a degradação dos mesmos, já que o lodo da ETE pode apresentar uma concentração do fármaco até 1000 vezes superior à concentração encontrada no respectivo efluente (GAO et al. 2012).

3.3.1 Aplicação de processos oxidativos avançados na degradação de ofloxacina

Plantas de tratamento de efluentes convencionais não são capazes de degradar totalmente resíduos dos compostos orgânicos recalcitrantes e, como resultado, estes podem ser introduzidos no ambiente aquático (NIKOLAOU et al. 2007). Durante os últimos anos, muitas investigações sobre tecnologias químicas e biológicas têm sido realizadas com intuito de promover a degradação de poluentes orgânicos em matrizes aquosas. Tendo em vista a ineficiência dos processos biológicos e outros tradicionalmente utilizados na remoção das quinolonas, faz-se necessário o estudo e desenvolvimento de novas técnicas que cumpram de maneira eficiente esta tarefa. Os processos oxidativos avançados (POA) são tecnologias de tratamento de água consideradas competitivas para a degradação de micropoluentes orgânicos, os quais não são removidos por tratamentos biológicos (OLLER et al. 2011; ESPLUGAS et al. 2007; PARSONS, 2004; HERRERA et al. 1998; PULGARIN e KIWI, 1996).

Os POA são caracterizados pela geração de radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), um forte oxidante não seletivo que possui grande potencial de mineralizar substâncias orgânicas devido ao seu elevado potencial de redução ($E = 2,730 \text{ V}$), que é superior ao dos oxidantes convencionais (MELO et al. 2009; PAUL et al. 2007).

3.3.1.1. Peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H₂O₂)

O processo oxidativo avançado peroxidação assistida por radiação ultravioleta (UV/H₂O₂) trata-se da combinação de dois processos muito conhecidos: a fotólise direta com radiação UV e a peroxidação (H₂O₂) ocasionando a geração de radicais hidroxila (•OH) no meio reacional (Equação 1), o que torna este processo mais eficiente na remoção de compostos orgânicos do que a aplicação da fotólise ou da peroxidação separadamente.



DA SILVA et al. (2011) constataram que, para a degradação de 0,5 mg L⁻¹ de flumequina utilizando-se da radiação UV, era necessário o emprego de uma dose de radiação de 5677 mJ cm⁻² para se obter 91% de remoção do fármaco. Empregando-se o processo UV/H₂O₂ (1,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂) e reduzindo-se a dose de radiação ultravioleta de 5677 mJ cm⁻² para 2838 mJ cm⁻², os autores obtiveram praticamente 100% de degradação da fluoroquinolona presente na solução aquosa.

DE LA CRUZ et al. (2012) comprovaram o aumento na eficácia da degradação de 32 poluentes detectados em um efluente de ETE (inclusive três fluoroquinolonas) quando empregado o processo UV/H₂O₂ ao invés da radiação UV_{254nm} isoladamente. Após 10 min de irradiação, 36% da norfloxacin, 65% da ofloxacin e 48% da ciprofloxacina foram degradadas pelo processo fotolítico. Adicionando 50 mg L⁻¹ de H₂O₂ e aplicando essa mesma dose de radiação (UV/H₂O₂), observaram que 100% da concentração das fluoroquinolonas ofloxacin e norfloxacin presentes no efluente foi degradada após 10 min de reação. Porém, para a ciprofloxacina, a total degradação foi observada apenas após 30 min de reação.

3.3.1.2 Fotocatálise com TiO₂ em suspensão (UV/TiO₂)

Entre os vários POA disponíveis, a fotocatálise, utilizando dióxido de titânio (TiO₂) como catalisador, é conhecida por sua capacidade de alcançar a oxidação completa de poluentes orgânicos pela geração de radicais hidroxila quando o catalisador é exposto à radiação ultravioleta (FUJISHIMA et al. 2008).

A fotocatálise utiliza semicondutores, isto é, materiais que possuem níveis de energia não contínuos em seu estado normal, não conduzindo eletricidade. Estes caracterizam-se por possuir banda de valência (BV), banda de condução (BC) e a separação energética entre elas, o *band-gap*. O dióxido de titânio (TiO₂) é amplamente utilizado devido a algumas características, tais como: disponível comercialmente em várias formas cristalinas, alta foto-atividade, natureza não tóxica, valor de *band-gap* adequado para a utilização com radiação UV, elevada estabilidade química, baixo custo e dispensar o uso de reagentes coadjuvantes (PASCHOALINO, 2006).

O *bandgap* do TiO₂ varia conforme a sua estrutura cristalina, a qual pode ser constituída em anatase, rutilo e brookite. O semicondutor mais comumente utilizado em ensaios fotocatalíticos com quinolonas é o TiO₂ P25 da Degussa, que possui uma fase cristalina constituída por 80% anatase e 20% rutilo. Essa composição confere um *bandgap* entre 3,00-3,15 eV (RODRIGUES-SILVA et al. 2014)

A fotocatálise pode ser realizada empregando o catalisador em suspensão ou imobilizado. Quando uma partícula do semicondutor é irradiada com fótons de energia maior que a energia do *band gap*, elétrons são transferidos da banda de valência para a banda de condução, gerando um par elétron (e⁻) / lacuna (h⁺) (Equação 2). Nas Equações 2 a 7 são apresentadas as reações envolvidas durante a formação dos radicais pelo processo fotocatalítico com TiO₂ (MALATO et al. 2009).



A adsorção do composto na superfície do TiO_2 é uma etapa importante no processo de fotocatalise. HAPESHI et al. (2010) fizeram testes com soluções de ofloxacina contendo diferentes concentrações de TiO_2 (50 – 1500 mg L^{-1}) e concluíram que 30 min são suficientes para garantir o equilíbrio de adsorção/dessorção da ofloxacina na superfície do catalisador. Esse mesmo período foi utilizado nos ensaios de fotocatalise de VASQUEZ et al. (2013). Vale salientar que a adsorção de contaminantes pelo TiO_2 é uma chave para esse POA, pois o composto necessita estar adsorvido para que aconteça a reação de oxidação. A adsorção de compostos no semicondutor varia em função da concentração do poluente, da concentração do adsorvente e da complexidade da matriz.

O emprego da fotocatalise para degradação da ofloxacina foi estudado por HAPESHI et al. (2010), utilizando 250 mg L^{-1} de TiO_2 para tratar uma solução contendo 20 mg L^{-1} de ofloxacina. A eficiência obtida foi de 88% após 240 min. RODRIGUES-SILVA et al. (2012) empregaram entre 5 a 150 mg L^{-1} de TiO_2 em suspensão para degradar uma solução de 0,5 mg L^{-1} de flumequina em água ultrapura e observaram total remoção do fármaco após 30 min, utilizando 50 mg L^{-1} de TiO_2 .

3.4 Considerações Finais

É necessário pontuar a existência de poucos trabalhos na literatura a respeito da degradação da ofloxacina em solução aquosa em baixas concentrações, utilizando processos oxidativos avançados, bem como de estudos para a avaliação da toxicidade e da

atividade antimicrobiana das amostras submetidas aos processos UV, H_2O_2 , UV/ H_2O_2 , UV/ TiO_2 e UV/ TiO_2 / H_2O_2 .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Ofloxacina (99,8% $C_{18}H_{20}FN_3O_4$, $361,368 \text{ g mol}^{-1}$) e ácido oxálico (99,5% $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos); peróxido de hidrogênio (30% m/m, H_2O_2), ácido sulfúrico concentrado (97%, H_2SO_4) e hidróxido de sódio (97%, NaOH) da Synth (Diadema, Brasil); metanol grau HPLC (CH_3OH) e cloreto de bário (99%, $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) da J.T. Baker (Edo, México); ácido fosfórico (85%, H_3PO_4) e permanganato de potássio (98%, KH_3PO_4) da Nuclear (São Paulo, Brasil); hidróxido de potássio (85%, KOH) da Ecibra (São Paulo, Brasil); metavanadato de amônio (99%, NH_4VO_3) da Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha) e dióxido de titânio (TiO_2 P-25) da Degussa (Frankfurt, Alemanha). Meio de cultura Mueller-Hinton e Mueller-Hinton-Agar foram comprados da Himidia (Mumbai, Índia). Cepas de *Escherichia coli* ATCC® 23716 foram adquiridas da ATCC (Manassas, Estados Unidos); cepas da bactéria *Vibrio fischeri*, solução de reconstituição da *Vibrio fischeri*, diluente (2% de NaCl) e solução de ajuste osmótico (22% em NaCl) foram obtidos da Umwelt (Blumenal, Brasil). A água ultrapura usada no presente estudo foi produzida no Sistema Acadêmico de Purificação de Água Milli-Q (Millipore).

4.2 Preparo da solução estoque

A solução estoque de ofloxacina de 500 mg L^{-1} foi preparada por meio da dissolução do padrão de ofloxacina em metanol. Esta foi conservada a 4°C , protegida da luz.

4.3 Preparo da amostra

As soluções de trabalho de ofloxacina de $500 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizadas em todos os ensaios deste estudo, foram obtidas por meio da fortificação de 1 L de água ultrapura com o composto, a partir da solução estoque.

4.4 Método analítico aplicado

Anteriormente a realização dos estudos de degradação da ofloxacina, foram avaliados os métodos analíticos para determinação desse fármaco. Após o estabelecimento das condições ótimas para identificação e quantificação por CLAE, as eficiências dos processos oxidativos avançados propostos foram avaliadas para a degradação da OFX em solução aquosa. Na sequência, foram avaliadas a toxicidade e a atividade antimicrobiana das amostras submetidas aos processos de degradação.

4.4.1 Extração em fase sólida

A técnica de extração em fase sólida foi utilizada para concentrar o analito, viabilizando as análises quantitativas utilizando CLAE. Foram avaliados dois tipos de cartuchos para extração em fase sólida: C_{18} (500 mg / 6 mL) da Varian, o qual emprega o adsorvente octadecilsilano, e o Oasis HLB (500 mg / 6mL) da Waters que utiliza adsorvente polimérico. As análises foram realizadas em pH 3 e 6. A escolha do cartucho a ser utilizado dependeu do grau de recuperação do analito de interesse.

4.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A concentração nas quais as fluoroquinolonas estão presentes no ambiente aquático é muito baixa (na faixa de ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$), o que torna necessário a utilização de técnicas analíticas sensíveis, adequadas para o monitoramento destes analitos (TURIEL et al. 2003). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica muito utilizada para a determinação da ofloxacina em matrizes aquosas.

O cromatógrafo à líquido de alta eficiência utilizado no desenvolvimento deste projeto é composto por um sistema de bombeamento unitário, modelo Waters 510 (Waters, EUA); injetor modelo 7725 (Rheodyne, EUA), com amostrador de 20 μL ; um detector de absorvância UV modelo 486 (Waters, EUA). A aquisição de dados foi realizada utilizando-se um integrador (Waters 746 Data Module). A coluna analítica utilizada foi a Waters X Bridge® RP18 (250 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm). O comprimento de onda utilizado para a determinação da ofloxacina foi 298 nm. A fase móvel era constituída de metanol e ácido oxálico 0,01 mol L^{-1} , na proporção de 35:65 v/v, sendo empregada uma vazão de 1 mL min^{-1} .

4.4.3 Varreduras UV-visível

Foi utilizado um espectrofotômetro HACH modelo DR4000 para a obtenção dos espectros na região de UV-Vis das amostras iniciais de ofloxacina (500 $\mu\text{g L}^{-1}$), bem como das amostras submetidas aos processos de degradação. Os espectros foram obtidos na faixa de 200 a 800 nm, com intuito de verificar a modificação do espectro da ofloxacina com o decorrer dos processos de degradação. O comprimento de onda de 288 nm corresponde à absorção pelo anel aromático da molécula de ofloxacina (MICHAEL et al. 2010). Após a eluição com metanol (4 mL), o extrato foi diluído 12,5 vezes e analisado por espectrometria UV-Vis.

4.4.4 Espectrometria de massas

Para a determinação dos subprodutos gerados pela aplicação dos processos oxidativos avançados, foi utilizado um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo Quatro Micro (Waters, EUA) acoplado com uma fonte de ionização por Eletrospray (ESI), operada em modo positivo. A aquisição de dados foi realizada com o software MassLynx®. As estruturas químicas e massas molares da ofloxacina e de seus subprodutos foram desenhadas e calculadas usando o software ChemSketch (ACD/Labs). Alíquotas da solução de ofloxacina foram coletadas nos tempos iguais a 5, 10, 15, 30 e 60 min. Foram utilizadas soluções de ofloxacina de 5 mg L⁻¹ para proporcionar a identificação qualitativa dos subprodutos. Os espectros foram obtidos entre m/z 100 e 600. No Quadro 4.1 são apresentadas as condições utilizadas nos experimentos.

Quadro 4.1: Condições utilizadas nas análises utilizando espectrometria de massas.

Analito	Ofloxacina
Íon precursor (m/z)	362,1
Energia do Cone (V)	25
Energia do capilar (V)	3000
Resolução (Da)	0,75
Polaridade	Positiva
Fluxo de gás no cone (L h ⁻¹)	10
Fluxo de gás de dessolvatação (L h ⁻¹)	1000
Energia do cone de extração(V)	3
Energia do íon 1	0,5
Energia do íon 2	1
Resolução da menor massa 1 (Da)	7,3
Resolução da maior massa 1 (Da)	14,5
Resolução da menor massa 2 (Da)	10,5

Continuação **Quadro 4.1.**

Resolução da maior massa 2 (Da)	14,7
Temperatura de dessolvatação (°C)	500
Vazão da infusão ($\mu\text{L min}^{-1}$)	20

4.5 Ensaaios de degradação

4.5.1 Sistema operacional

Os ensaios de degradação da ofloxacina pelos processos fotolítico, oxidativo (peroxidação) e oxidativos avançados (UV/H₂O₂ e UV/TiO₂) foram realizados no laboratório de Protótipos da FEC-Unicamp, utilizando um reator fotoquímico de vidro borossilicato na forma de tubo, com 38,5 cm de comprimento e 3,5 cm de diâmetro interno, contendo uma lâmpada de vapor de mercúrio de baixa pressão (15W, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$, e 2,1 cm de diâmetro interno) acoplada concentricamente, de maneira que a solução ficasse em contato direto com a lâmpada. O volume útil era de 190 ml. Na Figura 4.1 é apresentado o sistema experimental utilizado.

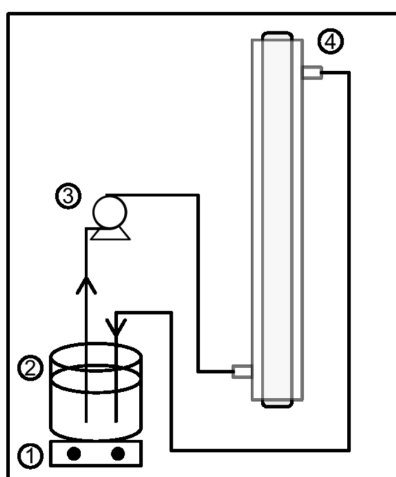


Figura 4.1. Sistema operacional utilizado: 1-agitador magnético; 2- reservatório; 3-bomba peristáltica; 4- reator fotoquímico.

O sistema é constituído do próprio reator, um agitador magnético, um reservatório de 1000 ml e uma bomba peristáltica para a recirculação da solução de ofloxacina pelo sistema. A vazão utilizada foi de 100 ml min⁻¹. O sistema operou em regime de batelada com recirculação. Um sistema experimental similar foi utilizado por DA SILVA et al. (2011) e GUADAGNINI et al. (2013).

A intensidade de radiação emitida pela lâmpada UV de 6,95 mW cm⁻² foi medida com um radiômetro (Cole Parmer - modelo VLX3 W) previamente calibrado em 254 nm. Vale a pena ressaltar que o tempo mostrado no eixo das abcissas dos gráficos de degradação, apresentados no Capítulo 5, representa o tempo total, que é diferente do tempo de irradiação, pois os volumes do reator (190 mL) e da solução a ser tratada (1000 ml) não são iguais. Os tempos de reação de 15, 30, 45 e 60 min correspondem a 2,9, 5,7, 8,6 e 11,4 min de irradiação quando utilizado o processo foto-assistido. O tempo de irradiação foi calculado por meio da Equação 8:

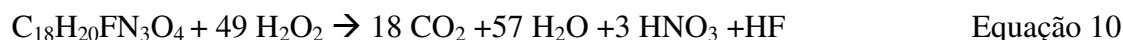
$$t_{irradiação} = \frac{t_{total} \times V_{reator}}{V_{solução}} \quad \text{Equação 8}$$

$$D = E \times t_{irradiação} \quad \text{Equação 9}$$

sendo, $t_{irradiação}$ é o tempo de exposição à radiação UV, t_{total} é o tempo total do experimento, V_{reator} é o volume do reator e $V_{solução}$ é o volume da solução. A dose de radiação (W s cm⁻²) foi determinada pelo produto da irradiância (W cm⁻²) e do tempo de exposição (s), de acordo com a Equação 9, onde D representa a dose de radiação UV, E a irradiância e $t_{irradiação}$ o tempo de exposição.

Foram avaliados quatro processos diferentes com objetivo de degradar uma solução sintética de ofloxacina. As concentrações de peróxido de hidrogênio utilizadas nos ensaios

de degradação foram baseadas na estequiometria de reação de mineralização entre a ofloxacina e o peróxido de hidrogênio, apresentada na Equação 10.



Pela Equação 10 é possível verificar que, para se obter a conversão total de 1 mol de ofloxacina, são necessários 49 mols de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, para a concentração inicial de OFX de $1,383 \times 10^{-3} \text{ mmol L}^{-1}$ ($500 \mu\text{g L}^{-1}$), foram utilizadas as concentrações de peróxido de hidrogênio iguais a $0,27 \text{ mmol L}^{-1}$ (relação OFX:H₂O₂ de 1:196, ou seja, relação estequiométrica de 1:4), $1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ (relação OFX:H₂O₂ de 1:1225 ou seja, relação estequiométrica de 1:25), $3,39 \text{ mmol L}^{-1}$ (relação OFX:H₂O₂ de 1:2450 ou seja, relação estequiométrica de 1:50), $6,77 \text{ mmol L}^{-1}$ (relação OFX: H₂O₂ de 1:4900 ou seja, relação estequiométrica de 1:100) e de $8,46 \text{ mmol L}^{-1}$ (relação OFX: H₂O₂ de 1:6125 ou seja, relação estequiométrica de 1:125).

A peroxidação foi realizada com intuito de avaliar a contribuição individual do peróxido de hidrogênio na degradação de ofloxacina. A faixa de concentração de peróxido utilizada foi de $0,27$ a $6,77 \text{ mmol L}^{-1}$. No processo de fotólise a radiação UV-C foi aplicada em soluções aquosas de ofloxacina e o resultado da degradação foi avaliado nos intervalos de tempo propostos. O POA UV/H₂O₂ é a combinação da peroxidação e da fotólise, originando um processo oxidativo avançado denominado peroxidação assistida por luz ultravioleta. A influência da adição de peróxido na faixa de $0,27$ a $8,46 \text{ mmol L}^{-1}$ foi avaliada. O processo de fotocatalise foi realizado utilizando TiO₂ em suspensão na faixa de 4 a 128 mg L^{-1} ; o efeito da adição de $1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio (processo UV/TiO₂/H₂O₂) também foi avaliado.

4.6 Quantificação do residual de peróxido de hidrogênio

Utilizou-se um método analítico colorimétrico para acompanhar o consumo de peróxido de hidrogênio nos ensaios de degradação, com intuito de eliminar a possibilidade de haver excesso de oxidante após a aplicação do processo de degradação. Este método baseia-se na reação de óxido-redução entre uma solução do íon metavanadato (coloração amarela) e o H_2O_2 presente na solução, resultando em solução de coloração vermelha (formação do cátion peroxivanádio) que apresenta máximo de absorbância em 450 nm e desta forma, pode ser determinado por espectrofotometria UV-Visível. (NOGUEIRA et al. 2005).

4.7 Ensaios de toxicidade

4.7.1 Testes de toxicidade com *Vibrio fischeri*

A toxicidade aguda utilizando a bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi avaliada pelo ensaio de inibição da bioluminescência, ou seja, pelo monitoramento das mudanças na emissão da bactéria luminescente quando estão em contato as soluções submetidas aos processos de degradação. As amostras foram avaliadas em meio contendo 2% de NaCl e a luminescência foi registrada após 15 min de incubação a 15°C.

Os ensaios foram realizados de acordo com a norma L5.227 (CETESB, 2001), usando um analisador Microtox modelo 500 (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, EUA). As amostras passaram por diluição serial, variando-se a concentração das amostras entre 89,1% e 0,32%. A toxicidade da solução inicial e das amostras submetidas aos processos de fotólise e UV/ H_2O_2 foi avaliada por meio do monitoramento da luminescência inicial do *V. fischeri* e após 15 min de exposição. Os resultados foram expressos em

porcentagem de inibição e calculados seguindo o protocolo do programa Microtox (SDIMicrotoxOmni 4.0) (Strategic Diagnostics Inc., Newark, Delaware, EUA).

4.7.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.7.2.1 Preparação das soluções

Para o ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana foram preparadas as seguintes soluções: tampão fosfato pH 8 (para ajustes de pH foi utilizado H_3PO_4 e KOH), caldo de cultura Mueller-Hinton-agar (meio sólido) e caldo de cultura Mueller-Hinton (meio líquido) esterilizados a 1 atm, 120 °C por 20 min; padrão McFarland (preparado com BaCl_2 , 0,048 mol L^{-1} , e H_2SO_4 , 0,18 mol L^{-1} , 0,5:99,5 v/v, respectivamente; a absorbância em 630 nm deveria estar na faixa de 0,08 a 0,10).

4.7.2.2 Preparo da cultura de *E. coli*

Inicialmente, uma amostra da colônia de *E. coli* K12 (ATCC: 23716) congelada em tubo criogênico com Mueller-Hinton-glicerol (60:40, v/v) foi transferida para um frasco de cultura de célula T de 25 cm^2 contendo 10 mL de caldo de cultura Mueller-Hinton. Em seguida, os frascos de cultura foram colocados em estufa a 37 °C por um período de incubação de 24 h.

Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana das soluções de ofloxacina submetidas aos processos de degradação foram realizados utilizando uma cultura de bactérias *Escherichia coli* K12 de densidade igual a $1,0 \times 10^6$ UFC mL^{-1} . Para tanto, foi

necessário realizar o cultivo da cepa da bactéria em meio sólido e líquido e mantê-las incubadas a 37 °C por 24 h até atingirem tal concentração.

4.7.2.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os ensaios foram realizados de acordo com os procedimentos de RODRIGUES-SILVA et al. (2013), com algumas modificações. Inicialmente, foram adicionados 100 µL de tampão fosfato em pH 8 nas colunas 2 a 12 de uma placa de 96 poços estéril, geometria de 12x8 (Figura 4.2: Passo A). Em seguida, alíquotas de 350 µL da amostra foram colocadas nos primeiros poços de cada linha. Então foi realizada a diluição serial utilizando 18 poços para cada amostra, por meio da transferência de 250 µl do primeiro poço para o segundo poço, aspirando e dispensando a amostra contida nos poços. Este procedimento foi repetido até o penúltimo poço de cada linha. (Figura 4.2: Passo B). O último poço, ou seja, o 18º poço, continha apenas a solução de tampão fosfato. (Figura 4.2: Passo D). A atividade antimicrobiana do padrão ofloxacina, das amostras iniciais ($t = 0$ min) e das amostras submetidas aos processos de degradação ($t = 15, 30, 45$ e 60 min) foram quantificadas em duplicata. Na Figura 4.2 são ilustrados os passos do processo de microdiluição.

Dessa forma, após a diluição serial da amostra, todos os poços da microplaca foram inoculados com 100 µL de uma solução de *E. coli* K12 de 1×10^6 UFC mL⁻¹. Em seguida, a microplaca foi tampada, selada e incubada sob agitação por 8 h a 37 °C (shaker Marconi, modelo MA-420). Após o período de incubação, a absorbância dos poços foi medida a 630 nm, usando um leitor de microplacas Multiskan MS (Labsystems).

4.7.2.4 Análise dos dados

As medidas de absorbância foram convertidas em inibição do crescimento, em porcentagem, I, de acordo com a Equação 11.

$$I = \frac{A_{\text{controle}} - A}{A_{\text{controle}}} \times 100\%$$

Equação 11

sendo, A_{controle} é a absorbância correspondente a cultura de *E.coli* incubada com tampão fosfato, o que corresponde ao crescimento da cultura não-inibida, e A é absorbância de cada poço contendo as amostras, ambas obtidas a 630 nm.

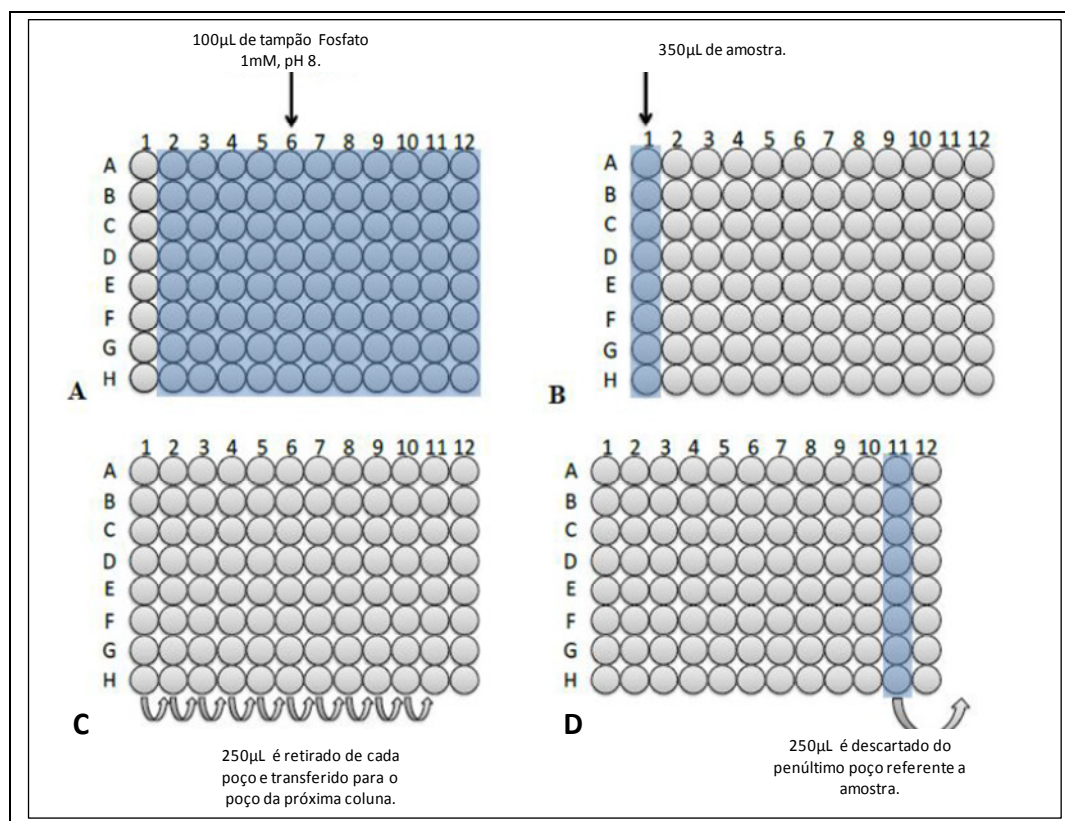


Figura 4.2: Procedimento utilizado na diluição serial da amostra para o ensaio de atividade antimicrobiana. (A) 100 µL de tampão fosfato são adicionados nos poços de A2 a H12; (B) 350 µL da amostra são adicionados nos poços da coluna 1; (C) 250 µL são transferidos dos poços da coluna 1 para os poços adjacentes da coluna 2, da coluna 2 para a 3, e sucessivamente até a coluna 11; (D) 250 µL são descartados dos poços da coluna 11.

O fator de diluição para cada poço da placa, após a diluição serial, foi determinado pela Equação 12.

$$Fator\ de\ Diluição = \frac{1}{m^n}$$

Equação 12

sendo, m o fator da diluição serial (ou seja 1,4) e n o número de diluições realizadas.

As curvas de dose-resposta e os valores de CE₅₀ (dose efetiva na qual se obtêm 50% de inibição de crescimento) das soluções iniciais e degradadas foram obtidas por meio do tratamento dos dados pelo software GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, USA), por meio da Equação 13.

$$I(\%) = I_{\min,t} + \frac{I_{\max,t} - I_{\min,t}}{(1 + 10^{((\log CE - \log(1/m^n) \times H))})}$$

Equação 13

sendo, log CE como a soma do log CE₅₀ da amostra padrão e da razão entre o log CE₅₀ da amostra padrão e de cada amostra submetida a degradação. I_{max,t} representa a máxima inibição do crescimento, I_{min,t} representa a mínima inibição de crescimento para cada amostra e H é o coeficiente de inclinação de Hill.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação da metodologia analítica

5.1.1 Extração em fase sólida

Foram realizados testes utilizando os cartuchos Varian e Oasis HLB em diferentes valores de pH, com intuito de verificar qual condição proporcionaria maior recuperação do analito. Sendo assim, avaliou-se a recuperação de soluções de ofloxacin de 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ nestes cartuchos, nos valores de pH 3 e 6, cujos resultados encontram-se na Figura 5.1. A melhor faixa de recuperação (90-100%) foi obtida em pH 3 para o cartucho Oasis HLB. Tendo em vista este resultado, para maximizar a porcentagem de recuperação da ofloxacin, os valores de pH de todas as amostras foram ajustados para 3 antes da realização da extração em fase sólida (EFS).

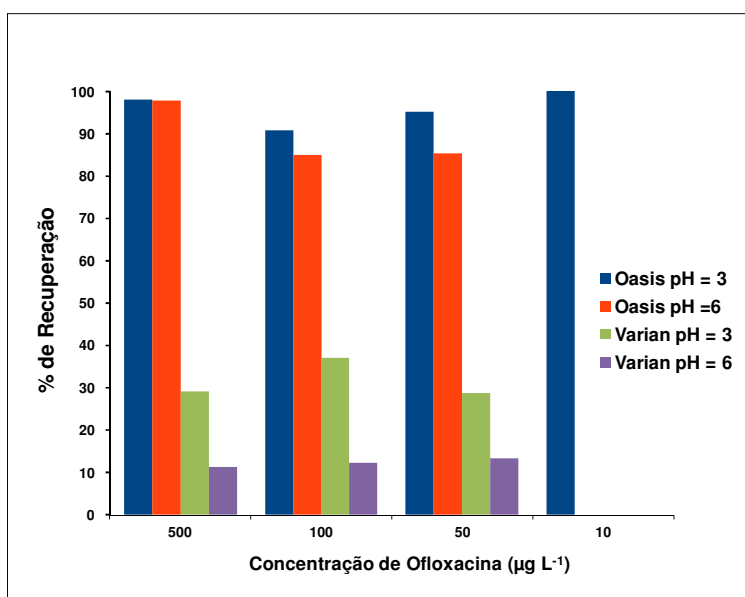


Figura 5.1: Recuperação da ofloxacin em dois tipos de cartuchos e em diferentes valores de pH.

5.1.2 Conformidade do Sistema

Para a avaliação da conformidade do sistema foram testadas várias condições cromatográficas utilizando-se a coluna X-Bridge – Shield RP 18 da Waters (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m).

Inicialmente, a proporção entre MeOH:ácido oxálico 70:30 (v/v) foi testada; entretanto, o tempo de retenção do pico foi menor que o tempo morto, o que não é desejado, pois recomenda-se que o tempo de retenção mínimo do analito seja de duas vezes o tempo morto (Paschoal *et al.* 2008). Com o intuito de aumentar a interação do fármaco com a fase estacionária, aumentando o tempo de retenção, foi avaliada como fase móvel a mistura metanol:ácido oxálico (concentração de ácido oxálico 0,01 mol L⁻¹), na proporção percentual de 60:40 (v/v), na vazão de 1 mL min⁻¹. Nessa condição, o pico cromatográfico da ofloxacina apareceu em tempo igual ao tempo morto.

A terceira fase móvel foi preparada na proporção de 30:70 (v/v) (MeOH:ácido oxálico) e o pico de ofloxacina apresentou tempo de retenção duas vezes maior que o tempo morto; no entanto, apresentou cauda frontal quando injetada uma solução de ofloxacina (15 mg L⁻¹) apenas em metanol.

Dessa forma, foi preparada uma solução de ofloxacina, nessa mesma concentração, utilizando-se água e metanol como solvente, na proporção de 50:50 (v/v). O pico não apresentou cauda, mostrando que houve boa interação da amostra com a fase móvel.

Finalmente, foi testada a fase móvel ácido oxálico:MeOH (0,01 mol L⁻¹) na proporção de 65:35 (v/v) e utilizada uma vazão de 1 mL min⁻¹. Nestas condições, todos os parâmetros de conformidade do sistema foram atingidos.

A conformidade do sistema cromatográfico foi realizada a partir dos cromatogramas adquiridos pelo integrador, sendo avaliada conforme Collins *et al.* (2006). Os parâmetros

avaliados foram: número de pratos ($N_{>2.000} = 25.339$), fator de assimetria ($As_{10\ 0,9-1,2} = 1,12$) e fator de retenção ($k_{>1,5} = 1,6$).

5.1.3 Validação

Todos os ensaios de degradação foram avaliados comparativamente com uma amostra padrão de ofloxacina de concentração igual a 20 mg L^{-1} . Dessa forma, a curva analítica foi construída na faixa de $0,05$ a 25 mg L^{-1} . A equação da reta obtida pela análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foi $y = 267039.C - 80655$, sendo que y representa a área do pico cromatográfico e C a concentração da ofloxacina. A curva analítica obtida neste estudo é apresentada na Figura 5.2 e os dados de LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação), linearidade (r^2), precisão e exatidão do método utilizado encontram-se no Quadro 5.1.

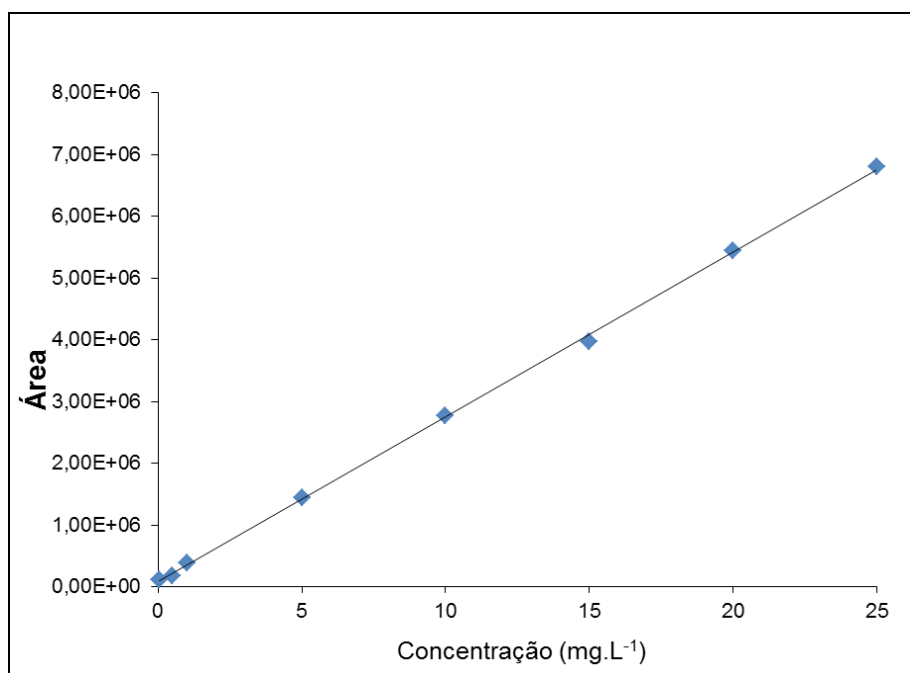


Figura 5.2: Curva analítica da ofloxacina.

O LOD do método foi igual a $0,01 \text{ mg L}^{-1}$, concentração em que o pico cromatográfico apresentou altura equivalente a 3 vezes ao do sinal do ruído da linha de base do cromatograma. O LOQ, determinado pela relação sinal-ruído, estabelecido pela proporção 10:1, foi igual a $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. A linearidade, expressa como o coeficiente de regressão linear da reta, igual a 0,9996, foi determinada a partir da curva analítica. Neste trabalho foi empregada a extração em fase sólida (EFS) para a concentração da ofloxacina; levando em consideração que as amostras foram concentradas 250 vezes, o LOD e LOQ do método são de $0,04 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Quadro 5.1: Parâmetros da metodologia analítica utilizada.

Equação da reta	$y = 267039.C - 80655$	
Linearidade (r^2)	0,9996	
LOD	$0,01 \text{ mg L}^{-1}$	
LOQ	$0,05 \text{ mg L}^{-1}$	
Exatidão	20 mg L^{-1} (n = 3)	96,3-107%
Precisão		
Inter-corrida	25 mg L^{-1} (n = 3)	4,84%
	20 mg L^{-1} (n = 3)	3,99%
	5 mg L^{-1} (n = 3)	7,20%
Intra-corrida	20 mg L^{-1} (n = 5)	1,24%

A precisão intra-corrida, determinada pela repetitividade de análise de uma mesma amostra em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento foi de 1,24% para 20 mg L^{-1} do analito (número de repetições n = 5). A precisão (desvio padrão) inter-corrida, determinada pela repetitividade de análise de uma mesma amostra em dias diferentes e no mesmo equipamento, foi avaliada em três diferentes concentrações, abrangendo o intervalo linear do método, com 3 réplicas (n = 3) cada. A precisão inter-corrida do método foi de 7,20, 3,99 e 4,84% para as amostras de ofloxacina nas concentrações de 5,0, 20 e 25 mg L^{-1} , respectivamente.

A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação de uma amostra contendo 20 mg L^{-1} do analito (número de repetições n = 3). A exatidão ficou entre 96,3 e

107%, quando avaliadas amostras contendo 20,0 mg L⁻¹ de ofloxacin, valor aceitável para o nível de concentração avaliado.

5.2 Avaliação da degradação da ofloxacin

5.2.1 Degradação da ofloxacin por fotólise e peroxidação

Os processos de fotólise e peroxidação foram avaliados separadamente usando o reator fotoquímico, com o intuito de estabelecer qual a contribuição de cada um deles na degradação da ofloxacin, quando utilizados os processos oxidativos avançados.

Na Figura 5.3 são mostrados os resultados de degradação da ofloxacin em solução aquosa obtidos com a aplicação dos processos de fotólise e peroxidação em função do tempo de ensaio. Análises quantitativas utilizando CLAE mostraram que a máxima remoção de ofloxacin obtida pelo processo de fotólise foi de 51% após 60 min de ensaio, o que corresponde a uma dose de radiação de 4753,8 mJ cm⁻². É necessário pontuar que o tempo de reação difere do tempo de irradiação, pois os volumes do reator (190 mL) e da solução a ser tratada (1000 ml) não são iguais. Sendo assim, o tempo de irradiação que corresponde a 60 min de reação é de 11,4 min.

O processo de peroxidação mostrou-se ineficiente para a remoção da ofloxacin, alcançando apenas 20% de eficiência para todas as concentrações de peróxido avaliadas (0,27 a 6,77 mmol L⁻¹). O consumo de peróxido ficou abaixo do limite de detecção do método utilizado (0,0298 mmol L⁻¹), indicando ausência de reação pronunciada entre a ofloxacin e o oxidante avaliado.

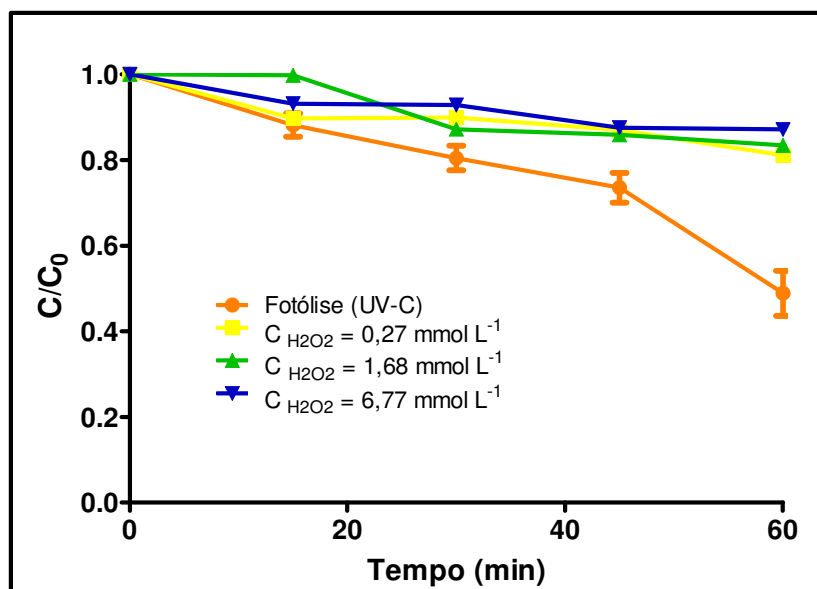


Figura 5.3: Degradação da ofloxacina ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) por fotólise e peroxidação, variando-se a concentração de H_2O_2 de 0,27 a $6,77 \text{ mmol L}^{-1}$.

HAPESHI et al. (2010) avaliaram a degradação de solução de 20 mg L^{-1} de ofloxacina utilizando fotólise com radiação UV (9 W) e peroxidação (concentração de peróxido igual a $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$). Após 240 min de ensaio, obtiveram 40% de degradação do fármaco e 30% de mineralização por fotólise e 40% de mineralização utilizando a peroxidação.

DE LA CRUZ et al. (2012) também aplicaram fotólise (25 W) para a degradação de ofloxacina ($0,41 \times 10^{-5} \text{ mg L}^{-1}$) contida em efluente, alcançando 65% de eficiência após 32 min. Nos estudos de MICHAEL et al. (2012), a fotólise (30 W) foi aplicada para a remoção de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de OFX, resultando em 17,7% de degradação após 54 min de ensaio. Os resultados presentes na literatura estão em consonância com os obtidos no presente estudo, pois demonstram que, em geral, a fotólise não é um processo que apresenta eficiência elevada na remoção da ofloxacina em solução aquosa.

5.2.2 Degradação por UV/H₂O₂

Para o processo UV/H₂O₂, o efeito da adição de concentrações de peróxido de hidrogênio menores que 0,27 mmol L⁻¹ (0,07 e 0,14 mmol L⁻¹) também foi avaliado. Entretanto, após 60 min, os resultados de degradação da ofloxacina foram apenas levemente superiores aos da fotólise, não havendo um incremento significativo na eficiência de degradação. O aumento nas concentrações de H₂O₂ adicionadas acarretou na elevação da eficiência de degradação. A adição de 1,68 e de 3,39 mmol L⁻¹ de H₂O₂ resultou em degradação de respectivamente 71% e 92,4% após 30min e de 96,8% e 98,9% após 60 min. Pelos resultados apresentados na Figura 5.5, é possível verificar que para as concentrações de peróxido de hidrogênio superiores a 3,39 mmol L⁻¹, a eficiência de degradação foi superior a 50% já nos primeiros 15 min de ensaio. 99% de degradação foi obtida após 45 min de reação, empregando-se a concentração de peróxido igual a 6,77 mmol L⁻¹ e dose de radiação de 3565,4 mJ cm⁻²; esta foi a melhor condição dentre as avaliadas. A elevação na concentração de H₂O₂ de 6,77 para 8,46 mmol L⁻¹ não resultou em aumento na eficiência de degradação do fármaco em questão. Estes fatos demonstram as vantagens do UV/H₂O₂ em relação à fotólise, pois este foi capaz de remover praticamente todo o fármaco em menor tempo de reação e, portanto, utilizando menor dose de radiação UV.

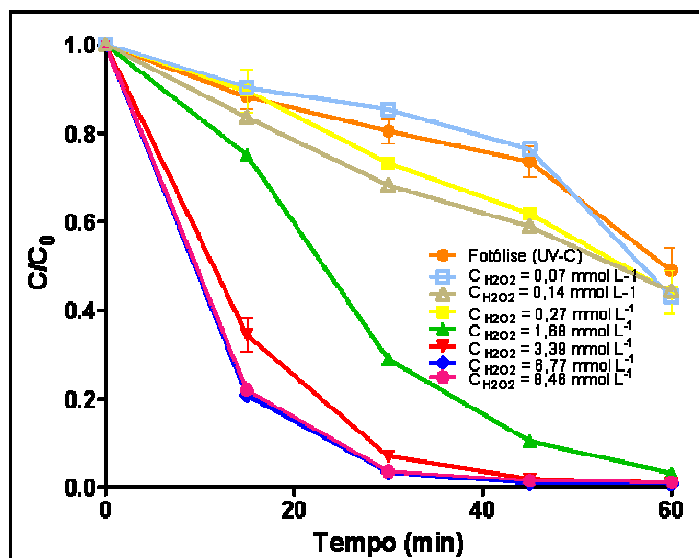


Figura 5.4. Degradação da ofloxacina por UV/H₂O₂ (C_{H2O2} inicial = 0,07 a 8,46 mmol L⁻¹).

O processo UV/H₂O₂ também foi empregado com sucesso para a remoção da ofloxacina por DE LA CRUZ *et al.* (2012). Estes utilizaram aproximadamente 1,5 mmol L⁻¹ de peróxido, alcançando 100% de degradação após 10 min de irradiação.

Para o processo UV/H₂O₂, diferentemente do ocorrido para a peroxidação, houve consumo de oxidante durante o período de reação. A cinética do consumo de peróxido de hidrogênio foi avaliada conforme metodologia descrita por NOGUEIRA *et al.* (2005). O consumo de H₂O₂ se comportou como uma reação de ordem zero e a constante de velocidade de consumo (k) aumentou com a elevação da concentração desse oxidante aplicada no POA (k = -0,002, -0,013, -0,048 mmol L⁻¹ min⁻¹ para concentrações iniciais de H₂O₂ iguais a 0,27, 1,68 e 6,77 mmol L⁻¹, respectivamente). Em todos os ensaios realizados, foi observado que a concentração de peróxido empregada estava em excesso; sendo assim, as doses de H₂O₂ aplicadas no processo UV/H₂O₂ foram suficientes para obedecer à estequiometria da reação, apresentada na Equação 10. O consumo indica que a radiação UV foi absorvida pelo peróxido, havendo a quebra da ligação entre oxigênios da molécula de H₂O₂, originando os radicais hidroxila (•OH). Porém, é necessário enfatizar

que nenhuma das concentrações de peróxido foi aplicada em grande excesso, o que poderia acarretar na inibição ou diminuição da eficiência deste POA.

5.2.3 Degradação por fotocatalise

O processo de fotocatalise foi realizado utilizando o dióxido de titânio (TiO_2 , Degussa P-25) como catalisador. Este foi mantido em suspensão no meio reacional por agitação. Após os ensaios de degradação realizados nos valores de pH iguais a 3, 6 e 10, o TiO_2 foi removido da solução por filtração em membrana de vidro GF 51-B, a qual se mostrou eficiente na retenção deste catalisador nas condições avaliadas.

No presente estudo, a adsorção da OFX também foi avaliada em concentrações de TiO_2 de 4 e 128 mg L^{-1} , nos valores de pH 3, 6 e 10, variando o tempo de contato de 0 a 90 min. Os resultados são apresentados na Figura 5.5. Observa-se que a concentração de ofloxacina adsorvida no catalisador não ultrapassou 30% em todas as condições testadas. HAPESHI et al. (2010) concluíram que 30 min foram suficientes para garantir a adsorção máxima da ofloxacina na superfície do catalisador; esse mesmo período foi utilizado por VASQUEZ et al. (2013) nos ensaios de fotocatalise. Sendo assim os resultados obtidos são consistentes com os estudos citados.

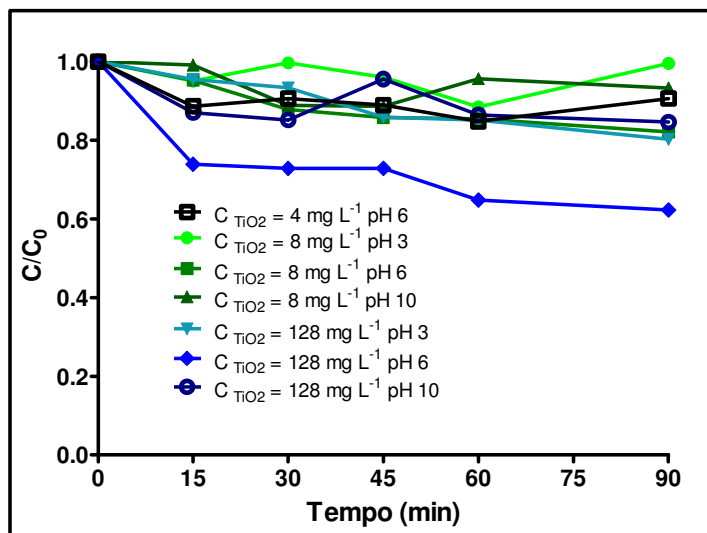


Figura 5.5: Adsorção de ofloxacina no TiO_2 ($C_{TiO_2} = 4, 8$ e 128 mg L^{-1}).

5.2.3.1 Efeito do pH

O pH é um importante parâmetro que pode afetar as reações fotocatalíticas. Neste estudo, a degradação da ofloxacina foi avaliada em diferentes valores de pH (3, 6 e 10). O pH inicial das soluções de OFX era igual a 6, e este foi ajustado para condições ácidas ou básicas com a adição de quantidades apropriadas de soluções de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio, respectivamente. Na Figura 5.8 são apresentados os resultados que mostram a influência do pH sobre a eficiência de degradação da ofloxacina.

A eficiência do processo de fotocatalise está relacionada ao estado de ionização da superfície do catalisador (KONSTANTINO et al. 2004), de acordo com as Equações 16 e 17.



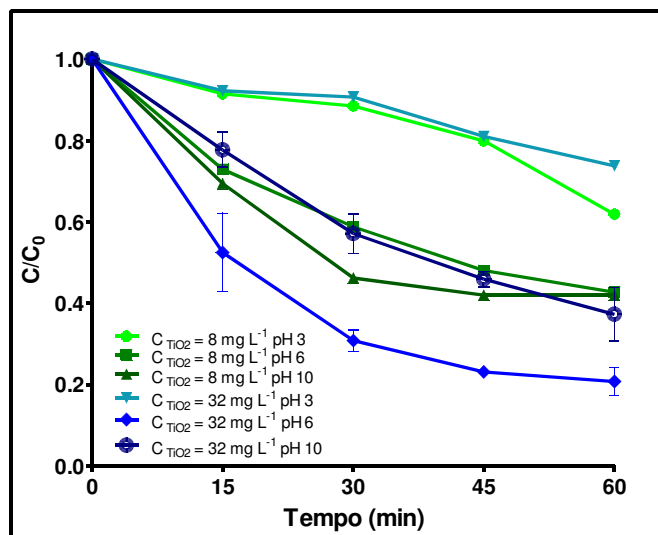


Figura 5.8: Degradação de ofloxacina por fotocatalise com TiO₂ em suspensão (pH 3, 6 e 10).

A eficiência do processo de fotocatalise está relacionada ao estado de ionização da superfície do catalisador (KONSTANTINO et al. 2004), de acordo com as Equações 16 e 17.



Mudanças no pH podem então influenciar a adsorção da molécula da ofloxacina na superfície do catalisador, que é uma etapa determinante para a ocorrência da reação de oxidação fotocatalítica. BAHNEMANN et al. (1994) avaliaram as propriedades ácido-base da superfície dos óxidos metálicos e concluíram que estas podem ter implicações consideráveis sobre sua atividade fotocatalítica. O ponto de carga zero do TiO₂ (Degussa P-25) é em pH 6. Assim, a superfície do catalisador está positivamente carregada em meio ácido (pH < 6) e negativamente carregada em condições básicas (pH > 6).

De acordo com a Quadro 3.2, a ofloxacina é positivamente carregada em valores de pH menores que o pK_{a1} (6,05), negativamente carregada em valores de pH acima do pK_{a2} (8,11) e neutra em valores de pH entre os pK_{a1} e pK_{a2} (HAPESHI et al. 2010). Em vista

disto, as condições de pH 3 e 10 não favorecem a adsorção da ofloxacina na superfície do catalisador, pois ocorre uma repulsão eletrônica entre as cargas de mesmo sinal do composto e do catalisador. Já em pH 6, tanto a molécula do catalisador quanto a do fármaco estão em suas formas neutras, não ocorrendo repulsão entre elas.

Observa-se na Figura 5.8 que, com o aumento da concentração de catalisador de 8 para 32 mg L⁻¹, o efeito do pH sobre a eficiência de degradação do fármaco foi mais pronunciado, ou seja, foi mais notável a diferença entre o resultado obtido em pH 6 em relação aos resultados em pH 3 e 10. Os resultados de degradação por fotocatalise em pH 3 e 10 foram inferiores aos obtidos para o mesmo processo em pH 6 provavelmente devido ao fenômeno de repulsão das cargas, que desfavorece a adsorção da ofloxacina no TiO₂.

5.2.3.2 Degradação por UV/TiO₂ em pH 6

Na Figura 5.6 são apresentados os resultados de degradação da ofloxacina em solução aquosa por fotocatalise, empregando concentrações de TiO₂ na faixa de 4 a 128 mg L⁻¹, em suspensão e em pH 6. Para todas as concentrações aplicadas, a eficiência desse processo foi superior a da fotólise. Utilizando 4 mg L⁻¹ de TiO₂, nota-se um sutil aumento na eficiência de degradação do fármaco em relação à fotólise, alcançando 56,2% após 60 min. Quando 8 mg L⁻¹ de catalisador foi utilizado, a degradação aumentou principalmente nos ensaios de 15, 30 e 45 min, atingindo 57,4% após 60 min. O emprego de 16, 32 e 64 mg L⁻¹ de TiO₂ provocou um ganho significativo na degradação da OFX, alcançado 71,7%, 75,8% e 82,3% respectivamente, após 60 min. Como pode ser observado na Figura 5.7, obteve-se eficiência máxima de degradação de 89,3% após 60 min de reação, quando adicionado 128 mg L⁻¹ de catalisador.

Não foram utilizadas concentrações superiores a 128 mg L⁻¹ de TiO₂ em solução pois isto não acarretaria em ganhos significativos na eficiência de degradação do fármaco, tendo em vista que concentrações de catalisador muito elevadas causam turbidez na

solução, dificultando a penetração da radiação UV incidente e, por sua vez, causando prejuízo para a eficiência do processo fotocatalítico (MALATO et al. 2009).

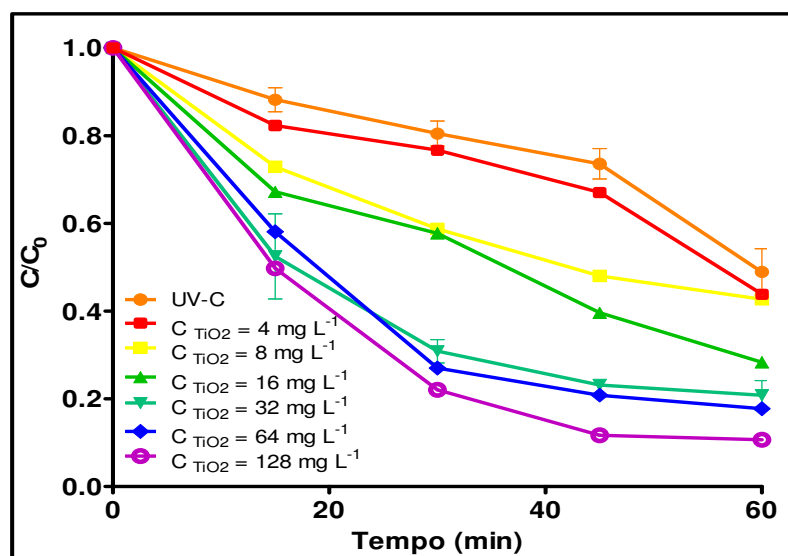


Figura 5.6: Degradação da ofloxacina por fotocatalise com TiO_2 em suspensão e pH 6. $C_{TiO_2} = 4$ a 128 mg L^{-1} .

A fotocatalise com TiO_2 também foi utilizada para degradação de ofloxacina na concentração de 10 mg L^{-1} por MICHAEL et al. (2010). A concentração do catalisador foi de 3 g L^{-1} , obtendo-se 60% de degradação após 120 min de irradiação. VASQUEZ *et al.* (2013) obtiveram 100% de degradação de uma solução de 10 mg L^{-1} de OFX aplicando fotocatalise (1 g L^{-1} de TiO_2) após 30 min. Por sua vez, HAPESHI et al. (2010) obtiveram 88% de degradação de solução 20 mg L^{-1} de ofloxacina aplicando UV/ TiO_2 (250 mg L^{-1} de TiO_2) após 240 min. No estudo de PRIETO-RODRIGUEZ et al. (2012), uma solução de $1,61 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ de OFX foi submetida ao processo fotocatalítico (20 mg L^{-1} de TiO_2) por 300 min, resultando em, aproximadamente, 90% de degradação.

Comparando os resultados de degradação da ofloxacina da literatura aos obtidos no presente estudo, observa-se que estes são similares, porém a grande maioria dos estudos existentes utilizam concentrações de ofloxacina e, também de TiO_2 , muito superiores as

empregadas neste trabalho (500 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 128 mg L^{-1} , respectivamente). Desta forma, é possível inferir que há um diferencial do presente estudo em relação aos já existentes.

5.2.3.3 Efeito da adição de peróxido

Foi avaliada a adição de 1,68 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio ao processo UV/TiO₂, empregando-se concentrações de TiO₂ de 8, 32, 64 e 128 mg L^{-1} . De acordo com CHU et al. (2007), quando quantidades pequenas de peróxido de hidrogênio são introduzidas no processo UV/TiO₂, o aumento na eficiência de degradação deve-se a maior geração de radicais hidroxila pelo UV/H₂O₂. Este estudo está em consonância com o estudo de HAPESHI et al.(2010) o qual infere que a utilização do peróxido de hidrogênio pode resultar em uma maior eficiência de degradação do método devido às reações adicionais de formação de radicais hidroxila (Equações 14 e 15)



A adição de peróxido de hidrogênio promoveu a elevação da eficiência do processo principalmente nos primeiros 15 min de reação, como pode ser observado na Figura 5.8. Comparando os resultados obtidos para a fotocatalise utilizando 8 mg L^{-1} de TiO₂, a adição de peróxido acarretou em ganho na eficiência de remoção do fármaco de aproximadamente 30%, atingindo 86,8% após 60 min. Quando 32 mg L^{-1} de catalisador foi utilizado, a eficiência de degradação após 60 min passou de 75,8% para 94,6% com a adição de H₂O₂. Foi observada remoção de 95,6% adicionando-se peróxido de hidrogênio à fotocatalise empregando 64 mg L^{-1} de TiO₂.

No processo UV/H₂O₂ (1,68 mmol L⁻¹ de H₂O₂), 25% de degradação da ofloxacina foi observada após 15 min e a máxima degradação foi de 96,8% após 60 min. A adição do catalisador no processo UV/TiO₂/H₂O₂, (1,68 mmol L⁻¹ de H₂O₂ e 128 mg L⁻¹ de TiO₂) elevou este resultado para 65,3%, após 15 min de ensaio. O melhor resultado de degradação obtido para este processo foi de 97,8%, após 60 min.

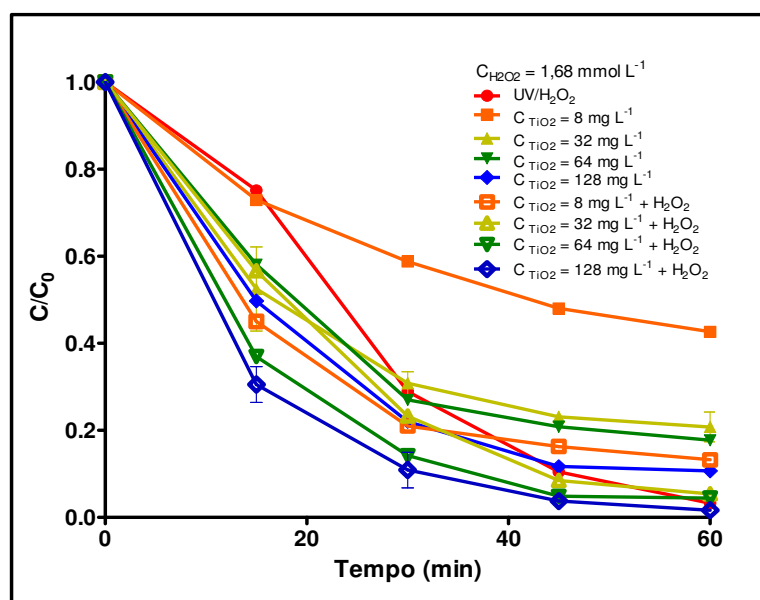


Figura 5.7: Degradação da OFX por UV/TiO₂/H₂O₂. Concentração inicial de H₂O₂ de 1,68 mmol L⁻¹.

5.2.4. Comparação entre os processos de degradação

Na Figura 5.9 são comparados os resultados de degradação da ofloxacina para cada processo empregado (fotólise, peroxidação, peroxidação assistida por radiação UV e fotocatalise). Para isso, foram escolhidos os experimentos que utilizaram a mesma concentração de peróxido de hidrogênio (1,68 mmol L⁻¹) e/ou de TiO₂ (128 mg L⁻¹).

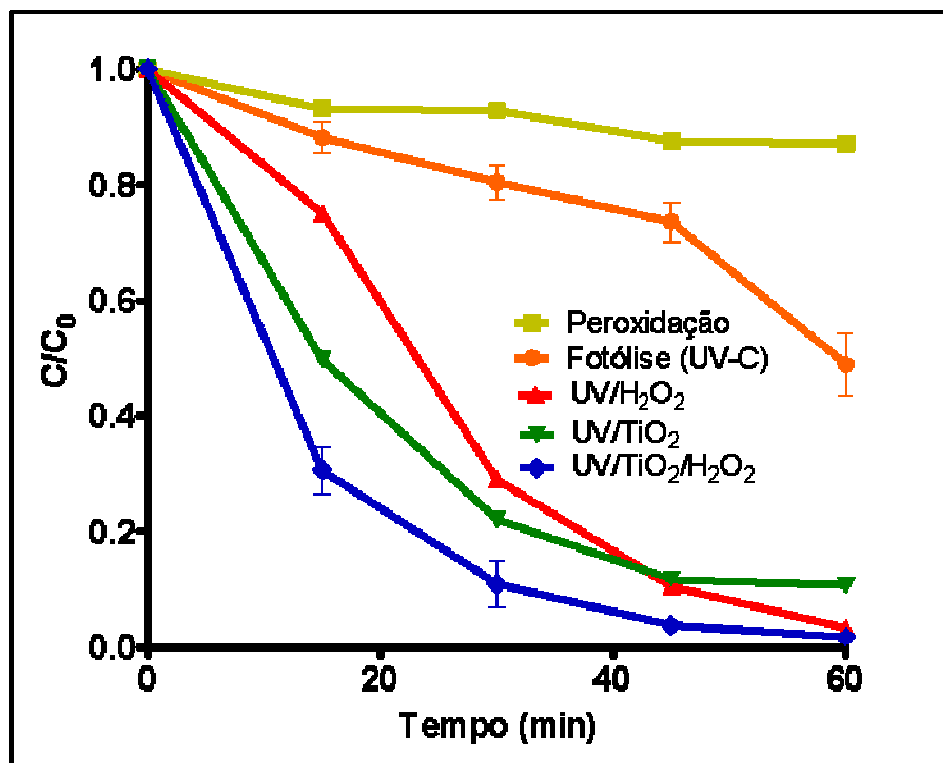


Figura 5.9: Degradação da ofloxacina em pH 6 por peroxidação ($1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2), fotólise, UV/ H_2O_2 ($1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2), UV/ TiO_2 (128 mg L^{-1} de TiO_2) e UV/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ (128 mg L^{-1} de TiO_2 e $1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2).

No Quadro 5.2 estão reunidos os resultados de eficiência de degradação obtidos para cada um dos processos apresentados na Figura 5.9 nos tempos de reação de 15 e 60 min. Observa-se que a adição do catalisador dióxido de titânio nos processos UV (128 mg L^{-1} de TiO_2) e UV/ H_2O_2 (128 mg L^{-1} de TiO_2 e $1,68 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2) acarretou na acentuada redução da concentração da ofloxacina em solução nos 15 primeiros min de ensaio. Após 60 min, verifica-se que os processos oxidativos avançados UV/ H_2O_2 e UV/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ foram os mais eficientes dentre os avaliados, resultando em degradação de aproximadamente 100% do fármaco em questão. Entretanto, comparando-se estes dois processos, observa-se que a adição do catalisador TiO_2 levou a um incremento de apenas 1% na eficiência de degradação após 60 min, ganho que não justifica a adição deste. Portanto, o processo UV/ H_2O_2 foi o que se mostrou mais eficiente para a degradação da ofloxacina, dentre todos os avaliados.

Quadro 5.2: Eficiência dos processos de degradação (%) para dois tempos de reação.

Processos	Eficiência de degradação (%)	
	15 min	60 min
Fotólise (UV)	11,8	51,1
Peroxidação (1,68 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂)	5,8	20,1
UV/H ₂ O ₂ (1,68 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂)	24,9	96,8
UV/TiO ₂ (128 mg L ⁻¹ de TiO ₂)	54,3	89,3
UV/TiO ₂ /H ₂ O ₂ (128 mg L ⁻¹ de TiO ₂ e 1,68 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂)	65,3	97,8

5.2.5 Varreduras no UV-Vis

Os espectros UV-Vis da ofloxacina em metanol possuem um pico de absorção máxima em 298 nm. De acordo com MICHAEL et al. (2010), a absorção em aproximadamente 290 nm corresponde ao anel aromático presente na molécula. Na Figura 5.10 são apresentados os espectros UV da amostra inicial (500 µg L⁻¹) e das amostras submetidas aos processos de peroxidação (1,68 mmol L⁻¹ de H₂O₂) e fotólise. Não foram observadas diferenças entre os espectros obtidos para as amostras degradadas por peróxido de hidrogênio e a amostra inicial. Entretanto, no caso da fotólise, houve uma diminuição acentuada no pico característico da ofloxacina no decorrer do tempo, havendo uma diferença pronunciada entre o espectro de absorbância da amostra inicial e das amostras submetidas ao processo.

Na Figura 5.11 é apresentado o espectro relativo à aplicação do processo UV/H₂O₂. Comparando-se os picos de absorbância da amostra inicial e das amostras submetidas ao processo nos vários tempos de ensaio, observa-se que ocorreu uma descaracterização das bandas de absorção características da ofloxacina, indicando elevada eficiência de

degradação do fármaco em questão durante a reação com radicais hidroxila. Resultado similar foi obtido para os espectros de absorção das amostras submetidas aos processos UV/TiO₂ (128 mg L⁻¹ de TiO₂) e UV/TiO₂/H₂O₂ (128 mg L⁻¹ de TiO₂ e 1,68 mmol L⁻¹ de H₂O₂), apresentados na Figura 5.12.

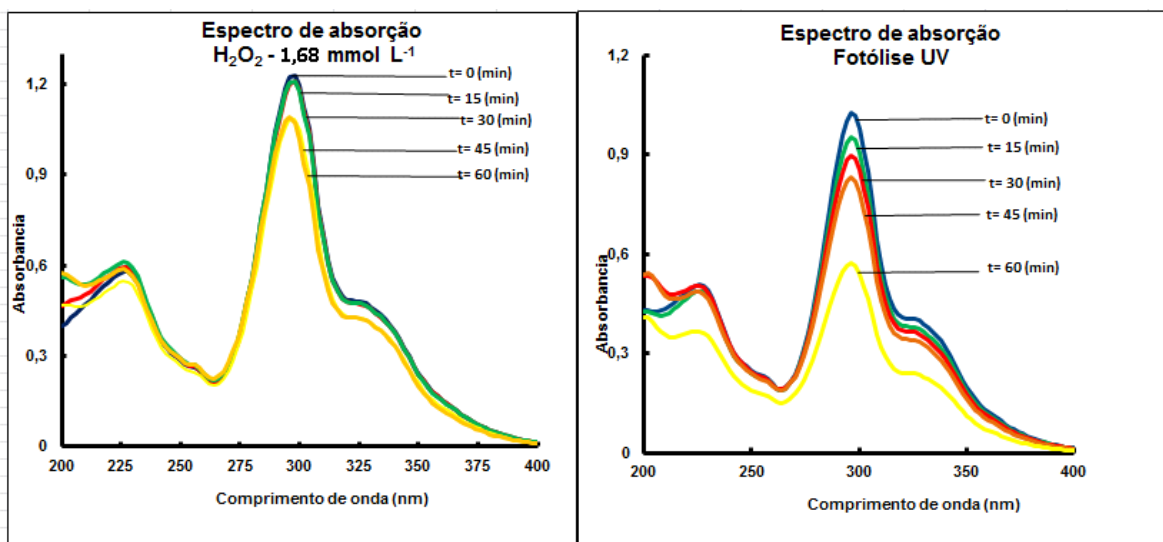


Figura 5.10: Espectros de absorção de soluções de ofloxacina submetidas aos processos de (A) peroxidação e (B) fotólise ($C_{H_2O_2}$ inicial = 1,68 mmol L⁻¹).

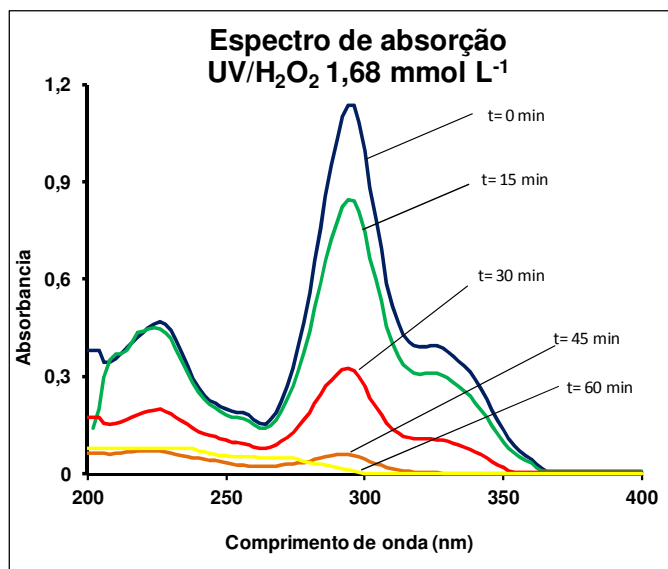


Figura 5.11: Espectro de absorção de soluções de ofloxacina submetidas ao processo de UV/H₂O₂ ($C_{H_2O_2}$ inicial = 1,68 mmol L⁻¹).

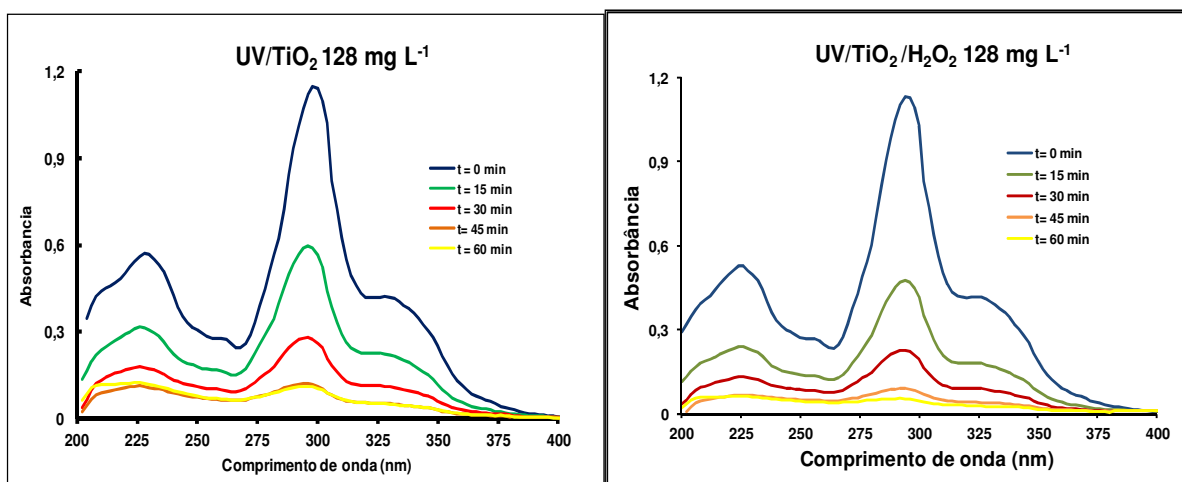


Figura 5.12: Espectro de absorção de soluções de ofloxacina submetidas ao processo UV/TiO₂ (128 mg L⁻¹ de TiO₂) e UV/TiO₂/H₂O₂ (128 mg L⁻¹ de TiO₂ e 1,68 mmol L⁻¹ de H₂O₂).

5.2.6 Testes biológicos

5.2.6.1 Atividade antimicrobiana

A atividade residual das amostras submetidas aos processos de degradação foi comparada com a atividade antimicrobiana das amostras não tratadas ($t = 0$ min). A concentração efetiva capaz de causar 50% de inibição do crescimento bacteriano (CE_{50}) foi determinada pela exposição da cultura de *E. coli* a concentrações de ofloxacina na faixa de 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 152,4 ng L^{-1} . Os valores de CE_{50} obtidos estiveram na faixa de 7,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 8,55 $\mu\text{g L}^{-1}$. O valor médio de 8,22 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi considerado como o valor da CE_{50} da ofloxacina.

Mudanças nos valores de CE_{50} das amostras durante a aplicação dos processos foram avaliadas por meio do cálculo do valor de potencial equivalente (PEQ), de acordo com a Equação 18.

$$PEQ = \frac{CE_{50,0}}{CE_{50,X}} \quad \text{Equação 18}$$

Sendo, PEQ o valor de potencial equivalente, $CE_{50,0}$ representa a dose efetiva na qual 50% de inibição do crescimento foi observada na solução não tratada de ofloxacina e $CE_{50,X}$ é o valor de CE_{50} calculado para cada amostra submetida ao processo de degradação. A redução na atividade antimicrobiana foi calculada pela Equação 19, a partir da atividade antimicrobiana relativa, dada pela Equação 20.

Redução da atividade antimicrobiana (%) = $100 - \text{Atividade antimicrobiana relativa}(\%)$ Equação 19

$$\text{Atividade Antimicrobiana Relativa}(\%) = 100 \times \frac{CE_{50,0}}{CE_{50,X}} \quad \text{Equação 20}$$

As curvas dose-resposta ilustram a relação entre a concentração da amostra (ou a diluição serial) e a porcentagem de inibição do crescimento. Estas são apresentadas nas Figuras 5.13 e 5.14. O deslocamento nas curvas dose-resposta para a direita indica que a atividade antimicrobiana da amostra foi reduzida. A aplicação da fotólise (Figura 5.13 B) por 60 min diminuiu 42% a atividade antimicrobiana. Entretanto, as amostras submetidas à peroxidação (Figura 5.13 A) tiveram uma redução da atividade antimicrobiana de apenas 27% após 60 min, quando $6,77 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 foi aplicado. Os melhores resultados de redução da atividade antimicrobiana foram obtidos usando $8,46 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 , alcançando 85% após 30 min e 95% após 60 min (Figura 5.13 D). Comparando os resultados de fotólise e UV/ H_2O_2 , é possível concluir que a redução na atividade antimicrobiana foi aumentada pela adição de peróxido de hidrogênio devido à formação de radicais hidroxila.

Os ensaios de atividade antimicrobiana também foram realizados com as amostras submetidas aos processos fotocatalíticos (UV/ TiO_2 e UV/ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$) e os resultados são apresentados na Figura 5.14. As concentrações de TiO_2 empregadas foram de 8, 32 e 128 mg L^{-1} e a concentração de H_2O_2 de $1,68 \text{ mmol L}^{-1}$.

A redução da atividade antimicrobiana obtida para o UV/ TiO_2 com concentração de catalisador igual a 8 mg L^{-1} (Figura 5.14 A) foi de 65%. Empregando 32 mg L^{-1} de TiO_2

(Figura 5.14 B), a redução foi de 77% e, para concentração de catalisador igual a 128 mg L⁻¹ (Figura 5.14 C), a remoção atingiu 91% após 60 min. A utilização do processo UV/TiO₂/H₂O₂ resultou em diminuição da atividade antimicrobiana de 67, 93 e 96%, após 60 min, utilizando concentrações de catalisador iguais a 8, 32 e 128 mg L⁻¹ (Figuras 5.14 D, E e F), respectivamente. A adição de peróxido de hidrogênio acarretou em uma maior eficiência de degradação da OFX e também em um incremento na redução da atividade antimicrobiana das soluções submetidas a este processo.

A atividade antimicrobiana da ofloxacina está associada a presença dos grupos carboxílico e carbonila na molécula (GARCIA et al. 2005). Então, a redução da atividade antimicrobiana pode estar relacionada às reações que ocorrem neste domínio.

Como pode ser observado no Quadro 5.3, e também por meio das análises dos resultados do PEQ, a degradação da ofloxacina está relacionada com a diminuição da atividade antimicrobiana.

Quadro 5.3: Remoção de atividade antimicrobiana em relação à eficiência de degradação.

Processos	Concentração de H ₂ O ₂ (mmol L ⁻¹)	Concentração de TiO ₂ (mg L ⁻¹)	Degradação após 60 min (%)	Remoção da atividade antimicrobiana (%)
Fotólise	-	-	51	42
Peroxidação	6,77	-	20	27
UV/H₂O₂	6,77	-	99	93
	8,46	-	99	95
UV/TiO₂	-	8	57	65
	-	32	76	77
	-	128	89	91
UV/TiO₂/H₂O₂	1,68	8	87	67
	1,68	32	93	95
	1,68	128	96	98

Os processos de degradação empregados não geraram subprodutos com atividade antimicrobiana superior ao composto parental. Estes resultados são consoantes com os

dados publicados por DODD et al. (2009), PAUL et al.(2010) e DA SILVA et al. (2011), os quais observaram que a atividade antimicrobiana diminuiu depois da degradação do fármaco por processos oxidativos avançados.

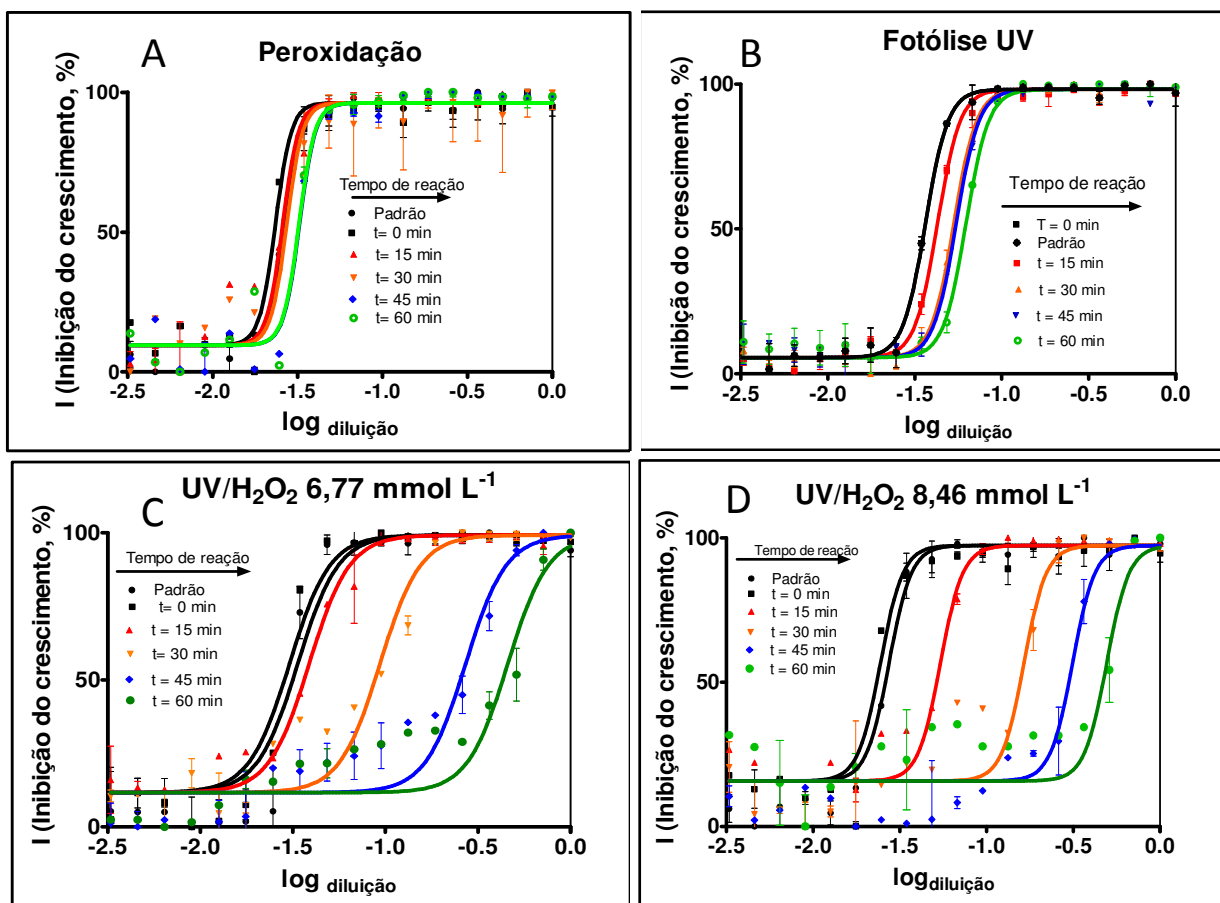


Figura 5.13: Curvas dose-resposta para soluções de ofloxacina submetidas a (A) peroxidação ($C_{H_2O_2} = 6,77 \text{ mmol L}^{-1}$), (B) fotólise, (C) UV/H₂O₂ ($C_{H_2O_2} = 6,77 \text{ mmol L}^{-1}$) e (D) UV/H₂O₂ ($C_{H_2O_2} = 8,46 \text{ mmol L}^{-1}$).

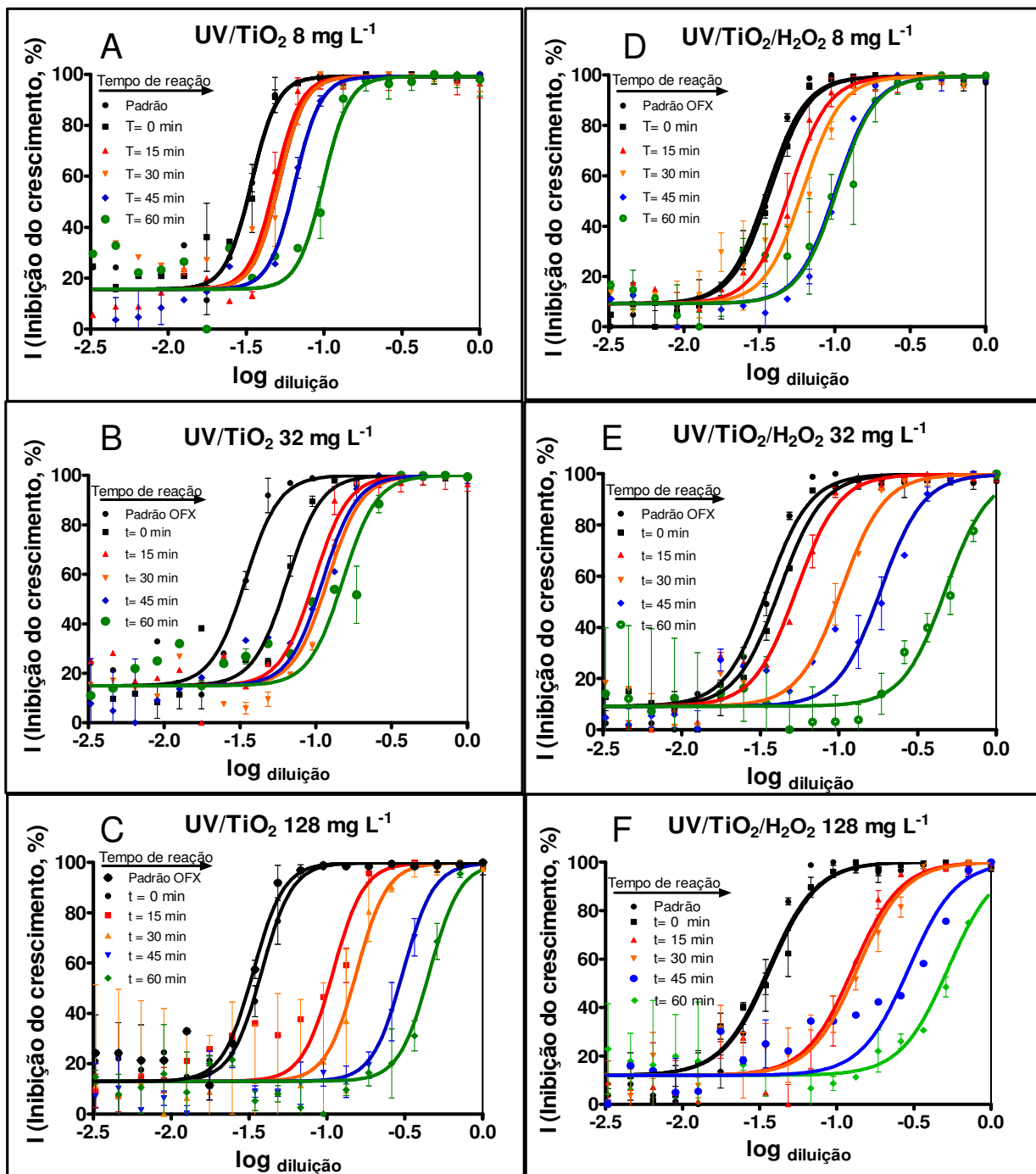


Figura 5.14: Curvas dose-resposta para soluções de ofloxacin submetidas a (A) UV/TiO₂ ($C_{TiO_2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$), (B) UV/TiO₂ ($C_{TiO_2} = 32 \text{ mg L}^{-1}$), (C) UV/TiO₂ ($C_{TiO_2} = 128 \text{ mg L}^{-1}$), (D) UV/TiO₂/H₂O₂ ($C_{TiO_2} = 8 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{H_2O_2} = 1,68 \text{ mmol L}^{-1}$), (E) UV/TiO₂/H₂O₂ ($C_{TiO_2} = 32 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{H_2O_2} = 1,68 \text{ mmol L}^{-1}$) e (F) UV/TiO₂/H₂O₂ ($C_{TiO_2} = 128 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{H_2O_2} = 1,68 \text{ mmol L}^{-1}$).

5.2.6.2 Avaliação da toxicidade utilizando *Vibrio fischeri*

Foram realizados testes com a bactéria *Vibrio fischeri* com intuito de avaliar a toxicidade aguda das amostras submetidas aos processos de degradação. A toxicidade das amostras submetidas aos processos de fotólise (Figura 5.15) foi comparada com a toxicidade da amostra inicial ($t = 0$ min); não foi observada inibição da luminescência da bactéria *V. fischeri* quando em contato com a amostra inicial ($t = 0$) ou com as amostras submetidas aos processos de degradação.

Os ensaios realizados com amostras submetidas ao processo UV/H₂O₂ foram realizados utilizando-se a melhor condição dos ensaios de degradação, ou seja, com 6,77 mmol L⁻¹ de H₂O₂. Nas amostras tratadas por este POA (Figura 5.16), foi observada inibição similar para todos os tempos de ensaio, ou seja, de 0 a 60 min, demonstrando que não houve alteração na toxicidade das amostras. Sendo assim, é possível inferir que o POA aplicado não acarretou em incremento de toxicidade.

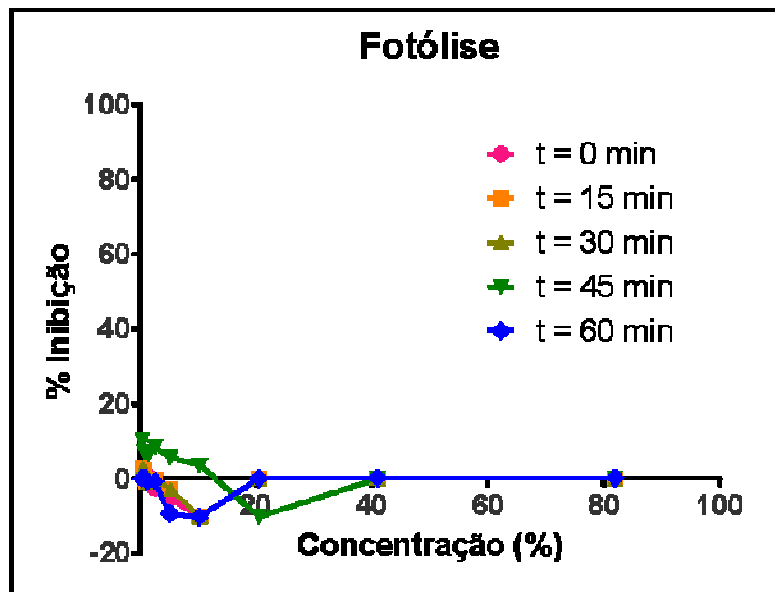


Figura 5.15: Inibição da luminescência da bactéria *V. fischeri* durante a fotólise.

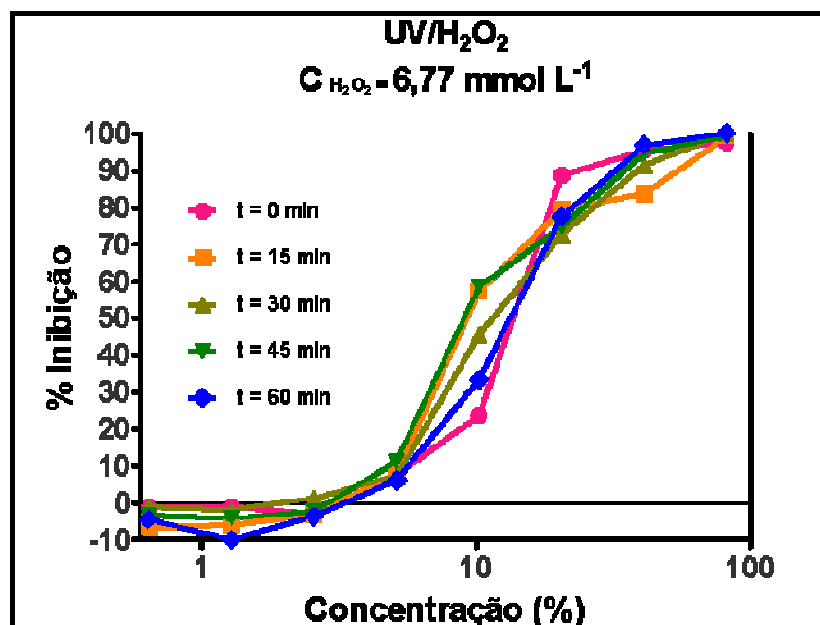


Figura 5.16. Inibição da luminescência da bactéria *V. fischeri* quando em contato com as amostras submetidas ao processo UV/H₂O₂.

5.3 Avaliação dos subprodutos de degradação

Foram realizados ensaios empregando espectrometria de massas com o objetivo de identificar os subprodutos gerados durante os processos de degradação UV/H₂O₂ e fotocatalise. Alíquotas da solução de ofloxacina foram coletadas nos tempos iguais a 5, 10, 15, 30 e 60 min. Foram utilizadas soluções de ofloxacina de 5 mg L⁻¹ para proporcionar a identificação qualitativa dos subprodutos. No Quadro 5.1 é apresentada a relação massa/carga (m/z) dos principais subprodutos obtidos e na Figura 5.18 são apresentados os espectros de massas obtidos para a melhor condição de degradação (UV/H₂O₂, 6,77 mmol L⁻¹ de H₂O₂). Não houve diferença significativa entre os subprodutos obtidos no processo UV/H₂O₂ e os obtidos pela aplicação da fotocatalise. Verifica-se na Figura 5.18 a diminuição da intensidade de sinal relativo à molécula original da ofloxacina (m/z 362) na amostra t = 0 min (Figura 5.18 A) em detrimento do aparecimento de seus subprodutos de

degradação. Após 60 min (Figura 5.18 F), o sinal da ofloxacina não está mais presente, indicando a completa degradação do fármaco original.

Quadro 5.4: Subprodutos da ofloxacina formados durante o processo UV/H₂O₂ e fotocatalise.

Subprodutos da fotodegradação da ofloxacina [M=H ⁺](valores de m/z)	
Tempo (min)	Processos empregados: UV/H ₂ O ₂ (6,77 mmol L ⁻¹), UV/TiO ₂ (128 mg L ⁻¹) UV/TiO ₂ / H ₂ O ₂ (128 mg L ⁻¹ e 1,68 mmol L ⁻¹ de H ₂ O ₂)
0	362
5	135, 157, 381, 403, 425, 559
10	135, 157, 269, 291, 381, 403, 425, 492, 515, 537, 559
15	135, 157, 269, 291, 381, 403, 425, 492, 515, 537, 559
30	135, 157, 197, 269, 291, 359, 381, 403, 425, 492, 515, 537, 559.
60	135, 145, 157, 197, 269, 291, 359, 381, 403, 425, 492, 515, 559

As possíveis estruturas de alguns dos subprodutos de degradação obtidos (m/z 291 e m/z 157) foram sugeridas e estão apresentadas na Figura 5.17. O subproduto com m/z 291 é gerado devido à oxidação do anel piperazínico. A clivagem da molécula da ofloxacina (perda de C₁₁H₁₅FN₂) pode originar o intermediário m/z 169 (HAPESHI et al. 2013) . A posterior perda de um grupo metila dá origem ao subproduto m/z 157. Não foi possível identificar as estruturas de todos os subprodutos gerados, tendo em vista que o ataque do radical hidroxila a compostos orgânicos não é seletivo, ou seja, o radical pode interagir com qualquer região da molécula alvo. Dependendo da estrutura química do analito, a investigação dos intermediários formados pode ser dificultada (BABIC et al. 2013). É importante ressaltar que para comprovar a identidade dos intermediários formados e propostos é necessária a aquisição de padrões analíticos desses intermediários, os quais

nem sempre se encontram disponíveis (AN et al. 2010; BABIC et al. 2013) ou sintetizar os mesmos.

A literatura apresenta alguns estudos que mostram que as fluoroquinolonas são susceptíveis a transformações fotoquímicas pela exposição à radiação ultravioleta (UV) (ALBINI e MONTI, 2003; SUNDERLAND et al. 2001), trazendo evidências limitadas de que tais processos podem diminuir a atividade antimicrobiana das soluções.

Acredita-se que o núcleo da estrutura molecular das fluoroquinolonas é responsável pela ligação do fármaco ao DNA das bactérias (SHEN et al.1989). Sendo assim, é esperado que a atividade antimicrobiana do fármaco seja reduzida apenas quando esta estrutura é degradada. Entretanto, mesmo que os subprodutos de degradação mantenham a estrutura da quinolonas intacta, a atividade antimicrobiana deles é inferior (PAUL et al. 2010). Este fato indica que transformações em grupos funcionais auxiliares também podem diminuir a ação antimicrobiana do composto parental. O anel piperazínico presente na ofloxacina tem a função de proporcionar o reconhecimento e a ligação do fármaco às enzimas topoisomerases do DNA das bactérias. Sendo assim, a fragmentação desta estrutura, como observado no subproduto m/z 291, pode reduzir a afinidade do fármaco com as bactérias-alvo, levando a diminuição de sua atividade antimicrobiana (ALOVERO et al. 2000). De acordo com SHEN et al. (1989), as fluoroquinolonas necessitam do grupo carboxila (-COOH) para exercer sua atividade; portanto, o subproduto proposto com m/z 157 não apresenta atividade antimicrobiana. Os resultados obtidos no presente estudo estão em consonância com o estudo de PAUL et al. (2010) pois estes demonstram que houve diminuição significativa (superior a 90%) de atividade antimicrobiana das soluções de ciprofloxacina submetidas à peroxidação assistida por radiação UV (UV/H₂O₂) e fotocatalise.

O estudo de VASQUEZ et al (2013) sugere que a geração dos subprodutos da ofloxacina pela reação fotolítica e fotocatalítica ocorre por duas rotas principais: a desalquilação do anel piperazínico e a descarboxilação (eliminação do grupo carboxila – COOH). Estudos demonstram que as principais reações fotolíticas que ocorrem com as

fluoroquinolonas são a perda do fluoreto (F^-) seguida pela descarboxilação (SIRTORI et al. 2009; ALBINI E MONTI, 2003). O processo de perda do fluoreto, típico em soluções aquosas neutras de fluoroquinolonas, não ocorre em condições ácidas nem com fluoroquinolonas com grupos doadores de elétrons, como é o caso da ofloxacina. A inserção de um substituinte doador de elétrons no C-8 (grupo alcoxi) torna a reação de saída do fluoreto ineficiente, pois este estabiliza a molécula (PARK et al. 2002). Nestas condições, ocorre a degradação parcial da cadeia alquilamina lateral, deixando o flúor ligado à cadeia heterocíclica intacto (ALBINI E MONTI, 2003).

A eliminação de pequenas moléculas como água e dióxido de carbono pela ofloxacina quando esta é submetida aos processos de fotólise e fotocatalise utilizando TiO_2 é relatada no trabalho de CALZA et al. (2008).

Ataques subsequentes dos radicais hidroxila podem levar a formação de produtos bi ou tri-hidroxilados ou a dimerização da molécula da ofloxacina, acarretando em subprodutos com m/z superior a molécula original (HAPESHI et al. 2013), fato que foi observado no presente estudo.

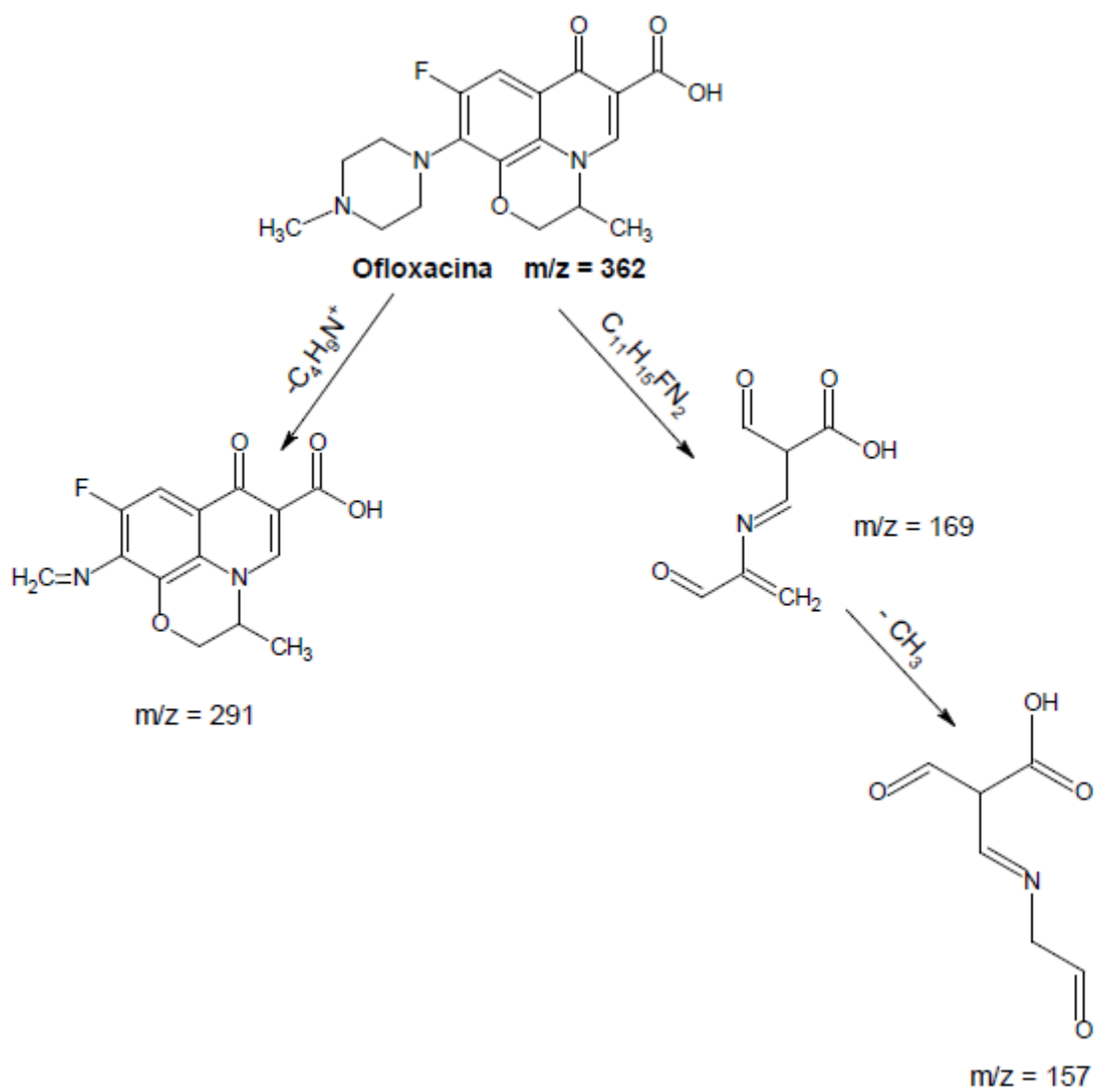


Figura 5.17: Possíveis rotas de degradação da ofloxacin.

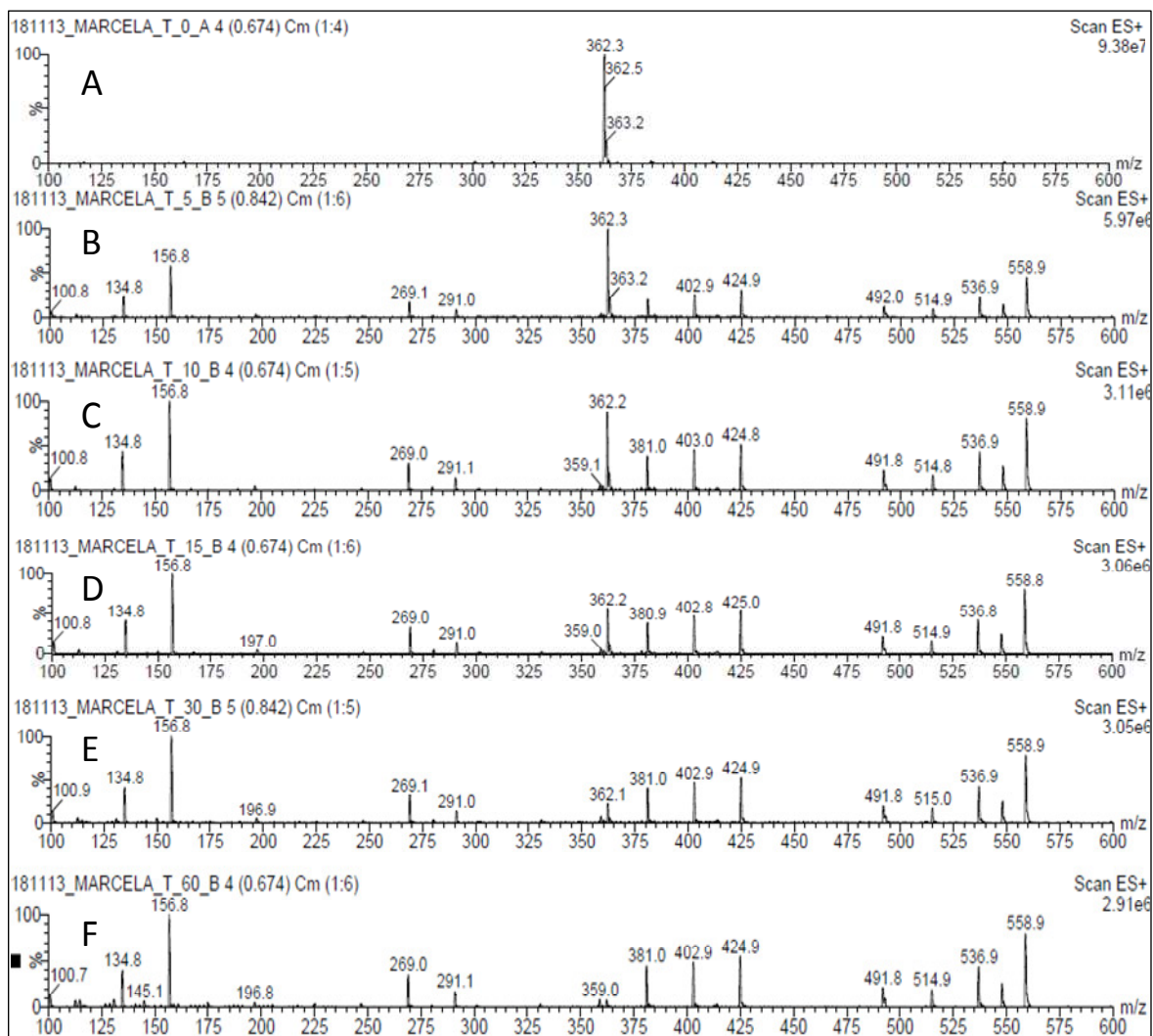


Figura 5.18: Espectros de massas da solução de ofloxacin submetida ao processo UV/H₂O₂ (6,77 mmol L⁻¹ de H₂O₂) nos tempos t = 0 min (A), t = 5 min (B), t = 10 min (C), t = 15 min (D), t = 30 min (E) e t = 60 min (F).

6 CONCLUSÕES

Entre os processos de degradação avaliados (peroxidação, fotólise, UV/H₂O₂, UV/TiO₂ e UV/TiO₂/H₂O₂), conclui-se que a peroxidação assistida por radiação ultravioleta foi o processo mais eficiente na remoção da ofloxacina da solução aquosa, atingindo quase total degradação do fármaco veterinário após 60 min de reação.

Com a diminuição da concentração de ofloxacina, a atividade antimicrobiana residual também diminuiu, mostrando que há uma relação entre a degradação e a remoção da atividade antimicrobiana. O processo UV/H₂O₂ foi efetivo na redução da atividade antimicrobiana, obtendo 95% após 60 min. O ensaio Microtox também indicou que a toxicidade das amostras não aumentou durante o processo UV/H₂O₂.

O processo UV/TiO₂ foi muito efetivo para a degradação da ofloxacina, atingindo 89,3% de remoção. A adição de peróxido de hidrogênio resultou em maior degradação do fármaco (97,8%) e também em maior remoção da atividade antimicrobiana.

Os ensaios empregando espectrometria de massas mostraram que a aplicação dos processos oxidativos avançados acarretam na formação de vários subprodutos de degradação. No entanto, apenas dois desses intermediários puderam ser identificados. Os ensaios quantitativos para avaliação da atividade antimicrobiana indicaram que as soluções finais, contendo os subprodutos, possuem atividade antimicrobiana muito reduzida em relação à solução original de ofloxacina.

Com relação às varreduras UV-visível, conclui-se que apenas para o processo peroxidação não foi observada alteração nas bandas de absorção. O processo UV/H₂O₂ foi o que apresentou maior diminuição das bandas de absorção em menor tempo de experimento.

Finalmente, conclui-se que a peroxidação assistida por radiação UV e a fotocatalise são processos eficientes para a degradação de ofloxacina em soluções aquosas. Portanto, é possível que estes processos possam ser aplicados no tratamento de efluentes contendo o

fármaco, reduzindo a concentração deste composto, bem como sua atividade antimicrobiana. Certamente estes processos oxidativos avançados são novas opções para o tratamento de efluentes contendo essa classe de compostos e contribuem para a diminuição dos impactos ambientais em corpos receptores.

7 REFERÊNCIAS

AL-AHMAD, A., HAISS, A., UNGER, J., BRUNSWICK-TIETZE, A., WIETHAN, J., KÜMMERRER, K. Effects of a realistic mixture of antibiotics on resistant and nonresistant sewage sludge bacteria in laboratory-scale treatment plants. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 57, n. 2, 264-273, 2008.

ALBINI, A., MONTI, S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. **The Royal Society of Chemistry** v. 32, 238-250, 2003.

ALDER, A. C., MCARDELL, C. S., GOLET, E. M., IBRIC, S., MOLNAR, E., NIPALES, N. S., GIGER, W. Occurrence and fate of fluoroquinolone, macrolide, and sulfonamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland In: Daughton, C.G., Jones-Lepp, T.M. (Eds.), **Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, Scientific and Regulatory Issues. American Chemical Society Symposium Series** v. 791, 56-69, 2001.

ALOVERO, F. L., PAN, X. S., MORRIS, J. E., MANZO, R. H., FISHER, L. M. Engineering the specificity of antibacterial fluoroquinolones: benzenesulfonamide modifications at the C-7 of ciprofloxacin change its primary target in *Streptococcus pneumoniae* from topoisomerase IV to gyrase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n. 2, 320-325, 2000.

AN, T., YANG, H., LI, G., SONG, W., COOPER, W. J., NIE, X. Mechanistic considerations for the advanced oxidation treatment of fluoroquinolone pharmaceutical compounds using TiO(2) heterogeneous catalysis. **The Journal of Physical Chemistry A** v. 114, n.7, 2569-2575, 2010.

ANDREOZZI, R., RAFFAELE, M., NICKLAS, P. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere** v. 50, 1319-1330, 2003.

BANDARA, J., PULGARIN, C., PERINGER, P., KIWI, J. Chemical (photo-activated) coupled biological homogeneous degradation of p-nitro-o-toluene-sulfonic acid in a flow reactor. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 111 n. 1-3, 253-263, 1997.

BAHNEMANN, D. W., CUNNINGHAM, J., FOX, M. A., PELIZZETTI, E., PICHAT, P., SERPONE, N. Aquatic Surface Photochemistry, **Lewis Publishers**, Boca Raton, 261, 1994

BROWN, K. D., KULIS, J., THOMSON, B., CHAPMAN, T. H., MAWHINNEY, D.B. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. **Science of the Total Environment** v. 366, 772-783, 2006.

BUDAI, M., GROF, P., ZIMMER, A., PAPAI, K., KLEBOVICH, I., LUDANYI, K. UV light induced photodegradation of liposome encapsulated fluoroquinolones: An MS study. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 198, 268–273, 2008.

CALZA, P., MEDANA, C., CARBONE, F., GIANCOTTI, V., BAIOCCHI, C. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography/ high-resolution multiple-stage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** v. 22, 1533–1552, 2008.

CHANG, X., MEYER, M. T., LIU, X., ZHAO, Q., CHEN, H., CHEN, J., QIU, Z., YANG, L., CAO, J., SHU, W. Determination of antibiotics in sewage from hospitals, nursery and slaughter house, wastewater treatment plant and source water in Chongqing region of Three Gorge Reservoir in China. **Environmental Pollution** v. 158, 1444–1450, 2010.

CETESB. Norma técnica L5.227: Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB); **2001** [<http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas—cetesb/43-normastecnicas—cetesb>].

CHENG, F. C., TSAI, T. R., CHEN, Y. F., HUNG, L. C., TSAI, T. H. Pharmacokinetic study of levofloxacin in rat blood and bile by microdialysis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** v. 961, 131–136, 2002.

CHRISTIAN, T., SCHNEIDER, R. J., FÄRBER, H. A., SKUTLAREK, D., MEYER, M. T., GOLDBACH, H. E. Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. **Acta hydrochimica et. Hydrobiologica** v. 31, 36–44, 2003.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Editora da Unicamp, 2010.

CZEKALSKI, N., BERTHOLD, T., CAUCCI, S., EGLI, A., BÜRGMANN, H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into lake geneva, Switzerland. **Frontiers in microbiology** v. 3, 1-18, 2012.

CHU, W., CHOY, W. Q., SO, T. Y. The effect of solution pH and peroxide in the TiO₂-induced photocatalysis of chlorinated aniline. **Journal of Hazardous Materials** v. 141, 86–91, 2007.

DA SILVA, C.R., MANIERO, M.G., RATH, S., GUIMARÃES, J.R. Antibacterial Activity Inhibition after the Degradation of Flumequine by UV/H₂O₂. **Journal of Advanced Oxidation Technologies** v. 14, n.1, 1-9, 2011.

DE LA CRUZ, N., GIMÉNEZ, J., ESPLUGAS, S., GRANDJEAN, D., ALENCASTRO, L. F., PULGARÍN, C. Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. **Water Research** v. 46, 1947-1957, 2012.

DE WITTE, B., LANGENHOVE, H. V., HEMELSOET, K., DEMEESTERE, K., WISPELAERE, P. D., SPEYBROECK, V.V., DEWULF, J. Levofloxacin ozonation in water: Rate determining process parameters and reaction pathway elucidation. **Chemosphere** v. 76, 683–689, 2009.

DIAZ-CRUZ, M. S., ALDA, M. J. L., BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry** v. 22, 340-351, 2003.

DOLLERY, C., BOOBIS, A., RAWLINS, M., THOMAS, S., WILKINS M. **Therapeutic Drugs, second ed., Churchill Livingstone**, London, 41-43, 1999.

DODD, M. C., KOHLER, H. P. E., VON GUNTEN, U. Oxidation of antibacterial compounds by ozone and hydroxyl radical: elimination of biological activity during aqueous ozonation processes. **Environmental. Science and. Technology**, v. 43, 2498-2504, 2009.

DORIVAL-GARCÍA, N., ZAFRA-GÓMEZ, A., CANTARERO, S., NAVALÓN, A., VÍLCHEZ, J. L. Simultaneous determination of 13 quinolone antibiotic derivatives in wastewater samples using solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatograph–tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal** v. 106, 323–333, 2013.

ESPLUGAS, S., BILA, D. M., KRAUSE, L. G. T., DEZOTTI, M. Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. **Journal of Hazardous Materials** v. 149, 631-642, 2007.

FATTA-KASSINOS, D., NIKOLAOU, A., ACHILLEOS, A., MERIC, S. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. **Trends in Analytical Chemistry** v. 26, n. 6, 515-533, 2007.

FATTA-KASSINOS, D., VASQUEZ, M. I., KÜMMERER, K. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. **Chemosphere** v. 85, 693–709, 2011.

FENT, K., WESTON, A. A., CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology** v. 76, 122-159, 2006.

FUJISHIMA, A., ZHANG, X., TRYK, D. A. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena-Review Article. **Surface Science Reports** v. 63, n. 12, 515-582, 2008.

GAO, L., SHI, Y., LI, W., NIU, H., LIU, J., CAI, Y. Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere** v. 86, 665–671, 2012.

GARCIA, M. S., ALBERO, M. I., SANCHEZ-PEDRENO, C., ABUHERBA, M. S. Flow injection spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals and urine. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** v. 61, 87–93, 2005.

GERDING, D. N., HUGHES, C., BAMBERGER, D. M., FOXWORTH, J., LARSON, T. A. Em: Lorian, V. (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Waverly e Wilkins, Baltimore, MD, 835–899, 1996.

GRACIA-LOR, E., SANCHO, J.V., HERNÁNDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1218, 2264–2275, 2011.

GRACIA-LOR, E., SANCHO, J.V., SERRANO, R., HERNÁNDEZ, F. Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. **Chemosphere** v. 87, 453–462, 2012.

GOLET, E.M., STREHLER, A., ALDER, A.C., GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry** v. 74, 5455–5462, 2002.

GROS, M., PETROVIC, M., BARCELO, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta** v. 70, 678–690, 2006.

GUADAGNINI, R. A., SANTOS, L. U., FRANCO, R. M. B., GUIMARÃES, J. R. Inactivation of bacteria and helminth in wastewater treatment plant effluent using oxidation processes. **Water Science and Technology** v. 68, n. 8, 1825–1829, 2013.

HAPESHI, E., ACHILLEOS, A., VASQUEZ, M. I., MICHAEL, C., XEKOULOLOTAKIS, N. P., MANTZAVINOS, D., KASSINOS, D. Drugs degrading photocatalytically: Kinetics and mechanisms of ofloxacin and atenolol removal on titania suspensions. **Water Research** v. 44, 1737–1746, 2010.

HAPESHI, E., FOTIOU, I., FATTA-KASSINOS, D. Sonophotocatalytic treatment of ofloxacin in secondary treated effluent. **Chemical Engineering Journal** v. 224, 96–105, 2013.

HERRERA, F., PULGARIN, C., NADTOCHENKO, V., KIWI, J. Accelerated photo-oxidation of concentrated p-coumaric acid in homogeneous solution. mechanistic studies, intermediates and precursors formed in the dark. **Applied Catalysis B:Environmental** v. 17, n.1-2, 141-156, 1998.

HERRMANN, M-J, GUILLARD, C. Photocatalytic degradation of pesticides in agricultural used water. **Chemistry** v. 3, 417-422, 2000.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K-L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science** v. 225, 109–118, 1999.

HO, C. S., LAM, C. W. K., CHAN M. H. M., CHEUNG R. C. K., LAW., L. K., LIT, L. C. W., NG, K. F., SUEN, M. W. M., TAI, H. L. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **Clinical Biochemist Reviews** v. 3, 3-12, 2003.

HOLLER, F. J., SKOOG, D. A., CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental Editora Bookman 2009.

HU, L., FLANDERS, P. M., MILLER, P. L., STRATHMANN, T. J. Oxidation of sulfamethoxazole and related antimicrobial agents by TiO₂ photocatalysis. **Water Research** v. 41, 2612-2626, 2007.

IKEHATA, K., NAGHASHKAR, N. J., EL-DIN, M. G Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. **Ozone Science Engineering** v. 2, n. 6, 353-414, 2006.

ISIDORI, M., LAVORGNA, M., NARDELLI, A., PASCARELLA, L., PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science Total Environment** v. 346, 87–98, 2005.

JIA, A., WAN, Y., XIAO, Y., HU, J. Occurrence and fate of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in a municipal sewage treatment plant. **Water Research** v. 46, 387-394, 2012.

JOHNSON & JOHNSON. Annual report 2010. <http://www.investor.jnj.com/2010annualreport>

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicator** v. 8, 1-13. 2008.

KIM, I., YAMASHITA, N., TANAKA, H. Performance of UV and UV/H₂O₂ processes for the removal of pharmaceuticals detected in secondary effluent of a sewage treatment plant in Japan. **Journal of Hazardous Materials** v. 166, 1134–1140, 2009.

KING, D.E., MALONE, R., LILLEY, S.H. New Classification and Update on the Quinolone Antibiotics. **American Family Physician** v. 61, n. 9, 2741-2748, 2000.

KLAVARIOTI, M., MANTZAVINOS, D., KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. **Environment International** v. 35, 402–417, 2009.

KONSTANTINOOU, I. K., ALBANIS, T. A. TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations A review. **Applied Catalysis B: Environmental** v. 49, 1–14, 2004.

KÜMMERER, K., AL-AHMAD, A., MERSCH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. **Chemosphere**, v. 40, 701-710, 2000.

KÜMMERER, K., HENNINGER, A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. **Clinical Microbiology and Infection** v. 9, 1203–1214, 2003.

KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere** v. 75, 417–434, 2009.

KUSTER, M., LOPEZ DE ALDA, M. J., HERNANDO, M. D., PETROVIC, M., MARTIN-ALONSO, J., BARCELO, D. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology** v. 358, 112-123, 2008.

LAI, H.-T., LIN, J.-J. Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments. **Chemosphere** v. 75, 462–468, 2009.

LANGDON K. A., WARNE M. S. T. J., KOOKANAZ R. S. Aquatic hazard assessment for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting compounds from biosolids-amended land. **Integrated Environment Assessment Manager** v. 6, 663–676, 2010.

LEE, H.-B., PEART, T. E., SVOBODA, M.L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, 45–52, 2007.

LI, W., SHI, Y., GAO, L., LIU, J., CAI, Y. Occurrence of antibiotics in water, sediments, aquatic plants, and animals from Baiyangdian Lake in North China. **Chemosphere** v. 89, 1307–1315, 2012.

LIN, A.Y.-C., YU, T.-H., LATEEF, S. K. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan. **Journal of Hazardous Materials** v. 167, 1163–1169, 2009.

LINDBERG, R. H., BJÖRKLUND, K., RENDAHL, P., JOHANSSON, M. I., TYSKLIND, M., ANDERSSON B. A. V. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. **Water Research** v.41, 613–619, 2007.

MALATO, S., FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P., MALDONADO, M. I., BLANCO, J., GERNJAK, W. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends- Review Article. **Catalysis Today** v. 147, n.1, 1-59, 2009.

MASSEY, L. B., HAGGARD, B. E., GALLOWAY, J. M., LOFTIN, K. A., MEYER, M. T., GREEN, W. R. Antibiotic fate and transport in three effluent-dominated Ozark streams. **Ecological Engineering** v. 36, 930–938, 2010.

MELO, S. A. S., TROVÓ, A. G., BAUTITZ, I. R., NOGUEIRA, R. F. P. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Química Nova** v. 32, 188-197, 2009.

MIAO, X –S., BISHAY , F., CHEN, M., METCALFE, C. D. Occurrence of Antimicrobials in the Final Effluents of Wastewater Treatment Plants in Canada. **Environment Science and Technology** v. 38, 3533-3541, 2004.

MICHAEL, I., HAPESHI, E., MICHAEL, C., FATTA-KASSINOS, D. Solar Fenton and solar TiO₂ catalytic treatment of ofloxacin in secondary treated effluents: Evaluation of operational and kinetic parameters. **Water Research** n. 44, 5450-5462, 2010.

MICHAEL, I., HAPESHI, E., MICHAEL, C., VARELA, A.R., KYRIAKOU, S. MANAIA, C.M., FATTA-KASSINOS, D. Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. **Water Research** v. 46, 5621 -5634. 2012.

MIRANDA-GARCÍA, N., SUÁREZ, S., SÁNCHEZ, B., CORONADO, J.M., MALATO, S., MALDONADO, M.I., Photocatalytic degradation of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plant effluents using immobilized TiO₂ in a solar pilot plant. **Applied Catalysis B: Environmental** v. 103, 294–301, 2011.

MUÑOZ, I., GÓMEZ, M. J., MOLINA-DÍAZ, A., HUIJBREGTS, M. A. J., FERNÁNDEZ-ALBA, A.R., GARCÍA-CALVO, E. Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. **Chemosphere** v. 74, 37–44, 2008.

NAKATA, H., KANNAN, K., JONES, P.D., GIESY, J. P. DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONE antibiotics in wastewater effluents by liquid chromatography– mass spectrometry and fluorescence detection. **Chemosphere** v. 58, 759–766, 2005.

NIETO, J., FREER, J., CONTRERAS, D., CANDAL, R.J., SILEO, E.E., MANSILLA, H.D., Photocatalyzed degradation of flumequine by doped TiO₂ and simulated solar light. **Journal of Hazardous Materials** v. 155, 45-50, 2008.

NIKOLAOU, A.D., GATIDOU, G.M., GOLFINOPOULOS, S.K., THOMAIDIS, N., LEKKAS, T.D. A one-year survey of organotin compounds in the reservoirs supplying the drinking water treatment plants of Athens, Greece. **Desalination** v. 210, 24–30, 2007.

NOGUEIRA R. F. P., OLIVEIRA M. C., PATERLINI W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta** v. 66, 86-91, 2005.

OLLER, I., MALATO, S., SANCHEZ-PEREZ, J. A.,. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination-a review. **Science of the Total Environment** v. 409, 4141-4166, 2011.

OWENS JR., R. C., AMBROSE, P. G. Antimicrobial Safety: Focus on Fluoroquinolones. **Clinical Infectious Diseases** v. 41, 144-57, 2005.

PAL, A., GIN, K.Y.H., LIN, A.Y.C., Reinhard, M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of the Total Environment** v. 408, 6062-6069, 2010.

PALOMINOS, R., FREER, J., MONDACA, M. A., MANSILLA, H. D. Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 193, 139-145, 2008.

PARK, H-R., KIM, T. H., BARK, K-M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **Environmental Journal of Medicinal Chemistry** v. 37, 443-460., 2002.

PARSONS, S., Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment. **IWA Publishing**, Cornwall, UK. 2004.

PASCHOAL, J. A. R., RATH, S. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química. Nova** v. 31, n. 5, 1190-1198, 2008.

PASCHOALINO, M. P. Utilização de fotocatalise heterogênea na desinfecção de atmosferas Confinadas. **Dissertação de Mestrado**, UNICAMP, Instituto de Química, Campinas, SP, 2006.

PATIL, P., SOMESHWARA R. B., KÜMMERER, K. Formulation and In Vitro Evaluation of Floating Matrix Tablets of Ofloxacin. **Asian Journal of Research Pharmaceutical Sciences** v. 1, 17-22, 2011.

PAUL, T., MILLER, P. L., STRATHMANN, T. J. Visible-light-mediated TiO₂ photocatalysis of fluoroquinolone antibacterial agents. **Environmental Science & Technology** v. 41, 4720-4727, 2007.

PAUL, T., DODD, M. C., STRATHMANN, T. J. Photolytic and photocatalytic decomposition of aqueous ciprofloxacin: transformation products and residual antibacterial activity. **Water Research** v. 44, 3121-3132, 2010.

PENG, X., WANG, Z., KUANG, W., JIANHUA TAN, J., LI, K. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China. **Science of the Total Environment** v. 371, 314–322, 2006.

PETROVIC, M., S. GONZALEZ, D. BARCELO. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. **Trends in Analytical Chemistry** v. 22, n. 10, 685–696, 2003.

PETROVIC, M., GROS, M., BARCELO, D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1124, 68–81, 2006.

PHILLIPS, G., JOHNSON, B.E., FERGUSON, J. The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 26, 783–789, 1990.

POZO, O. J., GUERRERO, C., SANCHO, J. V., IBÁÑEZ, M., PITARCH, E., HOGENDOORN, E., HERNÁNDEZ, F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1103, 83–93, 2006.

PRIETO-RODRIGUEZ, L., MIRALLES-CUEVAS, S., OLLER, I., AGÜERA, A., PUMA, GL., MALATO, S. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO_2 concentrations. **Journal of Hazardous Materials** v. 211–212, 131–137, 2012.

PULGARIN, C., KIWI, J. Overview on photocatalytic and electrocatalytic pretreatment of industrial non-biodegradable pollutants and pesticides. **Chimia** v. 50, n.3, 50–55, 1996.

RENEW, J. E., HUANG, C-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1042, 113–121, 2004.

ROCHA, F. R. P., TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para o aumento da sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Química Nova** v. 27, 807–812, 2004.

RODRIGUES-SILVA, C., MANIERO, M.G., RATH, S., GUIMARÃES, J.R. Degradation of flumequine by photocatalysis and evaluation of antimicrobial activity. **Chemical Engineering Journal** v. 224, 46–42, 2012.

RODRIGUES-SILVA, C., MANIERO, M.G., RATH, S., GUIMARÃES, J.R. Degradation of flumequine by Fenton and photo-Fenton processes: evaluation of residual antimicrobial activity. **Science of Total Environment** v. 445–446, 337–346, 2013.

RODRIGUES-SILVA, C., MANIERO, M.G, PERES, M. S., GUIMARÃES, J.R. Ocorrência e degradação de quinolonas por processo oxidativos avançados. **Química Nova**, in press, 2014.

ROSAL, R., RODRÍGUEZ, A., PERDIGÓN-MELÓN, J. A., PETRE, A., GARCÍA-CALVO, E., GÓMEZ, M. J., AGÜERA, A., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. **Water Research** v. 44, 578 – 588, 2010.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAUJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE- MATOS, C., MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. **Journal of Hazardous Materials** v. 175, 45-95, 2010.

SCHWARTZ, R. P., ESCHER, B. I., FENNER, K., HOFSTETTER, T. B., JOHNSON, C. A., V-GUTEN, U., WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science** v.313, 1072-1077, 2006.

SEIFRTOVÁ, M., PENA, A., LINO, C. M., SOLICH, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. **Analytical Bioanalytical Chemistry** v. 391, 799–805, 2008.

SEIFRTOVA, M., NOVAKOVA, L., LINO, C., PENA, A., SOLICH, P. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta** v. 649, 158–179, 2009.

SHEN, L. L., BARANOWSKI, J., PERNET, A. G., Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: Specificity and Cooperativity of Drug Binding to DNA. **Biochemistry** v. 28, 3879-3885, 1989.

SUNDERLAND, J., TOBIN, C. M., HEDGES, A. J., MACGOWAN, A. P., WHITE, L. O. Antimicrobial activity of fluoroquinolone photodegradation products determined by parallel-line bioassay and high performance liquid chromatography. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 47, 271–275, 2001.

SUKUL, P., SPITELLER, M., Fluoroquinolone antibiotics in the environment. **Environment Contamination Toxicology** v. 191, 131–162. 2007.

SUN, J., SONG, M., FENG, J., PI, Y. Highly efficient degradation of ofloxacin by UV/Oxone/Co²⁺ oxidation process. **Environmental Science Pollution Research**, 1–8. 2011.

TAMTAM, F., MERCIER, F., LE BOT, B., EURIN, J., DINH, Q.T., CLÉMENT, M., CHEVREUIL, M. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. **Science of the Total Environment** v. 393, 84 – 95, 2008.

TONG, L., LI, P., WANG, Y., ZHU, K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. **Chemosphere** v.74, 1090–1097, 2009.

TURIEL, E., BORDIN, G., RODRIGUEZ, A. R. Trace enrichment of (fluoro)quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography–ultraviolet detection. **Journal of Chromatography A** v. 1008, 145–155, 2003.

VASQUEZ, M. I., GARCIA-KÄUFER, M., HAPESHI, E., MENZ, J., KOSTARELOS, K., FATTA-KASSINOS, D., KÜMMERER, K. Chronic ecotoxic effects to *Pseudomonas putida* and *Vibrio fischeri*, and cytostatic and genotoxic effects to the hepatoma cell line (HepG2) of ofloxacin photo(cata)lytically treated solutions. **Science of the Total Environment** v. 450–451, 356–365. 2013.

VERLICCHI, P., AL AUKIDY, M., GALLETTI, A., PETROVIC, M., BARCELÓ, D., Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Science of the Total Environment** v. 430, 109–118, 2012.

VIENO, N. M., TUHKANEN, T., KRONBERG, L. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1134, 101–111, 2006.

VIENO, N., TUHKANEN, T., KRONBERG, L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. **Water Research** v. 41, 1001 – 1012, 2007.

WANG, S., MU, H., BAY, Y., ZHANG, Y., LIU, H., Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD, **Journal of Chromatography B** v. 877, 2961–2966, 2009.

WANG, P., HE, Y.-L., HUANG, C.-H. Oxidation of fluoroquinolone antibiotics and structurally related amines by chlorine dioxide: Reaction kinetics, product and pathway evaluation. **Water Research** v. 44, 5989–5998, 2010.

WATKINSON, A. J., MURBY, E. J., COSTANZO, S. D. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. **Water Research** v.41 n.18, 4164–4176, 2007.

WILSON, B. A., SMITH, V. H., DENOYELLES, F., LARIVE, C. K. Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages. **Environmental Science & Technology** v. 37 n.9, 1713–1719, 2003.

XIAO, Y., CHANG, H., JIA, A., HU, J. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A** v. 1214, 100–108. 2008.

ZHANEL, G G, NOREDDIN, A. M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. **Current Opinion in Pharmacology** v. 1, 459–463, 2001.

ZIVANOVIC, L., ZIGIC, G, ZECEVIC, M., Investigation of chromatographic conditions for the separation of ofloxacin and its degradation products. **Journal of Chromatography A** v. 1119, 224–230, 2006.

